



Evaluación del uso de *Sapindus saponaria* como Biocida de *Aedes aegypti* en condiciones *in vitro**

Laura Esther Rojas Martínez**, Ketty Carolina Araujo Pacheco***, Etilvia Montero Tejedor****

Assessment of the use of *Sapindus saponaria* as *aedes aegypti*'s biocide in *in vitro* conditions

Avaliação do uso *Sapindus saponaria* como biocida do *aedes aegypti* em condições *in vitro*

RESUMEN

Introducción. En los últimos años en el departamento del Cesar se detectó que el vector *Aedes aegypti* presentó resistencia a los controles químico-sintéticos, dando como resultado un incremento en el número de personas afectadas por la enfermedad. **Objetivo.** Es así como el objeto de este estudio fue evaluar los efectos *in vitro* de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* a diferentes concentraciones en los tres últimos estadios larvarios de *A. aegypti*. **Materiales y métodos.** La extracción de los crudos

fue con etanol en calor. **Resultado.** Como resultado se encontraron efectos letales del extracto de 0.9 g/mL de *Sapindus saponaria* en todo los estadios larvales en las primeras 24 horas de aplicación. **Conclusión.** En la determinación de porcentaje de saponinas en el extracto puro por el método de hidrólisis de azúcares de Miller, se obtuvo un alto índice de concentración de 1,3 % confirmando la estrecha relación entre la concentración de saponinas y el índice de mortalidad larval.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, biocida, *Sapindus saponaria*, mortalidad.

* Artículo original derivado del proyecto "Efectos de los extractos crudos de *Sapindus Saponaria* en estados larvarios de *Aedes Aegypti* e implementación de una página web didáctica para la divulgación de su actividad biocida", Realizado entre marzo de 2012 y septiembre de 2012, financiado por convocatoria interna de la Universidad Popular del Cesar. ** Bióloga, magister en Microbiología, docente del programa de Licenciatura en Ciencias Naturales y Educación Ambiental de la Universidad Popular del Cesar. ***Licenciada en Ciencias Naturales y Educación Ambiental de la Universidad Popular del Cesar. ****Licenciada en Ciencias Naturales y Educación Ambiental de la Universidad Popular del Cesar.

ABSTRACT

Introduction. In recent years, it was discovered that the *Aedes aegypti* vector developed a resistance against chemical-synthetic controls in the Cesar province and, then, the number of sick people increased.

Objective. Therefore, this study aims to assess the in vitro effects of the raw extracts of *Sapindus saponaria* at different concentrations in the last three larval stages of *A. aegypti*. **Materials and methods.** Heated ethanol was used for the extraction. **Results.**

As a result, lethal effects of the 0.9 g/mL of *Sapindus saponaria* were found in all of the larval stages during the first 24 hours of application. **Conclusions.** In the process of determining the saponins percentage in the pure extract by means of the Miller's sugars hydrolysis method, a high 1,3 % ratio of concentration was obtained, thus confirming the correlation between the saponins concentration and the larval mortality rate.

Key words: *Aedes aegypti*, biocide, *Sapindus saponaria*, mortality.

RESUMO

Introdução. Nos últimos anos no departamento do Cesar (Colômbia) se detectou que o vector *Aedes aegypti* apresentou resistência aos controles químico-sintéticos, dando como resultado um incremento no número de pessoas afetadas pela doença. **Objetivo.** É assim como o objeto deste estudo foi avaliar os efeitos in vitro dos extratos crus de *Sapindus saponaria* a diferentes concentrações nas três últimas etapas larvários de *A. aegypti*. **Materiais e métodos.** A extração dos crus foi com etanol em

calor. **Resultados.** Como resultado se encontraram efeitos letais do extrato de 0.9 g/mL de *Sapindus saponaria* em todo as etapas larvais nas primeiras 24 horas de aplicação. **Conclusões.** Na determinação de porcentagem de saponinas no extrato puro pelo método de hidrólises de açúcares de Miller, se obteve um alto índice de concentração de 1,3 % confirmando a estreita relação entre a concentração de saponinas e o índice de mortalidade larval.

Palavras chave: *Aedes aegypti*, biocida, *Sapindus saponaria*, mortalidade.

INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países atacados por el virus del dengue, y el Cesar es uno de los departamentos con mayor índice de casos de dengue, con datos para 2012 con más de 852 casos de dengue y dengue grave (Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud. Sivigila, 2012). Actualmente las medidas de control para *Aedes aegypti*, son básicamente insecticidas de origen químico, que erradican el mosquito adulto y no afectan el desarrollo larval pero sí generan altos costos e impacto negativo al medio ambiente y a la salud humana. De este modo se hace necesaria la implementación y desarrollo de nuevas técnicas para el control biológico de *Aedes aegypti*, que afecten la supervivencia y desarrollo de los estados larvarios. Históricamente las plantas del género *Sapindus*, cuyo nombre se debe a la presencia de saponinas, sustancia que ha sido reconocida alrededor del mundo por sus propiedades detergente, tóxica, y que tiene antecedentes biocidas en diferentes especies

animales (Abreu, 2005), son utilizadas en la pesca artesanal y en el control biológico de algunos artrópodos pues han demostrado que afectan su supervivencia (Cardona, Torres, y Echeverri, 2007). Los extractos de *Sapindus saponaria* han sido previamente utilizados para el control de leishmaniasis, y se han obtenido valores satisfactorios en la mortalidad del parásito (Herrera, Correa y Cardona, 2007). Los extractos también fueron evaluados por su actividad antifúngica contra aislados clínicos de levaduras *Cándida albicans* y *C. no-albicans*, concluyendo que los extractos de *Sapindus saponaria* L. mostraron un carácter antifúngico clínico significativo (Tsuzuki, Svidizinski, Shinobu, Silva, E. Rodrigues Filho, Cortez and Ferreira., 2007).

Es importante estimular e incrementar la búsqueda de biocidas naturales con especificidad en vectores transmisores de enfermedades que son un riesgo para la salud pública. Bajo esta premisa el objetivo de este trabajo fue

evaluar la actividad biocida de los extractos de *Sapindus saponaria* en estados larvarios de *Aedes aegypti* y determinar el índice de saponina presente en los frutos de *Sapindus saponaria* por espectrofotometría.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Valledupar entre los meses de julio y agosto que comprenden el periodo lluvioso en la región. La realización de este proyecto comprendió dos fases: una de campo (obtención de larvas y material vegetal) y otra experimental (obtención y aplicación de los bioactivos de *Sapindus saponaria*).

Obtención de larvas de *Aedes aegypti*: se ubicaron ovitrampas a campo abierto en varios puntos de la ciudad que habían sido declarados por la Secretaría de Salud con presencia de *Aedes* y que reunieran las condiciones propicias para la oviposición y desarrollo de las larvas de *Aedes aegypti*; luego fueron llevadas a laboratorio donde se realizó la identificación y clasificación de las larvas según su estadio larvario, para la posterior aplicación de los extractos en tres concentraciones diferentes.

Material vegetal

La recolección de los frutos de árboles de *Sapindus saponaria* se llevó a cabo en los alrededores de la serranía del Perijá en el municipio de San Diego; se procedió a hacer un despepado de los frutos, secado a 105 °C (Faroni, 1993) por una hora, y pesado, para un total de 530 g de frutos secos.

Obtención de los bioactivos de *Sapindus saponaria*

Para la obtención del extracto se trituraron con mortero y se pulverizaron con molinillo eléctrico los frutos secos hasta obtener una mezcla homogénea; luego se procedió a envasar 8 g del polvillo en bolsas de papel filtro, para realizar la extracción con etanol al 95 % a 83 °C

con posterior recuperación y evaporación del solvente (Uribe-Lamas, 1987).

Preparación de las concentraciones de *Sapindus saponaria*

Se preparó una solución de 25 mL de extracto puro con 225 mL de agua destilada, a partir del cual se obtuvieron las demás soluciones con diferentes concentraciones por diluciones sucesivas con agua destilada. Las soluciones obtenidas se sometieron a espectrofotometría con espectrofotómetro “Génesis 20” para determinar la concentración del extracto puro y las tres soluciones a utilizar.

Aplicación de los extractos

Con el fin de evaluar la actividad biocida de los extractos de *Sapindus saponaria* en estados larvarios de *Aedes aegypti*, se procedió de la siguiente manera:

Se aislaron larvas de *Aedes aegypti* en segundo, tercero y cuarto estadio larvario, colocándolas en recipientes con 100 mL de agua en grupos de 20 larvas por estadio con tres repeticiones por concentración y una réplica de control; las tres soluciones contenían una concentración de 0.9 g/mL, 0,160 g/mL y 0,092 g/mL, respectivamente. Los extractos se aplicaron por aspersión durante diez (10) días.

Determinación de Saponinas

Para determinar el índice de saponinas en los extractos de *S. saponaria* se utilizó el método de hidrólisis de azúcares de Miller por espectrofotometría a una longitud de onda 570 nm. Se elaboró una curva de calibración para relacionar la cantidad de azúcares generados por la hidrólisis de las saponinas, utilizando como estándar una solución de glucosa.

Análisis estadístico y diseño experimental

Para este estudio se utilizó un diseño experimental por bloques al azar, Anova y comparación de medias por el método Tukey

con un nivel de confianza del 95 %, y una muestra estimada de 720 larvas distribuidas por bloque; cada bloque representaba un estadio larval con tres tratamientos A, B y C que representan las concentraciones de 0.9 g/mL, 0.160 g/mL y 0.092 g/mL, respectivamente, y un control. Cada tratamiento fue sometido a tres réplicas con 20 especímenes por repetición, y la aplicación de las concentraciones fue de 10 días.

Los datos obtenidos por análisis de espectrofotometría se analizaron a través de regresión lineal e índice de correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la determinación del índice de saponinas del extracto de los frutos de *S. saponaria* a partir del método de hidrólisis de azúcares de Miller por espectrofotometría a una longitud de onda 570 nm para la cuantificación de saponinas, se obtuvo una concentración de 1.3 g/mL de saponinas. De acuerdo con el análisis de regresión lineal y coeficiente de correlación $R^2 = 0,9333$, se considera confiable el método de cuantificación indirecta por determinación de azúcares, ya que relaciona, con un alto índice de correlación, la cantidad de saponinas presentes con el contenido de azúcares hidrolizados (figuras 1 y 2).

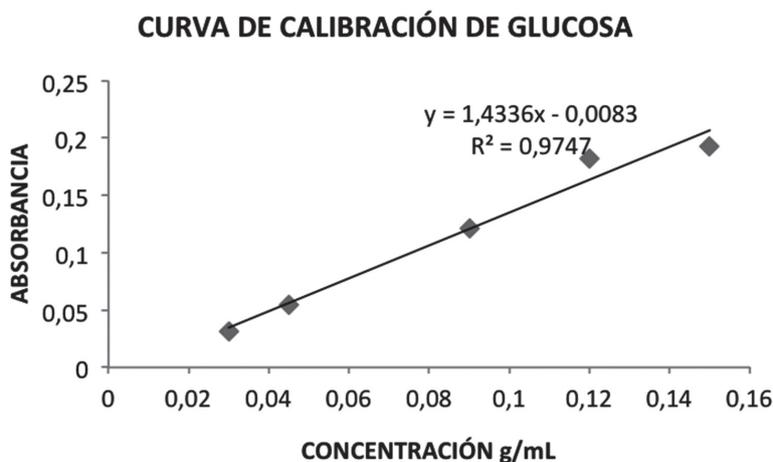


Figura 1. A partir de los datos de la curva de calibración de glucosa, se calculó la concentración de saponinas totales en el extracto etanólico de *S. saponaria* cuyos azúcares fueron liberados a partir de la hidrólisis ácida Miller y se compara con las concentraciones A, B y C aplicadas a los estadios larvales de *A. aegypti*.

Fuente: Rojas, L., Montero E., Araujo K.

Este porcentaje (1.3 %) obtenido es concordante con el estudio de *S. saponaria* endémica de Guatemala cuyo valor fue de 1.175 % en los frutos (Porres, 1999). Asimismo, la concentración obtenida en este estudio estuvo por encima de resultados arrojados en la cuantificación de saponinas en ajo genéticamente seleccionado donde la concentración de saponinas totales en ajo fresco, tanto en los extractos con agua como con los extractos obtenidos con la mezcla agua/etanol, oscila entre 0.3 y 0.5 % (Díaz, Ibarra

y Jiménez, 2005); con esto se demuestra una alta concentración de saponinas en *S. saponaria* nativa de la región.

Las saponinas están formadas por enlaces glucosídicos lineales o ramificados, caso en el cual pueden ser hidrolizados e inducir rompimientos de los enlaces glucosídicos dejando expuestos a los monosacáridos que componen a las saponinas y que son los únicos que pueden ser detectados por el método Miller. Sin embargo, hay que

tener en cuenta que altas concentraciones de saponinas requieren también incrementar la cantidad de ácido para una hidrólisis total y resultados más fiables al aplicar la técnica Miller (Hernández, Lugo, Díaz, y Villanueva, 2005).

En la evaluación de la mortalidad, el análisis de comparación de medias Tukey demostró el efecto bioinsecticida del extracto de *Sapindus saponaria* sobre las larvas de *Aedes aegypti* al

encontrarse diferencias significativas entre las medias del número de muertos de larvas bajo las concentraciones aplicadas, siendo la solución A, con una concentración de 0.9 g/mL, la más efectiva en los tres últimos estadios larvarios evaluados, seguido por la concentración B (0,160 g/mL) y por último, la concentración C (0.092 g/mL). El cuarto estadio presentó el más alto índice de mortalidad (20 individuos) respecto a los otros estadios (figura 3).

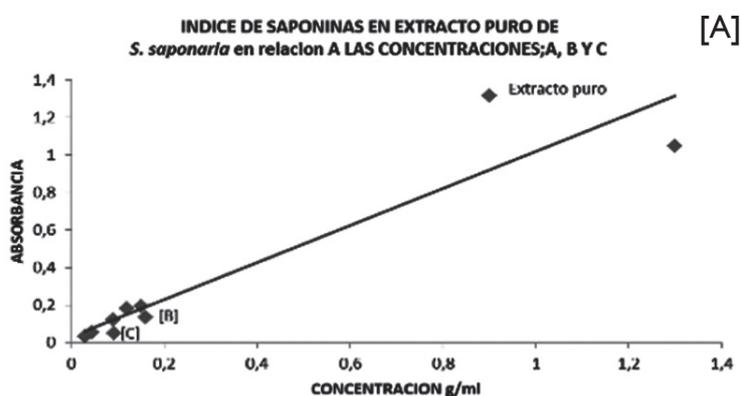


Figura 2. Determinación del índice de saponinas

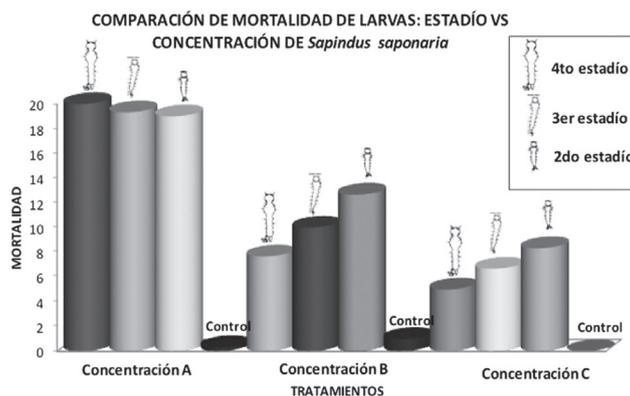


Figura 3. Mortalidad de larvas de *Aedes* por los extractos de *Sapindus saponaria*. De acuerdo al análisis de comparación de medias por método Tukey, existen diferencias estadísticas significativas entre las medias de los valores de mortalidad de los tratamientos. Siendo el cuarto estadio el que presentó el más alto índice de mortalidad de larvas en un periodo de 24 horas después de la aplicación.

Fuente: Rojas, Montero y Araujo.

El 100 % de la mortalidad de las larvas en todos los estadios se efectuó a partir de las 24 horas en la solución con una concentración de 0.9 g/mL del extracto de *Sapindus saponaria*, mientras que en los otros tratamientos la mortalidad total se dio en promedio, a partir del quinto día en la concentración B, y el sexto, en la concentración C.

La explicación al efecto letal del extracto de *S. saponaria* en los estadios larvarios de *Aedes* es planteada como una consecuencia de la cualidad fisicoquímica jabonosa de la saponina al obstruir las branquias lobuladas de las larvas y/o su sifón, dificultándole la respiración y desplazamiento en busca de alimento.

La razón de los decesos de larvas de *Aedes* en los tratamientos control, según estudios de Manrique et al. (1998), se debe a que hay una tasa constante de individuos larvarios de *Aedes* que mueren conforme transcurre el tiempo en condiciones "normales". Sin embargo, de acuerdo con los valores de tasa de mortalidad y poder de mortalidad existe una menor probabilidad de sobrevivir en los últimos estadios larvales.

La respuesta de las larvas hacia el extracto y sus diferentes concentraciones demostró diferentes susceptibilidades y composición genética distintas, siendo el segundo estadio larvario el más susceptible a los principios bioactivos de *Sapindus saponaria*.

CONCLUSIÓN

En la aplicación de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* en estados larvarios de *Aedes aegypti*, fue evidente la actividad biocida en cada una de las concentraciones aplicadas en los diferentes estadios larvarios, demostrando que la concentración de 0.90 g/mL afecta significativamente la supervivencia de las larvas de cualquier estadio. Además se determinó un alto índice de saponinas en los extractos crudos de *Sapindus saponaria* con una concentración de 1.3 % por el método propuesto para la cuantificación de saponinas el cual ofrece un alto índice de confiabilidad además de ser rápido

y fácil, por lo que su uso en la determinación de saponinas es factible para otras especies vegetales reconocidas como portadoras de saponinas.

En síntesis, este estudio demostró que el uso del extracto de *Sapindus saponaria* para el control del vector *Aedes* en reemplazo de los plaguicidas actuales cuyos efectos negativos pueden ocurrir en todo el ciclo de vida del plaguicida, desde la producción, transporte, almacenamiento, aplicación hasta en su disposición final, es una alternativa que, por su extraordinaria especificidad, su baja toxicidad y baja dosis de uso de su aplicación, resulta ser tan ecológica y natural que no tiene impacto toxicológico o ambiental y, además, disminuye los costos de inversión en control del vector *Aedes*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, O. (2005). Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindácea) y de la especie *Sapindus saponaria* L. *Rev. Cubana Plan Med*, 10, 3-4
- Cardona, E.; Torres, F. y Echeverri, F. (2007). Evaluación in vitro de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* sobre hembras ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Scientia et Technica* 33: 51-54.
- Díaz, J.; E. Ibarra y K. Jiménez. (2005). Cuantificación de saponinas en ajo genéticamente seleccionado. *III Encuentro De la Participación De La Mujer En Ciencia*. Recuperado de http://congresos.cio.mx/3_enc_mujer/files/extensos/.../S4-BCA05.doc
- Fernández, W. F y Lannacone J. (2005). Variaciones de tres índices larvarios de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) y su relación con los casos de dengue en Yurimaguas, Perú, 2000-2002. *Parasitol Latinoam*; 60 (1), 3-16.
- Tsuzuki, J. K.; T. I. E. Svidizinski, C. S.; Shinobu, L. F.; Silva, E.; Rodrigues, Filho.; D. A. G. Cortez & I. C. P. Ferreira. (2007). Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *An. Acad. Bras. Cienc.* 79: 577-83.
- Faroni, D. L. (2015). *Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural*. Santiago de Chile. Oficina

- Regional De La FAO Para América Latina y El Caribe. Los granos y su calidad. Secado artificial. Depósito de documentos de la FAO. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/x5027s/x5027S00.htm#Contents>. [Fecha de consulta; 20 febrero 2015]
- Hernández, R.; Lugo, E.; Díaz, L. y Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torre. *Revista e-Gnosis*, 3, 1-9.
- Herrera, N., Correa, E. y Cardona D. (2007) Estructura y actividad de sapogeninas triterpenicas scientia et technica. 33, 87-90
- Manrique-Saide, P.; Ibáñez-Bernal S.; Delfín-González H. y Parra-Tabla V. (1998). Mesocyclops longisetus effects on survivorship of *Aedes aegypti* immature stages in care tyres. *Med Vet Entomol*; 12, 386-90.
- Porres, C. (1999). Cuantificación de saponinas esteroidales en frutos, semillas y corteza de *Sapindus saponaria* [online]. Tesis de pregrado. Recuperado de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_1993.pdf
- Sanabria, L.; Segovia E. A.; González, N.; Alcaraz, P. y Vera N de Bilbao. (2009). Actividades larvicidas de extractos vegetales acuosos en larvas De *Aedes aegypti*. (Primeros ensayos). *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 7(2):26-31
- SIVIGILA. (2012). Boletín epidemiológico semanal. Sistema de vigilancia en salud. República de Colombia. Recuperado de http://www.col.ops-oms.org/sivigila/2004/BOLE08_04.pdf
- Uribe-Lamas A, (1987). *Métodos usados para la determinación de saponinas*. (Trabajo monográfico). Facultad de Química UNAM. México.