

UNIVERSIDAD NACIONAL  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Estudio de la actividad larvicida y la composición fitoquímica asociada de extractos de plantas para el control del mosquito *Aedes aegypti*.

Lic. Víctor Álvarez Valverde

Universidad Nacional, Heredia, 2021

Trabajo presentado para optar al grado de Magíster en Enfermedades Tropicales. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional. Heredia. Costa Rica.

## MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOS

.....  
[PhD. Mayela Coto Chotto / Dr. Luis A. Miranda Calderón / Dr. José Vega Baudrit /  
Dr. Jorge Herrera Murillo / Dra. Damaris Castro García / Máster Randall Gutierrez]  
Vargas

Representante del Consejo Central de Posgrado

.....  
Dra. Sandra Estrada König  
Coordinadora del Posgrado o su representante

.....  
M.Sc. Silvia Argüello Vargas  
Tutora

.....  
Dr. Gerardo Rodríguez Rodríguez  
Miembro del comité Asesor

.....  
Dr. Marco Herrero Acosta  
Miembro del comité Asesor

.....  
Lic. Víctor Álvarez Valverde  
Sustentante

## Resumen General

El mosquito *Aedes aegypti* es vector de diversas enfermedades tropicales como lo son el dengue, Zika, chikungunya, Mayaro y fiebre amarilla, las cuales cobran la vida de cientos de personas cada año, principalmente en países en vías de desarrollo que no cuentan con un manejo integral de residuos solidados. La principal estrategia para prevenir estas enfermedades es mediante el control del vector, ya sea eliminando criaderos, aplicando control biológico o bien utilizando el control químico con plaguicidas sintéticos. El uso indiscriminado de estos últimos conlleva a problemas como inespecificidad y desarrollo de resistencia en las poblaciones del vector, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos para su combate es una tarea que resulta necesaria, en especial si los productos con los que se busca sustituir estos plaguicidas sintéticos son productos naturales. El presente estudio tuvo como objetivos evaluar la actividad larvicida de extractos etanólicos de plantas encontradas comúnmente en Costa Rica, así como identificar los componentes que producen la actividad larvicida en las fracciones de extractos más promisorias. Se evaluó la actividad larvicida de 26 extractos etanólicos de plantas mediante la metodología descrita por la Organización Mundial de la Salud. Se eligió un total de 6 extractos con la toxicidad más elevada, siendo el extracto de tallos de *I. cairica* el que presentó menor  $LC_{50}$  con un valor de 0,0341 mg/mL, seguido del extracto de hojas de la misma planta con un valor de  $LC_{50}$  de 0,121 mg/mL. Luego se realizó un estudio bio-guiado del extracto más activo (tallos) de *I. cairica*, mediante su fraccionamiento por cromatografía de capa fina y de columna abierta. Los resultados permitieron concluir que el efecto larvicida se pierde al separar los componentes químicos de la FDCM. Dentro de los componentes químicos mayoritarios, detectados en la fracción con mayor actividad, se encontraron dos cumarinas: la umbeliferona y la escopoletina, las cuales fueron confirmadas utilizando diversas técnicas fisicoquímicas como la TLC, HPLC-DAD y HPLC-MS. Adicionalmente se pudo observar que estas dos cumarinas, ni juntas ni separadas, son las responsables de la actividad larvicida, sino que podrían tener una actividad sinérgica con los demás componentes químicos del extracto. Este estudio evidencia la actividad larvicida de extractos etanólicos de plantas y principalmente el potencial larvicida de *I. cairica* como una alternativa ambientalmente amigable para el control de *Aedes aegypti*.

## **Agradecimientos**

A mi familia por estar siempre ahí incondicionalmente.

A mi grupo asesor: La M. Sc, Silvia Arguello Vargas, al Dr. Gerardo Rodríguez Rodríguez y al Dr. Marco Herrero Acosta quienes me demostraron incansablemente sus ganas de investigar y de realizar una investigación responsable que pueda generar un impacto en la sociedad.

A todas aquellas personas que me brindaron una mano invaluable, aunque no tuvieran que hacerlo: Allan González Herrera, Clemens Rupert, Karla Solano, Ana Francis Carballo, Jihad Sasa, Manuel Sandoval, Roy Pérez. Muchas gracias

A todos los profesores y miembros del posgrado que mostraron total profesionalismo al impartir lecciones y transmitir su valioso conocimiento.

A mis compañeros(as) de maestría.

## **Dedicatoria**

Este trabajo se lo dedico con amor a mi familia: Prisci, por siempre animarme a continuar y apoyarme incondicionalmente en estas locuras personales y profesionales. A mis padres, hermano y tía por ser parte importante de lo que soy el día de hoy. Muchas gracias a todos...

## Índice

Resumen General.....	I
Agradecimientos.....	II
Dedicatoria.....	III
Lista de Cuadros.....	VI
Lista de Figuras.....	VII
Lista de Abreviaturas.....	VII
Descriptores.....	IX
Introducción General.....	1
Bibliografía.....	3
Artículo I.....	13
Actividad insecticida de extractos etanólicos de plantas sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i> .....	13
Resumen.....	13
Palabras clave.....	13
Introducción.....	14
Metodología.....	15
Resultados.....	17
Discusión.....	21
Bibliografía.....	24
Artículo II.....	30
Estudio fitoquímico bio-guiado de extractos de <i>Ipomoea cairica</i> con actividad larvicida en <i>Aedes aegypti</i> .....	30
Resumen.....	30
Palabras clave.....	30
Introducción.....	31

Materiales y Métodos .....	32
Resultados.....	35
Discusión .....	45
Bibliografía.....	48
Discusión General .....	52
Conclusiones Generales.....	53
Recomendaciones Generales .....	54

## Lista de Cuadros

### Artículo I

Cuadro 1. Especies de plantas utilizadas por familia y hábito. ....	16
Cuadro 2. Efecto larvicida producido por extractos etanólicos de plantas a 100 ppm sobre larvas de la sepa Rockefeller del mosquito <i>A. aegypti</i> . ....	19
Cuadro 3. Datos de LC <sub>50</sub> y LC <sub>90</sub> expresados como partes por mil (mg/mL) para los extractos etanólicos evaluados en larvas de <i>A. aegypti</i> . ....	21

### Artículo II

Cuadro 1. Gradiente en fase reversa de HPLC empleado en la separación cromatográfica de los metabolitos secundarios presentes en los extractos crudos de <i>I. cairica</i> . ....	34
Cuadro 2. Actividad larvicida del extracto etanólico del tallo y las hojas de <i>I. cairica</i> . ....	35
Cuadro 3. Actividad larvicida del extracto etanólico y su fraccionamiento de polaridad creciente en CC. ....	36
Cuadro 4. Actividad larvicida de la F.DCM y sus fracciones secundarias (1, 2 y 3) obtenidas por CCF-preparativa. ....	38
Cuadro 5. Resultados de la actividad larvicida de la F.DCM y del extracto crudo de Et. ...	38
Cuadro 6. Evaluación larvicida de los compuestos puros escopoletina y umbeliferona y de una combinación de ambos, aislados de la planta <i>I. cairica</i> . Prueba realizada con 4 réplicas homogéneas con un n= 80 de larvas. ....	45

## Lista de Figuras

### Artículo I

Figura 1. Gráfica de análisis PROBIT entre la respuesta logarítmica en base 10 de la concentración en ppm de los extractos etanólicos de las plantas evaluadas versus la mortalidad expresada en unidades PROBIT..... 20

### Artículo II

Figura 1. Cromatografía de capa fina de las fracciones evaluadas en cuanto a la actividad larvicida de los fraccionamientos mostrados en el cuadro 3, reveladas con luz UV a 365nm (A) y con KOH en etanol (B). 1: Extracto crudo en Et, 2: F. He, 3: F.DCM, 4: F. Ac, 5: F. Me..... 37

Figura 2. Gráfico de concentración de muestra contra porcentaje de mortalidad observadas en la FDCM y en el EC-Et en azul y amarillo respectivamente, en rojo y en verde se observa la mortalidad esperada utilizando intervalos de confianza del 95,0%..... 39

Figura 3. Cromatografía de capa fina corrida eluida con tolueno:éter (1:1) saturada con ácido acético al 10% y revelada con KOH al 5% en etanol donde E.C. Et.: Extracto crudo en etanol, Esc.: Patrón de escopoletina, Umb.: Patrón de umbeliferona y F.DCM: Fracción secundaria de diclorometano. .... 40

Figura 4. Cromatograma en fase reversa de HPLC-DAD de la F.DCM obtenido a dos longitudes de onda, 280nm y 343nm..... 41

Figura 5. Cromatograma en fase reversa de HPLC-DAD del primer compuesto purificado a dos longitudes de onda, 280nm y 343nm. .... 42

Figura 6. Cromatograma en fase reversa de HPLC-DAD del segundo compuesto purificado a dos longitudes de onda, 280nm y 343nm. .... 42

Figura 7. Cromatograma en fase reversa de HPLC-DAD de la F.DCM activa (A), patrón de escopoletina (B) y patrón de umbeliferona (C) a dos longitudes de onda, 280 y 343 nm.... 43

Figura 8. Espectro de masas del ion molecular de la cumarina umbeliferona. .... 44

Figura 9. Espectro de masas con el ion molecular de la cumarina escopoletina..... 44

## **Lista de Abreviaturas**

Ac: Acetona

CC: Cromatografía de columna

CCF: Cromatografía de capa fina

DAD: Detector de arreglo de diodos

DCM: Diclorometano

EC-Et: Extracto crudo de Etanol

Et: Etanol

He: Hexano

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

IC: Intervalo de confianza

Me: Metanol

MIV: Manejo integrado de vectores

MS: Espectrometría de masas

NP: Nervio principal

S: Semillas

## Descriptores

*Aedes aegypti*, cumarinas, metabolitos secundarios, actividad larvicida, *I. cairica*,

## Introducción General

El mosquito *Aedes aegypti* se encuentra ampliamente distribuido, principalmente en las zonas tropicales y sub-tropicales. Su presencia se ve favorecida por el clima que impera en bosques lluviosos tropicales, los cuales se han ido urbanizado paulatinamente con el paso de los años (Calderón y Troyo, 2016; Rickard, 1960). Adicionalmente, el aumento de temperatura debido al cambio climático ha favorecido que el mosquito amplíe su rango de distribución y colonice nuevas áreas (Bhatt et al., 2013).

El *A. aegypti*, que originalmente deposita sus huevos en huecos de árboles y fosas naturales, ha mostrado un sinantropismo conforme los asentamientos urbanos han ido reemplazando el bosque (Calderón, 2016). Diversas características fisiológicas y biológicas, además de la cercanía de este mosquito hematófago, específicamente las hembras, con los seres humanos lo ha convertido en un vector de enfermedades tropicales virales como dengue, Zika, chikungunya, fiebre amarilla y Mayaro (Paniz Mondolfi et al., 2016), siendo los casos de dengue mayoritarios en Costa Rica. En el año 2020 se reportaron en el país 121 casos de Zika, 9438 casos de dengue y 49 casos de chikungunya (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2020).

En la lucha contra estas enfermedades, las instituciones del Sistema Nacional de Salud implementan el Manejo Integrado de Vectores (MIV), el cual se basa en la aplicación de un conjunto de métodos de control vectorial, químicos o no químicos, que han sido eficaces para prevenir o minimizar la diseminación de los artrópodos (OPS, 2019). El control químico de *A. aegypti*, se ha realizado en con diferentes tipos de plaguicidas, entre ellos: piretroides, organofosforados, organoclorados y carbamatos (Hasan et al., 2015). Actualmente se utilizan larvicidas y adulticidas para el control de dos de los estadios biológicos del vector, los primeros se agregan al agua del criadero y los segundos se aplican por fumigación cuyo se presentan brotes epidémicos. La aplicación de estos debe realizarse con conocimiento adecuado de los hábitos de la especie transmisora y llevar a cabo una vigilancia de la susceptibilidad del vector a los productos utilizados con la finalidad de detectar de manera temprana la aparición de resistencia a los mismos (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2010).

El uso indiscriminado, intensivo y prolongado de recursos químicos para el control de este vector ha culminado, en algunos países, en la pérdida de efectividad debido al desarrollo de resistencia en muchas de las poblaciones vectoriales (Linás et al., 2010). Asimismo, este tipo de productos deben ser manejados por personal capacitado debido a su alta peligrosidad para la salud pública. Aunado a ello, los residuos pueden quedar en el ambiente ya que son persistentes y tienden a bioacumularse en los ecosistemas, por lo tanto, son fuente de contaminación ambiental (Greenop et al., 2020). Estas y otras problemáticas han motivado mundialmente el interés de desarrollar estrategias alternativas como la búsqueda de nuevos insecticidas para el control de vectores (Guruprasad y Pasha, 2015). Por esta razón, se ha generado una necesidad urgente y globalizada de nuevos abordajes para el control de plagas mediante el uso de nuevos insecticidas con precios asequibles, menos tóxicos a mamíferos y menos nocivos para el ambiente y ecosistemas en general. En este sentido, los extractos de plantas representan una alternativa viable debido a que, entre otras cosas, son biodegradables y presentan pocos efectos adversos en el medio ambiente (Muñoz V. et al., 2014). Estas características, sumadas a la gran riqueza de especies de flora, han dado pie a investigaciones con el propósito de identificar extractos, principalmente de aceites esenciales, que posean actividad insecticida (Ahbirami et al., 2014; Boehme et al., 2008; Cáceres et al., 1998; Evans y Raj, 1991; Gutiérrez et al., 2007; Jirovetz et al., 2007; Karmegam et al., 1997; Núñez et al., 2005; Prajapati et al., 2005; Quijano et al., 2014; Rajesh et al., 2017; Rey y Lounibos, 2015; Setzer et al., 2007).

En Costa Rica se han realizado diversos estudios sobre insecticidas naturales, sin embargo, estas investigaciones se desarrollaron para el control de plagas de cultivos y de sistemas agroforestales (Ahbirami et al., 2014; Dua et al., 2009; George et al., 2014; Hoffman et al., 2003; Leyva et al., 2008; Leyva-Silva et al., 2017; Oscar et al., 2009), a pesar de ello, no se conocen investigaciones sobre extractos naturales de plantas encontradas en Costa Rica para el control de vectores de enfermedades tropicales.

Debido a lo anterior, este estudio tuvo como objetivos evaluar la actividad larvicida de extractos etanólicos de plantas encontradas comúnmente en Costa Rica, así como identificar los componentes que producen la actividad larvicida en las fracciones de extractos etanólicos de tallos de *I. cairica*.

## Bibliografía

- Ahbirami, R., Zuharah, W. F., Thiagaletchumi, M., Subramaniam, S. y Sundarasekar, J. (2014). Larvicidal efficacy of different plant parts of railway creeper, *Ipomoea cairica* extract against dengue vector mosquitoes, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) y *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Science*, 14(180).
- Álvarez, V., Herrero, M., Rodríguez, G. y Arguello, S. (2021). *Actividad insecticida de extractos etanólicos de plantas sobre larvas de Aedes aegypti*. Manuscrito no publicado.
- Amariles Barrera, S., García Pajón, C. y Parra Henao, G. (2013). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera: Culicidae. *Revista CES Medicina*, 27(2), 193–203.
- Araya, M., Carvajal, Y., Álvarez, V., Orozco, R. y Rodríguez, G. (2017). Polyphenol characterization of three varieties of Blackberry fruits (*Rubus adenotrichos*), cultivated in Costa Rica. *Journal of Berry Research*, 7, 97–107.
- Arora, S., Kumar, D. y Shiba. (2013). Phytochemical, antimicrobial and antioxidant activities of methanol extract of leaves and flowers of *Ipomoea Cairica*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 198–202.
- Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., Moyes, C., Drake, J., Brownstein, J., Hoen, A., Sankoh, O., Myers, M., George, D., Jaenisch, T., Wint, G., Simmons, C., Scott, T., Farrar, J. y Hay, S. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446), 504–507.
- Bisset, J. A., Marin, R., Rodríguez, M. M., Severson, D. W., Ricardo, Y., French, L., Diaz, M. y Pérez, O. (2013). Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *J Med Entomol*, 50(2), 352–361.
- Boehme, A. K., Noletto, J. A., Haber, W. A. y Setzer, W. N. (2008). Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Research*, 22(1), 31–36.

- Bull, J. P. y Fisher, A. J. (1954). A study of mortality in a burns unit: a revised estimate. *Annals of Surgery*, 139(3), 269–274.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I., Maki, J., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I. y Maki, J. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 195–202.
- Calderón, Ó. (2016). Transmisión vectorial en mosquitos sinantrópicos. *Enfermedades Tropicales III*.
- Calderón, Ó. y Troyo, A. (2016). Evaluación de la resistencia a insecticidas en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de la Región Caribe de Costa Rica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(1).
- Calderón-Arguedas, Ó. y Troyo, A. (2014). Perfil de resistencia a insecticidas en una cepa de *Aedes aegypti* (Linnaeus) de la región Caribe de Costa Rica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3), 351–359.
- Carpinella, M. C., Ferrayoli, C. G. y Palacios, S. M. (2005). Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2922–2927.
- Chariandy, C., Seaforth, C., Phelps, R., Pollard, G. y Khambay, B. (1999). Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 265–270.
- Dorta, E., Lobo, M. G. y González, M. (2012). Reutilization of mango byproducts: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 77(1).
- Dua, V. K., Pandey, A. C., Raghavendra, K., Gupta, A., Sharma, T. y Dash, A. P. (2009). Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal*, 8, 124.

- Evans, D. A. y Raj, R. K. (1991). Larvicidal efficacy of Quassin against *Culex quinquefasciatus*. *The Indian Journal of Medical Research*, 93, 324–327.
- Ferreira, A. A., Amaral, F. A., Duarte, I. D. G., Oliveira, P. M., Alves, R. B., Silveira, D., Azevedo, A. O., Raslan, D. S. y Castro, M. S. A. (2006). Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1–2), 148–153.
- George, D. R., Finn, R. D., Graham, K. M. y Sparagano, O. A. (2014). Present and future potential of plant-derived products to control arthropods of veterinary and medical significance. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–12.
- González, M. (2021). *Informe de vigilancia de Arbovirus basada en laboratorio: Análisis de datos de virus Zika, Dengue, Chikungunya, Mayaro y Fiebre Amarilla Costa Rica* (Issue 2020).
- Greenop, A., Cook, S. M., Wilby, A., Pywell, R. F. y Woodcock, B. A. (2020). Invertebrate community structure predicts natural pest control resilience to insecticide exposure. *Journal of Applied Ecology*, 1365-2664.13752.
- Guruprasad, B. y Pasha, A. (2015). Biological screening of *Clerodendron inerme* leaf extracts for repellency and toxicity potentials against stored product insects. *Munis Entomology & Zoology*, 10(2), 407–416.
- Gutiérrez, O., Arenas, J., Barrera, M. y Martínez, J. (2007). Actividad insecticida de extractos de *Bocconia frutescens* L. sobre *Hypothenemus hampei* f. *Scientia et Technica*, 1(33).
- Hasan, H. A., Jaal, Z., Ranson, H. y McCall, P. (2015). Pyrethroid and Organophosphate Susceptibility Status of *Aedes Aegypti* (Linnaeus) and *Aedes Albopictus* (Skuse) in Penag, Malaysia. *International Journal of Entomological Research*, 03(03), 91–95.
- Haziqah-Rashid, A., Chen, C. D., Lau, K. W., Low, V. L., Sofian-Azirun, M., Suana, I. W., Harmonis, H., Syahputra, E., Razak, A., Chin, A. C. y Azidah, A. A. (2019). Monitoring insecticide resistance profiles of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Sunda Islands of Indonesia based on diagnostic doses of larvicides. *Journal of Medical Entomology*, 56(2), 514–518.

- Hildebert, W. y Sabine, B. (1996). Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. In *The Cambridge Companion to Wittgenstein, Second Edition* (Segunda Ed). Springer.
- Hoffman, D., Rattner, B., Burton, A. y Cairns, J. (2003). *Handbook of Ecotoxicology* (D. Hoffman, B. Rattner, A. Burton, & J. Cairns, Eds.; Segunda). Lewis Publisher.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A. y Schmidt, E. (2007). Spice plants: Chemical composition and antioxidant properties of *Pimenta Lindl* essential oils, part 1: *Pimenta doica* (L.) Merr. leaf oil from Jamaica. *Ernährung*, 31(7/8), 293.
- Karmegam, N., Sakthivadivel, M., Anuradha, V. y Daniel, T. (1997). Indigenous-plant extracts as larvicidal agents against *Culex quinquefasciatus* Say. *Bioresource Technology*, 59(2–3), 137–140.
- Keziah, E. A., Nukenine, E. N., Yingyang Danga, S. P. y Esimon, C. O. (2016). Synergistic Activity of a Mixture of *Lantana camara* and *Ocimum gratissimum* Leaves Extracts against *Aedes aegypti* Larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of Mosquito Research*, 6(23), 1–10.
- Kim, S. y Ahn, Y. J. (2017). Larvicidal activity of lignans and alkaloid identified in *Zanthoxylum piperitum* bark toward insecticide susceptible and wild *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, 10(1).
- Kishore, N., Mishra, B., Tiwari, V. y Tripathi, V. (2011a). A review on natural products with mosquitosidal potentials. *Research Signpost Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 37661(2), 335–365.
- Kishore, N., Mishra, B., Tiwari, V. y Tripathi, V. (2011b). A review on natural products with mosquitosidal potentials. *Research Signpost Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 37661(2), 335–365.
- Leal, A., de Oliveira, A., Santos, R., Soares, J., Lavor, E., Pontes, M., Lima, J., Santos, A., Tomaz, J., Oliveira, G., Neto, F., Lopes, N., Rolim, L. y Almeida, J. (2020).

- Determination of phenolic compounds, in vitro antioxidant activity and characterization of secondary metabolites in different parts of *Passiflora cincinnata* by HPLC-DAD-MS/MS analysis. *Natural Product Research*, 34(7), 995–1001.
- Leyva, M., Tacoronte, J., Marquetti, M., Scull, R., Montada, D., Rodríguez, Y. y Bruzón, R. (2008). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 60(1), 78–82.
- Leyva, M., French, L., Pino, O., Montada, D., Morejón, G. y Marquetti, M. (2017). Plantas con actividad insecticida: una alternativa natural contra mosquitos. *Revista Biomédica*, 28(3), 139–181.
- Lima, O. y Braz-Filho, R. (1997). Dibenzylbutyrolactone lignans and coumarins from *Ipomoea cairica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 8(3), 235–238.
- Liu, M., Cai, Q. X., Liu, H., Zhang, B. H., Yan, J. y Yuan, Z. (2002). Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 374–379.
- Llinás, G., Seccacin, E., Gardenal, C. y Licastro, S. (2010). Current resistance status to temephos in *Aedes aegypti* from different regions of Argentina. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(1), 113–116.
- Lounibos, L. y Kramer, L. (2016). Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and vectorial capacity for chikungunya virus. *Journal of Infectious Diseases*, 214(Suppl 5), S453–S458.
- Manjarres-Suarez, A. y Olivero-Verbel, J. (2013). Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 22(1), 68–75.
- Meira, M., da Silva, E., David, J. y David, J. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: Traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(3), 682–713.
- Mercolini, L., Mandrioli, R., Ferranti, A., Sorella, V., Protti, M., Epifano, F., Curini, M. y Raggi, M. A. (2013). Quantitative evaluation of auraptene and umbelliferone,

- chemopreventive coumarins in citrus fruits, by HPLC-UV-FL-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1694–1701.
- Ministerio de Salud de Costa Rica. (2010). Lineamientos Nacionales para el Control del Dengue Costa Rica. In *Ministerio de Salud de Costa Rica*.
- Ministerio de Salud de Costa Rica. (2020). *Análisis de situación de salud*. Análisis de Situación de Salud.
- Mora, S., Castro, V., Chavarría, M., Murillo, R. y Poveda, L. (2011). Chemical constituents from *Zanthoxylum setulosum* (Rutaceae). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 10(2), 155–158.
- Muñoz V., Staschenko, E. y Ocampo D. (2014). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2), 198–202.
- Murugan, K., Mahesh Kumar, P., Kovendan, K., Amerasan, D., Subrmaniam, J. y Hwang, J. (2012). Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 111(4), 1757–1769.
- Najafabadi, N., Sahari, M., Barzegar, M. y Hamidi, Z. (2020). Role of Extraction Conditions in the Recovery of Some Phytochemical Compounds of the Jujube Fruit. In *J. Agr. Sci. Tech* (Vol. 22, Issue 2).
- Núñez, V., Castro, V., Murillo, R., Ponce-Soto, L., Merfort, I. y Lomonte, B. (2005). Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry*, 66(9), 1017–1025.
- OMS. (1981). *Instruction for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides-diagnostic test*. World Health Organization WHO/VBC/81.807.

- OMS. (2004). *Global strategic framework for integrated vector management. WHO/CDS/CPE/PVC/2004.*
- OMS. (2009). Dengue Guías Para El Diagnóstico, Tratamiento, Prevención Y Control. In *OMS Y Programa Especial Para Investigacion Y Capacitacion De Enfermedades Tropicales* (Vol. 1).
- OMS. (2017). *Respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030* (Vol. 2030).
- OPS. (2019). Documento operativo de aplicación del manejo integrado de vectores adaptado al contexto de las Américas. In *Documento operativo de aplicación del manejo integrado de vectores adaptado al contexto de las Américas.*
- OPS/OMS. (2019). *Organización Panamericana de la Salud.* 2019.
- OPS/OMS. (2020). *Organización Panamericana de la Salud.* Reported Cases of Dengue Fever in the Americas by Contry or Territory, Cumulative Cases.
- Oscar, M., Henao, L. y Niño, J. (2009). Evaluación de la actividad insecticida in vitro de extractos vegetales contra la broca del café. *Recursos Naturales y Ambiente*, 58, 45–50.
- Paniz Mondolfi, A., Rodríguez Morales, A., Blohm, G., Marquez, M. y Villamil Gomez, W. E. (2016). ChikDenMaZika Syndrome: The challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 1–4.
- Paniz-Mondolfi, A. , Rodríguez-Morales, A., Blohm, G., Marquez, M. y Villamil-Gomez, W. E. (2016). ChikDenMaZika Syndrome: The challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 1–4.
- Parra, J., Hernández, P., Ocampo-Maroto, F., Álvarez-Valverde, V., Carvajal-Miranda, Y., Rodríguez-Rodríguez, G. y Herrera, C. (2018). Phytochemical characterization and antioxidant profile of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) varieties grown in Costa Rica. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 6(6), 448–457.

- Páska, C., Innocenti, G., Kunvári, M., László, M. y Szilágyi, L. (1999). Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. *Phytochemistry*, 52(5), 879–883.
- Patar, A., Hassan, W. y Yusof, F. (2015). Acute toxicity of malathion, dichlorvos and temephos in climbing perch (*Anabas testudineus*). *Malaysian Applied Biology*, 44(3), 37–42.
- Patel, K. y Patel, D. K. (2018). Health benefits of quassin from *Quassia amara*: A comprehensive review of their ethnopharmacological importance, pharmacology, phytochemistry and analytical aspects. *Current Nutrition & Food Science*, 16(1), 35–44.
- Patterson, J., Sammon, M. y Garg, M. (2016). Dengue, zika and chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. *Western Journal of Emergency Medicine*, 17(6), 671–679.
- Pinto, C., Menezes, J., Melo, D. y Feitosa, C. (2016). Chemical Composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Croton jacobinensis* Baill. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15(2), 122–127.
- Prabha, I. y Nagarajan, N. (2016). Synthesis, anti-larvicidal and anti-bacterial studies of 7-hydroxy-4-methylcoumarin, 7-acetoxy-4-methylcoumarin, 8-acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin, resacetophenone, 8-acetyl-5-hydroxy-4-methylcoumarin and 4, 7-dimethylcoumarin. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 9(4), 423–429.
- Prajapati, V., Tripathi, A., Aggarwal, K. y Khanuja, S. (2005). Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology*, 96(16), 1749–1757.
- Quijano, M., Riera Ruíz, C., Barragán, A., Miranda, M., Orellana, T. y Manzano, P. (2014). Molluscicidal activity of the aqueous extracts from *Solanum mammosum* L., *Sapindus saponaria* L. and *Jatropha curcas* L. against *Pomacea canaliculata*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(10), 871–877.

- Rajesh, A., Shamsudin, M. y Rajesh, C. (2017). Evaluation of ovicidal and larvicidal potential of *Kalanchoe pinnata* leaf extracts against filarial mosquito vector, *Culex quinquefasciatus*. *International Journal of Mosquito Research IJMR*, 4(42), 142–147.
- Rangiah, K. y Gowda, M. (2019). *Method to Quantify Plant Secondary Metabolites: Quantification of Neem Metabolites from Leaf, Bark, and Seed Extracts as an Example* (pp. 21–30). Springer, Cham.
- Rey, J. y Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y la transmisión de enfermedades. *Biomédica*, 35(2), 1–27.
- Rickard, C. (1960). *The Yellow Fever Mosquito: Its life history, bionomics and Structure*. THE SYNDICS OF THE CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS.
- Rollinger, J., Hornick, A., Langer, T., Stuppner, H. y Prast, H. (2004). Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(25), 6248–6254.
- Setzer, W., Stokes, S., Bansal, A., Haber, W. A., Caffrey, C. , Hanseir, E. y McKerrow, J. (2007). Chemical composition and cruzain inhibitory activity of *Croton draco* bark essential oil from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*, 2(6), 685–689.
- Srivastava, D. y Shukla, K. (2015). *Ipomoea cairica*: a medicinal weed with promising health benefits. In *International Journal of Information Research and Review* (Vol. 2).
- Vargas, K., Troyo, A. y Calderón, Ó. (2019). Resistance of *Aedes aegypti* Diptera: Culicidae to organophosphate and pyrethroid insecticides in Orotina, Alajuela, Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 28(1), 15–24.
- Wang, Z., Kim, J., Wang, M., Shu, S. y Ahn, Y. (2012). Larvicidal activity of *Cnidium monnieri* fruit coumarins and structurally related compounds against insecticide-susceptible and insecticide-resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. *Pest Management Science*, 68(7), 1041–1047.

Yu, B., Luo, J., Wang, J., Zhang, D., Yu, S. y Kong, L. (2013). Pentasaccharide resin glycosides from *Ipomoea cairica* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*, 95, 421–427.

# Artículo I

## Actividad insecticida de extractos etanólicos de plantas sobre larvas de *Aedes aegypti*.

Víctor Álvarez Valverde<sup>1</sup>,

Universidad Nacional, Heredia Costa Rica. victor.alvarez.valverde@una.cr

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Veterinarias Tropicales, Universidad Nacional

### Resumen

El mosquito *Aedes aegypti* es vector de enfermedades tropicales como dengue, Zika, fiebre amarilla, Mayaro y chikungunya, que causa millones de casos anuales a nivel mundial. El control de estas enfermedades se realiza principalmente mediante el uso de insecticidas sumamente inespecíficos, como piretroides y organoclorados, cuyo uso inadecuado ha influido en la aparición de poblaciones resistentes. Debido a ello, es importante contar con alternativas químicas naturales que contribuyan a disminuir la población del vector, generando la mínima resistencia y que sean menos tóxicos para los mamíferos, menos nocivos para el ambiente y con precios más asequibles. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad larvicida en *A. aegypti* de extractos etanólicos de plantas encontradas comúnmente en Costa Rica. Para la extracción de las muestras se realizaron tres extracciones con etanol al 95% mediante baño ultrasónico al material seco en horno a 40 °C y molido a 1mm. Se evaluó la actividad larvicida de 26 extractos etanólicos de plantas mediante la metodología descrita por la Organización Mundial de la Salud. Se eligió un total de 6 extractos con la toxicidad más elevada, siendo el extracto de tallos de *I. cairica* el que presentó menor LC<sub>50</sub> con un valor de 0,0341 mg/mL, seguido del extracto de hojas de la misma planta con un valor de LC<sub>50</sub> de 0,121 mg/mL. Este estudio evidencia la actividad larvicida de extractos etanólicos de plantas, principalmente el potencial larvicida de *I. cairica* como una alternativa ambientalmente amigable para el control de *Aedes aegypti*.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, extractos etanólicos, metabolitos secundarios, actividad larvicida, *I. cairica*,

## Introducción

El *Aedes aegypti* es uno de los vectores más importantes en el mantenimiento y la transmisión de virus como chikungunya, Zika, fiebre amarilla, Mayaro y dengue (Paniz-Mondolfi et al., 2016), produciendo este último la arbovirosis emergente más prevalente y peligrosa (Patterson et al., 2016). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS, 2019) en las últimas cuatro décadas los casos de dengue se han incrementado en las Américas y cerca de 500 millones de personas están en riesgo de contraerla. Solo en el año 2020 se contabilizaron más de 1,6 millones de casos en América, de los cuales 9,438 se reportaron en Costa Rica a octubre de ese año (Gonzalez, 2021; OPS/OMS, 2020).

Este incremento en los casos implica un impacto en la salud pública, pero también un alto costo económico para los países, debido a gastos hospitalarios, una menor productividad y menores ingresos en los hogares por incapacidades o muertes, la inversión en equipos para el control vectorial (recurso humano e infraestructura) y al seguimiento y tratamiento de las personas enfermas (OMS, 2017).

El control de vectores es una forma preventiva y eficaz para disminuir la incidencia de las enfermedades transmitidas por artrópodos, así como para impulsar el desarrollo humano y económico (OMS, 2004, 2017). A nivel mundial se ha implementado una estrategia de manejo integrado de vectores mediante la ejecución de diversas técnicas que involucran la participación de los distintos actores de la sociedad, así como estrategias físicas, químicas y biológicas que disminuyen el contacto huésped-vector o controlan el tamaño de la población. En las Américas, el principal método de control implementado ha sido el uso de pesticidas, incluyendo distintos grupos químicos como organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Sin embargo, su uso desmedido, la ausencia de vigilancia en cuanto a dosis utilizadas y la susceptibilidad del vector a los insecticidas, han influido en la aparición de poblaciones resistentes de *A. aegypti* (Lounibos y Kramer, 2016; Manjarres-Suarez y Olivero-Verbel, 2013). Aunado a ello, deben considerarse los posibles efectos nocivos sobre los ecosistemas y la salud pública que puedan derivarse del uso indiscriminado de estos productos químicos (OMS, 2017). Los estudios esporádicos que se han realizado en Costa

Rica no encontraron resistencia en *A. aegypti* a temefós ni a deltametrina, pero sí se encontró resistencia a cipermetrina en una cepa en Orotina (Bisset et al., 2013; Calderón y Troyo, 2016; Calderón-Arguedas y Troyo, 2014; Vargas Miranda et al., 2019). A pesar de esto, es importante contar con alternativas químicas naturales que contribuyan a disminuir la población del vector generando la mínima resistencia y que sean menos tóxicos para los mamíferos, menos nocivos para el ambiente y con precios más asequibles (Leyva 2008). En América, las investigaciones llevadas a cabo con principios activos naturales se han enfocado principalmente en la actividad larvicida y en la repelencia de aceites esenciales, sin embargo, aún no se cuenta con información para Costa Rica (Amariles Barrera et al., 2013; Dua et al., 2009; Hasan et al., 2015; Leyva-Silva et al., 2017; Lounibos y Kramer, 2016; Manjarres-Suarez y Olivero-Verbel, 2013).

Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la actividad larvicida en *A. aegypti* de extractos etanólicos de plantas encontradas comúnmente en Costa Rica.

## **Metodología**

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela Química de la Universidad Nacional de Costa Rica

- *Muestras Vegetales*

Las muestras seleccionadas (cuadro 1) siguieron al menos dos de los siguientes criterios de inclusión: fuentes diversas de metabolitos secundarios, seguimiento de usos etnomédicos de estas plantas para el uso de control biológico de bacterias y/o artrópodos, estar ampliamente distribuida y/o ser asequible en Costa Rica.

**Cuadro 1.** Especies de plantas utilizadas por familia y hábito.

<b>Especie</b>	<b>Familia</b>	<b>Habito</b>
<i>Ipomea cairica</i>	Convolvulaceae	Enredadera
<i>Piper umbelatum</i>	Piperaceae	Hierba
<i>Piper marginatum</i>	Piperaceae	Arbusto
<i>Zanthoxylum setulosum</i>	Rutaceae	Arbóreo
<i>Argemone mexicana</i>	Papaveraceae	Herbácea erecta
<i>Bocconia frutescens</i>	Papaveráceas	Arbusto a árbol pequeño
<i>Quassia amara</i>	Simaroubaceae	Arbusto a árbol pequeño
<i>Neurolaena lobata</i>	Asteraceae	Epífita
<i>Solanum mammosum</i>	Solanaceae	Arbusto
<i>Erythronxylum mucrophillum</i>	Erithroxilaceae	Arbusto
<i>Croton draco</i>	Euphorbiaceae	Hierba o arbusto
<i>Pimienta dioica</i>	Myrtaceae	Árbol
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	Arbusto
<i>Kalanchoe sp.</i>	Crasuláceas	Hierba-Arbusto

Las muestras de tallos, hojas y, en algunos casos, semillas fueron colectadas en la Estación Experimental Quinta Diamante Sociedad de Responsabilidad Limitada, ubicada en Pérez Zeledón, San José. La muestra de *I. cairica* se colectó en el sector de San Miguel de Santo Domingo de Heredia. Todas las muestras fueron colectadas y procesadas bajo el permiso de la CONAGEBIO R-012-2020-OT-CONAGEBIO. Estas muestras fueron secadas en un horno a 40 °C y molidas en un molino eléctrico de cuchillas con un tamiz de 1 mm.

- *Extracción*

Se realizaron tres extracciones con etanol al 95% mediante extracción asistida por ultrasonido, al material seco y molido a 40 °C. El extracto se filtró utilizando papel de filtro Whatman N°1 de filtración media por gravedad. El filtrado colectado se concentró a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio y una temperatura no mayor a 40 °C. Una vez

procesados en rotavapor, los extractos se liofilizaron para trabajar en base seca y asegurar la estabilidad de la muestra. Las muestras secas se pesaron y se prepararon disoluciones homogéneas de concentración conocida de cada uno de los extractos, los cuales se adicionaron a las larvas según se describe en la siguiente sección.

- *Evaluación de la actividad larvicida*

La metodología utilizada fue la descrita por la Organización Mundial de la Salud en el informe WHO/VBC/81.807 para la determinación de actividad larvicida (OMS, 1981). Las larvas utilizadas fueron larvas entre el tercer y cuarto estadio larval de la cepa *Rockefeller* de *A. aegypti*, susceptible a insecticidas. Para procurar homogeneidad fisiológica en cada ensayo, las larvas se obtuvieron a partir de huevos puestos a eclosionar simultáneamente y criadas con las mismas condiciones alimentarias y ambientales. Se establecieron 4 repeticiones por concentración de muestra a evaluar, con alrededor de 20 larvas cada una, y un volumen total de 25 mL. Se utilizó un control positivo con Temefós a una concentración de 50 ppm (mg/L) y un control negativo con agua de tubo des-clorada. La lectura de la mortalidad se efectuó a las 24 horas. Las concentraciones de extractos evaluados inicialmente fueron de 100 ppm. Tomando en cuenta que este es un estudio exploratorio, se decidió utilizar los seis extractos con mayor mortalidad. Para los extractos de las plantas en las que se obtuvo un porcentaje de mortalidad  $\geq 7,9$  %, se procedió a realizar una evaluación de respuesta a diferentes concentraciones partiendo desde 50 ppm hasta 400 ppm. La  $LC_{50}$  y  $LC_{90}$  se obtuvieron mediante un análisis PROBIT utilizando el software XLSTAT versión 2021.2: XLSTAT 2021.2 (Bull y Fisher, 1954).

## **Resultados**

Los resultados de la evaluación de los extractos (100 ppm) de las 13 especies de plantas se muestran en el cuadro 2. Diez de las especies presentaron algún porcentaje de actividad larvicida a las 24 horas. *Ipomea cairica*, *Zanthoxylum setulosum*, *Piper umbelatum*, *Rosmarinus officinalis* y *Kalanchoe sp.* presentaron una mortalidad mayor o igual al 7,9%. *I. cairica* fue la especie que presentó el valor más elevado con una mortalidad del 100%.

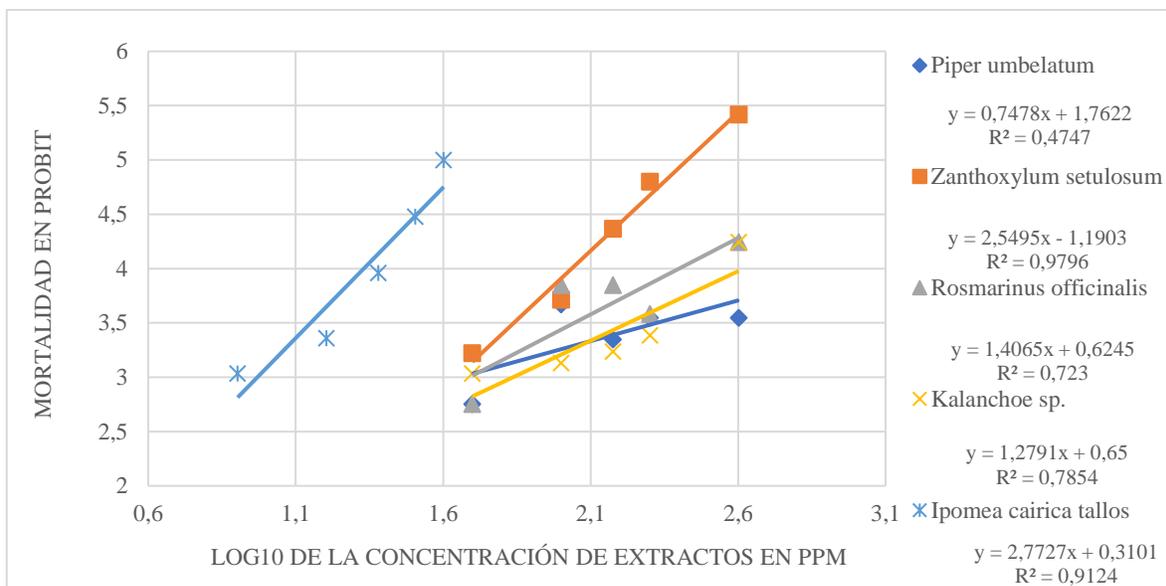
En todas las pruebas, tanto el control positivo con Temefós, como el control negativo con agua, mostraron valores de mortalidad dentro de los valores esperados, aproximadamente de 100% y 0% respectivamente, evidenciando que las condiciones fueron las óptimas en cada una de ellas.

En la figura 1 se muestra la línea de regresión de la mortalidad de las larvas de *A. aegypti* versus el logaritmo (base 10) de la concentración de insecticida natural. Los valores de las pendientes en este tipo de análisis son indicadores del grado de homogeneidad de la respuesta de la población al estímulo. De tal manera que, entre mayor sea la pendiente mayor será la homogeneidad de la población al estímulo (Leyva et al., 2008). La pendiente más elevada la muestra la especie *I. cairica* con un valor de 2,7727, seguida de la especie *Z. setulosum* con un valor de 2,5495. El valor de pendiente que se obtiene en la ecuación de esta gráfica es una herramienta que permite visualizar qué tan amplio puede ser el rango de concentraciones necesarias para que una sustancia con actividad larvicida puede ejercer un determinado efecto de mortalidad. En comparación con pendientes reportadas por otros autores, esta es una pendiente relativamente baja (Amariles Barrera et al., 2013; Leyva et al., 2008).

**Cuadro 2.** Efecto larvicida producido por extractos etanólicos de plantas a 100 ppm sobre larvas de la sepa Rockefeller del mosquito *A. aegypti*.

Muestras	Parte de la Planta*	Larvas Muertas	Larvas Totales	Porcentaje de Mortalidad a las 24 h
<i>Ipomea cairica</i>	H	32	80	40,0 ± 0,0
	T	80	80	100,0 ± 0,0
<i>Piper umbelatum</i>	H	7,0	76,0	9,2 ± 2,6
	T	8,0	81,0	9,9 ± 0,2
<i>Zanthoxylum setulosum</i>	H	8,0	81,0	9,8 ± 3,8
	T	2,0	80,0	2,5 ± 5,0
<i>Argemone mexicana</i>	S	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
	H	4,0	76,0	5,3 ± 0,1
	T	2,0	76,0	2,6 ± 3,0
<i>Bocconia frutescens</i>	NP	1,0	76,0	1,3 ± 2,6
	H	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
	T	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
<i>Quassia amara</i>	H	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
	T	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
<i>Neurolaena lobata</i>	H	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
	T	2,0	76,0	2,6 ± 3,0
<i>Solanum mammosum</i>	H	4,0	76,0	5,3 ± 0,1
	T	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
<i>Erythronxylum mucrophillum</i>	H	1,0	76,0	1,3 ± 2,6
	T	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
<i>Croton draco</i>	H	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
	T	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
<i>Pimienta doica</i>	H	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
	T	0,0	76,0	0,0 ± 0,0
<i>Rosmarinus officinalis</i>	H	6,0	76,0	7,9 ± 3,0
<i>Kalanchoe sp.</i>	H	2,0	76,0	2,6 ± 3,0
Control + (Temefós)		80,0	80,0	100,0 ± 0,0
Control – (agua)		1,0	80,0	1,3 ± 0,5

\*Nota: H: hojas, T: tallos, NP: Nervio Principal, S: Semillas. Los datos de incertidumbre en la mortalidad están determinados por la desviación estándar de la determinación entre las cuatro réplicas realizadas.



**Figura 1.** Gráfica de análisis PROBIT entre la respuesta logarítmica en base 10 de la concentración en ppm de los extractos etanólicos de las plantas evaluadas versus la mortalidad expresada en unidades PROBIT.

Los valores de LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> para los extractos etanólicos valorados se observan en el cuadro 3. La especie *I. cairica* obtuvo un valor de LC<sub>50</sub> más bajo, indicando de esta manera que es el extracto que posee una respuesta de mayor mortalidad a concentraciones menores.

**Cuadro 3.**Datos de LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub> expresados como partes por mil (mg/mL) para los extractos etanólicos evaluados en larvas de *A. aegypti*.

Planta	LC <sub>50</sub> en mg/mL (IC*95%)	LC <sub>90</sub> en mg/mL (IC*95%)	Dosis diagnóstica en mg/mL (IC*95%)
<i>Ipomea cairica</i> (tallos)	0,0341 (0,0293-0,0393)	0,0578 (0,0496-0,0674)	0,978 (0,840-1,140)
<i>Ipomea cairica</i> (hojas)	0,121 (0,089-0,166)	0,337 (0,246-0,462)	3,70 (2,52-4,89)
<i>Zanthoxylum setulosum</i> (hojas)	0,27 (0,18-0,39)	0,85 (0,59-1,23)	24,2 (16,7-34,9)
<i>Rosmarinus officinalis</i> (hojas)	3,4 (1,1-10,3)	36,0 (11,8-109,5)	2709,8 (891,3-8237,1)
<i>Kalanchoe sp.</i> (hojas)	11,1 (2,4-51,6)	320,3 (69,1-1483,2)	54445 (11755-252153)
<i>Piper umbelatum</i> (tallos)	39,6 (6,9-228,5)	3885 (673-22424)	1797603 (311483-10374157)

\*IC: Intervalo de confianza.

## Discusión

La realización de este estudio larvicida reveló la existencia de una respuesta diversa en la mortalidad de larvas del tercer y cuarto estadio de *A. aegypti* de la cepa Rockefeller, al evaluar los extractos etanólicos de plantas a una concentración de 100 mg/mL (ppm). Los porcentajes de mortalidad de los extractos etanólicos de la planta *I. cairica* fueron del 40,0% en hojas y 100% en tallos. Así mismo, los valores de mortalidad del extracto etanólico de *P. doica*, *C. draco* y *Q. amara* fueron de 0,0%, tanto en hojas como en tallos, para la misma concentración en todos los casos. Este comportamiento es un fenómeno esperable dado que la composición química de cada planta, y por ende de cada extracto, es diferente entre sí, generando una variación en la mortalidad de las larvas utilizadas según la presencia de sustancias con efectos larvicidas en el extracto (Jirovetz et al., 2007; Mora et al., 2011; Patel y Patel, 2018; Setzer et al., 2007). Los extractos etanólicos con mayor actividad larvicida son los de *I. cairica*, seguido por *P. umbelatum*, *R. officinalis* y *Kalanchoe sp.* Algunos otros extractos etanólicos produjeron mortalidad en una sola parte de la planta estudiada, entre los que podemos citar

el extracto de *S. mammosum* que presenta una mortalidad del  $5,3 \pm 0,1$  % en el extracto etanólico de las hojas, sin embargo, en el extracto etanólico de sus tallos no presenta mortalidad a la misma concentración. Lo anterior sugiere que las plantas poseen una composición de metabolitos secundarios distintos en cada una de sus partes, tanto en su concentración como en el tipo (Araya et al., 2017; Leal et al., 2020; Rangiah y Gowda, 2019).

Para el caso del *Z. setulosum*, es posible encontrar estudios donde se le atribuye un grado de toxicidad importante, principalmente contra *Artemia salina*, obteniendo un valor de  $LC_{50}=3.9$  mg/mL (Boehme et al., 2008). Estos fueron obtenidos a partir de un extracto por hidrodestilación, con el fin de obtener terpenos, terpenoides y derivados, ya que en dicho estudio pretendían extraer principalmente aceites esenciales y por ende la fracción volátil de la planta. En el presente estudio, se planteó la obtención de una fracción mayoritariamente no volátil debido a que existe una gran cantidad de metabolitos secundarios que no necesariamente son volátiles, como polifenoles, compuestos nitrogenados o alcaloides, y que son responsables de múltiples bioactividades reportadas (Araya et al., 2017; Gutierrez et al., 2007; Parra et al., 2018), existiendo ahí, una diferencia metodológica importante entre ambas investigaciones. Otro aspecto por considerar es que los organismos utilizados para medir la toxicidad son de especies distintas, ambas pertenecientes al *Phylum Artrópoda*, pero se incluyen en órdenes distintos.

El extracto etanólico de la especie *Z. setulosum* posee un valor importante de  $LC_{50}$  siendo este menor que las otras especies evaluadas, sin embargo, el extracto alcohólico de *I. cairica* posee un valor aún más bajo. El valor de dosis diagnóstica (DD) de 0,978 mg/mL para *I. cairica*, es un valor relativamente alto si se compara con las DD reportadas para los insecticidas comerciales como el Temefós ya que estos pueden llegar a alcanzar valores de DD de 1 mg/L (OMS, 2009). A pesar de ello, se debe considerar que este es un extracto crudo, implicando de esta manera que los posibles componentes responsables de la actividad larvicida se encuentran ya sea en pequeñas proporciones dentro del extracto o bien que la combinación de diversos metabolitos genere la actividad de manera sinérgica (Keziah et al., 2016; Liu et al., 2002).

Los resultados del análisis PROBIT muestran que el extracto etanólico de las hojas de *P. umbelatum* posee una pendiente más elevada que los extractos de *R. officinalis* y *Kalanchoe sp.*, sin embargo, el ajuste lineal es el menor ya que un valor  $R^2 = 0,4747$  refleja una menor relación entre los puntos evaluados, indicando de esta manera un pobre ajuste entre concentración y mortalidad en comparación con los últimos dos extractos mencionados. En un análisis PROBIT es importante tomar en cuenta el valor de la pendiente ya que a mayor pendiente se puede apreciar que a menores cambios de concentración se pueden obtener mayores efectos, lo cual significa, para el caso de la figura 1, mayor mortalidad.

Era de esperar que el extracto etanólico de la planta *I. cairica* obtuviera el valor menor tanto para el  $LC_{50}$  como para el  $LC_{90}$  en comparación con los otros extractos etanólicos evaluados, ya que la curva obtenida en el análisis PROBIT muestra un valor de pendiente más elevada con una afectación similar a menores concentraciones de extracto, siendo estos factores los de mayor contribución a la hora de realizar la regresión lineal. Para esta planta se ha reportado la presencia de alcaloides, carbohidratos, taninos, compuestos fenólicos, proteínas, aminoácidos, terpenoides, esteroides, saponinas, lignanos y cumarinas (Arora et al., 2013; Páska et al., 1999), específicamente se ha encontrado que posee dos cumarinas simples: la escopoletina (7-hidroxí-6-metoxícromen-2-nona) y la umbeliferona 7-(hidroxícromen-2-ona) (Lima y Braz-Filho, 1997). Esto es importante ya que diversos autores han podido relacionar la actividad tóxica de extractos naturales con la presencia de cumarinas, por lo que existen indicios del porqué de la actividad reportada en el presente estudio (Ahbirami et al., 2014; Prabha y Nagarajan, 2016; Wang et al., 2012).

Las plantas valoradas en la última etapa (*I. cairica*, *P. umbelatum*, *Z. setulosum*, *R. officinalis* y el *Kalanchoe sp.*), son las que generaron extractos etanólicos con una respuesta larvívica más elevada. Con excepción de *R. officinalis*, estas plantas no poseen un valor comercial significativo, ya que no se utilizan con fines culinarios ni algún otro fin comercial particular.

El uso de extractos naturales con actividad larvívica ofrece una opción a los productos sintéticos comercialmente utilizados, evitando así la presión sobre sistemas biológicos que difícilmente pueden degradar los insecticidas sintéticos, a diferencia de un producto de origen

natural que se reincorporará a los ecosistemas una vez cumplida su función (Greenop et al., 2020).

La utilización de sepas de campo para la realización de pruebas, además de la sepa *Rockefeller*, es de interés epidemiológico debido a que de esta manera se puede valorar si la resistencia cruzada a los principios activos de *I. cairica* es un fenómeno para considerar en Costa Rica (Haziqah-Rashid et al., 2019).

Los resultados de este estudio representan un aporte importante para la generación de conocimiento en la exploración de sustancias naturales con actividad larvicida ya que no hay estudios que aborden la evaluación larvicida de extractos no volátiles de plantas, siendo que el principal abordaje que se ha realizado es la evaluación de aceites esenciales, por lo que se deja de lado los compuestos que no son posibles extraer por los métodos de hidrodestilación convencionales y que han sido responsables, en diversos casos, de bioactividades reportadas (Boehme et al., 2008; Muñoz V. et al., 2014; Pinto et al., 2016). Este estudio evidencia la actividad larvicida de extractos etanólicos de plantas, principalmente el potencial larvicida de *I. cairica* como una alternativa ambientalmente amigable para el control de *Aedes aegypti*.

## **Bibliografía**

- Ahbirami, R., Zuharah, W. F., Thiagaletchumi, M., Subramaniam, S. y Sundarasekar, J. (2014). Larvicidal efficacy of different plant parts of railway creeper, *Ipomoea cairica* extract against dengue vector mosquitoes, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Science*, 14(180).
- Amariles Barrera, S., García Pajón, C. y Parra Henao, G. (2013). Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera: Culicidae. *Revista CES Medicina*, 27(2), 193–203.
- Araya, M., Carvajal, Y., Álvarez, V., Orozco, R. y Rodríguez, G. (2017). Polyphenol characterization of three varieties of Blackberry fruits (*Rubus adenotrichos*), cultivated in Costa Rica. *Journal of Berry Research*, 7, 97–107.

- Arora, S., Kumar, D. y Shiba. (2013). Phytochemical, antimicrobial and antioxidant activities of methanol extract of leaves and flowers of *Ipomoea Cairica*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 198–202.
- Bisset, J. A., Marín, R., Rodríguez, M. M., Severson, D. W., Ricardo, Y., French, L., Diaz, M. y Pérez, O. (2013). Insecticide resistance in two *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strains from Costa Rica. *J Med Entomol*, 50(2), 352–361.
- Boehme, A. K., Noletto, J. A., Haber, W. A. y Setzer, W. N. (2008). Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Research*, 22(1), 31–36.
- Bull, J. P. y Fisher, A. J. (1954). A study of mortality in a burns unit: a revised estimate. *Annals of Surgery*, 139(3), 269–274.
- Calderón, Ó. y Troyo, A. (2016). Evaluación de la resistencia a insecticidas en cepas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de la Región Caribe de Costa Rica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(1).
- Calderón-Arguedas, Ó. y Troyo, A. (2014). Perfil de resistencia a insecticidas en una cepa de *Aedes aegypti* (Linnaeus) de la región Caribe de Costa Rica. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3), 351–359.
- Dua, V. K., Pandey, A. C., Raghavendra, K., Gupta, A., Sharma, T. y Dash, A. P. (2009). Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal*, 8, 124.
- González, M. (2021). *Informe de vigilancia de Arbovirus basada en laboratorio: Análisis de datos de virus Zika, Dengue, Chikungunya, Mayaro y Fiebre Amarilla Costa Rica* (Issue 2020).
- Greenop, A., Cook, S. M., Wilby, A., Pywell, R. F. y Woodcock, B. A. (2020). Invertebrate community structure predicts natural pest control resilience to insecticide exposure. *Journal of Applied Ecology*, 1365-2664.13752.
- Gutierrez, O., Arenas, J., Barrera, M. y Martínez, J. (2007). Actividad insecticida de extractos de *Bocconia frutescens* l. sobre *Hypothenemus hampei* F. *Scientia et Technica*, 1(33).

- Hasan, H. A., Jaal, Z., Ranson, H. y McCall, P. (2015). Pyrethroid and organophosphate susceptibility status of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes Albopictus* (Skuse) in Penang, Malaysia. *International Journal of Entomological Research*, 03(03), 91–95.
- Haziqah-Rashid, A., Chen, C. D., Lau, K. W., Low, V. L., Sofian-Azirun, M., Suana, I. W., Harmonis, H., Syahputra, E., Razak, A., Chin, A. C. y Azidah, A. A. (2019). Monitoring insecticide resistance profiles of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the Sunda Islands of Indonesia based on diagnostic doses of larvicides. *Journal of Medical Entomology*, 56(2), 514–518.
- Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A. y Schmidt, E. (2007). Spice plants: Chemical composition and antioxidant properties of *Pimenta Lindl* essential oils, part 1: *Pimenta doica* (L.) Merr. leaf oil from Jamaica. *Ernährung*, 31(7/8), 293.
- Keziah, E. A., Nukenine, E. N., Yingyang Danga, S. P. y Esimon, C. O. (2016). Synergistic Activity of a Mixture of *Lantana camara* and *Ocimum gratissimum* Leaves Extracts against *Aedes aegypti* Larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of Mosquito Research*, 6(23), 1–10.
- Leal, A., de Oliveira, A., Santos, R., Soares, J., Lavor, E., Pontes, M., Lima, J., Santos, A., Tomaz, J., Oliveira, G., Neto, F., Lopes, N., Rolim, L. y Almeida, J. (2020). Determination of phenolic compounds, in vitro antioxidant activity and characterization of secondary metabolites in different parts of *Passiflora cincinnata* by HPLC-DAD-MS/MS analysis. *Natural Product Research*, 34(7), 995–1001.
- Leyva, M., Tacoronte, J., Marquetti, M., Scull, R., Montada, D., Rodríguez, Y. y Bruzón, R. (2008). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas en larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 60(1), 78–82.
- Leyva-Silva, M. I., French, L., Pino, O., Montada, D., Morejón, G. y Marquetti, M. del C. (2017). Plantas con actividad insecticida: una alternativa natural contra mosquitos. *Revista Biomédica*, 28(3), 139–181.
- Lima, O. y Braz-Filho, R. (1997). Dibenzylbutyrolactone lignans and coumarins from *Ipomoea cairica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 8(3), 235–238.

- Liu, M., Cai, Q. , Liu, H. , Zhang, B., Yan, J. y Yuan, Z. (2002). Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 374–379.
- Lounibos, L. P. y Kramer, L. D. (2016). Invasiveness of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and vectorial capacity for chikungunya virus. *Journal of Infectious Diseases*, 214(Suppl 5), S453–S458.
- Manjarres-Suarez, A. y Olivero-Verbel, J. (2013). Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 22(1), 68–75.
- Mora, S., Castro, V., Chavarría, M., Murillo, R. y Poveda, L. (2011). Chemical constituents from *Zanthoxylum setulosum* (Rutaceae). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 10(2), 155–158.
- Muñoz V., J. A., Staschenko, E. y Ocampo D., C. B. (2014). Actividad insecticida de aceites esenciales de plantas nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 40(2), 198–202.
- OMS. (1981). *Instruction for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides-diagnostic test*. World Health Organization WHO/VBC/81.807.
- OMS. (2004). *Global strategic framework for integrated vector management*. WHO/CDS/CPE/PVC/2004.
- OMS. (2009). Dengue: Guías Para El Diagnóstico, Tratamiento, Prevención Y Control. En *OMS y Programa Especial Para Investigación y Capacitación de Enfermedades Tropicales* (Vol. 1).
- OMS. (2017). *Respuesta mundial para el control de vectores 2017-2030* (Vol. 2030).
- OPS/OMS. (2019). *Organización Panamericana de la Salud*. 2019.
- OPS/OMS. (2020). *Organización Panamericana de la Salud*. Reported Cases of Dengue Fever in the Americas by Contry or Territory, Cumulative Cases.

- Paniz-Mondolfi, A. E., Rodríguez-Morales, A. J., Blohm, G., Marquez, M. y Villamil-Gomez, W. E. (2016). ChikDenMaZika Syndrome: The challenge of diagnosing arboviral infections in the midst of concurrent epidemics. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 1–4.
- Parra, J., Hernández, P., Ocampo-Maroto, F., Álvarez-Valverde, V., Carvajal-Miranda, Y., Rodríguez-Rodríguez, G. y Herrera, C. (2018). Phytochemical characterization and antioxidant profile of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) varieties grown in Costa Rica. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 6(6), 448–457.
- Páska, C., Innocenti, G., Kunvári, M., László, M. y Szilágyi, L. (1999). Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. *Phytochemistry*, 52(5), 879–883.
- Patel, K. y Patel, D. K. (2018). Health benefits of quassin from *Quassia amara*: A comprehensive review of their ethnopharmacological importance, pharmacology, phytochemistry and analytical aspects. *Current Nutrition & Food Science*, 16(1), 35–44.
- Patterson, J., Sammon, M. y Garg, M. (2016). Dengue, zika and chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. *Western Journal of Emergency Medicine*, 17(6), 671–679.
- Pinto, C., Menezes, J., Melo, D. y Feitosa, C. (2016). Chemical Composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Croton jacobinensis* Baill. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15(2), 122–127.
- Prabha, I. y Nagarajan, N. (2016). Synthesis, anti-larvicidal and anti-bacterial studies of 7-hydroxy-4methylcoumarin, 7-acetoxy-4-methylcoumarin, 8-acetyl-7-hydroxy-4methylcoumarin, resacetophenone, 8-acetyl-5-hydroxy-4-methylcoumarin and 4, 7-dimethylcoumarin. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 9(4), 423–429.
- Rangiah, K. y Gowda, M. (2019). *Method to Quantify Plant Secondary Metabolites: Quantification of Neem Metabolites from Leaf, Bark, and Seed Extracts as an Example* (pp. 21–30). Springer, Cham.

- Setzer, W., Stokes, S., Bansal, A., Haber, W. , Caffrey, C., Hanseir, E. y McKerrow, J. (2007). Chemical composition and cruzain inhibitory activity of *Croton draco* bark essential oil from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*, 2(6), 685–689.
- Vargas, K., Troyo, A. y Calderón, Ó. (2019). Resistance of *Aedes aegypti* Diptera: Culicidae to organophosphate and pyrethroid insecticides in Orotina, Alajuela, Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 28(1), 15–24.
- Wang, Z., Kim, J., Wang, M., Shu, S. y Ahn, Y. (2012). Larvicidal activity of *Cnidium monnieri* fruit coumarins and structurally related compounds against insecticide-susceptible and insecticide-resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. *Pest Management Science*, 68(7), 1041–1047.

## Artículo II

### Estudio fitoquímico bio-guiado de extractos de *Ipomoea cairica* con actividad larvicida en *Aedes aegypti*

Víctor Álvarez Valverde<sup>1</sup> victor.alvarez.valverde@una.cr

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Veterinarias Tropicales, Universidad Nacional

#### Resumen

Las enfermedades vectoriales, como las transmitidas por el *A. aegypti*, son una amenaza constante para los habitantes de las zonas tropicales del planeta. Como estrategia para controlarlas se utilizan comúnmente productos químicos sintéticos, sin embargo, es conocido que estos productos persisten en los ecosistemas y pueden generar la aparición de genes de resistencia en los vectores artrópodos. Ante esto, el uso de productos naturales surge como una alternativa ambientalmente amigable en la estrategia integrada de control vectorial. El presente estudio profundizó en el potencial larvicida de extractos de *Ipomoea cairica* mediante su fraccionamiento por cromatografía de capa fina y de columna abierta, debido a que esta especie ha demostrado tener efectos larvicidas en el género *Aedes*. El objetivo del estudio fue identificar los componentes que producen la actividad larvicida en las fracciones de extractos etanólicos de tallos de *I. cairica*, donde fueron identificadas las cumarinas 7-hidroxi-6-metoxicromen-2-nona (escopoletina) y la 7-hidroxicromen-2-ona (umbeliferona) como las que se encontraban mayoritariamente. Luego de las pruebas, se determinó que estas cumarinas no son las responsables directas de la actividad larvicida, sino que dicha actividad podría ser atribuible a un efecto sinérgico de todos los compuestos presentes en la fracción secundaria más activa, denominada F.DCM, la cual presentó un valor de LC<sub>50</sub> de 30,608 mg/L. Se sugiere realizar más estudios que permitan corroborar si la actividad observada está ligada a un sinergismo.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, *I. cairica*, actividad larvicida, cumarinas, metabolitos secundarios.

## Introducción

El *Aedes aegypti* es uno de los vectores más importantes para la transmisión de enfermedades virales como dengue, Zika, chikungunya, fiebre amarilla y Mayaro (Kim y Ahn, 2017; Patterson et al., 2016; Rey y Lounibos, 2015). Solo en Costa Rica durante el año 2020 se diagnosticaron 9438 casos de dengue (a la semana epidemiológica 44) y desde el 2010 se reportan más de 185.471 casos acumulados (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2020). El control químico de vectores artrópodos ha sido utilizado como estrategia de emergencia ante la aparición de brotes, sin embargo, es conocido que los productos sintéticos como organofosforados, piretroides, carbamatos, entre otros, son inespecíficos, tienen poca hidrosolubilidad, persisten en los ecosistemas y su uso inadecuado ha generado la aparición de resistencia en los vectores en distintas partes del mundo. En este sentido, el uso de larvicidas naturales ha surgido como una alternativa para el control vectorial de artrópodos ya que de manera natural es posible encontrar metabolitos secundarios que expresen múltiples bioactividades, entre ellas larvicida, y que se reincorporarán a los ecosistemas una vez cumplida su función (Ahbirami et al., 2014; Arora et al., 2013; Ferreira et al., 2006; Lima y Braz-Filho, 1997; Yu et al., 2013).

La *Ipomea cairica*, comúnmente conocida como “*Morning Glory*”, es una planta común en climas tropicales y conocida por su rápido crecimiento y abundante proliferación, la cual se utiliza con fines ornamentales principalmente. Posee una diversidad de metabolitos secundarios que han mostrado algunas bioactividades, tales como, larvicida, anticancerígena, antimicrobianas, antinociceptiva, citotóxica, entre otras (Arora et al., 2013; Ferreira et al., 2006; Meira et al., 2012; Lima y Braz-Filho, 1997; Páska et al., 1999; Srivastava y Shukla, 2015; Yu et al., 2013). Un estudio preliminar permitió determinar que de un espectro de 14 plantas que se encuentran en Costa Rica, cinco mostraron actividad larvicida contra *Aedes aegypti*, siendo la más letal para este organismo el extracto etanólico de tallos de *I. cairica*, con un valor de  $LC_{50}$  de 0,0341 mg/mL con intervalo de confianza a un 95% de (0,0293-0,0393) mg/mL (Álvarez et al., 2021). El objetivo del estudio fue identificar los componentes que producen la actividad larvicida en las fracciones de extractos etanólicos de tallos de *I. cairica*.

## **Materiales y Métodos**

- *Material vegetal*

La muestra fue colectada en San Miguel de Santo Domingo de Heredia, Costa Rica (permiso R-012-2020-OT-CONAGEBIO). Se procedió a separar las hojas de los tallos y ambas partes de la planta se secaron en un horno de convección a 40°C por 72 horas. Una vez secas, se molieron en un molino de cuchillas, empleando un tamiz de 1mm.

- *Procesamiento de la muestra*

Treinta gramos de hojas y de tallos secos y molidos de *I. cairica* fueron extraídos con etanol (Et) de manera exhaustiva utilizando un baño asistido por ultrasonido a 40°C durante 15 minutos por cada extracción y posteriormente los extractos se combinaron y llevados a sequedad utilizando un evaporador rotatorio con un baño temperado a 40°C y a presión reducida. Posteriormente 100g de tallo fueron extraídos y concentrados, una vez secos se realizaron fraccionamientos del extracto utilizando cromatografía de columna (CC) con relleno de gel de sílice y una fase móvil en gradiente creciente de polaridad desde hexano (He), diclorometano (DCM), acetona (Ac) y hasta metanol. Las fracciones resultantes fueron concentradas a sequedad.

- *Seguimiento por cromatografía de capa fina (CCF) y aislamiento por CCF-preparativa*

Las fracciones obtenidas fueron evaluadas por cromatografía de capa fina (CCF) en gel de sílice con revelador fluorescente. Como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó tolueno:éter (1:1) saturado con ácido acético al 10% (Hildebert y Sabine, 1996). Para revelar las placas se utilizó luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm y para resaltar posibles cumarinas, las placas se rociaron con hidróxido de potasio al 10% en etanol (Hildebert y Sabine, 1996).

La técnica de CCF-preparativa se realizó bajo las mismas condiciones (fase estacionaria y fase móvil) que la CCF, sin embargo, esta utiliza una mayor cantidad de muestra debido a que es con fines de aislamiento. Para recuperar los compuestos aislados se procedió a raspar las franjas de interés, se extrajeron con DCM y posteriormente se llevaron a sequedad. Los procesos tanto de extracción, fraccionamiento y realización de la actividad larvicida fue llevado a cabo por cuatuplicado, para descartar algún falso positivo o negativo a lo largo de la prueba.

- *Cromatografía Líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos y de espectroscopía de masas (HPLC-DAD-MS)*

Para la técnica de HPLC-DAD se utilizó un equipo marca Shimadzu con un desgasificador modelo DGU20A5, bomba LC20AT, detector de arreglo de diodos SPD20A y un inyector de bucle manual de 50  $\mu$ L. El gradiente utilizado fue de ácido trifluoroacético al 0,1% como A y metanol como B, iniciando la corrida al 15% de A y terminando al 100% de B en 20 minutos, con un flujo de 1mL/min tal y como se muestra en el cuadro 1. La columna empleada fue una C18 marca Phenomenex Luna, con partículas de 5 mm y 100 Å y longitud de 250 y 4,6 mm de diámetro. Para la técnica de HPLC semi-preparativa se utilizó una columna Marca Agilent Pursuit, con partículas de 10 mm, 250 mm de largo y 10 mm de diámetro con un flujo mayor que el analítico de 4,5 mL/min. El detector de masas se utilizó con las siguientes condiciones de operación: Flujo 0,5mL/min, polaridad: ESI+; gas de arrastre: 30 psi, nebulizador: 45 psi, gas de secado: 55 psi, voltaje capilar: 5.5 kV, gas de colisión: 10 psi.

**Cuadro 1.** Gradiente en fase reversa de HPLC empleado en la separación cromatográfica de los metabolitos secundarios presentes en los extractos crudos de *I. cairica*.

Tiempo (minutos)	Concentración de A	Concentración de B	Flujo (mL/min.)
0,01	85	15	1,00
3,00	65	35	1,00
7,00	60	40	1,00
10,00	55	45	1,00
13,00	50	50	1,00
15,00	50	50	0,50
16,00	50	50	0,50
18,00	15	85	0,50
18,00	15	85	1,25
19,00	0	100	1,25
20,00	85	15	1,00

- *Ensayo de actividad larvicida*

La metodología utilizada para la determinación de la actividad larvicida fue la descrita por la Organización Mundial de la Salud en el informe WHO/VBC/81.807 para la determinación de actividad larvicida (OMS, 1981). Las larvas utilizadas fueron larvas entre el tercer y cuarto estadio larval de la cepa Rockefeller de *A. aegypti*, susceptible a insecticidas. Estas se almacenaron en el laboratorio sin ninguna exposición a insecticidas conocidos. Para procurar homogeneidad fisiológica en cada ensayo, las larvas se obtuvieron a partir de huevos puestos a eclosionar simultáneamente y criadas en las mismas condiciones alimentarias y ambientales. En los ensayos se establecieron 4 repeticiones por concentración de metabolito o extracto, con 20 larvas cada una y un volumen total de 25 mL. Se utilizó un control positivo con Temefós y un control negativo con agua. La lectura de la mortalidad se efectuó a las 24 horas de iniciado el ensayo. Las concentraciones evaluadas inicialmente fueron de 100 ppm., tanto para la determinación de los valores de LC<sub>50</sub> y LC<sub>90</sub>. En cada caso se procedió a determinar los intervalos de confianza

## Resultados

En el cuadro 2 se observan los resultados de la actividad larvicida de los extractos etanólicos de tallos y hojas. El extracto etanólico de los tallos de esta planta produjo un 71.3% de mortalidad y el extracto de las hojas un 40.0%, lo que concuerda con los hallazgos encontrados en un estudio preliminar (Álvarez et al., 2021). Siendo que el extracto etanólico de las hojas no resultó tan promisorio en cuanto a actividad biológica como el extracto de los tallos, en adelante el enfoque de la investigación se centra solamente en los tallos de *I. cairica*.

**Cuadro 2.** Actividad larvicida del extracto etanólico del tallo y las hojas de *I. cairica*.

Muestra	Porcentaje de mortalidad a 24 h
Tallo	71.3 ± 4,8 %
Hojas	40.0 ± 0.0 %
Control positivo	100 ± 0 %
Control Negativo	0 ± 0 %

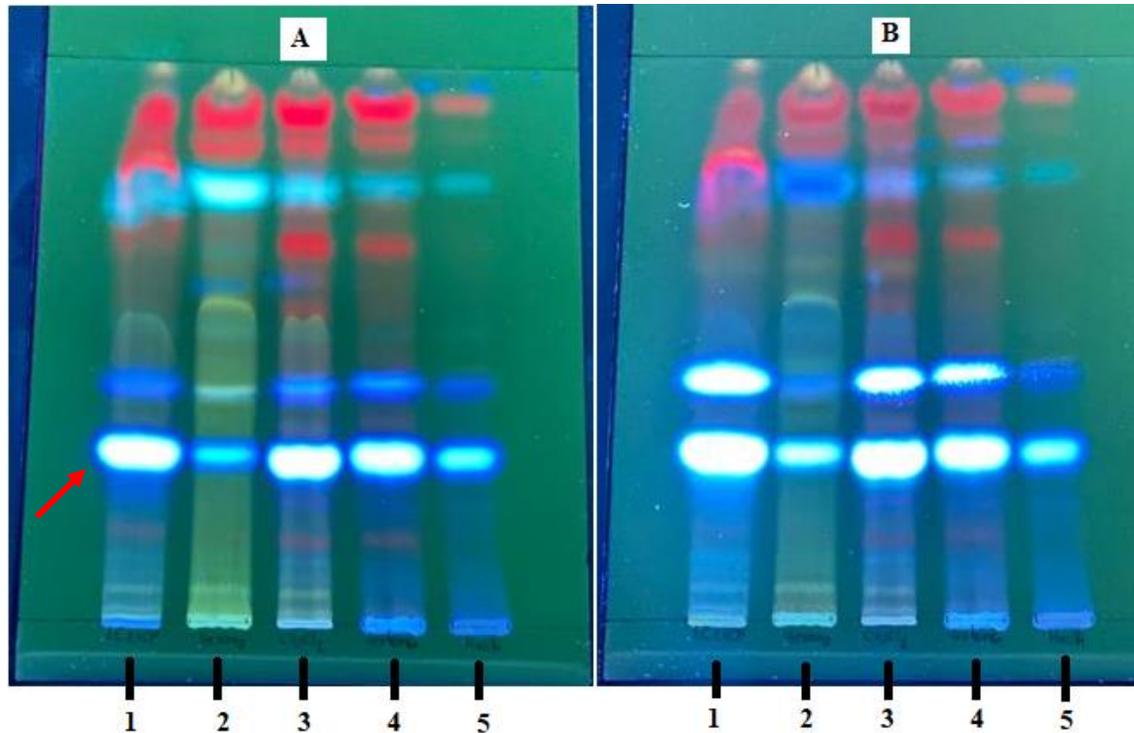
Los resultados de la actividad larvicida del extracto etanólico del tallo y de su fraccionamiento de polaridad creciente en CC se muestran en el cuadro 3. El extracto etanólico crudo de los tallos de *I. cairica* a 100 mg/L presenta una actividad larvicida relativamente elevada de un 71,3% de mortalidad. La F. Ac mostró un bajo porcentaje de mortalidad y las F. He. y F. Me no mostraron actividad larvicida. Por el contrario, la F.DCM mostró una mortalidad del 100% de los individuos al ensayarse en condiciones semejantes a las demás fracciones.

**Cuadro 3.** Actividad larvicida del extracto etanólico y su fraccionamiento de polaridad creciente en CC.

Muestra	Porcentaje de mortalidad a 24 h
Extracto crudo en Et.	71,3 ± 4,8 %
F*. He.	0 ± 0 %
F*. DCM	100 ± 0 %
F*. Ac.	18,8 ± 2,9 %
F*. Me.	0 ± 0 %
Control positivo	100 ± 0 %
Control Negativo	0 ± 0 %

\*F: Fracción

La figura 1 muestra la cromatografía de capa fina (CCF) o delgada de las muestras reportadas en el cuadro 3. Cada columna numerada de 1 a 5 corresponde a una muestra diferente, las cuales se mueven de abajo hacia arriba con la fase móvil, permitiendo la separación de los compuestos. La muestra 1 es el extracto original y las fracciones de 2 a 5 corresponden a fracciones secundarias obtenidas con diferentes disolventes de una columna cromatográfica del extracto etanólico original. La CCF permite la separación de la mayoría de los componentes presentes en cada muestra evaluada. La CCF fue revelada con luz ultravioleta a la longitud de onda de 365 nm, la absorción a estas longitudes de onda es indicativo de la presencia de anillos aromáticos y/o dobles enlaces conjugados en la estructura del metabolito. La mancha señalada con la flecha roja en la figura 1A indica la presencia de un metabolito con grupos funcionales similares a los mencionados. Cuando la intensidad de la mancha se intensifica (figura 1B) al rociar la placa con una base como KOH, es altamente probable que se trate de una cumarina. Considerando lo mencionado, es predecible que los metabolitos secundarios presentes en las muestras corridas en esta placa sean muy parecidos en cuanto a su estructura química y que al menos dos sean cumarinas.



**Figura 1.** Cromatografía de capa fina de las fracciones evaluadas en cuanto a la actividad larvicida de los fraccionamientos mostrados en el cuadro 3, reveladas con luz UV a 365nm (A) y con KOH en etanol (B). 1: Extracto crudo en Et, 2: F. He, 3: F.DCM, 4: F. Ac, 5: F. Me.

Los principales componentes de la F.DCM se separaron utilizando CCF-preparativa, cada fracción secundaria de la F.DCM fue evaluada en cuanto a la actividad larvicida. Todos los bioensayos a 100 ppm de la F.DCM mostraron actividad larvicida con un 100% de mortalidad, sin embargo, se observa que el fraccionamiento resultante de la F.DCM genera una pérdida absoluta de la actividad larvicida (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Actividad larvicida de la F.DCM y sus fracciones secundarias (1, 2 y 3) obtenidas por CCF-preparativa.

Muestra	Porcentaje de mortalidad a 24 h*
F. DCM	100 ± 0 %
F. DCM (1)	0 ± 0 %
F. DCM (2)	0 ± 0 %
F. DCM (3)	0 ± 0 %
Control positivo	100 ± 0 %
Control Negativo	0 ± 0 %

\*Promedio de cuatro réplicas

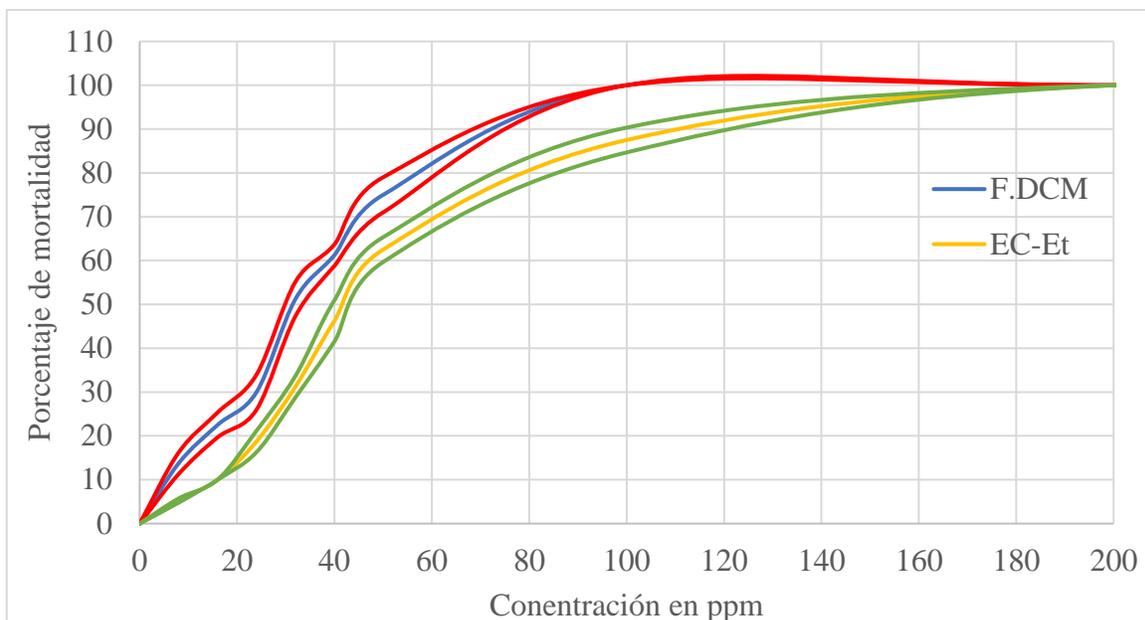
En el Cuadro 5 se observan los resultados de la actividad larvicida de la F.DCM y la del extracto crudo en etanol de los tallos de la planta *I. cairica*. Los valores de LC<sub>50</sub> para la F.DCM revelan que ésta posee un valor menor medio que el valor del extracto etanólico de los tallos.

**Cuadro 5.** Resultados de la actividad larvicida de la F.DCM y del extracto crudo de Et.

Fracción	LC <sub>50</sub> en mg/L (IC*95%)	LC <sub>90</sub> en mg/L (IC*95%)	Dosis diagnóstica en mg/L (IC*95%)
F.DCM	30,608 (23,9-39,1)	79,875 (62,5-98,1)	349,2 (273,1-446,4)
EC-Et.	42,1 (32,1-55,0)	131 (100,0-172,0)	664 (507-870)

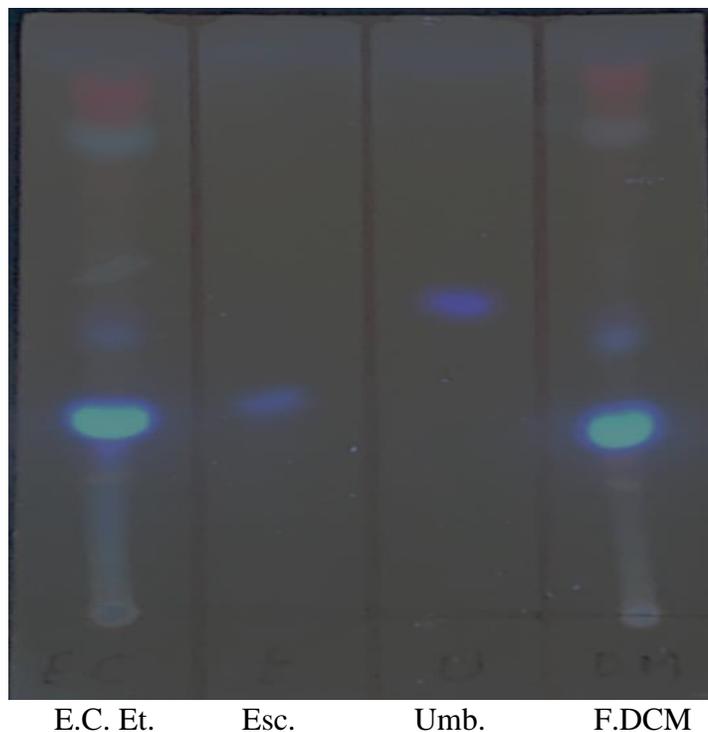
\*IC: Intervalo de confianza

En la figura 2 se observa tanto el comportamiento que presentan la F.DCM como el EC-Et cuando se generan disoluciones de diversas concentraciones para evaluar la actividad larvicida de cada uno. En dicha figura, es posible observar que, con un intervalo de confianza de 95%, en cada curva, la respuesta de mortalidad es diferente entre el F.DCM y el EC-Et donde a una misma concentración, la mortalidad observada de la F.DCM es mayor que la obtenida por EC-Et hasta 150 ppm. Fitoquímicamente hablando, se puede afirmar que, en la F.DCM los metabolitos responsables de la actividad larvicida se encuentra en una mayor concentración en comparación con el EC-Et.



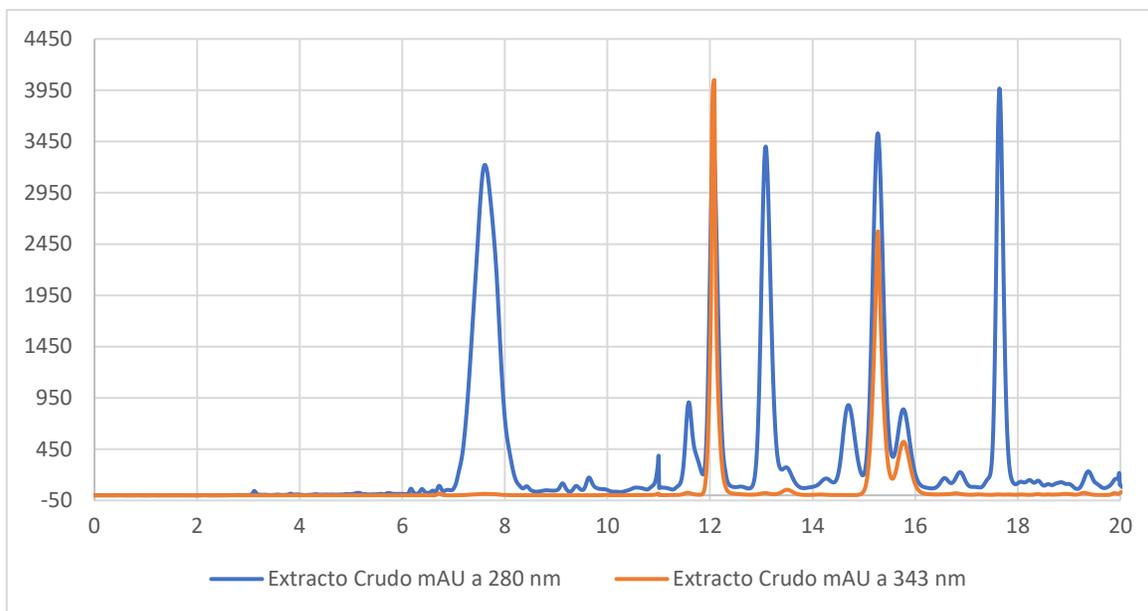
**Figura 2.** Gráfico de concentración de muestra contra porcentaje de mortalidad observadas en la FDCM y en el EC-Et en azul y amarillo respectivamente, en rojo y en verde se observa la mortalidad esperada utilizando intervalos de confianza del 95,0%.

Como se observa en la figura 3, la F.DCM muestra dos manchas azules al revelar la placa con luz UV a 365nm, las cuales se intensifican al rociar la placa con KOH al 10% en etanol. Esto es indicativo de la presencia de cumarinas en el tallo de la planta.



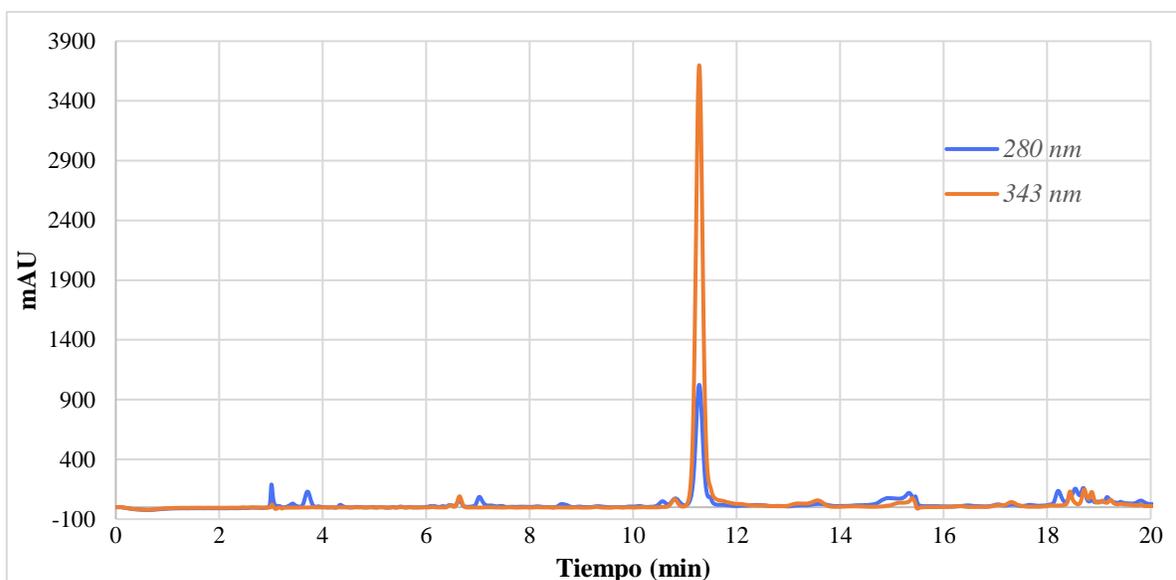
**Figura 3.** Cromatografía de capa fina corrida eluida con tolueno:éter (1:1) saturada con ácido acético al 10% y revelada con KOH al 5% en etanol donde E.C. Et.: Extracto crudo en etanol, Esc.: Patrón de escopoletina, Umb.: Patrón de umbeliferona y F.DCM: Fracción secundaria de diclorometano.

En la figura 4 se observa el cromatograma de HPLC a dos longitudes de onda 280nm, típica para moléculas con anillos aromáticos, y 343nm, exclusiva para algunos pocos metabolitos secundarios, entre ellos las cumarinas. Cada pico en el cromatograma representa un compuesto, indicando que la F.DCM está conformada por relativamente pocos compuestos y tres de ellos son posibles cumarinas.

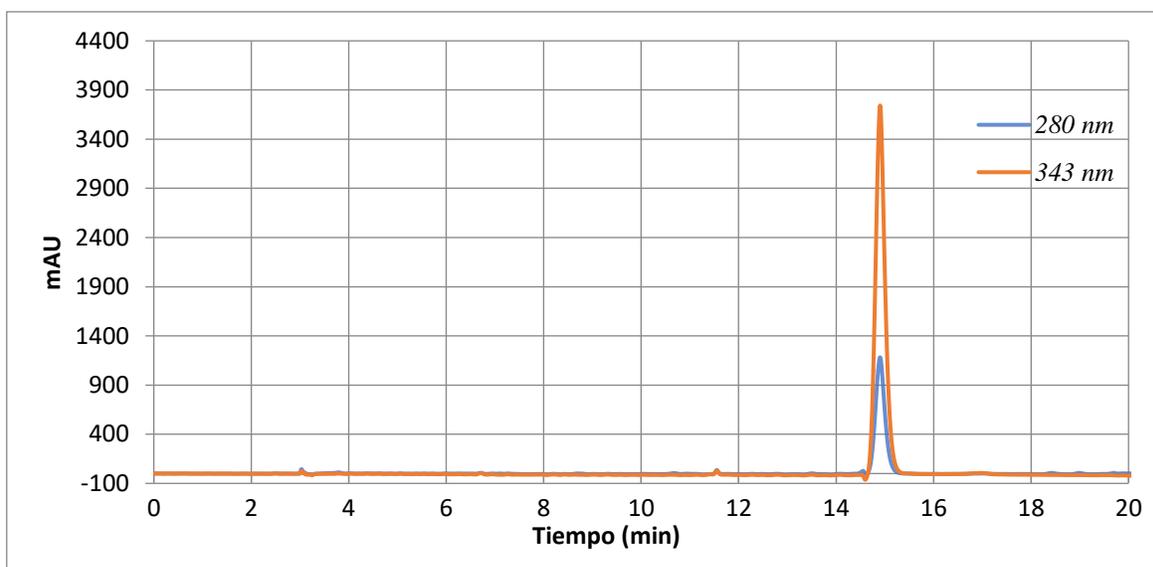


**Figura 4.** Cromatograma en fase reversa de HPLC-DAD de la F.DCM obtenido a dos longitudes de onda, 280nm y 343nm.

Como parte del proceso de identificación de al menos dos metabolitos secundarios presentes en la fracción secundaria activa de diclorometano, se procedió a aislar las señales o picos presentes en el cromatograma de la figura 4 a 11.8 y 14.9 minutos, correspondientes a los picos mayoritarios que absorben a 343nm. El resultado del aislamiento de los picos mayoritarios presentes en la F.DCM y que absorben a 343nm se observa en forma pura en las figuras 5 y 6.

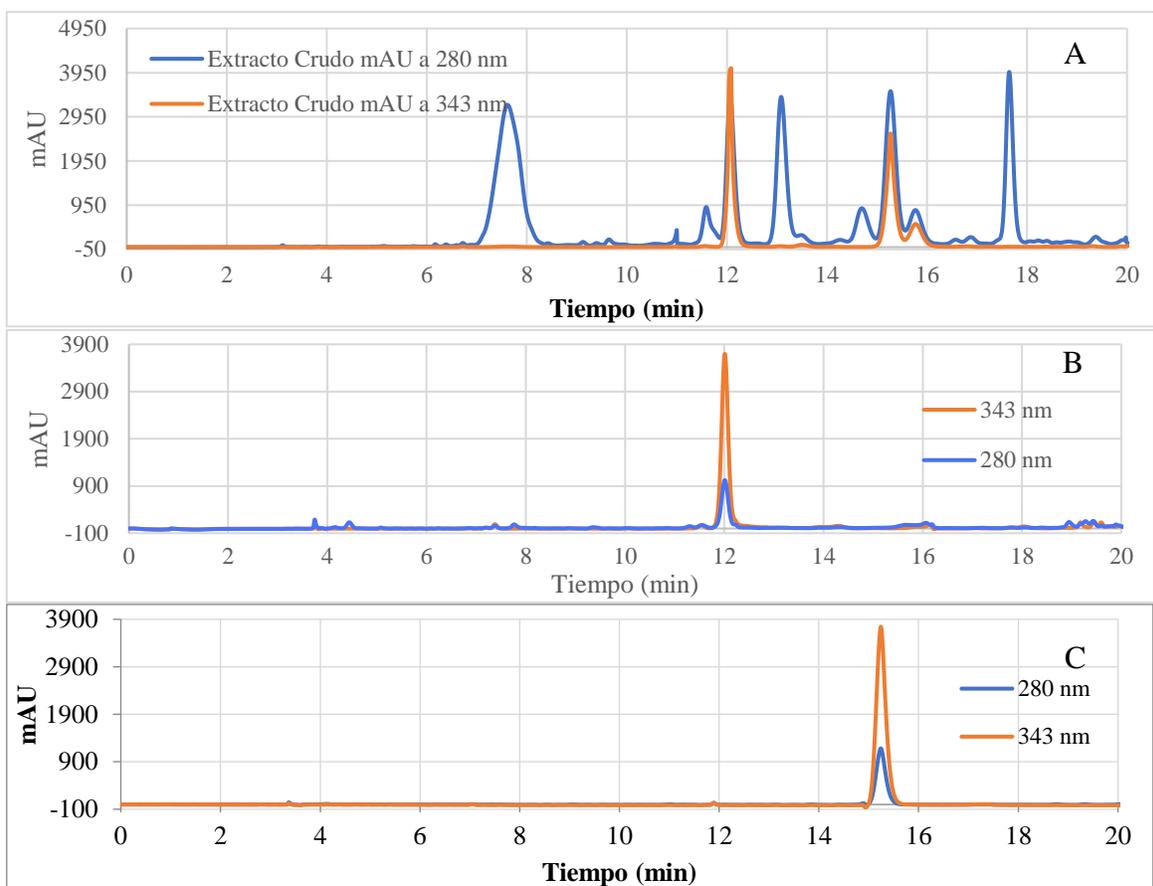


**Figura 5.** Cromatograma en fase reversa de HPLC-DAD del primer compuesto purificado a dos longitudes de onda, 280nm y 343nm.



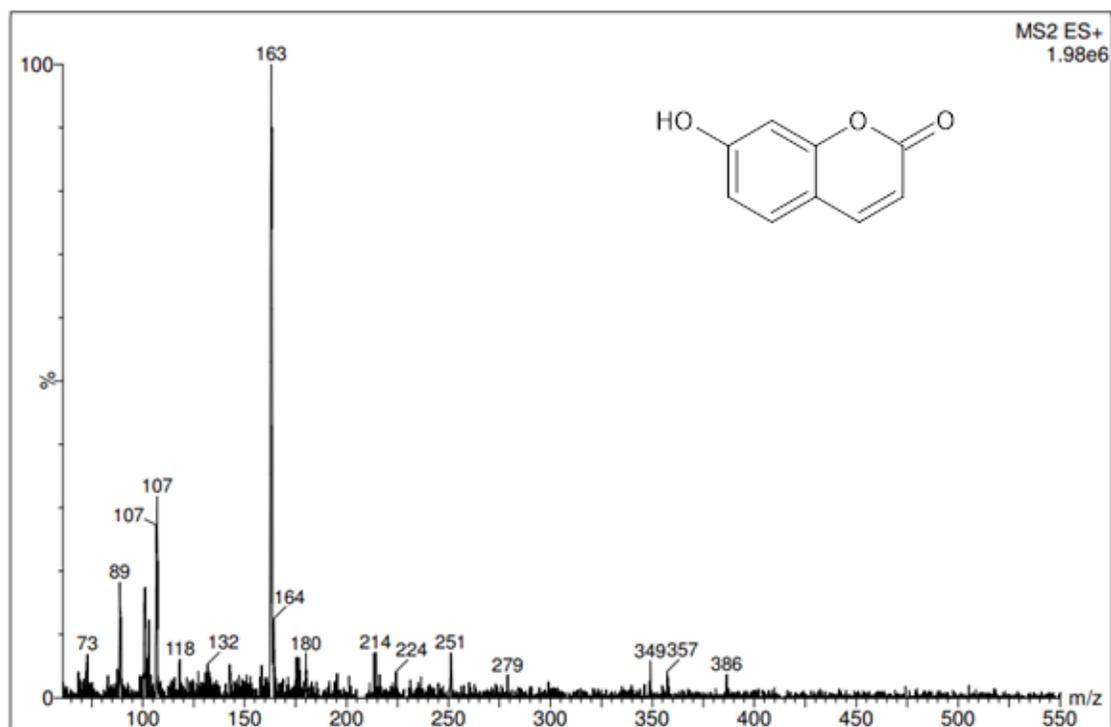
**Figura 6.** Cromatograma en fase reversa de HPLC-DAD del segundo compuesto purificado a dos longitudes de onda, 280nm y 343nm.

Los cromatogramas de HPLC de la figura 7 muestran la concordancia en los tiempos de retención que existen entre los patrones de las dos cumarinas (B y C) y la F.DCM (A) bajo las mismas condiciones cromatográficas y a las longitudes de onda de 280 y 343 nm.

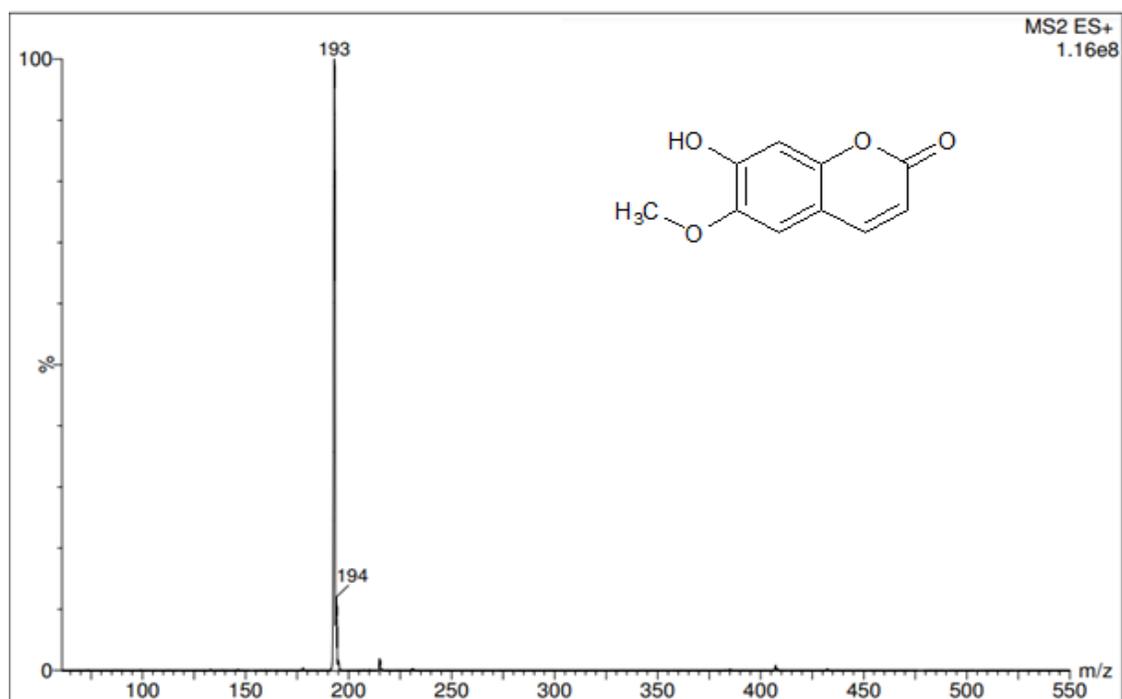


**Figura 7.** Cromatograma en fase reversa de HPLC-DAD de la F.DCM activa (A), patrón de escopoletina (B) y patrón de umbeliferona (C) a dos longitudes de onda, 280 y 343 nm.

Las figuras 8 y 9 corresponden a los espectros de masas de las dos cumarinas obtenidas de los tallos de *I. cairica*. Con este análisis se generaron los espectros de masas del ion molecular, en este caso en modo positivo, es decir, el peso molecular de la molécula +1, esto en algunos casos puede generar una serie de picos adicionales correspondientes a diversos fragmentos de la molécula, tal y como se aprecian en la figura 8. En esta misma figura se observa y sobresale el ion molecular a 163 que corresponde al peso molecular de la cumarina umbeliferona +1. Seguidamente, la figura 9 muestra un ion molecular a 193, el cual corresponde al peso molecular de la cumarina escopoletina +1.



**Figura 8.** Espectro de masas del ion molecular de la cumarina umbeliferona.



**Figura 9.** Espectro de masas con el ion molecular de la cumarina escopoletina.

La evaluación de la actividad larvicida de las cumarinas fue negativa, sugiriendo que la misma podría estar relacionada con la actividad sinérgica de todos los compuestos presentes en la F.DCM (cuadro 6).

**Cuadro 6.** Evaluación larvicida de los compuestos puros escopoletina y umbeliferona y de una combinación de ambos, aislados de la planta *I. cairica*. Prueba realizada con 4 réplicas homogéneas con un n= 80 de larvas.

<b>Muestra</b>	<b>Porcentaje de Mortalidad</b>
Escopoletina	0
Umbeliferona	0
Escopoletina + Umbeliferona	0
CONTRO +	100,00
CONTROL -	0,00

## **Discusión**

Un estudio preliminar sobre la mortalidad de larvas empleando extractos etanólicos de tallos y de hojas de *I. cairica* de manera separada, permitió establecer que generan actividad larvicida diferente (Álvarez et al., 2021), tal y como se demuestra en este estudio, donde el extracto etanólico de los tallos de esta planta posee un 71.3% de mortalidad y el de las hojas de 40.0%. Los tejidos fotosintéticos de la planta se concentran en mayor medida en las hojas que en los tallos, viéndose estos extraídos al ponerse en contacto con disolventes orgánicos, como el etanol, lo que genera un extracto rico tanto de metabolitos secundarios como de pigmentos fotosintéticos, como las clorofilas y xantofilas, las cuales no solo dificultan el proceso de separación de algún metabolito secundario en particular, sino que generan un efecto de dilución de la posible actividad biológica. En este estudio el extracto etanólico de las hojas no resultó tan promisorio en cuanto a actividad biológica como el extracto de los tallos.

El extracto etanólico crudo de los tallos de *I. cairica* a 100 mg/L presenta una actividad larvicida relativamente elevada, de un 71,3% de mortalidad, si se compara con datos de mortalidad larvicida reportada por Srivastava y Shukla (2015) donde indican que un extracto de aceite esencial de esta planta puede lograr hasta el 100% de mortalidad en 24h cuando se

evalúa a 120 mg/L. Adicionalmente, resultados presentados por Chariandy y colaboradores (1999) indican que obtienen resultados positivos de mortalidad a los dos días de iniciado el ensayo a 500 mg/L, luego de exponer las larvas del IV estadio de *A. aegypti* a un extracto en acetato de etilo de *Justicia pectoralis* por una hora, permitiendo asegurar que la actividad larvicida está presente en el extracto inicial antes del fraccionamiento. Las F. He. y F. Me no mostraron actividad larvicida. Por el contrario, la F.DCM mostró una mortalidad del 100% de los individuos al ensayarse en condiciones semejantes a las demás muestras. El bajo porcentaje de mortalidad de la F. Ac indica que muy pocos de los metabolitos secundarios activos fueron eluidos con este disolvente, mientras que con Me y He ninguno de estos compuestos fueron eluidos.

Según Ahbirami *et al* ( 2014) , las hojas de *I. cairica* poseen una actividad larvicida tanto para *A. albopictus* como para *A. aegypti* cuando se extraen con acetona o con metanol, mostrando valores de LC<sub>50</sub> de 101,94 mg/L y de 105,50 mg/L respectivamente para *A. aegypti* (Ahbirami et al., 2014). Este resultado obtenido por Ahbirami es fundamental debido a que proporciona evidencia de que esta planta posee potencial larvicida, sin embargo, no profundiza en distintos abordajes fitoquímicos para determinar si los extractos en acetona o metanol son los solventes más apropiados para extraer los metabolitos secundarios responsables de la actividad larvicida. Existe una diferencia importante entre el proceso de extracción utilizado por Ahbirami y colaboradores (2014) y el desarrollado en el presente estudio. Esta diferencia radica en la temperatura utilizada para realizar el extracto ya que, diversos autores la reportan como un factor que debe de regularse meticulosamente debido a que, al hacerlo, se contribuye a mejorar la integridad química del extracto cuando se utilizan temperaturas no mayores a 40 °C. En lo que respecta a la metodología de extracción utilizada por Ahbirami y compañía se utilizaron hasta 60°C por al menos tres horas y en el presente estudio se tomaron las precauciones necesarias para no superar los 40 °C, generando de esta manera, una posible diferencia fundamental en la composición del extracto (Dorta et al., 2012; Najafabadi et al., 2020).

Debido a los resultados obtenidos, es posible inferir que la F.DCM podría estar constituido por una combinación de metabolitos secundarios, mismos que estarían presentes el extracto crudo de Et. El extracto etanólico está constituido por mayor número de metabolitos, algunos

de los cuales no poseen actividad larvicida, como resultado en el EC-Et los metabolitos bioactivos se encuentran en una menor concentración, lo cual se ve reflejado en una bioactividad menor en comparación con F.DCM

La F.DCM mostró dos manchas azules al revelar la placa cromatográfica con luz UV a 365nm, las cuales se intensifican al rociar la misma con KOH al 10% en etanol. Esto es indicativo de la presencia de cumarinas en el tallo de la planta. Meira (2012) describe la presencia de dos cumarinas, la 7-hidroxi-6-metoxicromen-2-na (escopoletina) y la 7-hidroxicromen-2-ona (umbeliferona) en el extracto de diclorometano de la planta de *I. cairica*. Es posible identificar estas cumarinas por su factor de retención, (rf) de 0,25 y 0,45 respectivamente (Hildebert y Sabine, 1996), los cuales están dentro del rango obtenido en esta investigación.

La similitud en los tiempos de retención de los picos de los patrones con los picos presentes en el cromatograma de HPLC de la F.DCM, sugiere que las cumarinas corresponden a la escopoletina y a la umbeliferona. Para comprobarlo se utilizó la técnica de HPLC-MS, donde la masa molecular de las cumarinas concuerda con lo reportado en la literatura de 162,14 g/mol para la umbeliferona (Mercolini et al., 2013) y de 192,16 g/mol para la escopoletina (Carpinella et al., 2005).

La evaluación de la actividad larvicida de estas cumarinas fue negativa, sugiriendo que la actividad larvicida podría estar relacionada con una actividad sinérgica de los componentes de la F.DCM. Esta actividad larvicida de la F.DCM fue detectada a relativamente bajas concentraciones, si se compara con otros estudios realizados (Murugan et al., 2012; Wang et al., 2012). Un estudio *in silico* realizado por Rollinger et al ( 2004) sugiere que análogos de escopoletina y su homólogo glucosilado, la escopolina, sobresalen en un análisis de cerca de 110000 moléculas estudiadas como posibles inhibidores del acetil colinesterasa (ACh) (Rollinger et al., 2004), el cuál es el mismo mecanismo de acción que presentan los organofosforados como el Temefós, utilizado como larvicida en el control de vectores (Patar et al., 2015)

Debido a la minuciosidad en el proceso de purificación, así como de los ensayos larvicidas realizados, es posible afirmar que la actividad larvicida mostrada por los extractos y

fracciones obtenidas de los tallos de *I. cairica* poseen una letalidad comparativamente alta con respecto a otros extractos no volátiles de productos naturales evaluados contra larvas de *A. aegypti* (Chariandy et al., 1999; Ferreira et al., 2006; Kishore et al., 2011). Así mismo, no fue posible atribuir la actividad larvicida a los compuestos puros aislados de las fracciones activas, sino que, por el contrario, esta bioactividad podría ser atribuido a un efecto sinérgico del conjunto de compuestos presentes tanto en el extracto en etanol como en la F.DCM, por ello se sugiere realizar más estudios que permitan corroborar si la actividad observada está ligada a un sinergismo.

## **Bibliografía**

- Ahbirami, R., Zuharah, W. F., Thiagaletchumi, M., Subramaniam, S. and Sundarasekar, J. (2014). Larvicidal efficacy of different plant parts of railway creeper, *Ipomoea cairica* extract against dengue vector mosquitoes, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Insect Science*, 14(180).
- Álvarez, V., Herrero, M., Rodríguez, G. and Arguello, S. (2021). *Actividad insecticida de extractos etanólicos de plantas sobre larvas de Aedes aegypti*. Manuscrito no publicado.
- Arora, S., Kumar, D. and Shiba. (2013). Phytochemical, antimicrobial and antioxidant activities of methanol extract of leaves and flowers of *Ipomoea Cairica*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 198–202.
- Carpinella, M. C., Ferrayoli, C. G. and Palacios, S. M. (2005). Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2922–2927.
- Chariandy, C., Seaforth, C., Phelps, R., Pollard, G. and Khambay, B. (1999). Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 265–270.

- Dorta, E., Lobo, M. G. and Gonzalez, M. (2012). Reutilization of mango byproducts: Study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal of Food Science*, 77(1).
- Ferreira, A. A., Amaral, F. A., Duarte, I. D. G., Oliveira, P. M., Alves, R. B., Silveira, D., Azevedo, A. O., Raslan, D. S. and Castro, M. S. A. (2006). Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1–2), 148–153.
- Hildebert, W. and Sabine, B. (1996). Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. In *The Cambridge Companion to Wittgenstein, Second Edition* (Segunda Ed). Springer.
- Kim, S. il and Ahn, Y. J. (2017). Larvicidal activity of lignans and alkaloid identified in *Zanthoxylum piperitum* bark toward insecticide-susceptible and wild *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. *Parasites and Vectors*, 10(1).
- Kishore, N., Mishra, B., Tiwari, V. and Tripathi, V. (2011). A review on natural products with mosquitosidal potentials. *Research Signpost Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 37661(2), 335–365.
- Meira, M., da Silva, E. P., David, J. M. and David, J. P. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: Traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(3), 682–713.
- Lima, O. O. and Braz-Filho, R. (1997). Dibenzylbutyrolactone lignans and coumarins from *Ipomoea cairica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 8(3), 235–238.
- Mercolini, L., Mandrioli, R., Ferranti, A., Sorella, V., Protti, M., Epifano, F., Curini, M. and Raggi, M. A. (2013). Quantitative evaluation of auraptene and umbelliferone, chemopreventive coumarins in citrus fruits, by HPLC-UV-FL-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1694–1701.
- Ministerio de Salud de Costa Rica. (2020). *Análisis de situación de salud*. Análisis de Situación de Salud.
- Murugan, K., Mahesh Kumar, P., Kovendan, K., Amerasan, D., Subrmaniam, J. and Hwang, J. (2012). Larvicidal, pupicidal, repellent and adulticidal activity of *Citrus sinensis* orange peel

- extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 111(4), 1757–1769.
- Najafabadi, N. S., Sahari, M. A., Barzegar, M. and Hamidi Esfahani, Z. (2020). Role of Extraction Conditions in the Recovery of Some Phytochemical Compounds of the Jujube Fruit. In *J. Agr. Sci. Tech* (Vol. 22, Issue 2).
- OMS. (1981). *Instruction for determining the susceptibility or resistance of adult mosquitoes to organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides-diagnostic test*. World Health Organization WHO/VBC/81.807.
- Páska, C., Innocenti, G., Kunvári, M., László, M. and Szilágyi, L. (1999). Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. *Phytochemistry*, 52(5), 879–883.
- Patar, A. A., Hassan, W. R. M. and Yusof, F. Z. M. (2015). Acute toxicity of malathion, dichlorvos and temephos in climbing perch (*Anabas testudineus*). *Malaysian Applied Biology*, 44(3), 37–42.
- Patterson, J., Sammon, M. and Garg, M. (2016). Dengue, zika and chikungunya: Emerging arboviruses in the new world. *Western Journal of Emergency Medicine*, 17(6), 671–679.
- Rey, J. and Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y la transmisión de enfermedades. *Biomédica*, 35(2), 1–27.
- Rollinger, J. M., Hornick, A., Langer, T., Stuppner, H. and Prast, H. (2004). Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(25), 6248–6254.
- Srivastava, D. and Shukla, K. (2015). *Ipomoea cairica*: a medicinal weed with promising health benefits. In *International Journal of Information Research and Review* (Vol. 2).
- Wang, Z., Kim, J.-R. R., Wang, M., Shu, S. and Ahn, Y.-J. J. (2012). Larvicidal activity of *Cnidium monnieri* fruit coumarins and structurally related compounds against insecticide-susceptible and insecticide-resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti*. *Pest Management Science*, 68(7), 1041–1047.

Yu, B., Luo, J., Wang, J., Zhang, D., Yu, S. and Kong, L. (2013). Pentasaccharide resin glycosides from *Ipomoea cairica* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*, 95, 421–427.

## Discusión General

El uso de extractos de plantas provee una alternativa natural para el control de vectores, que para el caso del *A. aegypti* se da en las etapas más tempranas de su ciclo de vida cuando se encuentran como larvas. A pesar de esto es importante hacer notar que no cualquier extracto de una planta es capaz de generar una actividad larvicida ya que esta se encuentra supeditada tanto a la composición química presente en el extracto como en la proporción de los metabolitos secundarios (Kishore et al., 2011b).

Es posible afirmar que el extracto de tallos de *I. cairica* (LC<sub>50</sub> 0,0341 mg/mL) es sin duda el que posee mayor actividad larvicida de todas las plantas evaluadas, siendo este valor una octava parte del valor de LC<sub>50</sub> del extracto etanólico de las hojas de *Z. setulosum* (LC<sub>50</sub> 0,268 mg/mL), planta con la segunda mayor actividad larvicida detectada. Los tallos de *I. cairica* (LC<sub>50</sub> 0,0341 mg/mL) son capaces de producir un extracto crudo en etanol con mayor actividad larvicida que el mismo extracto crudo de las hojas de esta planta (LC<sub>50</sub> 0,121 mg/mL) siendo el valor de LC<sub>50</sub> del extracto de tallos una tercera parte del valor de LC<sub>50</sub> del extracto etanólico de las hojas.

El fraccionamiento por CC en fase normal del extracto etanólico de tallos de *I. cairica* reveló que la fracción de diclorometano (F.DCM) es la más activa de las cuatro obtenidas, con una mortalidad del 100% cuando se ensaya a 100 mg/L. De la misma forma, el fraccionamiento de F.DCM evidenció que la actividad larvicida desaparece al separar sus componentes en tres fracciones por CCF-preparativa. Este resultado podría sugerir que no existe un único responsable químico de la actividad, sino que, por el contrario, el efecto sinérgico de los constituyentes presente en la F.DCM sería el responsable de causar la actividad.

Dos de los componentes identificados de la F.DCM son la 7-hidroxi-6-metoxicromen-2-nona (escopoletina) y la 7-hidroxicromen-2-ona (umbeliferona) se encuentran en cantidades importantes dentro de la F.DCM. Su identificación se realizó mediante la comparación con patrones utilizando tres técnicas distintas: CCF, HPLC-DAD y espectroscopía de masas, siendo los resultados consistentes con los obtenidos tanto para los patrones como para los componentes de la muestra en sus distintas etapas de fraccionamiento. Ni la escopoletina ni

la umbeliferona mostraron actividad larvicida por separado ni tampoco al mezclarlas entre sí en proporciones iguales.

## Conclusiones Generales

- Las muestras estudiadas mostraron comportamientos muy diferentes entre sí en cuanto a su actividad larvicida. Esto debido a que algunas de ellas no presentan actividad, otras presentan actividad solo en una parte de la planta y otras presentan actividad larvicida en dos de las partes de la planta estudiadas.
- Los valores de LC<sub>50</sub> de las muestras más promisorias presentan valores muy diferentes entre sí, siendo el de extractos etanólicos de *I. cairica*, tanto tallos como hojas, los menores de todos.
- La *I. cairica* posee una actividad larvicida más elevada que todas las muestras evaluadas en este estudio.
- Los extractos de tallos de *I. cairica* poseen una actividad larvicida mayor que la mostrada por extractos de las hojas bajo las mismas condiciones.
- El efecto larvicida mostrado por los tallos de *I. cairica* podría deberse a un efecto sinérgico entre los metabolitos secundarios de la fracción más activa.

- Se confirma la presencia de dos metabolitos secundarios, la 7-hidroxi-6-metoxicromen-2-nona (escopoletina) y la 7-hidroxicromen-2-ona (umbeliferona), aislados e identificados de la fracción más activa. Los mismos son catalogadas como cumarinas, según lo reportado por Lima O y Braz-Filho en 1997.
- Existe un alto potencial en *I. cairica* para su uso como insecticida ya que mostró actividad larvicida a bajas concentraciones contra larvas de *A. aegypti*.

### **Recomendaciones Generales**

- Dado que al fraccionar los metabolitos secundarios presentes en la F.DCM se pierde la actividad larvicida, se recomienda un estudio más minucioso que permita determinar si el efecto sinérgico mostrado por la F.DCM se puede mantener al utilizar distintos metabolitos presentes en combinación.
- Se recomienda un estudio que evalúe la especificidad de la toxicidad del extracto de *I. cairica*, con el fin de evitar afectar especies no blanco.
- En aras de buscar una aplicabilidad, es posible utilizar el extracto alcohólico crudo de los tallos en su dosis diagnóstica que permita sustituir a los plaguicidas comúnmente utilizados por uno de origen natural.