



Revista MINERVA

Plataforma digital de la revista: <https://minerva.sic.ues.edu.sv>



Actividad larvicida de especies vegetales de la flora salvadoreña para el control de *Aedes aegypti*

Larvicidal activity of Salvadoran plant species on *Aedes aegypti*

Susana Hernández-Doño¹, Angélica Dalila Moreno², Eduardo Romero³, Rina A. Toledo¹, Miguel A. Serrano⁴, Miguel Moreno², Marvin J. Núñez⁵

RESUMEN

En la lucha por la protección del medio ambiente y la salud de la población, es de vital importancia encontrar formas alternativas de control para el combate de insectos vectores como el *Aedes aegypti*. Una fuente de ello lo constituyen las plantas que posean principios activos potentes y con alta estabilidad química con acción insecticida. En este estudio se determinó la actividad larvicida de los extractos etanólicos y acuosos de semilla de *Annona diversifolia*, hojas y tallos de *Yucca guatemalensis* y raíz de *Petiveria alliacea* sobre larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti*. Se desarrollaron ensayos para determinar la línea base de susceptibilidad de los tres extractos etanólicos. Los resultados fueron procesados según el método PROBIT utilizando el programa Bioestat 2009 profesional 5.4.8. Los extractos etanólicos de *Annona diversifolia* (semillas) revelaron valores de CL_{50} de 41.93 ppm y la CL_{90} en 121.82 ppm, seguida por *Yucca guatemalensis* (hojas y tallos) con CL_{50} en 544.8 ppm y la CL_{90} en 2,374.6 ppm y la *Petiveria alliacea* (raíz) en CL_{50} de 1,548.6 ppm y el valor para CL_{90} 2,899.2 ppm. Según estos resultados el extracto etanólico de *Annona diversifolia* resultó ser efectivo como larvicida a concentraciones bajas.

Palabras claves: *Aedes aegypti*, *Annona diversifolia*, *Petiveria alliacea*, *Yucca guatemalensis*, Larvicida.

ABSTRACT

In the search for the protection of the environment and the health of the population, it is truly important to find alternative forms of control for the combat of vector insects such as *Aedes aegypti*. A source of this are plants that have potent active ingredients and high chemical stability with insecticidal action. In this study, the larvicidal activity of the ethanolic and aqueous extracts of seed from *Annona diversifolia*, leaves and stems of *Yucca guatemalensis* and root of *Petiveria alliacea* on larvae of the third stage of *Aedes aegypti* was determined. Trials were developed

- 1 Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- 2 Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de El Salvador.
- 3 Unidad de Enfermedades Vectorizadas, Ministerio de Salud de El Salvador.
- 4 Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador.
- 5 Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. marvin.nunez@ues.edu.sv

to determine the baseline susceptibility of the three ethanol extracts. The results were processed according to the PROBIT method using the professional Bioestat 2009 program 5.4.8. The ethanolic extract of *Annona diversifolia* (seeds) revealed LC_{50} values of 41.93 ppm and the CL_{90} at 121.82 ppm, followed by *Yucca guatemalensis* (leaves and stems) with LC_{50} at 544.8 ppm and the CL_{90} at 2,374.6 ppm and *Petiveria alliacea* (root) in LC_{50} of 1,548.6 ppm and the value for CL_{90} 2,899.2 ppm. According to these results, the ethanolic extract of *Annona diversifolia* proved to be effective as a larvicide at low concentrations.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Annona diversifolia*, *Petiveria alliacea*, *Yucca guatemalensis*, Larvicial.

INTRODUCCIÓN

Los mosquitos son los más importantes transmisores del virus dengue y las observaciones epidemiológicas incriminan en primer lugar a varias especies de *Aedes* como principales transmisores del virus, entre las cuales está el *Aedes aegypti*, principal transmisor del virus del dengue en El Salvador¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha revisado esta clasificación y ha clasificado a esta enfermedad como: dengue sin señales de peligro, dengue con señales de advertencia y dengue grave², esta enfermedad de carácter epidémico se ha encontrado en más de cien países a través de África, las Américas, Este del Mediterráneo, Sureste de Asia y el Oeste del Pacífico³. La fiebre del dengue es causada por 4 serotipos denominados (DENV-1, 2, 3 y 4), todos ellos actualmente circulan en El Salvador².

Históricamente, las campañas para erradicar este vector han sido dirigidas principalmente hacia la eliminación de larvas y adultos por medio de plaguicidas y hacia la reducción del mal manejo de los desechos⁵ para minimizar la carga de enfermedades transmitidas por mosquitos, todo esto para intensificar los esfuerzos de control de vectores en áreas con alto riesgo de transmisión o los niveles de incidencia de la enfermedad⁶. El Ministerio de Salud ha incrementado las acciones de prevención y control que incluyen destrucción de criaderos, acciones de limpieza y fumigación⁴, sin embargo, en el caso del dengue, la identificación de predicción de los puntos

calientes infestación / transmisión en tiempo suficiente para la intervención efectiva, se ve obstaculizada por la pobre correlación entre los índices de abundancia larval actualmente utilizados y la densidad real de las poblaciones de vectores de mosquitos adultos⁷.

Diversos autores proponen un enfoque hacia el control químico y el manejo de la enfermedad⁵. Sin embargo, en la lucha por la protección del medio ambiente y la salud de la población es de vital importancia encontrar formas alternativas de control para el combate de insectos vectores como el *Aedes aegypti*. Justificando nuestro estudio está el rápido incremento de la resistencia de los zancudos vectores de enfermedades a varios insecticidas químicos, entre ellos los insecticidas piretroides y organofosforados⁷, lo cual ha generado la necesidad de desarrollar alternativas naturales para el control de los mosquitos.

Una fuente de ello lo constituyen las plantas de nuestra flora que posean principios activos potentes con alta estabilidad química y con acción insecticida. Es por esta razón que, en la presente investigación, se evaluaron las diluciones de los extractos etanólicos y acuosos a diferentes concentraciones de las especies *Annona diversifolia* (semillas), *Yucca guatemalensis* (hojas y tallos) y *Petiveria alliacea* (raíz), con el objetivo de investigar el efecto larvívica de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti* luego de 24 horas de exposición.

DISEÑO METODOLÓGICO

Material Vegetal

Las semillas de *Annona diversifolia* Saff (Annonaceae) "Anona" (13°57'19.04"N; 89°34'14.59"W, No. de Voucher: J. Menjívar & M. Núñez 4064), corteza del tallo y hojas de *Yucca guatemalensis* Baker (Agavaceae) "Izote" (13°55'9"N; 89°31'5"W; No. de Voucher: J. Menjívar & M. Núñez 4063), y raíces de *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) "Epacina" (13°55'7"N; 89°31'11"W; No. de Voucher: J. Menjívar & M. Núñez 4065), fueron recolectadas en 2017, en el Cantón Jocotón, Municipio de Coatepeque, Departamento de Santa Ana y fueron identificadas Jenny Menjivar, curadora del herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador, El Salvador.

Preparación del material vegetal

De los frutos maduros de *Annona diversifolia* se obtuvieron las semillas, las cuales se lavaron, secaron y luego fueron quebradas dejando al descubierto la almendra o endospermo, éstas a su vez fueron fraccionadas por trituración y secaron a 40° en una estufa de aire circulante por 48 horas.

Los tallos y hojas de *Yucca guatemalensis* se lavaron y luego se secaron a 40° en una estufa de aire circulante por 48 horas.

Las raíces de *Petiveria alliacea* fueron lavadas con suficiente agua hasta eliminar todos los restos de tierra, luego fueron cortadas y colocadas en un balón para ser extraídas en fresco.

Obtención del extracto acuoso

A 2.5 g de cada especie vegetal se le agregó 250 mL de agua destilada y sometieron a extracción ultrasónica con un ultrasonificador VWR (Modelo 97043-988) a temperatura ambiente (25°C) durante 90 minutos.

Obtención del extracto etanólico 95°

Los extractos etanólicos de las tres especies vegetales fueron obtenidos por extracción ultrasónica con un ultrasonificador VWR (Modelo 97043-988) a temperatura ambiente (25°C), durante 90 minutos, utilizando etanol 95° como disolvente de extracción en una relación 1:10 (m/v). Luego fueron filtrados y concentrados en un rotaevaporador hasta obtener los correspondientes extractos secos, los cuales fueron colocados en un desecador para su secado total.

Análisis fitoquímico preliminar de los extractos de las tres especies vegetales

A los extractos etanólicos de las especies vegetales que mostraron actividad larvicida contra el *Aedes aegypti* se les realizó el análisis fitoquímico preliminar siguiente:

Identificación de alcaloides

Pruebas químicas de precipitación

20 ml de extracto etanólico se concentró y luego se redisolvió con 6 ml de HCl al 10 %, esta solución se filtró y se distribuyó en tres tubos para realizar las pruebas químicas cualitativas de precipitación de Mayer, Wagner y Dragendorff; la presencia de unos precipitados de color blanco, marrón y anaranjado, respectivamente, es prueba positiva para alcaloides.⁸

Identificación de glicósidos cardiotónicos (grupos lactónicos)

Cromatografía de capa fina

Se realizó sobre una placa (5 x 6 cm) de gel de sílice tipo G, de 0,25 mm de espesor, utilizando como fase móvil acetato de etilo-metanol-agua (8:1:1) y como revelador el reactivo de Kedde, la presencia de un color lila o morado es positivo para glicósidos cardiotónicos.⁸

Identificación de glicósidos saponínicos

Prueba de la espuma

Se colocó una pequeña porción de la droga seca y pulverizada en un tubo de ensayo, se añadió 3 ml de agua destilada, se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se dejó reposar. Una espuma con una altura mayor a 2 cm y que se mantiene por 30 minutos es prueba positiva de saponinas.⁸

Prueba de Salkowski

Se tomó 3 ml de cada uno de los extractos etanólicos y se le agregó 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado, gota a gota por las paredes del tubo; la presencia de un anillo rojizo (triterpenos) o verde (esteroides), es prueba positiva⁸.

Identificación de glicósidos antraquinónicos

Cromatografía de capa fina

Se realizó sobre una placa (5 x 6 cm) de gel de sílice tipo G, de 0,25 mm de espesor, utilizando como fase móvil acetato de etilo-alcohol isopropílico-agua (6:3:1) y como revelador hidróxido de potasio 10 %; la aparición de manchas de color rosado es prueba positiva de presencia de antraquinonas⁸.

Identificación de glicósidos flavonoides

Prueba de Shinoda

2 ml de extracto etanólico fueron colocados en un vidrio de reloj, se añadió una lámina de magnesio metálico y 5 gotas de HCL concentrado; el desarrollo de un color rojo en la prueba es positivo para flavonoides⁸.

Identificación de taninos

Se midió 12 ml del extracto etanólico y se distribuyó en 6 tubos de ensayo y se procedió a realizar las pruebas de FeCl₃, gelatina, sub-

acetato de plomo, clorhidrato de quinina; la formación de un color verde o azul para FeCl₃ y precipitados con sub-acetato de plomo y clorhidrato de quinina, es prueba positiva para taninos⁸.

Identificación de sesquiterpenlactonas (grupos lactónicos)

Cromatografía de capa fina

Se realizó sobre una placa (5 x 6 cm) de gel de sílice tipo G, de 0,25 mm de espesor, utilizando como fase móvil *n*-hexano-acetato de etilo (3:7) y como revelador, el reactivo de Baljet⁸. Manchas de color anaranjado es evidencia positiva de identificación de sesquiterpenlactonas.

Identificación de acetogeninas

Cromatografía de capa fina

Se realizó sobre una placa (5 x 6 cm) de gel de sílice tipo G, de 0,25 mm de espesor, utilizando como fase móvil: CH₂Cl₂-EE (1:1) y como revelador, el reactivo de Kedde⁸. Manchas de color lila o morado es evidencia positiva de identificación de acetogeninas, en el caso de las semillas de *Anona diversifolia*.

Determinación de azufre en el extracto etanólico de *Petiveria alliacea*⁹

Método A: se colocó en un tubo 2 ml del extracto etanólico, se le agregó 6 gotas de ácido acético y 4 gotas de acetato de plomo. La formación de un precipitado negro indico la presencia de azufre.

Método B: se colocó en un tubo 2 ml del extracto etanólico, se le agregó 3 gotas de nitroprusiato de sodio. La formación de una coloración violeta oscura indico la presencia de azufre.

Preparación de diluciones a partir de los extractos

Se elaboraron diferentes diluciones a diferentes concentraciones a partir del extracto etanólico seco y el acuoso, para realizar los ensayos

preliminares. El disolvente utilizado para hacer las diluciones fue agua destilada¹⁰.

A los beaker conteniendo las muestras de extractos etanólicos secos previamente pesados, se les agregó 15 ml de agua destilada y luego fueron colocadas en el ultrasonicador VWR (Modelo 97043-988) con el objetivo de obtener completa disolución y homogenización de las soluciones.

Después de ser ultrasonicadas, cada una de las soluciones fue agregada a balones volumétricos de 250 ml, agregándoles agua destilada para obtener los volúmenes deseados de cada dilución. En el caso de las soluciones acuosas, estas fueron elaboradas a partir de la decocción.

Obtención de las larvas experimentales

La recolección de las larvas para los experimentos se efectuó en los Municipios de San Salvador (Comunidad la Fosa) y Soyapango (Colonia San Antonio) del Departamento de San Salvador, se colectaron con ayuda de una pipeta plástica, larvas en el tercer estadio las cuales fueron colocadas en recipientes que contenían 10 % de agua de pila o barril y 90% de agua que se ha dejado reposar durante 72 horas para eliminar el cloro.

Las larvas fueron alimentadas artificialmente con cereal para bebe, y fueron colocadas en un nuevo beaker conteniendo 100% de agua reposada 24 horas antes de realizar el ensayo. Se mantuvieron a una temperatura controlada de 28° C en el Laboratorio de Experimentación Animal del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Ensayos larvicidas preliminares

Se realizaron ensayos preliminares con el extracto etanólico y acuoso de las tres especies vegetales con el objetivo de determinar la concentración mínima (en ppm) que posean un valor de letalidad del 100% (CL_{100} aproximada) sobre larvas de *Aedes aegypti*¹¹.

Para el diseño experimental preliminar se constituyeron dos grupos, un grupo tratamiento y un grupo control. Para la realización de los grupos tratamientos de los extractos de las tres especies vegetales se tomó como base la investigación realizada por Toledo, R. A. y col.¹⁰ para elaborar las concentraciones de partida de las diluciones a ensayar.

Para los grupos tratamiento se utilizaron 20 larvas del tercer estadio, las cuales fueron colocadas en vasos descartables de 8 onzas cada uno conteniendo agua de chorro con 72 horas de reposo y que además tendrán los extractos etanólicos y acuosos por separado de las especies vegetales a diferentes concentraciones. Para cada ensayo se realizaron dos repeticiones por cada dilución.

Para el grupo control se utilizaron veinte larvas colocadas en el vaso de 8 onzas conteniendo solo agua reposada.

Con los resultados de CL_{100} aproximada, se procedió a realizar los ensayos de susceptibilidad.

Ensayo para determinar línea base de susceptibilidad¹²

Luego de determinar la CL_{100} aproximada (no determinada estadísticamente) se realizaron los ensayos para encontrar la línea base de susceptibilidad. A partir de la concentración que mostró la CL_{100} se determinaron los grupos tratamiento para cada extracto de cada planta realizando 6 diluciones a diferentes concentraciones cada uno.

Se utilizaron vasos descartables de 8 onzas con un volumen total de 50 ml de agua reposada agregándose 20 larvas para cada vaso que serán trasladados del recipiente donde se encuentran y colocadas en los vasos haciendo uso de pipetas de plástico. Se realizó 4 repeticiones por cada concentración o dilución utilizada. Se realizó un grupo control por cada tratamiento al cual se le agregaron 20 larvas en un volumen

de 50 ml de agua reposada. Las larvas fueron dejadas en exposición por 24 horas, al final de las cuales se procedió a la lectura para cada concentración, con el objeto de calcular el porcentaje de mortalidad. Se tabuló el número de larvas muertas (aquellas que no se mueven al tocarlas en la región cervical) y larvas moribundas (incapaces de subir a la superficie o que no tienen la reacción característica de sumergirse como reacción a estímulos externos, movimientos descoordinados o rigidez). Además, durante la prueba, se registró el número de larvas que pupan, las cuales fueron descontadas del total de expuestas; ya que, de acuerdo a lo establecido para este tipo de pruebas, si en los vasos de control o testigo puparan más del 10% de larvas o murieran más del 20% de larvas durante la prueba, entonces la prueba es anulada o invalidada¹¹.

Se utilizó para el ensayo de cada concentración 100 larvas, para un total de 600 larvas por extracto evaluado.

Análisis estadístico de los resultados

Finalizados los ensayos en el laboratorio, se determinó la línea base de susceptibilidad (concentración *vs* mortalidad) estimada, a través de la línea de regresión lineal o ajuste de líneas, calculando los porcentajes de mortalidad; CL_{50} , CL_{90} . A los datos de mortalidad observada se les aplicó el análisis de supervivencia PROBIT de mínimos cuadrados estimadores de la pendiente del intercepto. Se utilizó el programa de software Bioestat 2009 profesional 5.4.8 para el análisis de resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados de los ensayos preliminares de actividad larvívica, realizados a los extractos acuosos de las tres especies vegetales, estos no mostraron ninguna actividad positiva, razón por la cual el análisis fitoquímico

preliminar solo le fue realizado a los extractos etanólicos de las tres especies, obteniéndose los resultados que se muestran en los cuadros 1, 2 y 3.

El cuadro 1 muestra las semillas de *Annona diversifolia* en las que hay presencia de glicósidos saponínicos del tipo triterpénico¹³ por la formación de abundante espuma y el apareamiento de un anillo café rojizo en las pruebas de Liebermann Burchard y Salkowski. En las pruebas de taninos se observó la formación de precipitados en las correspondientes pruebas. En el caso de los alcaloides de igual manera se observó la formación de precipitados color naranja, blanco amarillento y café en las pruebas de Dragendorff, Mayer y Wagner respectivamente. Magadula, Joseph J. y *col.*¹⁴ reportan que fueron identificados dos alcaloides ya conocidos como Roemerine y Annonaine en *A. senegalensis* y *A. squamosa* respectivamente, lo cual confirma los resultados obtenidos de laboratorio.

Se comprobó además la presencia de acetogeninas mediante la cromatografía de capa fina con el apareamiento de manchas de color morado, la formación de manchas de color naranja en la cromatografía de capa fina después de haberse revelado con el reactivo de Baljet y manchas de color púrpura al ser revelada con el reactivo de Kedde, que indica la presencia de agrupamiento lactónico característico de las acetogeninas e indicadores quimiotaxonómicos de este género.

Según estudios fitoquímicos reportados, la *Annona diversifolia* contiene gran cantidad de acetogeninas tales como Laherradurin y cherimolin-2¹⁵ y en *Annona glabra*: glabranin, muricatecrocín-B, gigantetronenín, gigantetrocín-A, annonacín, annonacina, corossolin, corossolone, molvizarin, parviflorin, laherradurin e itrabin¹⁶, lo cual confirma los resultados de laboratorio obtenidos.

Cuadro 1. Resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares para el extracto etanólico de semillas de *Annona diversifolia*

Metabolito secundario	Pruebas de identificación	Evidencia positiva	Extracto etanólico
Glicósidos saponínicos	Prueba de espuma	Abundante espuma	+
	Prueba de Liebermann - Burchard	Anillo café rojizo	+
	Prueba de Salkowski	Anillo café rojizo	+
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado de color naranja	+
	Mayer	Precipitado blanco amarillento	+
	Wagner	Precipitado café	+
Taninos	Solución de FeCl ₃	Color verde o azul	+
	Solución de Gelatina	Precipitado blanco	+
	Solución de Clorhidrato de Quinina	Precipitado blanco amarillento	+
	Solución de Acetato de Plomo	Precipitado blanco	+
Sesquiterpenlactonas (agrupamientos lactónicos)	Cromatografía en capa fina Revelador Baljet	Manchas de color naranja	+
Glicósidos cardiotónicos (agrupamientos lactónicos)	Cromatografía en capa fina Revelador Kedde	Manchas de color púrpura o violeta	+
Antraquinonas	Reacción Bornträger	Manchas de color rosado	-
Flavonoides	Prueba de Shinoda	Formación color rojo	-

Cuadro 2. Resultados de pruebas fitoquímicas preliminares para el extracto etanólico de tallos y hojas de *Yucca guatemalensis*

Metabolito secundario	Pruebas de identificación	Evidencia positiva	Extracto etanólico
Glicósidos saponínicos	Prueba de espuma	Abundante espuma	+
	Prueba de Liebermann - Burchard	Anillo color verde	+
	Prueba de Salkowski	Anillo color verde	+
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado de color naranja	-
	Mayer	Precipitado blanco amarillento	-
	Wagner	Precipitado café	-
Taninos	Solución de FeCl ₃	Color verde o azul	+
	Solución de Gelatina	Precipitado blanco	+
	Solución de Clorhidrato de Quinina	Precipitado blanco amarillento	+
	Solución de Acetato de Plomo	Precipitado blanco	+
Sesquiterpenlactonas	Cromatografía en capa fina Revelador Baljet	Manchas de color naranja	-
Glicósidos cardiotónicos	Cromatografía en capa fina Revelador Kedde	Manchas de color púrpura o violeta	-
Antraquinonas	Reacción Bornträger	Manchas de color rosado	-
Flavonoides	Prueba de Shinoda	Formación color rojo	-

En hojas y tallos de *Yucca guatemalensis* (Cuadro 2) solamente se identificaron glicósidos saponínicos del tipo esteroidal por la formación de abundante espuma y el apareamiento de un anillo de color verde en las pruebas de Liebermann Burchard y Salkowski. En las

pruebas de taninos se observó la formación de precipitados en las correspondientes pruebas. Estudios previos reportan haber aislado en tallos secos de *Y. elephantipes* 10 glicósidos esteroiales con fusión *cis* en el anillo A/B.¹⁷

Cuadro 3. Resultados de pruebas fitoquímicas preliminares para el extracto etanólico de raíz de *Petiveria alliacea*

Metabolito secundario	Pruebas de identificación	Evidencia positiva	Extracto etanólico
Glicósidos saponínicos	Prueba de espuma	Abundante espuma	+
	Prueba de Liebermann – Burchard	Anillo café rojizo	+
	Prueba de Salkowski	Anillo café rojizo	+
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado de color naranja	-
	Mayer	Precipitado blanco amarillento	-
	Wagner	Precipitado café	-
Taninos	Solución de FeCl ₃	Color verde o azul	+
	Solución de Gelatina	Precipitado blanco	+
	Solución de Clorhidrato de Quinina	Precipitado blanco amarillento	+
	Solución de Acetato de Plomo	Precipitado blanco	+
Sesquiterpenlactonas	Cromatografía en capa fina Revelador Baljet	Manchas de color naranja	-
Glicósidos cardiotónicos	Cromatografía en capa fina Revelador Kedde	Manchas de color púrpura o violeta	-
Antraquinonas	Reacción Bornträger	Manchas de color rosado	-
Flavonoides	Prueba de Shinoda	Formación color rojo	+
Determinación de azufre	Pruebas para azufre A	Precipitado negro	+
	Pruebas para azufre B	Coloración violeta oscuro	+

En los extractos de raíz de *Petiveria alliacea* (Cuadro 3), se identificaron flavonoides, al observar la formación de un color rojo en la prueba de Shinoda. También posee taninos y glicósidos saponínicos del tipo triterpénico identificados mediante las pruebas químicas cuyo resultado fue similar a las especies vegetales anteriores. Investigaciones previas reportan la presencia de triterpenos, saponinas, polifenoles y flavonoides en raíz, tallo y hojas de *P. alliacea*,^{18,19} los cuales fueron identificados en los extractos etanólicos. Se comprobó además la presencia de compuestos sulfurados mediante

las pruebas A y B observándose la formación de un precipitado negro y una coloración violeta oscuro respectivamente.

Según reportes sobre *P. alliacea* se encontró en ella compuestos organosulfurados tales como: Organosulfurados: sulfóxido de (*R_cR_s*)/(*R_cS_s*)-*S*-Bencilcisteína, sulfoxido de (*R_sR_c*)/(*S_sR_c*)-*S*-(2-hidroxi)etil)cisteína, *S*-óxido del (*Z*)-tiobenzaldehído, *S*-(2-hidroxi)etil)fenilmetanotiosulfinato, *S*-becil(2-hidroxi)etano) tiosulfinato, *S*-becil)fenilmetanotiosulfinato, *S*-(2-hidroxi)etil)2-(hidroxi)etano) tiosulfinato, sulfuro de bencilo, sulfuro de bis(2-hidroxi)etilo),

disulfurobencílico, trisulfurobencílico, sulfuro de 2-hidroxietilbencilo, disulfuro de 2-hidroxietilbencilo, disulfuro de bis(2-hidroxietilo), trisulfuro de 2-hidroxietilbencilo, trisulfuro de bis(2-hidroxietilo), bencilsulfonato de sodio y ácido bencilsulfinilo²⁰ y los Sulfóxidos: Petiveriin A y Petiveriin B²¹

Resultados de los ensayos preliminares de CL₁₀₀

Se realizó ensayos larvicidas preliminares con los extractos acuosos y etanólicos de las tres especies vegetales en estudio, con el objetivo de determinar la concentración mínima en ppm aproximada de los extractos que tuvieran un valor de letalidad del 100%, ósea, una CL₁₀₀ aproximada de larvas experimentales de *Aedes aegypti* que mueren tal como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Ensayo preliminar de CL₁₀₀ para semillas de *Annona diversifolia*, tallos y hojas de *Yucca guatemalensis* y raíz *Petiveria alliacea*.

	Concentración de la dilución en ppm	Numero de larvas	Porcentaje larvas muertas
Extracto Etanólico de <i>Annona diversifolia</i>	10	20	10
	100	20	60
	250	20	90
Extracto Etanólico de <i>Yucca guatemalensis</i>	50	20	5
	100	20	40
	250	20	50
	600	20	60
	1000	20	80
Extracto Etanólico de <i>Petiveria alliacea</i>	50	20	10
	100	20	40
	250	20	60
	400	20	70
	600	20	93

Una vez determinados estos porcentajes de mortalidad, se eligieron las concentraciones para encontrar los valores de la línea base de

susceptibilidad a CL₅₀ y CL₉₀ tal como se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5. Concentraciones de las diluciones para encontrar la línea base de susceptibilidad

<i>Annona diversifolia</i>	<i>Yucca guatemalensis</i>	<i>Petiveria alliacea</i>
0.4 ppm	5 ppm	50 ppm
1.0 ppm	400 ppm	120 ppm
10.0 ppm	800 ppm	240 ppm
50.0 ppm	1200 ppm	360 ppm
100.0 ppm	1600 ppm	480 ppm
250.0 ppm	2000 ppm	600 ppm

Se determinó las concentraciones letales en 50% (CL_{50}) y 90% (CL_{90}) de la población de larvas de *A. aegypti*, mediante una adaptación de los bioensayos de susceptibilidad propuestos por OMS²².

Los resultados de los análisis y gráficos que presentan la respuesta biológica de las larvas de *Aedes aegypti* a los extractos se presentan en las tablas 1, 2 y 3 y las figuras 1, 2 y 3.

Resultados de línea base de susceptibilidad para *Annona diversifolia*

Como se muestra en la Tabla 1, la concentración de 10 ppm, presentó actividad larvívica, ya que 23 de las 54 larvas expuestas (exposición corregida) murieron a la exposición del extracto etanólico, lo que resulta en una mortalidad observada del 42.6%, la cual es cercana a un 50% de mortalidad. A una concentración de 50 ppm, 35 de las larvas mueren de un total de 52 expuestas (corregida), presentando el extracto una mortalidad observada en las larvas de 67.3%. La dosis letal 90 se alcanzó a las 100ppm, en la cual 47 de las larvas expuestas mueren de un total de 52.

Tabla 1. Valores de mortalidad observados del bioensayo para determinar línea base de susceptibilidad de las larvas de *A. aegypti* frente al extracto etanólico de *Annona diversifolia*.

Concentración	0.4 ppm		1 ppm		10 ppm		50 ppm		100 ppm		250 ppm		TOTAL	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
Grupo según prueba														
Réplicas	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	12	24
Larvas expuestas	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	180	360
Larvas que pupan	0	0	0	7	0	6	0	8	0	8	3	5	3	34
Larvas muertas	0	2	0	5	0	23	0	35	0	47	0	55	0	167
Expuestos corregida	30	58	30	53	30	54	30	52	30	52	27	55	177	326
Pupación control (%)	0		0		0		0		0		10			
Mortalidad observada (%)	3.44		9.43		42.6		67.3		90.38		100			

Al realizar el análisis PROBIT (Figura 1), que representa el porcentaje de mortalidad a una dosis determinada. En la respuesta observada (curva verde) de las larvas de *A. aegypti* al extracto etanólico de *Annona diversifolia*, esta curva presenta una pendiente muy pronunciada entre las concentraciones de 0.4 ppm a 10 ppm. Al ajustar la concentración de CL_{50} calculada resulta un valor de 41.93 ppm (curva azul). En esta concentración, la pendiente de la curva observada se observa menos pronunciada (curva verde), la cual se mantiene hasta alcanzar una la dosis letal 90 calculada de 121.82 ppm.

Diversos estudios fitoquímicos han reportado que el género *Annona* contiene en sus semillas

altas concentraciones de acetogeninas tales como: Rollinastatin-2²⁴, Laherradurin y cherimolin-2¹⁶ (Figura 1), y alcaloides del núcleo del aporfinano que poseen actividad larvívica¹⁴. Además en las semillas de *Annona squamosa* se han reportado ácidos grasos libres, los cuales han demostrado tener una actividad larvívica²⁵. Esto concuerda con los resultados reportados en nuestro análisis fitoquímico, debido a que se evidenció la presencia de acetogeninas y alcaloides. La presencia de estos compuestos químicos en los extractos de *A. diversifolia* actúan sinérgicamente y es a quien se debe la respuesta de actividad biológica frente *A. aegypti* a 24 horas de exposición larvaria.

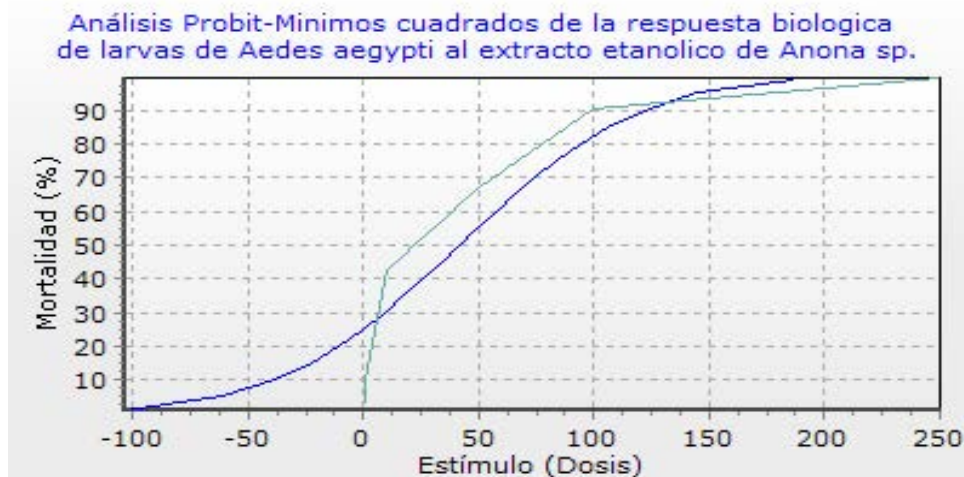


Figura 1. Análisis Probit – Mínimos cuadrados de la respuesta biológica de larvas de *Aedes aegypti* al extracto etanólico de *Annona diversifolia*. Las dosis están calculadas en partes por millón (ppm). -- Curva de regresión dosis calculada, -- Respuesta observada.

Diversos estudios^{10,14,24} concuerdan con nuestros resultados, indicando que el género *Annona* posee actividad larvicida, lo cual sugiere que los extractos de esta especie representa un potencial para la formulación de productos larvicidas.

Resultados de línea base de susceptibilidad para *Yucca guatemalensis*

Tal como puede observarse en la Tabla 2, la respuesta biológica de las larvas de *A. aegypti* frente al extracto de *Yucca guatemalensis*

muestra un incremento significativo de las mortalidades observadas entre la concentración 5.0 ppm y la concentración de 400 ppm con mortalidades del 1.72 y 61.4 % respectivamente. Del mismo modo, puede observarse que, a partir de esta última concentración, las mortalidades se mantienen estables a pesar del aumento de las concentraciones de la sustancia de estudio; lo que pone en evidencia un poco susceptibilidad de las larvas de *A. aegypti* a la sustancia de estudio.

Tabla 2. Valores de mortalidad observados del bioensayo para determinar línea base de susceptibilidad de las larvas de *Aedes aegypti* frente al extracto etanólico de *Yucca guatemalensis*

Concentración	5.0 ppm		400 ppm		800 ppm		1,200 ppm		1,600 ppm		2,000 ppm		TOTAL	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
Grupo según prueba														
Réplicas	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	12	24
Larvas expuestas	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	180	360
Larvas que pupan	3	2	0	3	2	1	1	2	0	2	3	3	11	13
Larvas muertas	0	1	3	35	0	38	0	35	1	47	0	46	4	202
Expuestos corregida	26	58	27	57	28	59	29	58	30	58	26	57	169	347
Pupación control (%)	10		0		6.6		3.3		0		10			
Mortalidad observada (%)	1.72		61.4		64.4		60.3		81.0		80.7			

El análisis de supervivencia PROBIT (Figura 2), reveló que la dosis calculada para alcanzar una CL_{50} fue de 544.8 ppm, y para una CL_{90} era 2,374 ppm del extracto etanólico de *Y. guatemalensis*. Estos valores confirman la baja susceptibilidad de las larvas de *A. aegypti* frente a la sustancia

ensayada, a pesar que el extracto etanólico de la especie vegetal posee glicósidos saponínicos, reportados en otros estudios a los cuales se les atribuye actividad larvívica frente a *A. aegypti*

17,26



Figura 2. Análisis Probit – Mínimos cuadrados de la respuesta biológica de larvas de *Aedes aegypti* al extracto etanólico de *Yucca guatemalensis*. Las dosis están calculadas en partes por millón (ppm). -- Curva de regresión dosis calculada, -- Respuesta observada.

Resultados de línea base de susceptibilidad para *Petiveria alliacea*.

En la Tabla 3, se observan los resultados de mortalidad registradas como consecuencia de la exposición de las larvas de *A. aegypti* al extracto etanólico de *Petiveria alliacea*. Estos resultados muestran que la mortalidad es

directamente proporcional a la concentración del extracto etanólico de *P. alliacea*. Así tenemos que a una concentración de 360ppm la mortalidad alcanza el 64.4% entre las larvas de *A. aegypti*, ya a una concentración de 600ppm la mortalidad observada fue del 90% de larvas.

Tabla 3. Valores de mortalidad observados del bioensayo para determinar línea base de susceptibilidad de las larvas de *Aedes aegypti* frente al extracto etanólico de *Petiveria alliacea*.

Concentración	5.0 ppm		400 ppm		800 ppm		1,200 ppm		1,600 ppm		2,000 ppm		TOTAL	
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E
Grupo según prueba														
Réplicas	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	2	4	12	24
Larvas expuestas	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	180	360
Larvas que pupan	3	5	2	2	2	1	1	1	0	1	2	0	10	10
Larvas muertas	3	4	0	10	2	25	0	38	3	45	3	54	11	176
Expuestos corregida	27	55	28	58	28	59	29	59	30	59	28	60	170	350
Pupación control (%)	10		6.6		6.6		3.3		0.0		6.6			
Mortalidad observada (%)	7.3		17.3		42.4		64.4		76.3		90.00			

El análisis PROBIT para los resultados observados (Figura 3), demuestran una susceptibilidad moderada de las larvas de *A. aegypti* frente a la acción larvicida del extracto etanólico de *P. alliacea*, determinando una CL_{50} de 359.57 ppm y una CL_{90} y 706.89 ppm, respectivamente.

Estos valores confirman una susceptibilidad moderada de larvas de *A. aegypti* a los efectos tóxicos de esta especie vegetal, lo que a su vez concuerda con el efecto larvicida de esta especie reportado por otros autores^{27,28}.

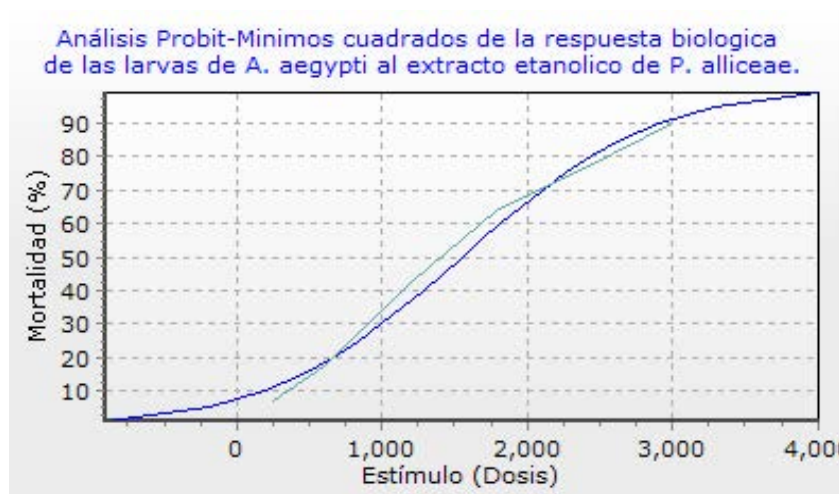


Figura 3. Análisis Probit - Mínimos cuadrados de la respuesta biológica de larvas de *Aedes aegypti* al extracto etanólico de *Petiveria alliacea*. Las dosis están calculadas en partes por Millón (ppm). -- Curva de regresión dosis calculada, -- Respuesta observada.

En los extractos de *Petiveria alliacea* se logró identificar la presencia de glicósidos saponínicos, taninos y flavonoides, además se comprobó la presencia de compuestos sulfurados, resultados que encuentran fundamento en las referencias citadas anteriormente^{19,20,21,27} en donde se menciona la presencia en la raíz de *Petiveria alliacea* de diversos componentes con azufre tales como: Sulfina: S-óxido del (Z)-tiobenzaldehído y Sulfóxidos: Petiveriin A y Petiveriin B entre otros.

El potencial como insecticida del dibenciltrisulfuro (DBTS) aislado de raíces de *P. alliacea* ha sido reportado en otro estudio²⁸. También se menciona que los extractos acuosos de raíces han mostrado actividad larvicida en *Aedes aegypti*, *Culex pipiens*, *C. fatigans* y *Anopheles gambiae*²⁷, además los extractos etanólicos de hojas de *P. alleacea* mostraron actividad larvicida en huevos de *Bemisia tabaci*

²⁹ los cuales confirman los resultados obtenidos en esta investigación.

La actividad larvicida de los extractos etanólicos de las tres especies vegetales: *A. diversifolia*, *P. alliacea* y *Y. guatemalensis*, son debidas a los metabolitos secundarios que están presentes en ellas y de las tres especies vegetales estudiadas y analizadas, la *A. diversifolia* resultó ser la más efectiva como larvicida a concentraciones mucho más bajas que *P. alliacea* y *Y. guatemalensis*.

Estos resultados abren la posibilidad de tener una alternativa natural en estas especies botánicas ya que estas pueden encontrarse en todo el país y son ampliamente conocidas por la población; En el caso de la *A. diversifolia*, por tratarse de una fruta que se cosecha en la temporada entre junio hasta septiembre, sus semillas deben ser recolectadas en esa época y guardarse en recipientes secos y cerrados para

cuando se necesiten utilizar.

Y. guatemalensis se encuentra abundantemente en el país ya que forma parte de barreras vivas que sirven para evitar la erosión de los suelos, por tal razón se obtiene fácilmente.

P. alliacea por ser una hierba se encuentra durante todo el año en todo el país y en época lluviosa se propaga abundantemente, la única limitante es que la parte de la planta que se utiliza es la raíz, lo que significa que para recolectarla se debe de cortar toda la planta con pérdida de las partes aéreas, por lo que se sugiere propagar más la especie para que no se extinga.

Se han realizado numerosos estudios en relación con las propiedades larvívicas de los compuestos derivados de plantas de la familia Annonaceae lo cual se comprueba con los resultados obtenidos en esta investigación, además se sabe que presentan efectos tóxicos sobre amplia gama de organismos. El uso indiscriminado de insecticidas sintéticos para el control de mosquitos ha llevado al desarrollo de la resistencia por ellos y la acumulación de productos químicos nocivos en el medio ambiente. Estos factores han hecho necesario una intensa búsqueda de insecticidas respetuosos del medio ambiente contra los mosquitos. En base a esta información sugerimos que se realicen otras investigaciones que tengan como objetivo realizar más ensayos contra larvas del *Aedes aegypti* en los cuales se pueda buscar las concentraciones adecuadas para el desarrollo de productos con actividad larvívica de origen natural a base de los extractos de la *A. diversifolia*, lo cual será de beneficio para la salud de la población trayendo consigo un ahorro el estado y a la vez podría ser una fuente de nuevos campos de trabajo multidisciplinarios, además es importante y necesario realizar la propagación de las especies a través del fomento de viveros, lo que

implica la colaboración de otras instituciones encargadas de esta labor.

CONCLUSIONES

Los metabolitos secundarios presentes en las tres especies vegetales; acetogeninas en semillas de *Annona diversifolia*, compuestos sulfurados en raíz de *Petiveria alliacea* y glicósidos saponínicos esteroideos en hojas y tallos de *Yucca guatemalensis*, posiblemente sean los responsables de la actividad larvívica. El extracto que presento la mayor actividad larvívica fue el extracto etanólico de semillas de la *Annona diversifolia*.

Las especies investigadas pueden representar una alternativa amigable con el medio ambiente para el control del dengue en el país, sobre todo porque son especies que se pueden recolectar fácilmente en todo el territorio y además son conocidas por la población, no sin antes realizar estudios que garanticen la inocuidad de dichas especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Dengue Prevención y Control. EBS 136/24. 2014.
2. World Health Organization (WHO). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Third edition, 10-12, 2009.
3. Izabela, A. R.; Zybert, J.; Wilschut, J. M.; Smit. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating Infectivity, *Cell. Mol. Life Sci.*, (67), 2773-2786, 2010.
4. Zúñiga-Vega, C.; Peraza-Moraga, J.; Hernández-Carvajal, E. Abordando la problemática del Dengue desde una perspectiva ambiental, *Tecnología en Marcha*, 22(1), 81-89, 2009.
5. Maciel-de-Freitas, R.; Aguiar, R.; Bruno, R.

- V.; Guimarães, M. C.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Sorgine, M.; Struchiner, C. J.; Valle, D.; O'Neill, S. L.; Moreira, L. A. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 107 (6), 828-829, 2012.
6. Flores, E; Badii, M.; Ponce, G. Resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades con énfasis en mosquitos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 2(4), 2-8, 2001.
 7. Ayala R., & M. Moreno. Resistencia al tenephos por presión de selección en una población de *A. aegypti* en El Salvador. *Minerva Revista*, 2 (1):1-9, 2011.
 8. Guerra, R.; Gómez L. J.; Castillo, U.G.; Toloza G.; Sánchez-Pérez, J.P.; Avalos, N.; Mejía, J.G.; Núñez M. J.; Moreno, M. A. Efecto analgésico, caracterización fitoquímica y análisis toxicológico del extracto etanólico de hojas de *Pereskia lychnidiflora*. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica*, 35 (4):581-589, 2018.
 9. Shriner, R.L.; Hermann, O.F.; Morrill, T.C.; Curtin, D.Y.; Fuson, R.C. *The Systematic Identification of Organic Compounds, Student Solutions Manual*, 8th Edition, John Wiley & Sons, 2003.
 10. Toledo, R. A.; Alfaro Hernández, R.; Artiga Acosta, R.; Hernández Flores, R. Investigación de la actividad larvicida contra el mosquito *Aedes aegypti* en las fracciones de los extractos de 5 especies vegetales y la elaboración de un preparado larvicida. Tesis de Licenciatura. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, 40-60, 2002.
 11. Falero, G.C. Pruebas de Susceptibilidad de Mosquito Adulto y Larvas a los Insecticidas y Bioensayos de las Aplicaciones Residuales Usadas en el Control de Mosquitos Vectores de Malaria y Dengue. 2-47, 2001.
 12. Moreno, M. A. 2003. Susceptibilidad y/o resistencia de las larvas de *Aedes aegypti* al larvicida Temefhos. Tesis de Licenciatura, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de El Salvador
 13. Kumar, S. V.; Mani, P.; Bastin, T.M.; Kumar, R.; Arun, R. Larvicidal, oviposition deterrent and repellent activity of *Annona squamosa* extracts against hazardous mosquito vectors. *Int J Pharm Tech*, 3(3), 3143-3155, 2011.
 14. Magadula, J. J.; Innocent, E.; Otieno J. N.; Mosquito larvicidal and Cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. *J Plant Res*, 3 (9), 674-680, 2009.
 15. Schlie-Guzmán, M.A.; García-Carrancá A.; González-Esquínca, A.R. In vitro and in vivo antiproliferative activity of laherradurin and cherimolin-2 of *Annona diversifolia* Saff, *Phytother Res*, 23(8), 1128-33, 2009.
 16. Gallardo, T.; Aragón, R.; Tormo, J.R.; Blázquez, M.A.; Zafra-Polo, M.C.; Cortes, D. Acetogenins from *Annona glabra* seeds. *Phytochemistry*, 47 (5), 811-816, 1998.
 17. Zhang Y, Zhang YJ, Jacob MR, Li XC, Yang CR. Steroidal saponins from the stem of *Yucca elephantipes*. *Phytochemistry*, 69(1):264-270, 2008.
 18. Montenegro, T.; De Melo, A. S.; Cardoso, R.; Pompeu, E.; De Oliveira, F.R.; Fernandes J.; De Andrade, M.A.; Baetas, A.C.; Monteiro, M.C.; Do Socorro, C. Potential behavioral and pro-oxidant effects of *Petiveria alliacea* L. extract in adult rats. *J. Ethnopharmacol.*, 143(2), 604-610. 2012.
 19. Mulyani, Y.; Sukandar, E. Y.; Adnyana I. K.; Elfahmi. *Petiveria alliacea*: New alternative for the treatment of sensitive and multi-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Pharmacognosy Phytother.*, 4(7), 91-95, 2012.

20. Kim, S.; Kubec, R.; Musah, R. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. *J. Ethnopharmacol.*, **104** (1), 188-192, 2006.
21. Kubec, R.; Musah, R.A. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*, *Phytochemistry*, **58** (1), 981-985, 2001.
22. World Health Organization. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. WHO/VBC/81.807, Geneva, 1-6, 1981.
23. Fontana, J.D.; Lancas, F.M.; Passos, M.; Cappelaro, E.; Vilegas, J.; Baron, M.; Nosedá, M.; Pomilio, A.B.; Vitale, A.; Webber, A.C.; Maul, A. A.; Peres, W.A.; Foerster, L. A. Selective polarity-and adsorption-guided extraction purification of *Annona* sp. polar acetogenins and biological assay against agricultural pests. *Appl. Biochem. Biotech.*, **70**(2), 67-76, 1998.
24. Saxena, R.C.; Harshan, V.; Saxena, A.; Sukumaran, P.; Sharma, M. C.; Kumar, M. L. Alkaloids isolated from *Annona squamosa* have shown larvicidal growth-regulating and chemosterilant activities against *Anopheles stephensi* at 50-200 ppm. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **9**(1), 7-84, 1993.
25. Madhumitha, G.; Rajakumar, G.; Roopan, S. M.; Rahuman, A. A.; Priya, K. M; Saral, A. M.; Khan, F. R.; Velayutham, K.; Jayaseelan, C.; Kamaraj, C.; Elango, G. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. *Parasitol. Res.*, **111**, 2189-2199, 2012.
26. Johnson, L.; Williams, Lawrence A. D.; Roberts, E. V. An Insecticidal and acaricidal polysulfide metabolite from the roots of *Petiveria alliacea*. *Pestic.Sci.*, **50** (3), 228-232, 1997.
27. Adebayo, T. A.; Olaifa, J. I.; Akintola, A. J.; Ojo, A. O. Field control of peridomestic mosquitoes of medical importance with extracts of *Petiveria alliacea* L. *Ife Journal of Science*, **6**(1), 6-9, 2004.
28. Johnson L, Williams LAD, Roberts E: An Insecticidal and Acaricidal Polysulfide metabolite from the Roots of *Petiveria alliacea*. *Pesticide Science*, 1997, **50**:228-232.
29. Cruz, A.; Gomboa-Angulo, M.; Borges-Argáez, R.; Ruiz-Sánchez, E. Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bermisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroidea). *Electronic Journal of Biotechnology*, **16** (1), 6-6, 2013.