

Evaluación de la actividad tóxica de extractos metanólicos de plantas en *Triatoma pallidipennis* (hemiptera: reduviidae), vector de la enfermedad de Chagas

Molina Garza Zinnia Judith^{1*}, Leal Olvera Ana Karen¹, Galaviz Silva Lucio¹, Montes Rincón Laura Mayela¹, Quintanilla Licea Ramiro.²

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Zoología de Invertebrados. Ave. Pedro de Alba s/n cruz con Ave. Manuel L. Barragán, San Nicolás de los Garza, Nuevo León. C.P. 66455. México.

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Química. Ave. Pedro de Alba s/n cruz con Ave. Manuel L. Barragán, San Nicolás de los Garza, Nuevo León. C.P. 66455. México.

*Autor para correspondencia: molinazinnia@hotmail.com

Recibido:

18/julio/2018

Aceptado:

20/septiembre/2018

Palabras clave:

Triatoma pallidipennis, extractos, toxicidad

Keywords:

Triatoma pallidipennis, extracts, toxicity

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). En su ciclo de transmisión interviene vectores invertebrados perteneciente a la Familia Reduviidae. En triatomines se ha reportado resistencia a insecticidas como deltametrina, betacipermetrina, etc. El objetivo de este es evaluar la actividad tóxica de extractos metanólicos de plantas en *Triatoma pallidipennis*. Se aplicó un volumen de 0.5 µL en los tergos abdominales de 10 ninfas, se realizaron 3 repeticiones para cada extracto, se aplicaron dosis desde 3 a 164 mg/mL de cada planta, así como para el control. De acuerdo a los resultados obtenidos, las mejores alternativas a los insecticidas comerciales se encontraron en el extracto del pirul, *Shinnus molle* (DL₅₀ de 25.47 mg/ml), y en el extracto de la ruda, *Ruta chalepensis* (DL₅₀ y DL₉₀ de 43.65-140.9 mg/mL respectivamente), de acuerdo a las mortalidades obtenidas superiores al 90 % en las ninfas.

ABSTRACT

Chagas disease is a complex zoonosis caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). In the cycle of transmission intervene invertebrate vectors belonging to the Family Reduviidae. Triatomines have reported resistance to insecticides such as deltamethrin, betacypermethrin, etc. The objective of this work was to provide a viable alternative for the control of triatomines with which the risk of cross resistance is reduced. A volume of 0.5 µL was applied in the abdominal tergos of 10 nymphs. Three repetitions were made for each extract, applying doses from 3 to 164 mg/mL of each plant, as well as for the control. According to the results obtained, the best alternatives to commercial insecticides were found at the American pepper (*Shinnus molle*) (LD₅₀ of 25.47 mg/mL) and the bougainvillea plant, *Ruta chalepensis* (DL₅₀ and DL₉₀ of 43.65-140.9 mg/mL, respectively), which were obtained a higher mortalities over 90 % in nymphs.

Introducción

La enfermedad de Chagas es una zoonosis compleja causada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Esta enfermedad se encuentra mayormente distribuida en el Continente Americano, con un elevado índice de prevalencia; esta enfermedad, suele presentar un cuadro clínico grave, como, megacolon, megaesofago hasta una miocardiopatía crónica chagásica, la cual es uno de los retos de salud pública más importantes de América Latina (Shofield, 1994). La tripanosomiasis americana, es endémica en 21 países latinoamericanos, donde es señalada como la mayor causa de morbilidad y mortalidad con alrededor de 7-8 millones de personas infectadas, aproximadamente 12,000 muertes anuales y una incidencia de 56000 casos al año (WHO, 2013).

En su cadena de transmisión interviene un gran número de reservorios vertebrados y de insectos triatominos vectores que hacen imposible su erradicación (Rassi et al., 2009). Se menciona que hay mas de 130 triatominos en el mundo (Shofield, 1994) y para México se ha reportado la presencia de 31 especies de estos vectores (Ramsey et al., 2015), Actualmente en el estado de Guanajuato, se ha reportado la distribución de algunas especies de triatominos como son: *Triatoma mexicana* (Herrich-Schaeffer 1848) (Hemiptera: Reduviidae); *Triatoma barberi* (Usinger, 1939); *Meccus longipennis* (Usinger, 1939); *Meccus pallidipennis* (Stål, 1872) y *T. dimidiata* (Latreille, 1811) (López et al., 2002), Además de los reduvidos, existen otras vías de transmisión como son: transfusión sanguínea, vía trasnplacentaria, transplante de órganos, accidentes en el laboratorio etc (OMS, 2011). El principal medio de control de la endemia se basa en la lucha contra los triatominos domiciliarios con uso de insecticidas no selectivos, diseñados para matar una gran variedad de Reduviidae (Schofield, 1994; Coura y Dias, 2009). Actualmente en el control de las especies domiciliarias se utilizan insecticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides sintéticos de los cuales los insecticidas piretroides suelen ser los más efectivos contra estas plagas (Oliveira-Filho, 1984), sin embargo estas generan un mecanismo de resistencia en los triatominos, *T. infestans* (Klug 1834) y *Rhodnius prolixus* (Stål 1859), los cuales son dos especies que son en gran medida responsables de la transmisión de *T. cruzi* (Vassena et al., 2000). La utilización de plaguicidas de origen químico de manera excesiva y sin previa asistencia técnica ha causado la resistencia en los organismos de la familia Reduviidae a los que se les aplica (Badii y Landeros, 2007). En triatominos se ha reportado resistencia a insecticidas como deltametrina, betacipermetrina, betaciflutrina y lambdacihalotrina (Gupta, 2004). El uso

indiscriminado de insecticidas sintéticos ha ocasionado contaminación medioambiental, además de presentar alta toxicidad para otros organismos (Nakata et al., 2005).

Para minimizar el riesgo de resistencia es necesario desarrollar otras estrategias de manejo que permitan obtener nuevas alternativas químicas o biológicas para el control de triatominos. Las plantas producen metabolitos secundarios que actúan como mecanismos de defensa y éstos se pueden utilizar en el control de plagas. Estas sustancias insecticidas pueden afectar la alimentación e inhibir el crecimiento de los insectos al alterar su equilibrio endocrinológico (Balandrin, 1985). La mayoría de los insecticidas vegetales son extractos que están constituidos por un grupo de ingredientes activos de diversa naturaleza química que ejerce una baja estabilidad de los insecticidas vegetales con escasa probabilidad que dos extractos sean siempre iguales, lo cual modifica la acción de este en las distintas plagas. Esto causa que la resistencia por parte de los insectos tarda más tiempo en desarrollarse a una mezcla de ingredientes activos naturales que a cualquiera de sus componentes por separado (Sukumar et al., 1991).

El objetivo de este trabajo, fue analizar cinco extractos metanólicos de plantas contra el vector *T. pallidipennis* colectado en el estado de Guanajuato. Los extractos con los que se trabajaron fueron los siguientes (se anexa el número de voucher identificadas en el laboratorio de botánica de la UANL-FCB) *Syzygium aromaticum*, nombre común: Clavo (025569), *Ruta chalepensis* o Ruda(025579), *Foeniculum vulgare*, nombre vulgar Hinojo (025546), *Capsicum annum cv. 'Serrano Sinahusia'* o Chile serrano (025536) y *Schinus molle* o Pirul (025567). Así mismo, los extractos de las plantas citadas no han sido estudiados con respecto a su actividad insecticida y/o repelente contra *Triatoma* sp, a excepción de los extractos de *S. molle* (Ferrero et al., 2006), pero sin llegar a la identificación química de compuestos activos. Por lo tanto este trabajo contribuye a la identificación de extractos metanolicos como una alternativa viable para el control de triatominos, y reducir el riesgo de resistencia a los insecticidas.

Metodología

Material vegetal

Dos de las plantas se compraron en Pacalli® (pacalli.com.mx, Monterrey, México): *S. aromaticum* y *F. vulgare*, las otras 3 fueron colectadas en el área metropolitana de Monterrey, N.L e identificadas por el laboratorio de botánica de la UANL-FCB. En la tabla 1 se muestran las especies vegetales utilizadas, el nombre botánico, la

familia y las partes de plantas con las que se trabajó para obtener los extractos metanólicos.

Extracción de las plantas

De las plantas se obtuvieron 60 g de material seco y en polvo, se extrajeron con metanol (MeOH, 600 mL) mediante el uso de un sistema Soxhlet para la extracción continua. Después de filtrar, el disolvente se evaporó bajo presión reducida en un evaporador rotatorio. Los diferentes extractos se conservaron en viales de vidrio herméticamente cerrados (Molina et al., 2014). Los rendimientos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Plantas medicinales utilizadas en el noreste de México investigadas respecto a su actividad.

Nombre científico ^a	Familia	Parte Usada ^b	Rendimiento (% ^p / _p) ^c
<i>Schinus molle</i> Linnaeus	Anacardiaceae	PA	15.9
<i>Syzygium aromaticum</i> Linnaeus	Myrtaceae	FL	39.9
<i>Ruta chalepensis</i> Linnaeus	Rutaceae	PA	12.7
<i>Foeniculum vulgare</i> Miller P.	Apiaceae	HO	12.4
<i>Capsicum annuum</i> Linnaeus	Solanaceae	FR	37.9

^a Lista de plantas (www.theplantlist.org), accesada 24.04.2018.

^b Parte de la planta extraída: HO, hojas; FL, flores; FR, frutos; PA, partes aéreas.

^c Porcentaje basado en material seco de la planta.

Preparación de dosis

El pirul, clavo, ruda, hinojo, y chile serrano, fueron preparados como extractos metanólicos por el Laboratorio de Fitoquímica de la UANL-FCB. Los extractos liofilizados, se pesaron en una balanza analítica, la cantidad con la que se trabajaron estaban en una proporción de 60 µg a 70 µg por tubo de extracto; posteriormente, estos se resuspendieron en 300 µL a 400 µL en metanol grado reactivo; considerándose ésta como la concentración stock de trabajo para poder hacer los retos experimentales.

Colecta del *Triatoma pallidipennis*

Se realizaron capturas de *T. pallidipennis* en el estado de Guanajuato, en los municipios de Xichú, Santa Catarina y

San Felipe Torresmochas. Los ejemplares se colectaron de manera manual y/o utilizando trampas de luz y rastreo con lámpara (Barrera-Pérez, 2003).

Cepa susceptible

De los ejemplares capturados, se estableció una colonia como “cepa susceptible”, la cual se crió durante 3 generaciones bajo condiciones controladas de humedad y temperatura en el laboratorio, manteniéndose alejada del contacto con insecticidas de origen químico. Todos los triatominos fueron alimentados una vez a la semana con sangre de rata albina (*Rattus Norvegicus albinus*) (Ministerio de Salud de la Nación, 2018).

Bioensayo de actividad tóxica

Para los bioensayos de toxicidad, se utilizaron 10 ninfas, se realizaron las aplicaciones en los tergos abdominales con un volumen de 0.5 µL (Figura 1), En la figura 2, es una representación esquemática donde se aplicaron las dosis. Se realizaron 3 repeticiones para cada bioensayo, la dosis fue de 3 hasta 164 mg/mL de cada extracto metanólico de la planta. Se evaluaron alrededor de 6 dosis, registrándose mortalidades de 10 – 100 %. Todas las ninfas que se utilizaron para los bioensayos de toxicidad se encontraban en el estadio 1, con una edad promedio de 3 a 5 días, sin haber sido alimentadas. Estos insectos se mantuvieron a una temperatura de alrededor de 24± 5 °C (Valladares et al., 1999). Se realizaron las lecturas a las 24 y 48hrs después de la exposición a las diferentes dosis. Para el criterio de mortalidad se consideró como muerta aquella ninfa que colocada sobre un papel filtro que no presentara actividad locomotora o reacción a la estimulación. Como control negativo se utilizaron 10 ninfas de estadio 1 de *T. pallidipennis* expuestas al metanol, mismo que se utilizó para la suspensión de los extractos liofilizados.



Figura 1. Ninfa 1 de *T. pallidipennis* vista ventral (Estereoscopio)

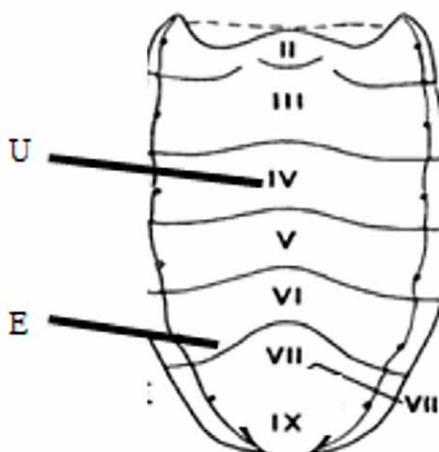


Figura 2. Representación esquemática del abdomen, vista ventral, U: Urosternitas; E: Espiráculos.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por medio de un análisis PROBIT con la ayuda del paquete estadístico SPSS 17.0. Para la dosis-respuesta, se utilizó el programa IRMA para determinar la dosis letal 50 y dosis letal 90 (DL₅₀ y DL₉₀).

Resultados y discusión

Para la prueba de toxicidad, el único extracto que obtuvo una mortalidad de 100 % a una concentración de 125 mg/mL fue la perteneciente al extracto de la ruda, mientras que para los extractos de clavo, pirul y chile serrano su mortalidad fue de 90 % a esta misma concentración, mientras que el extracto de hinojo tuvo un 80 % de mortalidad. El extracto de pirul tuvo una alta efectividad en menores concentraciones, teniendo una mortalidad de 60 % a la concentración de 45 mg/mL, el extracto de ruda, a la misma concentración, tuvo una mortalidad de 40 %, mientras que los extractos de clavo, chile serrano e hinojo a esta concentración mostraron una mortalidad de alrededor de 10 %. Los resultados se observaron en la figura 3.

En Perú, *S. molle*, se utiliza como control biológico para plagas agrícolas en insectos de los chrisopidos (*C. cincta* y *C. asoralis*), al exponer las larvas al extracto acuoso al 10 % a 48 h mostró una sensibilidad de 75 % de mortalidad, además de tener un efecto ovicida (Iannacone y Alvaríño, 2010), además Ferrero et al., (2006) obtuvo actividad de ovicida y repelencia en ninfas del primer estadio, al utilizar los extractos acetónicos de las hojas y frutos del pirul en *T. infestans*, lo cual corresponde con los resultados observados en la mortalidad observada.

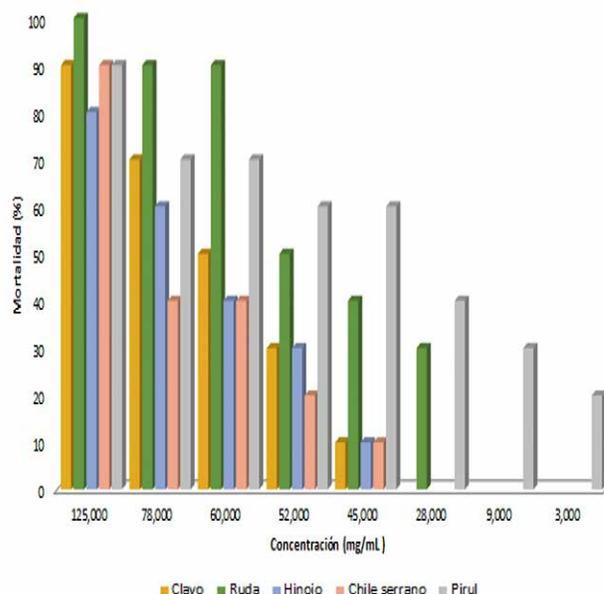


Figura 3. Pruebas de toxicidad de los extractos metanólicos contra *T. pallidipennis* en ninfas del estadio I.

Para la prueba de toxicidad, se obtuvieron DL₅₀ entre 25.5 a 76.6 mg/mL, mientras que para la DL₉₀ se obtuvieron concentraciones entre 140.9 a 353.7 mg/mL; Los extractos de pirul, clavo y ruda presentaron una DL₅₀ con alta efectividad. Sin embargo, el extracto del pirul, aunque tuvo una DL₅₀ con una alta efectividad, la DL₉₀ obtenida mostró una efectividad baja (Tabla 1); Ferrero et al., (2006), utilizó extractos hexánicos de hojas y frutos de la planta del pirul, los cuales obtuvieron una acción de repelencia y ovicida en ninfas y huevos de *T. infestans*, sin embargo, los autores no realizaron pruebas de toxicidad para esta especie. Se ha observado actividad de insecticida de extractos crudos de drupas de *S. molle* sobre larvas neonatas de *Cydia pomonella* observándose una mortalidad de 60 % a una concentración 5 g/kg, el cual tuvo también efecto de repelencia a una concentración de 1,25 a 5 g/kg (Chirino et al., 2001).

El extracto correspondiente a clavo obtuvo una DL₅₀ efectiva (35.9 mg/mL), en cambio para la prueba de toxicidad su DL₉₀ no fue efectiva, ya que su dosis utilizada en el vector fue muy alta (236.0 mg/mL). En cambio, el extracto de la ruda, tuvo un buen rendimiento en las dos dosis utilizadas para toxicidad: DL₅₀ fue de 43.65 y DL₉₀ tuvo una concentración menor a 140.9 mg/mL (Tabla 2), Abramson et al., (2007) estudiaron la exposición de *Rhodnius prolixus*, a los olores de canela, citral y *Ruta graveolens*, en sus resultados mostraron un retraso de muda, además de obtener una mortalidad de 75 % de triatomas del quinto estadio.

En cuanto a los extractos de hinojo, se obtuvo una efectividad baja en la DL₅₀ y DL₉₀, la toxicidad se observa de 72 y 241.5 mg/mL respectivamente, de igual forma se observan los resultados para el extracto de chile serrano (Tabla 2). Laurent (1997), observó una actividad larvicida del aceite esencial de *F. vulgare* en *T. infestans*, con muy buena actividad.

De acuerdo con la morfología de las ninfas de triatominos, éstos presentan en el abdomen, una placa quitinosa en el segmento ventral IX, lo que es más difícil la penetración de los compuestos de los extractos metanólicos. Sin embargo, se obtuvieron buenos resultados de toxicidad en las dosis letales 50 y 90 en el extracto de la ruda, por lo cual se recomienda el uso de esta planta como control del vector. También se recomienda el extracto de pirul, pero solo en la DL₅₀ ya que la DL₉₀ no fue satisfactoria.

Tabla 1. Actividad de toxicidad de extractos metanólicos contra *T. pallidipennis* vector de la enfermedad de Chagas

Extracto	DL ₅₀ (mg/mL)	DL ₉₀ (mg/mL)
	IC	IC
<i>S. molle</i>	25.5 (p=0.001) (15.3 - 35.7)	353.7(p=0.0006) (341.0 - 366.5)
<i>S. aromaticum</i>	35.9 (25.4 - 46.4)	236.0 (223.6 - 248.4)
<i>R. chalepensis</i>	43.65(p=0.001) (32.9 - 54.3)	140.9(p=0.0006) (129.0 - 152.7)
<i>F. vulgare</i>	72.0(p=0.0006) (60.8 - 83.2)	241.5(p=0.0005) (229.1 - 253.90)
<i>C. annuum cv.</i>	76.6(p=0.005) (65.4 - 87.8)	231.3(p=0.006) (218.9 - 243.6)

DL₅₀: Dosis que causa 50 % de mortalidad en las ninfas expresada en miligramos/mililitros; DL₉₀: Dosis que causa 90 % de mortalidad en las ninfas expresada en miligramos/mililitros; IC: intervalo de confianza de 95 %.

Conclusiones

De los extractos metanólicos probados, la opción más factible para su uso como insecticida natural en base a la prueba de toxicidad fue el extracto de la planta de *Ruta chalepensis* (Ruda), ya que sus dos dosis (DL₅₀ y DL₉₀) obtuvieron una efectividad alta en comparación de los

demás extractos probados. También se recomienda a *S. molle* (pirul) con una toxicidad alta para su DL₅₀.

Agradecimientos

Se agradece la colaboración de los investigadores del Laboratorio de Fitoquímica y del Laboratorio de botánica de la FCB-UANL. Además del personal perteneciente al Laboratorio de Patología Molecular y Experimental correspondiente a esta misma institución por su apoyo a lo largo del proyecto.

Referencias

Abramson C. I., Aldana E., Sulbara E. (2007). Exposure to citral, cinnamon and ruda disrupts the life cycle of vector of Chagas Disease. *Environ. Sci.*, 3: 7-8.

Badii M. H., Landeros J. (2007). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *Cultura Científica y Tecnológica (CULCyT)*, 19: 21-34.

Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele E. S., Bollinger W. H. (1985). Natural plant chemicals: Source of industrial and medicinal materials. *Scienc., New Serie*, 228: 1154-1160.

Barrera-Pérez M. A. (2003). Dinámica poblacional de *Triatoma dimidiata*, vector de la enfermedad de Chagas, en la Península de Yucatán, México. Colima, México. Tesis de Doctorado, Universidad de Colima.

Chirino M., Carriac M., Ferrero M. A. (2001). Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de *Schinus Molle L.* (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de *Cydia Pomonella L.* (Lepidoptera: Tortricidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 27: 305-314.

Coura J., Dias J. (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease-100 years after its discovery. *Mem I Oswaldo Cruz*, 1: 31-40.

Ferrero A., Werdin-González J., Sánchez-Chopa C. (2006). Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia*, 77: 381-383.

Gupta P. N. K. (2004). Pesticide exposure-Indian scene. *Toxicology*, 198: 83-90.

Laurent D. (1997). Insecticidal Activity of Essential Oils on *Triatoma infestans*. *Phytotherapy research*, 11: 283-290.

López-Cárdenas J., Gonzáles-Bravo F. E., Salazar-Schettino P. M. (2002). Distribución espacial de vectores de la enfermedad de Chagas en el estado de Guanajuato

1998–2000. Acta Universitaria, sept–dic, año/vol. 12, núm. 003. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.

Molina-Garza Z. J., Bazaldúa-Rodríguez A. F., Quintanilla-Licea R., Galaviz-Silva L. (2014). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta tropica.*, 136: 14-18.

Nakata H. Y., Hirakawa M., Kawazo T., Nakabo K., Arizono, S. I., Abe T., Kitano H., Shimada I., Watanabe W., Ding X. (2005). Concentrations and compositions of organochlorine contaminants in sediments, soils, crustaceans, fishes and birds collected from Lake Tai, Hangzhou Bay and Shanghai city region, China. *Environ. Pollu.*, 133: 415-429.

Oliveira-Filho A. (1984). New alternatives for Chagas' disease control. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.*, 79: 117-123.

O.M.S. (2011). Enfermedad de Chagas. Recuperado el 10 de Junio del 2018, de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743.

Ramsey J. M., Peterson A. T., Carmona-Castro O., Moo-Llanes D. A., Nakazawa Y., Butrick M., Tun-Ku E., de la Cruz-Félix K., Ibarra-Cerdeña C. N. (2015). Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 110: 339-35.

Rassi A. Jr., Dias J. C., Marin-Neto J. A., Rassi A. (2009). Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart.*, 95: 524-34.

Schofield C. (1994). Triatominae: biología y control. West Sussex. *Eurocommunica Publications*, p. 1-79.

Sukumar K., Perich M., Boobar L. (1991). Botanical derivatives in mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc.*, 2: 210–237.

Valladares G. R., Ferreyra D., Defago M. T., Carpinella M. C., Palacios S. (1999). Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia.*, 70: 421-424.

Vassena C., Picollo, M., Zerba E. (2000). Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol.*, 1: 51-55.

WHO. *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. Obtenido de World Health Organization: Recuperado

el 8 de Marzo del 2013, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

Zárate L. G., Zárate R. J. (1985). A checklist of triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. *Int J Entomol.*, 27: 102–12.