

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Utilización de aceites esenciales de pinaceas endémicas como una alternativa en el control del *Aedes aegypti*

Maureen Leyva,¹ Juan E. Tacoronte,² María del Carmen Marquetti,³ Ramón Scull,⁴ Olinka Tiomno,⁵ Antonio Mesa⁵ y Domingo Montada⁶

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Pinus caribaea* y *Pinus tropicalis* son especies de plantas endémicas de Cuba y en su composición química presentan estructuras que se reportan en otras especies de plantas con fuerte actividad insecticida. **OBJETIVO:** evaluar el efecto larvicida de dos Pinaceas y sus derivados (aceites de trementina) en, *Aedes aegypti*, además de determinar el efecto ovicida de estos últimos en huevos de esta especie. **MÉTODOS:** se utilizó una cepa susceptible de referencia Rockefeller, suministrada por el Centro de Control de Enfermedades de San Juan de Puerto Rico y los bioensayos se realizaron según metodología de la Organización Mundial de la Salud para determinar resistencia y(o) susceptibilidad a insecticidas en mosquitos. El aceite de *Pinus tropicalis* fue obtenido por hidrodestilación y el aceite de *Pinus caribaea* se obtuvo por arrastre al vapor. El aceite de trementina (AT01) fue obtenido destilando la resina de pinos y una parte de este fue sometido a un tratamiento fotoquímico (AT02) de izomerización del α -pineno y β -pineno como componentes mayoritarios. **RESULTADOS:** el aceite de *P. tropicalis* mostró una concentración letal CL_{50} = 42 mg/L y una CL_{95} = 57 mg/L, y para *P. caribaea* la CL_{50} = 51 mg/L y CL_{95} = 181 mg/L. Los 2 aceites de trementina utilizados AT01 y AT02 mostraron alta acción larvicida al obtenerse las CL_{50} más bajas de este estudio (21,4 mg/L y 23,9 mg/L). El mayor efecto ovicida se mostró con la dosis diagnóstico del aceite de trementina AT02, con 94 % de no eclosión. **CONCLUSIONES:** los aceites foliales y sus derivados son candidatos para el control de esta especie de insecto, tanto por actividad insecticida como por su factibilidad, extracción y escalado.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, *Pinus*, trementina, aceites esenciales.

INTRODUCCIÓN

A partir de la necesidad de encontrar una nueva alternativa para el control de insectos vectores de enfermedades y disminuir la aplicación de los insecticidas sintéticos surgen los insecticidas botánicos, los que ofrecen seguridad para el medio ambiente. La selección de plantas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como insecticidas naturales deben cumplir una se-

rie de requisitos como son estar ampliamente distribuida, de asequible obtención, con principios activos potentes, y alta estabilidad química.¹ Por causa de la resistencia y toxicidad asociadas a los insecticidas sintéticos, además de sus altos costos, la utilización de plantas y sus aceites esenciales constituye una fuerte tendencia actual como alternativa para el control de insectos.²⁻⁵ Tal es el caso de 2 especies de la familia Pinaceas; *Pinus caribaea* y *Pinus tropicales*, las cuales son

¹ Máster en Entomología Médica y Control de Vectores. Aspirante a Investigadora. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK). Ciudad de La Habana, Cuba.

² Doctor en Ciencias Químicas. Investigador Auxiliar. Centro de Investigaciones e Ingeniería Química (CIQ). Ciudad de La Habana, Cuba.

³ Doctora en Ciencias de la Salud. Investigadora Auxiliar. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁴ Ingeniero Agrónomo. Investigador Agregado. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Ciudad de La Habana, Cuba.

⁵ Máster en Química. Investigador Agregado. CIQ. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁶ Licenciado en Biología. Investigador Auxiliar. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

endémicas de Cuba y en su composición química presentan estructuras que se reportan en otras especies de plantas con fuerte actividad insecticida.^{6,7}

Como parte del aprovechamiento de los recursos forestales se hace necesaria la utilización de la flora autóctona como fuente ecosostenible para el control de insectos en el contexto de búsqueda de soluciones más ecológicas.⁸

Es por eso que el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto larvicida de 2 Pináceas y sus derivados (aceites de trementina), además de determinar el efecto ovicida de estos últimos en huevos de *Aedes aegypti*.

MÉTODOS

Para evaluar la *actividad larvicida* de los aceites foliales y aceites de trementina en larvas de mosquito, se realizaron los bioensayos según la metodología de la Organización Mundial de la Salud (OMS);⁹ se utilizó una cepa susceptible de referencia Rockefeller, suministrada por el Centro de Control de Enfermedades de San Juan, Puerto Rico, cuya CL₉₀ para lambda-cialotrina fue de 0,014 ppm, para cipermetrina 0,006 ppm y para clorpirifos 0,012 ppm. En cada concentración evaluada se utilizó un control y 4 réplicas, a los cuales se les añadió 1 mL de las soluciones preparadas del aceite (que fueron disueltas en etanol) y se añadió en 249 mL de agua y al control 1 mL de etanol en el mismo volumen. Para cada concentración probada se utilizaron 125 larvas de tercer instar (25 para cada frasco). Las dosificaciones por aceite se replicaron 3 veces. La temperatura ambiente osciló entre 28 y 30 °C. Se realizó la lectura de la mortalidad a las 24 h. En los bioensayos

para medir la *acción ovicida* se tomaron huevos recién puestos acondicionados en cámara húmeda, se supervisó su viabilidad bajo un microscopio estéreo. Se expusieron los huevos contados (n≈ 300 por cada concentración) a las CL₅₀, CL₇₀, CL₉₅ y las dosis diagnósticas obtenidas de los aceites de trementina en 100 mL de agua de clorinada con una pizca de alimento. Cada concentración ensayada constó de 1 control y 4 réplicas. A las 24 h se extrajeron los huevos para ser contados bajo el estéreo y calculado el porcentaje de no eclosión. Posteriormente se introdujeron de nuevo en agua limpia con una pizca de alimento, para observar si ocurría eclosión después de 24 h de exposición a estas dosis.

Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa Probit -Log,¹⁰ el cual brinda la CL₅₀ y CL₉₀ además de la ecuación de la línea de regresión y se aplicó también una prueba de comparación de proporciones para evaluar el efecto ovicida.

El aceite de *Pinus tropicalis* fue obtenido por hidrodestilación y el aceite de *Pinus caribaea* se obtuvo por arrastre al vapor. El aceite de trementina fue obtenido por destilación de la resina de pinos, el cual por nomenclatura se nombró AT01. Una parte de este aceite fue sometido a un tratamiento fotoquímico de izomerización de componentes mayoritarios; α-pineno y β-pineno, se nombró AT02.

RESULTADOS

En la tabla se observan los resultados obtenidos con los aceites de *Pinus tropicalis* y *Pinus caribaea*. Se pudo constatar que el aceite de *P. tropicalis* mostró una CL₅₀ = 0,0042 % (42 mg/L) y una CL₉₅ = 0,0057 % (57 mg/L), y para

TABLA. Concentraciones letales (%), rectas de regresión y pendientes obtenidas con los aceites esenciales de *Pinus tropicalis*, *Pinus caribaea* y sus derivados; aceite de trementina puro (AT01) y aceite de trementina modificado (AT02) en *Aedes aegypti*

	<i>P. tropicalis</i>	<i>P. caribaea</i>	AT01	AT02
CL ₃₀	0,0039	0,0034	0,00194	0,00198
CL ₅₀	0,0042	0,0051	0,00214	0,00239
CL ₇₀	0,0047	0,0077	0,00237	0,00290
CL ₉₅	0,0057	0,0181	0,00293	0,00436
Recta de regresión	Y= 5,30 + 12,93 X	Y= 5,17 + 3,00 X	Y= 4,66 + 12,13 X	Y= 4,92 + 6,32 X
Pendiente (b)	12,93	3,00	12,13	6,32

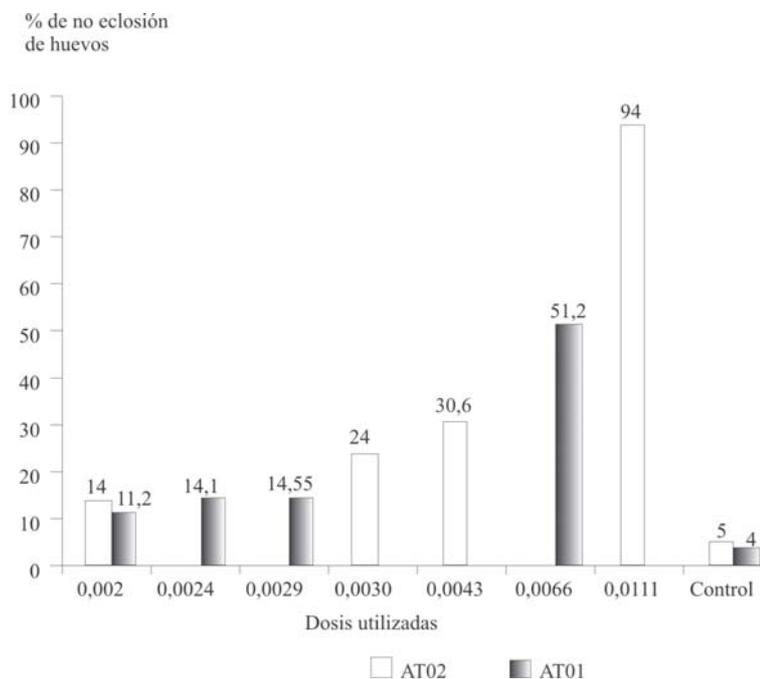


Fig. Porcentaje de no eclosión de huevos de *Aedes aegypti* enfrentados a las CL_{50} , CL_{70} y CL_{95} y dosis diagnóstico de aceite de trementina puro (AT01) y con tratamiento fotoquímico (AT02).

P. caribaea la CL_{50} = 0,0051 % (51 mg/L) y CL_{95} = 0,0181 % (181 mg/L). De la misma forma se observaron los resultados obtenidos con los 2 aceites de trementina, los cuales mostraron alta acción larvicida al obtenerse las CL_{50} más bajas de este estudio (21,4 mg/L y 23,9 mg/L).

Al aplicar un prueba de χ^2 la probabilidad resultó mayor que 0,5, por lo que las mortalidades ocurridas están asociadas de manera directa con las concentraciones ensayadas. En la figura se muestran los resultados al evaluar el efecto ovicida de las dosis subletales 50, 70 y 95, además de las concentraciones diagnóstico de cada aceite de trementina. El mayor efecto ovicida se mostró con la dosis diagnóstico del aceite de trementina y el tratamiento fotoquímico (AT02), con 94 % de no eclosión a las 24 h, no ocurrió eclosión en las 48 h posteriores.

Al aplicar una prueba de comparación de proporciones a estos resultados se compararon las diferentes dosis de cada aceite entre sí y, a su vez, cada CL_{95} y dosis diagnóstico fue comparada; se encontró que para una $p=0,05$ existen diferencias significativas entre las dosis probadas con el aceite de trementina modificado (AT02), mientras que para el aceite sin modificar (AT01) solo se encontró diferencia significativa al comparar la CL_{95} y

la dosis diagnóstico. Al comparar las CL_{95} y las dosis diagnóstico entre sí, se encontró diferencia significativa para $p=0,05$.

DISCUSIÓN

Los aceites esenciales reportan además de sus propiedades medicinales, la acción insecticida como mecanismo milenario de defensa ante el ataque de insectos. El estudio de estas propiedades en la flora autóctona de cada país se hace necesario, como parte del aprovechamiento de sus recursos forestales. Las 2 especies de *Pinus* utilizadas en este estudio son endémicas de Cuba, los taxónomos reconocen 3 variedades de pino caribeño: *P. caribaea* var. *caribaea* de Cuba, *P. caribaea* var. *hondurensis* de la América Central y *P. caribaea* var. *bahamensis* de las Bahamas y las Islas Caicos; las cuales difieren un tanto unas de otras en el número de agujas por fascículo, el tamaño de los conos y la anatomía de la semilla.¹¹ Al ser estas 2 especies endémicas (*P. tropicalis* y *P. caribaea*), son los primeros reportes sobre la acción larvicida específicamente para *Ae. aegypti* que se realizan con estas especies en Cuba. Ambas presentan en su composición hidrocarburos monoterpénicos: α -

tuyeno, α -pineno, canfeno, sabineno, β -pineno y mirceno; el α -pineno constituye 26,5 % y 23,6 %, respectivamente, de su composición. Se le puede atribuir al método de obtención el hecho de que sus concentraciones letales y las pendientes de las rectas de regresión sean diferentes entre sí. Las dosis obtenidas son más bajas que las obtenidas en estudios realizados por otros autores, al evaluar la acción larvicida y repelente del aceite de *Pinus longifolia* en *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *An. stephensi*, las dosis menores resultan las obtenidas para *Ae. aegypti* que para las demás especies¹² (CL_{50} = 82,1 mg/L y CL_{90} = 252 mg/L). En otros estudios al ser evaluadas con soluciones acuosas a 0,1 %, en *Culex quinquefasciatus* se obtuvo una mortalidad de 20 %, el autor plantea que esto puede deberse a la especie de mosquito utilizada, porque la acción larvicida y repelente del aceite de pino ha sido reportada por otros autores para *Ae. aegypti*¹³

Los aceites de trementina que se obtienen de destilar la resina presentan en su composición altos porcentajes de α y β -pinenos. Existen reportes en la literatura de que el aceite de trementina ha sido utilizado para el control en específico de moscas^{14,15} *Lucia* y otros (2007), al evaluar el aceite de trementina en larvas de *Ae. aegypti* encontraron una CL_{50} menor (14,7 mg/L) que la reportada en nuestros estudios, también evaluó por separado alfa y beta pineno como componentes mayoritarios de este aceite, lo cual comprueba que ambos influyeron en su actividad larvicida.¹⁶ En los experimentos de este estudio el aceite sometido a fotoisomerización del α -pineno y β -pineno a derivados del limoneno con funciones oxigenadas como verbenona y pulegona presentó valores más altos de CL_{50} y CL_{95} y más bajos de pendiente, esto corroboró que la alta actividad insecticida del aceite de trementina sin tratar (AT01) encontrada en estos ensayos, se debió al α -pineno y β -pineno y no a otras estructuras que se obtengan por la fotoisomerización, aunque posean también actividad insecticida.

En estos estudios se encontró una diferencia en la acción ovicida entre un aceite de trementina y otro, se pudo observar 94 % de no eclosión en los huevos expuestos al aceite de trementina modificado (AT02) y 54,3 % para el aceite de trementina puro (AT01) y aunque no todas las

esencias de plantas poseen acción ovicida, estos resultados deben tenerse en cuenta para estudios posteriores. Bassole y otros (2003), al ensayar esencias de 3 plantas en *Anopheles* y *Ae. aegypti*, encontraron mayor acción ovicida en los huevos de *Anopheles* y mayor acción larvicida en *Ae. aegypti*.¹⁷ Por otra parte, con el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* en *Cx. quinquefasciatus*, se obtuvo 100 % de acción ovicida a 300 mg/L¹⁸ (dosis más alta que la obtenida en este estudio); de la misma manera Prajapati y otros evaluaron 10 aceites de plantas en *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus* y *An. stephensi*; ellos encontraron solo 2 plantas de las ensayadas con acción ovicida en las 3 especies de mosquitos.¹⁹

El aceite de pino muestra actividad insecticida en larvas de mosquitos, lo cual ha sido publicado por diferentes autores.^{11,12} Las esencias de estos no han podido ser utilizadas en formulaciones para cuerpos de agua no potable, porque se requieren grandes cantidades, pero pudiera tenerse en cuenta que formulaciones de estas plantas pueden ser usadas en pequeños depósitos domésticos y peridomésticos, los cuales sirven de almacenamiento de agua para diversos usos por el hombre, no de consumo humano, y proporcionan un sitio de cría al vector del dengue

Pinus tropicalis mostró mayor acción larvicida al presentar menor CL_{50} que *P. caribaea*, aunque presentan similar composición química de sus estructuras terpénicas. El aceite de trementina sin modificar posee mayor actividad larvicida, con la menor CL_{50} (21,4 mg/L). El aceite de trementina modificado mostró mayor acción ovicida (94 % de no eclosión) a la dosis diagnóstico (111 mg/L). Los aceites foliales y sus derivados son candidatos para el control de esta especie de insecto, tanto por su actividad insecticida como por su factibilidad, extracción y escalado.

Use of essential oils from endemic pinaceae as an alternative for *Aedes aegypti* control

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Pinus caribaea* and *Pinus tropicalis* are endemic plants of Cuba and their chemical composition exhibits structures similar to those reported in other plant species with strong insecticidal action. OBJECTIVE: to evaluate the larvicidal effect of two pinaceae and their derivatives (turpentine oils) on *Aedes aegypti* in addition to determine the ovicidal effect of the latter

on this species' eggs. METHODS: a reference susceptible strain called Rockefeller supplied by the Center of Disease Control in San Juan, Porto Rico was the choice whereas bioassays were conducted according to the World Health Organization methodology to ascertain resistance and (or) susceptibility of mosquitoes to insecticides. Water distillation allowed obtaining *Pinus tropicalis* oil and vapour dragging. Turpentine oil (AT01) was obtained by distilling pine resin and one part of it (AT02) underwent photochemical treatment of isomerization of α -pinen y β -pinen as main components. RESULTS: *P. tropicalis* showed lethal concentration LC_{50} = 42 mg/L and LC_{95} = 57 mg/L, and for *P. caribaea*, LC_{50} = 51 mg/L and LC_{95} = 181 mg/L. The two turpentine oils AT01 and AT02 exhibited high larvicidal action since they recorded the lowest LC_{50} of this study (21,4 mg/L and 23,9 mg/L). The greatest ovicidal effect went to diagnostic dose of AT02 turpentine oil, with 94 % of hatching-deterrent action. CONCLUSIONS: leaf oils and their derivatives are candidates for the control of this species, because of their insecticidal action and also their feasibility, extraction and scaling.

Key words: *Aedes aegypti*, *Pinus*, turpentine, essential oils.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Silva G. Insecticidas vegetales; 2002 [citado 11 Dic 2006]. Disponible en: <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/pchapters/GSilvaSp.htm>
- Mohammed A, Chadee DD. An evaluation of some Trinidadian plant extracts against larvae of *Aedes aegypti* mosquitoes. J Am Mosq Control Assoc. 2007;23(2):172-6.
- Da Silva HH, Geris R, Rodríguez FE, Rocha C, da Silva IG. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(3):264-7.
- Kim NJ, Byun SG, Cho JE, Chung K, Ahn YJ. Larvicidal activity of *Kaempferia galanga* rhizome phenylpropanoids towards three mosquito species. Pest Manag Sci. 2008;64(8):857-62.
- Silva WJ, Dória GA, Mai RT, Nunes RS, Carvalho GA, Blank AF, et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. Bioresour Technol. 2008;99(8):3251-5.
- Cheng SS, Chua MT, Chang EH, Huang CG, Chen WJ, Chang ST. Variations in insecticidal activity and chemical compositions of leaf essential oils from *Cryptomeria japonica* at different ages. Bioresour Technol. 2008;100(1):465-70.
- Samarasekera R, Weerasinghe IS, Hemalal KP. Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. Pest Manag Sci. 2008;64(3):290-5.
- Aguilera L, Navarro A, Tacoronte JE, Leyva M, Marquetti MC. Efecto letal de Myrtaceas cubanas sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Rev Cubana Med Trop. 2003;55(2):100-4.
- OMS. Instrucciones para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas en larvas de mosquito. WHO/VBC/81.807.
- Raymod M. Presentation d'un programme d'analyse log-probit pacer micro-ordinateur. Cah. ORSTOM. Ser Ento Med Parasitol. 1985;22:117-21.
- Bega RU, Henderson FF. Variation of monobasidiospore isolates of *Fomes annosus* Phytopathology. 1962;52(1):3.
- Ansari MA, Mittal PK, Razdan RK, Sreehari U. Larvicidal and mosquito repellent activities of Pine (*Pinus longifolia*, Familia: Pinaceae) oil. J Vect Borne Dis. 2005;95-9.
- Pérez-Pacheco R, Rodríguez HC, Lara-Reyna J, Montes-Belmont R, Ramirez-Valverde G. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Acta Zool Mex. 2004;20(1):141-52.
- Rumiantsev I, Bagirov K, Askerov G. On the use of oil of turpentine in control of flies. Voen Med Zh. 1961;7:76-7.
- Kumarasinghe SP, Karunaweera ND, Ithalamulla RL, Arambewela LS, Dissanayake RD. Larvicidal effects of mineral turpentine, low aromatic white spirits, aqueous extracts of *Cassia alata*, and aqueous extracts, ethanolic extracts and essential oil of betel leaf (*Piper betle*) on *Chrysomya megacephala*. Int J Dermatol. 2002;41(12):877-80.
- Lucia A, Gonzalez Audino P, Saccacini E, Licastro S, Zerba E, Masuh H. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Ae. aegypti* larvae. J Am Mosq Control Assoc. 2007;23:293-303.
- Bassole IH, Guelbeogo WM, Nebie R, Constantini C, Sagnon N, Kabore Z, et al. Ovicidal and larvicidal activity against *Ae. aegypti* and *An. gambiae* complex mosquitoes of essential oils extracted from three spontaneous plants of Burkina Faso. Parasitologia. 2003;45(1):23-6.
- Pushpanathan T, Jebanesan A, Govindarajan M. Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Trop Biomed. 2006;23(2):208-12.
- Prajapati V, Tripathi AK, Aggarwall KK, Kanuja SP. Insecticidal repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *An. stephensi*, *Ae. aegypti* and *Cx. quinquefasciatus*. Bioresour Technol. 2005;96(16):1749-57.

Recibido: 6 de octubre de 2008. Aprobado: 13 de enero de 2009.
Ing. Maureen Leyva Silva. Departamento Control de Vectores. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½. AP 601, Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 53-7-2046051 y 53-7-2020633. Correo electrónico: maureen@ipk.sld.cu