

## INHIBICIÓN DE DESARROLLO DE LARVAS DE *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (DIPTERA: CULICIDAE) CON EXTRACTOS DE HOJA DE *Pseudocalymma alliaceum* Sandwith, 1954 (BIGNONACEAE)

José Abimael Campos-Ruiz<sup>1,2</sup>, Rafael Pérez-Pacheco<sup>1</sup>, Benjamín Ortega-Morales<sup>3</sup>, Manuel Chan-Bacab<sup>3</sup> y Carlos A. Granados-Echegoyen<sup>3,4</sup>✉

<sup>1</sup>CIIDIR – IPN – Unidad Oaxaca, Calle Hornos 1003. Colonia Noche Buena, C. P. 71230, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

<sup>2</sup>Escuela Universitaria de Agronomía y Agricultura de Zaachila A. C. Huijato S/N. Barrio de Lexio, C. P. 71250, Villa de Zaachila, Oaxaca, México

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología (DEMAB) - UAC. Av. Agustín Melgar S/N. Colonia Buenavista, C. P. 24039, San Francisco de Campeche, Campeche; México.

<sup>4</sup>CONACYT. Universidad Autónoma De Campeche (UAC) - CEDESU. Av. Agustín Melgar S/N. Colonia Buenavista. C. P. 24039, San Francisco de Campeche, Campeche; México.

✉Autor de correspondencia: granados.echegoyen@yahoo.com

**RESUMEN.** *Aedes aegypti* Linnaeus es un mosquito con distribución global, con mayor presencia en zonas tropicales y subtropicales, además de ser un vector (potencial) de arbovirus responsables de diversas enfermedades (dengue, zika y chikungunya). Se realizó un bioensayo para determinar el Índice de Crecimiento Relativo (ICR) de extractos etanólicos y metanólico de *Pseudocalymma alliaceum* en larvas de segundo instar de *Ae. aegypti*. Se evaluaron 20 larvas colocadas en vasos de plástico con 99 mL de agua destilada y 1 mL de los extractos a diferentes concentraciones (800, 600, 400, 200, 100 y 50 ppm). Se observó mortalidad de 50% con la aplicación de extracto de etanol de *P. alliaceum* con la concentración de 800 ppm. Con la aplicación de ambos extractos se obtuvieron ICR entre 0.51 y 0.77, que indican un aletargamiento en el ciclo de vida del insecto. Estos extractos pueden ser incluidos dentro de una estrategia de manejo integrado para reducir las poblaciones de mosquitos por el efecto inhibitorio encontrado.

**Palabras clave:** mosquitos, *Pseudocalymma*, extracto vegetal

### Inhibition of development of mosquito larvae *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with leaf extract of *Pseudocalymma alliaceum* Sandwith, 1954 (Bignoniaceae)

**ABSTRACT.** *Aedes aegypti* Linneo is a mosquito with global distribution, a majority presence in tropical and subtropical zones, as well as a vector (potential) of arboviruses responsible for various diseases (dengue, zika and chikungunya). A bioassay was performed to determine the Relative Growth Rate (ICR) of ethanolic and methanolic extracts of *Pseudocalymma alliaceum* in second instar larvae of *Ae. aegypti*. Twenty larvae placed in plastic cups were evaluated with 99 ml of distilled water and 1 ml of the different extracts (800, 600, 400, 200, 100 and 50 ppm). A mortality of 50% was observed with the application of ethanol extract of *P. alliaceum* with the concentration of 800 ppm. With the application of both extracts ICR between 0.51 and 0.77 were obtained, indicating a lethargy in the life cycle of the insect. These extracts can be included within an integrated management strategy to reduce mosquito populations by the inhibitory effect found.

**Keywords:** mosquitoes, *Pseudocalymma*, plant extract

## INTRODUCCIÓN

Los mosquitos (Díptera: Culicidae) son un grupo de insectos que comprende aproximadamente 3,500 especies distribuidas en áreas tropicales y subtropicales (Govindarajan y Karuppannan, 2011). *Aedes aegypti* Linnaeus (*Ae. aegypti*) es uno de los principales vectores de arbovirus que causan el Dengue, Fiebre Amarilla, Chikungunya y Zika (Macedo *et al.*, 2017). El dengue se ha convertido en la principal amenaza para la salud de aproximadamente 2,500

millones de personas en más de 100 países (Rahuman y Venkatesan, 2008; Chellappandian *et al.*, 2018).

El control de estos insectos se ha realizado con la aplicación de insecticidas sintéticos, sin embargo, el uso excesivo de estos productos ha generado resistencia fisiológica, efectos tóxicos en la salud humana y organismos no objetivo, así contaminación del ambiente (Das y Chandra, 2012; Rajesh *et al.*, 2015). Las plantas y sus derivados químicos secundarios han mostrado ser una alternativa ecológica con actividad sobre diversos organismos, como ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos, ya que los compuestos que los conforman presentan determinado modo de acción (Govindarajan *et al.*, 2011). *Pseudocalymma alliaceum* (*P. alliaceum*) es una planta comúnmente conocida en la región del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México como “bejuco de ajo” debido a que sus hojas al ser perturbadas o trituradas liberan un aroma similar al ajo (Granados-Echegoyen *et al.*, 2014). Esta planta tiene importancia económica debido a que sirve como sustituto del ajo y también ha sido utilizada en la medicina tradicional por poseer propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antipiréticas, antirreumáticas, purgantes y vermífugas (Taylor, 2005; Dugasani *et al.*, 2009).

Las investigaciones que se realizan actualmente sobre el uso de sustancias vegetales para el control de mosquitos están enfocadas principalmente al control de estados inmaduros y adultos (Warikoo *et al.*, 2013). Estos bioensayos de efectividad biológica nos permiten conocer el grado de susceptibilidad de las larvas tratadas bajo presión de desarrollo y el efecto tóxico que ejercen los tratamientos sobre los estadios de crecimiento del mosquito. En concordancia con lo anterior, el objetivo del estudio es cuantificar el efecto insectistático en larvas de *Ae. aegypti* tratadas con extractos etanólico y metanólico de hojas secas de *P. alliaceum* obtenidos a través de maceración convencional.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Cría de mosquitos.** Los huevos de *Ae. aegypti* se recolectaron en depósitos de aguas artificiales ubicados en la ciudad de Campeche, México (19°49'36.7"N 90°33'15.6"W). Los huevos se colocaron individualmente en bandejas de plástico que contenían 300 mL de agua destilada para promover la eclosión y el desarrollo de las fases inmaduras del mosquito. La cría se mantuvo a 26±12°C y 60 – 70% de humedad relativa y fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Las larvas se alimentaron con un producto pulverizado para peces. Las pupas formadas se transfirieron a recipientes de plástico y se introdujeron a jaulas entomológicas de 60 x 60 x 60 cm para la emergencia de adultos. Los adultos fueron provistos con una solución azucarada al 10% en un frasco con una mecha de algodón y semanalmente se introdujo un conejo inmovilizado como material hematofágico para las hembras. Las larvas empleadas en los bioensayos se obtuvieron de los huevos depositados por dichas hembras, al llegar al segundo instar (Pérez-Pacheco *et al.*, 2004).

**Material vegetal para maceración y obtención de extractos vegetales.** Se recolectaron hojas *Pseudocalymma alliaceum* en el municipio de San Pedro Comitancillo, Oaxaca. La identificación taxonómica la realizó el Dr. Carlos Granados-Echegoyen. Las hojas se lavaron con agua clorada y se colocaron sobre papel en sombra para su secado y posteriormente se pulverizaron en un molino eléctrico (Granados-Echegoyen *et al.*, 2014). Se agregaron 150 g de hojas pulverizadas en un matraz y se añadió etanol o metanol hasta cubrir el material, se dejó reposar por 72 h. Se separó el sólido del líquido a través de un papel filtro Whatman No. 1 y el remanente se descartó. Los extractos filtrados se concentraron individualmente y se eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio a presión reducida y 40 °C para obtener los extractos.

**Preparación de las concentraciones.** Se tomaron 880 mg de cada uno de los extractos crudos de etanol y metanol y se disolvieron individualmente con 11 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.7% como emulsificante para obtener la concentración de 80,000 ppm y por dilución volumétrica en serie se prepararon las concentraciones de 60,000, 40,000, 20,000, 10,000 y 5,000 ppm.

**Bioensayos de inhibición de crecimiento y duración larval y pupal.** Para el establecimiento del bioensayo se seleccionaron grupos de 20 larvas que fueron colocadas en un vaso de plástico estéril de 125 mL con 99 mL de agua destilada y 1 mL de los tratamientos, obteniendo las concentraciones de bioensayos de 800, 600, 400, 200, 100, y 50 ppm. Se registró el número de larvas y pupas vivas y muertas en cada instar de desarrollo hasta que se formó el 90 – 93% de pupas en el control con agua destilada, posteriormente se consideró sin vida a las que no presentaron movimientos similares a los exhibidos por las larvas del grupo control en agua destilada y cuando la larva no mostro ninguna reacción al momento de ser alterada en el sifón y su región cervical (Martinez-Tomás *et al.*, 2018). Con la información recopilada se calculó el Índice de Inhibición de Crecimiento (IIC) usando la siguiente fórmula (Zhang *et al.*, 1993):

$$IIC = \frac{\sum_1^4(\text{No. de insectos vivos} * \text{fase insecto}) + \sum_1^4[\text{No. de insectos muertos} * (\text{fase insecto} - 1)]}{(\text{No. total de insectos evaluados} * \text{total de fases del insecto})}$$

Donde 1, 2, 3 y 4 representan la fase de insecto de 2°, 3°, 4° instar y pupas formadas respectivamente. El número total de insectos evaluados fue 60 para cada tratamiento y el número total de etapas del insecto fueron cuatro (tres larvas y pupa). Con los resultados obtenidos, se calculó el Índice de Crecimiento Relativo (ICR) mediante la fórmula:

$$ICR = IIC \text{ tratamiento} / IIC \text{ control}$$

La toma de datos se continuó con los individuos supervivientes, registrando duración larval y pupal; la duración larval se consideró al número de días transcurridos desde que la larva se sometió al tratamiento (segundo instar) hasta que terminó su fase (cuarto instar) y la duración pupal desde que se formó la pupa hasta la emergencia del adulto.

**Diseño experimental y análisis estadístico.** Los bioensayos se establecieron bajo un diseño experimental completamente aleatorizado con tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias con el programa Minitab v8.1. (Minitab, Inc. 2017). Resultados con  $p < 0.05$  se consideraron significativamente diferentes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El experimento se estableció utilizando larvas de mosquito *Ae. aegypti* de segundo instar para determinar el efecto de los tratamientos en las etapas subsecuentes de desarrollo (tercer y cuarto instar larval y pupa). En el estudio se registró la mortalidad de las larvas cuando pasaron por el tercer instar de desarrollo, afectando en mayor medida el comportamiento de las mismas y en consecuencia la durabilidad del ciclo de vida. Las larvas de *Ae. aegypti* sometidas a tratamientos con extracto de etanol de *P. alliaceum* registraron valores de hasta 50% de mortalidad a finalizar el experimento con la concentración de 800 ppm, en comparación con el extracto de metanol, que registro valores máximos de 41.67% con la misma concentración.

La duración de las etapas larvarias se afectó por la exposición al extracto de etanol y metanol, produciendo un retraso en el desarrollo de las mismas para alcanzar la fase de pupa, mientras que

las pupas que fueron tratadas con extracto de metanol presentaron una reducción en el tiempo de desarrollo en comparación con el control de agua destilada (Cuadro 1).

Estadísticamente, las mejores concentraciones, al finalizar el experimento fueron las de 800 ppm en ambos extractos. No se encontraron diferencias significativas en la mortalidad registrada con la utilización de extracto de etanol a una concentración de 600 y 400 ppm. Shrankhla *et al.* (2011) reportaron que el extracto en hexano de hojas de *P. alliaceum* exhibe actividad larvicida sobre *Culex quinquefasciatus* (*Cx. quinquefasciatus*) después de 24 h de la aplicación de los tratamientos, obteniendo valores letales LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> de 2.49 y 15.06 ppm, respectivamente; datos que no son similares a los encontrados en nuestro estudio, debido a que en las primeras 48 h no se registró mortalidad de las larvas tratadas, sin embargo, se presentó un efecto en las fases de desarrollo del mosquito inducido por la exposición a los tratamientos.

**Cuadro 1.** Mortalidad e índice de crecimiento relativo de larvas de mosquito *Aedes aegypti* tratadas con extractos de *Pseudocalymma alliaceum*

Disolvente	Concentración (ppm)	# larvas y pupas muertas				Mortalidad total (%)	Duración (días)		ICR
		II	III	IV	P		Larva <sup>+</sup>	Pupa <sup>++</sup>	
Etanol	800	-	30	-	-	50.00 a	11.15	2.15	0.51
	600	-	15	-	-	25.00 b	11.24	2.04	0.64
	400	-	11	-	-	18.33 b	10.04	2.00	0.68
	200	-	5	-	-	8.33 c	8.87	1.99	0.73
	100	-	-	-	-	0.00 d	8.81	1.54	0.77
	50	-	-	-	-	0.00 d	8.90	1.21	0.77
	Control	-	-	-	-	0.00 d	3.60	2.26	1.00
Metanol	800	-	25	-	-	41.67 a	10.23	1.36	0.56
	600	-	18	-	-	30.00 b	10.02	1.23	0.62
	400	-	-	-	-	0.00 c	9.76	1.08	0.78
	200	-	-	-	-	0.00 c	9.43	1.08	0.77
	100	-	-	-	-	0.00 c	7.03	1.03	0.77
	50	-	-	-	-	0.00 c	6.83	1.05	0.76
	Control	-	-	-	-	0.00 c	3.60	2.26	1.00

II: larvas de segundo instar; III: tercer instar; IV: cuarto instar; P: pupa; <sup>+</sup> Periodo de larva a pupa; <sup>++</sup> Periodo de pupa a adulto; ICR: Índice de crecimiento relativo; Las medias seguidas por letras diferentes dentro de la misma columna y disolvente son significativamente diferentes con  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de control.

Las diferencias en los valores de mortalidad entre el extracto de etanol y metanol en nuestro estudio y considerado lo que reporta Shrankhla *et al.* (2011), nos permite inferir que estas dependen directamente de la polaridad de los disolventes utilizados en el proceso de extracción de los compuestos bioactivos que los hace efectivos contra insectos plaga (Ghosh *et al.*, 2012).

Otros reportes indican el potencial de los metabolitos secundarios encontrados en especies vegetales sobre la durabilidad de las fases biológicas de mosquitos, como Martínez-Tomás *et al.*, 2018 que mencionan que la duración de larvas de *Cx. quinquefasciatus* tratadas con extracto de metanol de semillas de *Ricinus communis* con una concentración de 162.5 ppm disminuye su desarrollo, mientras que Daniel *et al.* (1995) informaron que los extractos de *Acalypha indica* aumentan en el periodo de larvas, lo cual coincide con los datos obtenidos en esta investigación.

Granados-Echegoyen *et al.*, (2014) evaluaron la aplicación de extractos de etanol y metanol de hojas de *P. alliaceum* al 10% sobre larvas de segundo instar de *Cx. quinquefasciatus* y reportan valores de ICR de 0.70 y 0.76, respectivamente, que son valores similares a los que se obtuvieron

en este estudio con la aplicación de los tratamientos utilizados, sin embargo, en nuestro estudio las concentraciones a las que se sometieron las larvas de *Ae. aegypti* son mayores.

Las diferencias encontradas en los resultados de ICR se deben a la afectación en las etapas de larva y pupa, ya que el desarrollo de las mismas duraba más que la otra o viceversa, lo que ocasiona que al momento de realizar el análisis estadístico se encuentran diferencias con el grupo control, aunque no se registró mortalidad en los tratamientos, sin embargo, si existe interferencia de los mismos sobre las fases biológicas.

## CONCLUSIONES

La aplicación de extractos de etanol y metanol tiene un efecto insectistático, lo que se traduce en una ventaja, debido a que permite que las etapas de desarrollo se prolonguen y el número de larvas se reduce debido al período más largo necesario para que una nueva generación complete el ciclo de vida. El extracto de etanol de *P. alliaceum* se puede considerar como una alternativa en el manejo integrado de mosquitos, permitiendo el control de hasta el 50% de la población durante todo el ciclo de vida.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por la Beca de Estimulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) y al CONACYT por los apoyos económicos para la realización de esta investigación. Al Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología (DEMAB) y al Laboratorio de Entomología Aplicada del Centro de Estudios de Desarrollo Sustentable y Aprovechamiento de la Vida Silvestre (CEDESU) de la Universidad Autónoma de Campeche por las facilidades prestadas para realizar los experimentos..

## LITERATURA CITADA

- Chellappandian, M., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Karthi, S., Thanigaivel, A., Ponsankar, A., Kalaivani, A. y Hunter, W. B. 2018. Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environment International*, 113, 214–230. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.038>
- Daniel T., Umarani S. y Sakthivadivel M. 1995. Insecticidal action of *Ervatamia divaricata* L. and *Acalypha indica* L. against *Culex quinquefasciatus* Say. *Geobios New Reports* 14(2):95–98
- Das, D., y Chandra, G. 2012. Mosquito larvicidal activity of *Rauvolfia serpentina* L. seeds against *Culex quinquefasciatus* Say. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(1), 42–45.
- Dugasani, S. L., Balijepalli, M. K., y Pichika, M. 2009. Growth inhibition and induction of apoptosis in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cells by *Adenocalymma alliaceum* flowers. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 3, 278–286.
- Ghosh, A., Chowdhury, N., y Chandra, G. 2012. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian Journal of Medical Research*, 135(5), 581–598.
- Govindarajan, M., y Karuppanan, P. 2011. Mosquito larvicidal and ovicidal properties of *Eclipta alba* (L.) Hassk (Asteraceae) against chikungunya vector, *Aedes aegypti* (Linn.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(1), 24–28.
- Govindarajan, M., Sivakumar, R., Amsath, A., y Niraimathi, S. 2011. Mosquito larvicidal properties of *Ficus benghalensis* L. (Family: Moraceae) against *Culex tritaeniorhynchus*

- Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4(7), 505–509.
- Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Soto-Hernández, M., Ruiz-Vega, J., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernández, N., y Gato-Armas, R. 2014. Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of *Pseudocalymma alliaceum* (Bignoniaceae). Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 7(8), 594–601.
- Macedo, A. L., Duprat, R. C., Moreira, D. de L., Kaplan, M. A. C., Vasconcelos, T. R. A., Pinto, L. C., Montenegro, R. C., Ratcliffe, N. A., Mello, C. B. y Valverde, A. L. 2017. Isolation of a larvicidal compound from *Piper solmsianum* C.D C. (Piperaceae). Natural Product Research, 32(22): 2701-2704. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1374265>
- Martínez-Tomás, S. H., Pacheco, R. P., Hernández, C. R., Valverde, G. R., Nápoles, J. R., Espinoza, F. de J. R., y López, M. A. R. (2018). Inhibición de Desarrollo de Larvas *Culex quinquefasciatus* Say con Extractos de Semilla y de Hoja de *Ricinus communis*. Southwestern Entomologist, 43(1), 221–238. <https://doi.org/10.3958/059.043.0114>
- Minitab Inc., 2017. Base Minitab software, versión 18.1. USA.
- Pérez-Pacheco, R., C. Rodríguez H., J. Lara R., R. Montes B. y G. Ramírez V. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* Say (Díptera: Culicidae). Acta Zoológica Mexicana, 20(1): 141-152.
- Rahuman, A. A., y Venkatesan, P. 2008. Larvicidal efficacy of five cucurbitaceous plant leaf extracts against mosquito species. Parasitology Research, 103(1), 133–139. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0940-5>
- Rajesh, K., Dhanasekaran, D., y Tyagi, B. K. (2015). Mosquito survey and larvicidal activity of actinobacterial isolates against *Culex* larvae (Diptera: Culicidae). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 14(2):116–122. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2013.08.001>
- Shrankhla, Sharma, P., Mohan, L., y Srivastava, C. N. 2011. Larvicidal activity of *Pseudocalymma alliaceum* and *Allium sativum* against *Culex quinquefasciatus* (Say). Entomological Research, 41(6), 216–220. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2011.00344.x>
- Taylor, L. N. D. (2005). The Healing Power of Rainforest Herbs. Square One Publishers, Inc. Garden City Park, New York. 583 pp.
- Warikoo, R., y Kumar, S. 2013. Impact of *Argemone mexicana* extracts on the cidal, morphological, and behavioral response of dengue vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Parasitology Research, 112(10), 3477–3484. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3528-7>
- Zhang, M., Chaudhuri, S. K., y Kubo, I. 1993. Quantification of insect growth and its use in screening of naturally occurring insect control agents. Journal of Chemical Ecology, 19(6), 1109–1118. <https://doi.org/10.1007/BF00987372>