

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE ACETOGENINAS ANNONÁCEAS SOBRE NINFAS DE *PERIPLANETA AMERICANA* L. (DICTYOPTERA: BLATTIDAE)

Paulo César Robledo-Reyes

Grupo de Investigaciones Entomológicas, Departamento de Biología, Universidad del Valle, A.A. 25360 Cali, Colombia; correo electrónico: pcrbledoreyes@gmail.com

Ranulfo González

Grupo de Investigaciones Entomológicas, Departamento de Biología, Universidad del Valle, A.A. 25360 Cali, Colombia; correo electrónico: ranulfog@gmail.com

Gloria Isabel Jaramillo

Grupo de Investigaciones Entomológicas, Departamento de Biología, Universidad del Valle, A.A. 25360 Cali, Colombia; correo electrónico: gloriaisabeljaramillo@gmail.com

Jaime Restrepo

Laboratorio de Investigación y Análisis de Alimentos, Departamento de Química, Universidad del Valle, A.A. 25360 Cali, Colombia; correo electrónico: jerestre@univalle.edu.co

RESUMEN

Se evaluó en condiciones de laboratorio la actividad tóxica de extractos de *Annona muricata* sobre ninfas de últimos estadios de *Periplaneta americana* de seis poblaciones del suroccidente Colombiano. Se emplearon bioensayos con botellas e ingestión de cebo tratado. También se determinó la repelencia producida por el extracto en las ninfas. Los bioensayos revelaron alta mortalidad a una concentración de 0.5 ml/botella y todas las poblaciones fueron igualmente susceptibles. Los resultados por ingestión no se consideraron prácticos, debido a que la capacidad de atracción del cebo se vio radicalmente reducida al mezclarse con el extracto. Por otra parte, la repelencia de extracto fue del 80% frente a las ninfas, teniéndose como un resultado prometedor en este campo del control de plagas.

Palabras clave: Cucaracha americana, Insecticidas naturales, Bioensayos con botellas, Plaga urbana.

SUMMARY

The toxic action of *Annona muricata* extracts over *Periplaneta americana* nymphs from six southwest Colombian locations was tested, in laboratory conditions. Bioassays were used, with bottles and ingesting of treated bait. The repellency generated by the extract for the nymphs was determined as well. The bioassays showed a high mortality in a 0.5 ml/bottle concentration, with whole populations being susceptible. Ingesting results were not considered practical, since the attraction capacity was greatly reduced when mixed with the extract. On the other hand, the extract repellency reached 80% for the nymphs, obtaining a promising result in the field of pest control.

Key words: American cockroach, Natural insecticide, Bioassays with bottles, Urban pest.

INTRODUCCIÓN

Entre las 4000 especies descritas de cucarachas menos del 1% son consideradas plagas urbanas que habitan los hogares, restaurantes, tiendas de

abarrotes, etc. Producen ciertos daños de importancia económica por el deterioro de los ambientes y algunos artículos comerciales. Las encontradas en este pequeño porcentaje son conocidas como potenciales vectores mecánicos de bacterias, virus,

protozoarios, helmintos entre otros parásitos que pueden ser patógenos para el hombre (Bell & Adiyodi 1981; Cornwell 1968). Así mismo se hacen aún más importantes médicamente como causantes de alergias en personas susceptibles a los alérgenos que estas producen (Ardusso 2002).

El control de las cucarachas se ha basado en la aplicación de insecticidas químicos sintéticos como organofosforados, organoclorados, piretroides y carbamatos (WHO 1999). Con el correr del tiempo y de su uso constante, ha causado un elevado grado de resistencia de muchas de las especies plaga de cucaracha frente a tales compuestos. Uno de los medios más eficientes y tradicionales que se han usado son los cebos tóxicos. Estos han demostrado ser bastante eficientes, pero dependen de su capacidad de atracción para poder llegar hasta los individuos blanco (Appel 1992).

Actualmente existe la posibilidad de usar sustancias biológicas conocidas comúnmente como insecticidas naturales para combatir esta plaga. Un ejemplo de estas nuevas sustancias son extractos de plantas anonáceas llamadas acetogeninas (He et al. 1996; Londershausen et al. 1991).

Las acetogeninas anonáceas (AA) son metabolitos secundarios, aislados de plantas de la familia Annonaceae (Alali et al. 1998). Estas han sido empleadas como fungicidas, bactericidas, antihelmínticos, antivirales e insecticidas contra diversos ordenes de insectos (coleópteros, hemípteros, phthyrápteros, lepidópteros, blátidos y otros). La acción de las AA está basada en el hecho de que son, hasta ahora, los inhibidores más potentes y específicos del Complejo I de la respiración mitocondrial (Romano 2003). Además de su reconocido efecto antiparasitario y antitumoral, las AA son importantes por la baja tasa de resistencia que podrían generar los insectos frente a ellas (He et al. 1996; Alali et al. 1998)

Teniendo en cuenta que *Periplaneta americana* es una especie plaga importante en el ambiente doméstico de todo el mundo y dado que la resistencia a los insecticidas químicos sintéticos es un fenómeno frecuente, es importante buscar otras alternativas de control y trabajar en la evaluación de la toxicidad de nuevos productos insecticidas. Las acetogeninas extraídas de las semillas de *Annona muricata* (Annonaceae), pueden constituirse en alternativas eficientes y ambientalmente menos costosas para el control de *P. americana*. Los resultados encontrados podrían ser la base para la elabo-

ración y producción de una línea de insecticidas naturales para uso en ambientes urbanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas: Se emplearon seis cepas de *P. americana*. La cepa control (Univalle) ha estado en aislamiento desde hace 10 años y es la más susceptible a los insecticidas químicos sintéticos piretroides y organofosforados (G. Jaramillo com. pers.). Las cinco cepas restantes corresponden a poblaciones de tres ciudades del suroccidente colombiano (Cali-Ciudad Jardín, Cali-Los Álamos, Popayán-Las Américas, Popayán-Santa Clara y Buenaventura). Las seis cepas se encuentran en el Insectario de Entomología de la Estación Experimental del Departamento de Biología de la Universidad del Valle, sede Meléndez.

Los individuos empleados para todas las pruebas y ensayos fueron ninfas de últimos estadios. En ningún caso se hizo distinción entre individuos machos y hembras.

Pruebas con olfatómetros para selección del cebo: Estas pruebas fueron realizadas de forma similar a lo expuesto por Wileyto & Boush (1983) mediante un circuito cerrado con cámaras conocido como olfatómetro. Este poseía una cámara central triangular (25 cm alto x 30 cm base), que se unía a dos cámaras laterales (34 cm x 25 cm) a través de sendos tubos de PVC (8 cm de diámetro x 50 cm de largo), regulando el paso a ellas por medio de compuertas (Figura 1).

Para los ensayos se aislaron 30 individuos de la cepa control sin alimento ni agua durante 24 a 36 horas. Uno a uno cada individuo se introdujo en la cámara central con las compuertas cerradas y se dejó reposar por cinco minutos. Cada evento individual fue considerado una repetición para el conteo final. Luego se abrieron las compuertas de acceso a las diferentes cámaras elegibles. Entre cada ensayo individual se limpió el olfatómetro rigurosamente usando hipoclorito de sodio, detergente, agua caliente y etanol al 95%. Las opciones a las que se expusieron las ninfas se presentan en la tabla 1 (modificado de Wileyto & Boush 1983).

El Cebo en gel para las pruebas consistió en una mezcla de gelatina sin sabor (7.5 gr), agua (70 ml), cerveza (40 ml), miel (30 ml) y benzoato de sodio (basado en Appel 1992).

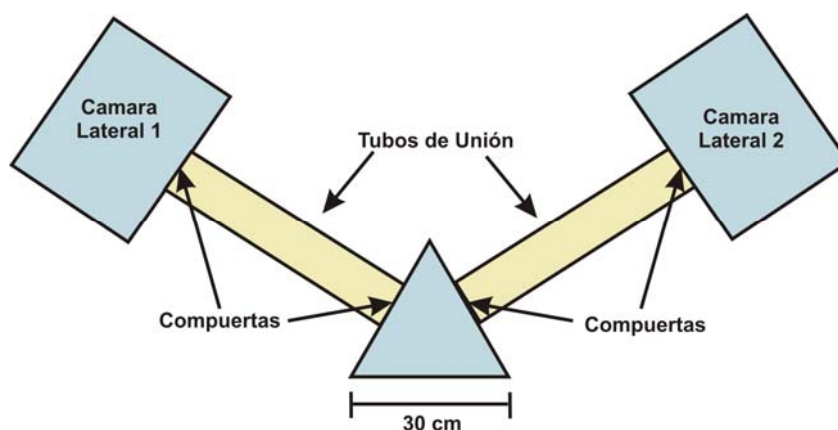


Figura 1. Esquema del olfatómetro usado en las pruebas de selección del cebo por parte de *P. americana* (escala 1:10).

Extracción de las acetogeninas: Las semillas de guanábana (*A. muricata*) se obtuvieron de la despulpadora “Pulpas San Fernando”, localizada en el corregimiento de San Fernando de Bolívar, Valle. Las semillas se secaron al sol durante siete días para producir su deshidratación. Posteriormente fueron pulverizadas en un molino industrial marca Willey Mill Modelo No 2. A partir de esta harina se realizó la extracción utilizando un equipo Soxhlet con etanol al 95% como solvente. Este proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Análisis de Alimentos de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad del Valle (basado en Garzón 1996).

Terminado este proceso, la extracción fue rotavaporada a 40°C y 60 rpm en un equipo Laborota 4001 WB Heidolph, ubicado en el laboratorio de Síntesis Orgánica de la Universidad del Valle. Por cada 40 gr de harina de semilla se obtuvieron 8 ml de extracto aceitoso el cual fue refrigerado a 4 °C (modificado de Garzón 1996).

Tabla 1. Opciones usadas en las pruebas con olfatómetros realizadas con ninfas de *P. americana*.

Opción 1	Opción 2
Pan+Cerveza	Control negativo*
Cebo en gel	Control negativo*
Cebo en gel	Pan+Cerveza

* Frasco de vidrio de 2 ml.

Pruebas biológicas: Se realizaron bioensayos para dos métodos de intoxicación que fueron: contacto con superficie (bioensayos con botellas) e ingestión de cebo tratado.

Bioensayos con botellas: Las botellas Schott Duran tenían un volumen de 250 ml. Previo a cada prueba se les realizó un lavado riguroso con jabón, acetona y agua caliente para eliminar cualquier residuo químico de su interior.

Para los bioensayos con botellas se realizaron cinco soluciones prueba (0.25, 0.30, 0.40, 0.50 y 0.60 ml/botella) a partir de la solución base (extracto aceitoso). Con estas diluciones se impregnó la superficie interna de las botellas. En total se trataron seis botellas para introducir cinco individuos de la cepa control Univalle en cada una y completar 30 repeticiones para la prueba. Se adicionaron dos botellas más tratadas con una mezcla de acetona y aceite mineral (en la misma proporción del tratamiento) como control. Cada diez minutos durante dos horas y a las 4, 12, 24 y 48 horas se observó y retiró los individuos en knock-down y se midió la mortalidad total a las 24 y 48 horas. Este proceso se repitió con cada solución test y para cada una se obtuvo una dosis de knock-down (KD) que fueron la línea base para la especie. Con la KD90 obtenida de esta forma se impregnaron nuevamente seis botellas para introducir otros 30 individuos (5 en cada una) de una de las poblaciones del sur-occidente colombiano. También se adicionaron 10 individuos como control. Se realizaron las mismas observaciones anteriormente mencionadas para cada población evaluada. El procedimiento con la

KD90 (obtenida a partir de la cepa control Univalle) se repitió con cada una de las poblaciones de las cinco ciudades para obtener los KT de cada una (modificado de WHO 2006).

Pruebas de ingestión: En esta prueba se emplearon recipientes de plástico con capacidad de 1500 ml. El tratamiento de acetogeninas se mezcló en una proporción 1:1 del cebo de gel probado, reemplazando el volumen de agua por el de extracto requerido. Se colocó 1 ml del cebo tratado y cinco individuos por cada recipiente y se observó por 10 días. También se adicionaron dos recipientes control con 1 ml de cebo que no había sido tratado (modificado de Appel 1992).

Los individuos se aislaron sin comida por al menos 48 horas antes de cada prueba. La concentración usada en la preparación del cebo fue la misma del KD90 de la prueba de botellas (0.5 ml extracto/1 ml de cebo).

Además, se realizaron pruebas con pan humedecido con extracto de acetogeninas (AA) como cebo, que se colocó sobre una caja petri pequeña dentro del recipiente de plástico. Se empleó la proporción 1 ml de extracto de AA/1 cm³ de pan y se realizaron las mismas observaciones anteriormente indicadas por un periodo de diez días (modificado de Appel 1992).

Prueba de repelencia: Se probó la repelencia producida por el extracto de AA frente a las ninfas de *P. americana*, usándose la misma metodología de olfatómetros (excepto el previo ayuno de los

individuos). En este caso las opciones empleadas fueron: (1) un pedazo de papel de 2 cm² impregnado con 0.1 ml de extracto de AA como opción repelente y (2) un pedazo de papel de 2 cm² sin ningún aditivo como control. Se emplearon 30 individuos, cada uno como una repetición (basado en Parra-Henao et al. 2007)

Análisis de datos: Para los conteos de las pruebas con olfatómetros se emplearon pruebas X². Los valores de los KD y KT se obtuvieron con Análisis Probit, a partir del paquete estadístico Polo-Plus: Probit and Logit Analysis (Robertson et al. 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas con olfatómetros para selección del cebo: Se evidenció una clara preferencia de las ninfas por los cebos expuestos (76.7%) que por el control (frasco de vidrio, 23.3%), X²=8.53, p<0.05 (Tabla 2).

Al contrastar el poder de atracción de ambos cebos frente a las ninfas, no se observó diferencia significativa entre ellas (X²=0.13, p>0.05) (Tabla 2).

Bioensayos con botellas: Los valores de KD para la prueba de contacto en superficie se muestran en la tabla 3. A partir del valor de la KD90 se calcularon los KT de las diferentes poblaciones de *P. americana*.

Tabla 2. Resultados de pruebas con olfatómetros para escogencia de cebo (cebo en gel y pan+cereza) en ninfas de *P. americana*.

% de Escogencia de Cebo		X ²	p
Cebo en Gel 76.67% (n=23)	Frasco de Vidrio 23.33% (n=7)	8.53	0.0035
Pan+Cerveza 76.67% (n=23)	Frasco de Vidrio 23.33% (n=7)	8.53	0.0035
Cebo en Gel 46.67% (n=14)	Pan+Cerveza 53.33% (n=16)	0.13	0.715

Esta atracción es probablemente debida a que las cucarachas tienen una gran afinidad por los compuestos azucarados (Wileyto & Boush 1983) tales como los que se encuentran en la miel y en la cebada de la cerveza.

Técnicamente, no importa cuál de los dos cebos se emplee ya que la principal característica que deben poseer es ser atractivo para la especie blanco (Appel 1992). Sin embargo, si se tienen en cuenta características como la estabilidad en el ambiente, el cebo en gel sería el más recomendable.

Tabla 3. KD para ninfas de *P. americana* obtenida en bioensayos con botellas tratadas con diferentes concentraciones de extractos de AA de *A. muricata*.

KD	Dosis (ml/botella)	IC95 de la Dosis
KD10	0.178	0.143 – 0.206
KD50	0.319	0.293 – 0.342
KD90	0.569	0.514 – 0.661
KD95	0.671	0.591 – 0.813
KD98	0.808	0.690 – 1.029
KD99	0.914	0.764 – 1.205

Los extractos realizados con soxhlet a partir de *A. muricata* presentaron actividad insecticida sobre ninfas de últimos estadios de *P. americana*, lo cual está aparentemente asociado al efecto de las AA. La figura 2 muestra la mortalidad presentada por las ninfas de *P. americana* de las seis cepas durante el tiempo. Las curvas tienden a ser homogéneas en incremento de porcentajes de mortalidad, reflejando una considerable similaridad para todas las poblaciones.

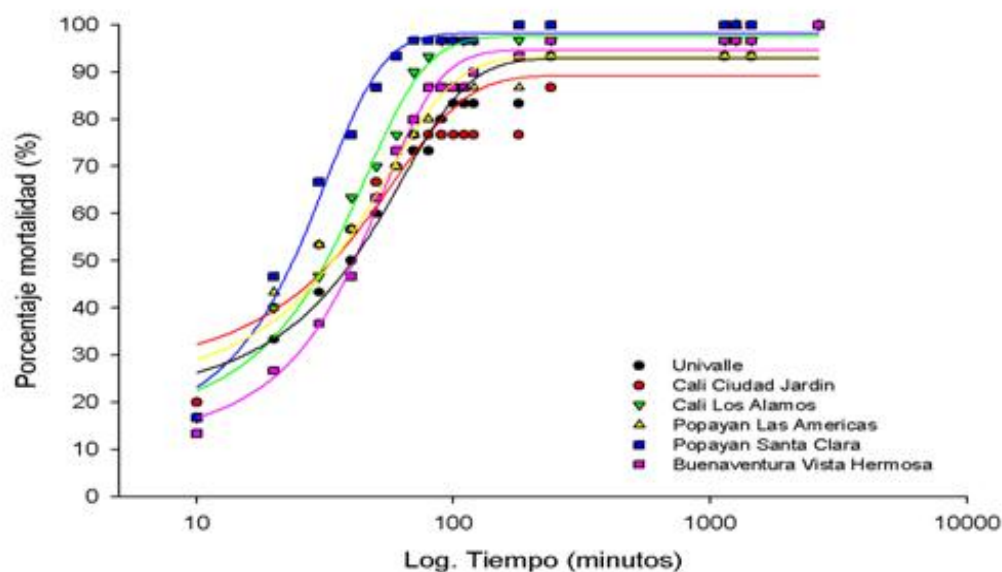


Figura 2. Curvas dosis/respuesta de seis cepas de *P. americana* obtenidas en bioensayos con botellas, tratadas con una concentración de 0.5ml/botella de extracto de AA, bajo condiciones de laboratorio.

Los tiempos de knock-down medio (KT50) presentaron valores similares entre cada una de las poblaciones del sur-occidente colombiano y la cepa control (Tabla 4). No se evidenció diferencia significativa, teniendo en cuenta los IC95. Esto sugiere que las poblaciones del sur-occidente colombiano son igualmente susceptibles a los extractos de acetogeninas utilizados.

Estos resultados coinciden con los de estudios realizados por Alali et al. (1998) en *Blattella germanica*, donde encontraron tasas de resistencia mucho menores frente a AA en relación a insecticidas químicos sintéticos.

Tabla 4. KT50 de contacto con superficie para ninfas de *P. americana* de las poblaciones del sur-occidente colombiano y cepa control Univalle.

Población	KT50 (min)	IC95 de los Tiempos
Control Univalle	32.21	22.48 – 41.76
Cali- Ciudad Jardín	26.40	17.46 – 35.56
Cali- Los Álamos	27.08	22.42 – 31.46
Popayán- Las Américas	25.11	14.18 – 35.97
Popayán- Santa Clara	21.19	17.11 – 25.00
B/ventura- Vista Hermosa	35.27	29.37 – 40.95

Pruebas de Ingestión: Las observaciones realizadas en los intervalos de 1, 2, 3, 7 y 10 días se muestran en la tabla 5. Ninguno de los individuos tratados con el cebo en gel murió en la primera semana excepto el que entró en proceso de muda. El 40% murió después de la primera semana (a los 10 días), sin embargo, la causa de ingestión no

pudo ser precisada. Esto podría indicar que a pesar de que el cebo en gel es significativamente atractivo por sí mismo, su afinidad es considerablemente reducida al mezclarse con el extracto aceitoso de AA, lo cual lo hace poco práctico y no recomendable.

Tabla 5. Observaciones cualitativas de respuesta de ninfas de *P. americana* a la ingestión de cebo tratado con extractos de AA de *A. muricata*

Cebo	Tiempo	Observaciones
Gel (AA 50%)	24 horas	Individuos normales. Uno en inicio de muda.
	48 horas	El individuo en muda en estado de knock-down. Los demás individuos con baja actividad.
	72 horas	El individuo en knock-down muere. Los demás con signos de debilitamiento.
	10 días	40% de los individuos muertos. Los demás débiles, pero vivos.
Pan Humedecido (AA 100%)	24 horas	Todos los individuos normales.
	48 horas	Un individuo muerto. La causa es el contacto debido a un derrame de extracto.
	7 días	Individuos débiles, pero aun vivos.
	10 días	60% de los individuos muertos. La causa no es muy clara.

El cebo de pan solo presentó mortalidad luego de una semana (10 días). En los primeros días solo ocurrió una muerte accidental por contacto. Ninguno de los individuos entró en proceso de muda durante este tiempo.

El largo tiempo requerido para producir la muerte estuvo relacionado con la baja tasa de consumo de

cebo tratado. Este aparentemente perdió su capacidad de atracción cuando fue mezclado con el aceite de AA. Aun así, las señales de debilitamiento se pueden atribuir a intoxicación por AA (característica con la que Londershausen et al. (1991) definieron la acción de las AA) y no a la inanición, debido a que esta especie tiene la capacidad

de soportar extensos periodos de ayuno (Bell & Adiyodi 1981).

Se observó adicionalmente, que todas las ninfas que entraron en proceso de ecdisis, mientras estaban en contacto con AA, eran conducidas a estado de knock-down y posteriormente morían. Sin embargo, es necesario clarificar como es el mecanismo de acción de las AA durante el proceso de ecdisis y definir si algunos de los compuestos de los extractos aceitosos pueden actuar como análogos y/o inductores por si mismos de la ecdisis en ninfas de *P. americana*.

Al parecer el hecho está ligado al alto déficit energético que produce la intoxicación por AA (Romano et al. 2003) que es cercano a un 80% menos de ATP producido. Esto, contrastado con la alta demanda energética que es requerida durante el proceso de ecdisis.

Prueba de repelencia: Las pruebas con olfatómetros mostraron un marcado efecto repelente (80%) por las ninfas de *P. americana* a las AA impregnadas en el papel ($X^2=10.2$, $p=0.001$). Por lo tanto se podría considerar efectivo en la prevención de infestaciones o colonizaciones por parte de esta

especie, pero es necesario definir cuál sería la formulación más adecuada y la duración del efecto repelente.

El aroma en las semillas de guanábana es debido a diversos compuestos llamados alquilbencenos (Correa & Bernal 1989). Uno de los compuestos más fácilmente captados por las cucarachas son los lípidos, ya que son bastante volátiles y además tienen cierta analogía con su hormona de agregación (Wileyto & Boush 1983). La relación entre los lípidos y los alquilbencenos es probablemente la combinación que al ser depositada en algún vehículo, produce el alcance y la repelencia de gran efectividad contra las cucarachas. Sin embargo, se debería calcular con precisión la dosis adecuada y evaluar la permanencia del efecto repelente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la empresa Pulpas San Fernando por la donación de las semillas de *A. muricata*, al Laboratorio de Investigación y Análisis de Alimentos de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad del Valle por el apoyo en la obtención de los extractos.

LITERATURA CITADA

- Alali, F. Q., W. Kaakeh, G. W. Bennett & J. L. McLaughlin. 1998. Annonaceous acetogenins as natural pesticides: Potent toxicity against insecticide-susceptible and insecticide-resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 91(3):641-649.
- Appel, A. G. 1992. Performance of gel and paste bait products for German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) control: laboratory and field studies. *Journal of Economic Entomology*, 85(54):1176-1183.
- Arduso, L. 2002. Alergenos: Características que deben presentar para realizar pruebas cutáneas de lectura inmediata. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica*, 33(2):43-50.
- Bell, W. J. & K. G. Adiyodi. 1981 *The American Cockroach*. Chapman and Hall. New York.
- Cornwel, P. B. 1968. *The Cockroach*, Volume I. Hutchinson & Co. Ltd. London.
- Correa, J. E. & H. Y. Bernal. 1989. Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Tomo I. Guadalupe Ltda. Bogotá D.C.
- Garzón, T. S. P. 1996. Obtención de metabolitos secundarios del extracto polar de la semilla de *Annona muricata* (Guanábana). Tesis de pregrado Química. Cali-Colombia, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias.
- He, K., L. Zeng, Q. Ye, G. Shi, N. H. Oberlies, G. Zhao, C. J. Njoku & J. L. McLaughlin. 1996. Comparative SAR evaluations of Annonaceous Acetogenins for pesticidal activity. *Journal of Pesticide Science*, 49:372-378.
- Londershausen, M., W. Leicht, F. Lieb, H. Moeschler & H. Weiss. 1991. Molecular mode of action of annonins. *Journal of Pesticide Science*, 33:427-438.
- Parra-Henao, G. J., P. C. M. Garcia & T. J. M. Cotes. 2007. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* (Hemiptera: Reuviidae). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 47(1):125-137.
- Robertson, J. L., H. K. Preisler & R. M. Rusell. 2003. PoloPlus Probit and Logit Analisis. LeOra Software.

- Romano, V. A., R. V. A. Orru, B. Groenendaal, J. Van Heyst, M. Hunting, C. Wesseling, R. F. Schmitz, S. F. Mayer & K. Faber. 2003. Biomimetic approach to the stereoselective synthesis of Acetogenins. *Pure Application Chemistry*, 75(2-3):259-264.
- Wileyto, E. P. & M. Boush. 1983. Attraction of the German cockroach, *Blattella germanica* (Othoptera: Blattellidae), to some volatile food components. *Journal of Economic Entomology*, 76:752-756.
- World Health Organization (WHO). 1999. Communicable diseases prevention and control (CDS/CPC). WHO Pesticide evaluation scheme (WHOPES) cockroaches. Their biology distribution and control by Donald G. Cochran.
- World health Organization (WHO). 2006. Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets. (WHO/CDS/NTD/WHOPES/GDCPP/2006.3).