

Artículo Original

Composición química y actividad larvicida del aceite esencial de *Annona cherimola* Mill. de Los Andes venezolanos contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.).

Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Annona cherimola* from the Venezuelan Andes against *Aedes aegypti* (L).

Ramírez Rosslyn N¹, Mora Flor D¹, Avila Jorge L², Rojas Luis B³, Usubillaga Alfredo³, Segnini Samuel⁴, Carmona Juan¹.

¹Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia, ²Grupo de Química Ecológica, Facultad de Ciencias, ³Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia ⁴Laboratorio de Ecología de Insectos, Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes, Mérida, 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido octubre 2011 - Aceptado marzo 2012

RESUMEN

Se describe la composición y la actividad larvicida contra *Aedes aegypti* del aceite esencial de *Annona cherimola* recolectada en Mérida, Venezuela. Éste fue obtenido por hidrodestilación de sus hojas frescas (0,17 % p/p de rendimiento) utilizando una trampa de Clevenger. Mediante análisis por CG-MS se identificaron trece componentes químicos (97,2 %). Los compuestos mayoritarios fueron germacreno D (57,7%), *trans*-cariofileno (8,9%), biciclogermacreno (8,8%) y germacreno B (5,0%). El aceite esencial resultó activo contra larvas del tercer instar de *Aedes aegypti* (CL₅₀ = 30,7ppm).

PALABRAS CLAVE

Aceite esencial, *Annona cherimola*, Annonaceae, *Aedes aegypti*, larvicida.

ABSTRACT

This paper describes the chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of *Annona cherimola* essential oil collected in Mérida, Venezuela. The essential oil of fresh leaves of *Annona cherimola*, was obtained by hydrodistillation using Clevenger type apparatus, yielding 0,17 % of the essential oil. Thirteen components (97,2 %) were identified by GC-MS analysis. The major constituents were

germacrene-D (57,7%), *trans*-caryophyllene (8,9%), bicyclogermacrene (8,8%), germacrene-B (5,02%). The essential oil was active against third instar larvae of *Aedes aegypti* (CL₅₀ = 30,7 ppm).

KEY WORDS

Essential oil, *Annona cherimola*, Annonaceae, *Aedes aegypti*, larvicide.

INTRODUCCIÓN

La familia Annonaceae incluye más de 120 géneros y 2000 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales; algunas de estas especies tienen importancia económica por sus frutos comestibles [1]. Estudios fitoquímicos de esta familia han demostrado la presencia de una gran cantidad de metabolitos secundarios tales como alcaloides, polifenoles y terpenos. Éstos han sido señalados como potentes agentes antiparasitarios asociados a enfermedades como la malaria, leishmaniasis y diversas tripanosomiasis [2-4]. También resaltan las acetogeninas como prometedores agentes antitumorales y antihelmínticos [3,5].

La *Annona cherimola* es originaria de las montañas del Ecuador y Norte del Perú. Su fruto, conocido popularmente como chirimoya, es una buena fuente de vitaminas B1, B2, B3, hierro, calcio y fósforo. Está considerado entre los más sabrosos

y se consume principalmente como fruta fresca [6]. Estudios fitoquímicos han reportado la presencia de péptidos cíclicos, acetogeninas, alcaloides, amidas, kauranos y lignanos [7-12]. Las semillas del fruto han mostrado actividad tóxica en células cancerosas del páncreas, mama, próstata y otros órganos [5,13]. Los extractos acuosos de las hojas, semillas y tallos tienen propiedades insecticidas. Se ha reportado, por ejemplo, que las semillas son medianamente tóxicas para las larvas de *Aedes* spp. e inocuas contra larvas de *Anopheles* spp. [14-16].

Muchas de las especies de *Annona* son aromáticas debido a la presencia de aceites esenciales mayoritariamente constituidos por monoterpenos y sesquiterpenos, [17,18]. Un análisis comparativo de los compuestos volátiles presentes en los frutos de cuatro cultivos diferentes de la especie *A. cherimola* reportó la presencia de 60 compuestos entre terpenos, ésteres, alcoholes, ácidos grasos y compuestos carbonílicos, siendo comunes 40 compuestos entre los diferentes cultivos [19]. El aceite esencial de los frutos frescos tiene abundancia de compuestos terpénicos como β -pineno, α -terpinoleno y alcohol β -fenchílico [20,21]. De sus hojas se ha extraído un aceite esencial abundante en biciclogermacreno, *trans*-cariofileno, α -amorfenoleno y α -copaeno. Las flores son ricas en biciclogermacreno, α -terpinoleno y germacreno D. Todos ellos han mostrado actividad antimicrobiana in vitro contra bacterias Gram (\pm) tales como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei* y fungicida contra *Candida albicans* [20].

El mosquito *Aedes aegypti* es el vector del virus de la enfermedad del dengue y su forma más severa, la fiebre hemorrágica del dengue. En Venezuela, esta enfermedad infecciosa se ha mantenido recurrente con características endémicas y epidémicas [22,23]. Tomando en cuenta que el uso sostenido de insecticidas sintéticos para controlar el insecto vector representa un riesgo al medio ambiente y la salud humana, el desarrollo de insecticidas botánicos surge como una alternativa de control más seguro [24-26]. Especies del género *Annona*, además de controlar plagas agrícolas, han resultado también eficaces contra insectos con importancia médica. Se han reportado efectos larvicidas de extractos acuosos de las partes aéreas de *Annona muricata* y *A. squamosa* contra los mosquitos *A. aegypti* y *Culex quinquefasciatus*. El extracto etanólico y las acetogeninas aisladas de las semillas de *A. muricata* han mostrado efecto tóxico sobre *A. aegypti*. Efectos larvicidas se han obtenido también en mosquitos transmisores de la malaria [27-29].

El objetivo de este estudio fue determinar la composición química del aceite esencial de las hojas de *A. cherimola* y evaluar su actividad contra larvas del tercer instar del mosquito *A. aegypti*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal:

Las hojas de *A. cherimola* fueron recolectadas en Mérida, Edo Mérida, Venezuela a una altitud de 1259 m.s.n.m. (8° 33' 21,58" latitud norte y 71° 11' 21,58" latitud oeste), en Mayo de 2009. Una muestra fue depositada en el Herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida, (Herbario MERF) bajo el código N° FMRN023, y determinada por el Ing. Juan Carmona.

Obtención del aceite esencial:

Las hojas frescas (1.000 g) se cortaron en trozos pequeños y se sometieron a hidrodestilación durante 3 horas usando una trampa de Clevenger. El aceite obtenido (0,17 % de rendimiento), fue secado con sulfato de sodio anhidro y almacenado a 4 °C, hasta el momento de iniciar su estudio.

Cromatografía de gases (GC):

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer AutoSystem equipado con detector de ionización de llama, entrada manual de datos y una columna capilar de sílica 5% fenilmetilpolisiloxano (AT-5, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL), 60 m x 0,25 mm, 0,25 μ m de ancho. La temperatura inicial del horno fue de 60°C. El horno se calentó a 4°C / min hasta 260 °C manteniendo esta temperatura durante 20 min. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 200 °C y 250 °C, respectivamente. El gas portador fue helio a 1,0 mL/min. La muestra se inyectó en una relación de dilución de 1:10. Los índices de Kovats se calcularon en relación con una serie de *n*-alcanos C8-C24 y se compararon con los valores reportados en la literatura. El método de normalización de las áreas de los picos se utilizó para calcular el porcentaje de cada compuesto en el aceite esencial [30].

Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS):

Estos análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 acoplado a un detector de masas HP5973. El cromatógrafo fue equipado con una columna capilar de sílice fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de la película). El programa de temperatura del horno fue el mismo utilizado para el análisis de GC-FID. Se inyectó 1,0 μ L de la muestra utilizando un inyector automático Hewlett-Packard (ALS) con un reparto de 50:1. La energía de ionización fue de 70 eV, con

rango de escaneo, 40:500 amu; 3,9/s. La identificación de los compuestos del aceite esencial se hicieron de acuerdo a sus índices de retención y por comparación de los espectros de masas con los existentes en la biblioteca (Wiley, 6ª ed., Nist, 05) [31,32].

Bioensayo de la actividad larvica:

Cepa de mosquitos:

Las larvas del *A. aegypti* se obtuvieron de una colonia de cría mantenida en el Laboratorio de Ecología de Insectos, Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Actividad larvica:

Esta actividad se evaluó según el método estándar de la Organización Mundial de la Salud [33], usando larvas del instar III del mosquito *Aedes aegypti*. El aceite esencial de *A. cherimola* se disolvió en agua destilada con 1,5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una solución "stock" de 400 ppm. Ésta sirvió de base para preparar una serie de soluciones a concentraciones de 100, 75, 50, 25, 10, 5 y 1 ppm con un volumen final de 150 mL para cada una. Se colocaron 15 larvas de instar III en recipientes que contenían 50 mL de cada solución, haciendo tres repeticiones para cada concentración. Se utilizó como control negativo agua destilada con 1,5 % de dimetilsulfóxido (DMSO), mientras que como control positivo se usó el insecticida sintético Temefós, en un rango de concentración que varió entre 0,001 y 0,5 ppm. Después de 24 horas, se registró el número de larvas muertas y se calculó la CL₅₀. Las larvas se consideraron muertas si estaban inmóviles o incapaces de moverse hasta la superficie del agua. Las pruebas se realizaron a 26 ± 2 °C y en periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El valor de la CL₅₀ fue calculado mediante análisis probit usando el programa estadístico BioStat 2007 (AnalystSoft Company).

RESULTADOS

De la hidrodestilación de las hojas de *A. cherimola* se obtuvo un aceite ligeramente amarillo, cuyo rendimiento fue de 0,17 % en relación al peso fresco del material vegetal. El análisis por GC-MS permitió la identificación de 13 compuestos que se muestran en la Tabla 1, representando el 97,2 % de la muestra. Puede observarse que el 75 % de la muestra estuvo constituida por tres compuestos: germacreno D (57,7 %), *trans*-cariofileno (8,9 %) y biciclogermacreno (8,8 %). Las pruebas de susceptibilidad de las larvas de *A. aegypti* mostraron que la mortalidad se ubicó en el rango de concentración de 5 ppm (11 %) y 100 ppm (100%) (Fig. 1). El valor de CL₅₀ fue de 30,7 ppm.

TABLA 1
Componentes mayoritarios del aceite esencial de *Annona cherimola*

Compuesto	Tiempo de retención	Área %	IK cal
δ-Elemeno	17,2	1,6	1344
α-Copaeno	18,4	1,4	1382
Cubebeno	18,8	0,1	1395
<i>trans</i> -Cariofileno	19,8	8,9	1428
α-Humuleno	20,8	1,9	1465
Germacreno D	21,7	57,7	1495
Biciclogermacreno	22,2	8,8	1510
Cadineno	22,9	3,5	1534
Elemol	23,7	1,7	1558
Germacreno B	23,9	5,0	1566
5-guaien-11-ol	25,7	1,8	1611
‡-Cadinol	26,4	2,0	1624
α-Cadinol	26,7	2,9	1630
TOTAL		97,2	

La composición química fue determinada por comparación de los espectros de masas de cada compuesto con las bases de datos Wiley GC/MS library y por los índices de Kóvats (KI). IK cal: Índices de Kóvats determinados sobre columna capilar HP-5.

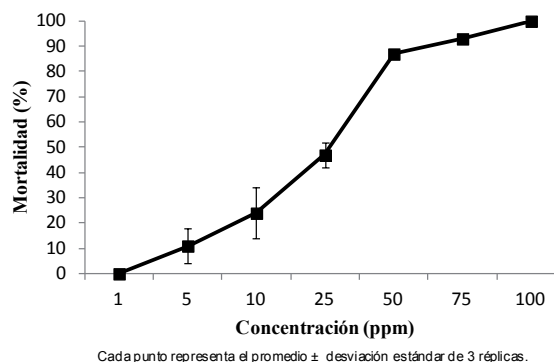


Fig. 1. Mortalidad larval de *Aedes aegypti* en función de la concentración del aceite esencial de *Annona cherimola*.

DISCUSIÓN

Un 97,2% de los componentes del aceite esencial las hojas de *A. cherimola* colectadas en los andes venezolanos ha sido identificada. El 80,5 % del aceite estuvo constituido por cuatro compuestos: germacreno D resultó ser mayoritario (57,7 %) seguido de *trans*-cariofileno (8,9 %), biciclogermacreno (8,8 %) y germacreno B (5,0 %). La abundancia de sesquiterpenos coincidió con resultados obtenidos en otros estudios para esta misma especie y otras del género *Annona* [2,17,20]. La comparación de estos resultados con el estudio realizado en México [20] reveló diferencias importantes en la composición y

abundancia de los componentes de los aceites. En este último trabajo se identificaron más de 40 componentes del aceite esencial de las hojas en contraste con los 13 compuestos encontrados en la muestra venezolana, siendo algunos de ellos comunes. El compuesto más abundante fue el biciclogermacreno (18,20 %), seguido por *trans*-cariofileno (11,50 %), δ -amorfeno (7,57 %) y δ -cadineno (4,63 %). El germacreno D, mayoritario en nuestra muestra, resultó estar en menor proporción (3,75%), mientras que el germacreno B no fue encontrado en ese análisis. Llama la atención también que el δ -amorfeno, siendo el tercer compuesto más abundante en el estudio mexicano, haya estado ausente en la muestra de nuestro trabajo. Estas diferencias pueden ser atribuidas a diversos factores. Es conocido que la composición química de un aceite esencial depende de variables tales como: estado fenológico, origen geográfico, condiciones ambientales de crecimiento, variabilidad genética y otros [34].

Este estudio demostró el efecto tóxico del aceite esencial de *A. cherimola* en larvas de *A. aegypti*. Aunque ya se conocía la toxicidad del extracto etanólico de las semillas en larvas de *Anopheles* sp. [35]. La actividad del aceite esencial de las hojas no había sido estudiada antes contra *A. aegypti*. Siendo el germacreno D el componente mayoritario de la muestra, se podría sugerir que este compuesto es el responsable de la toxicidad observada, tomando en cuenta estudios que han demostrado su acción larvicida contra los mosquitos *Aedes aegypti* y *Anopheles* spp.[36]. El valor de CL₅₀ obtenido en este trabajo fue mucho menor a los reportados para los aceites de *Annona salzmannii* y *A. pickelii* estudiados con larvas de *A. aegypti*, donde las CL₅₀ calculadas estuvieron por encima de 1000 ppm [37]. Estos resultados permiten considerar al aceite esencial de *A. cherimola* como un candidato a ser explorado en el control de larvas de *A. aegypti*.

CONCLUSIONES

Este estudio mostró que el aceite esencial obtenido de hojas de *A. cherimola* resultó ser rico en sesquiterpenos, siendo el germacreno D su principal constituyente. Las pruebas de sensibilidad revelaron una importante acción tóxica contra las larvas de *A. aegypti*. Surge la necesidad de posteriores estudios para la formulación de un larvicida a partir del aceite esencial de esta promisoriosa especie.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de

Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes a través del proyecto FA-444-08-03-B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kessler PJA. Annonaceae. The families and genera of vascular plants Vol II, Flowering Plants, Dicotyledons. Berlín. Springer-Verlag; 1993. p 93-129.
- [2] Leboeuf M, Cave A, Bhaumik PK, Mukherjee B, Mukherjee R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*. 1982; 21: 2783-2813.
- [3] Alalí F, Liu X, MacLaughlin J. Annonaceous acetogenins. *Recent progress*. *J Nat Prod*. 1999; 62: 504-540.
- [4] Ocampo DM, Ocampo R. Bioactividad de la familia Annonaceae. *Rev Univ Caldas*. 2006; 135-155.
- [5] Zeng L, Ye Q, Oberlies NH, Shi G, Gu Z-M, He K, McLaughlin J L. Recent advances in annonaceous acetogenins. *Nat Prod Rep*. 1996; 13: 275-306
- [6] Vanhove Wouter. Descriptores para Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). Biodiversity International y CHERLA, 2008, Roma, Italia; Proyecto CHERLA, Málaga, España. p 3.
- [7] Wele A, Zhang Y, Dubost L, Pousset JL, Bodo B. Cyclic peptides from the seeds of *Annona glauca* and *A. cherimola*. *Chem Pharm Bull*. 2006; 54: 690-692.
- [8] Cortes D, Myint SH, Dupont B, Davoust D. Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*. 1993; 32: 1475-1482.
- [9] Chen CY, Chang FR, Pan WB, Wu YC. Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*. 2001; 56: 753-757.
- [10] Chen CY, Chang FR, Yen HF, Wu YC. Amides from stems of *Annona cherimola*. *Phytochemistry*. 1998; 49: 1443-1447.
- [11] Miyashita H, Nishida M, Okawa M, Nohara T, Yoshimitsu H. Four new *ent*-Kaurane diterpenoids from the fruits of *Annona cherimola*. *Chem Pharm Bull*. 2010; 58: 765-768.
- [12] Chen CY, Wu TY, Chan FR, Wu YC. Lignans and kauranes from the stems of *Annona cherimola*. *J Chinese Chem Soci*. 1998; 45: 629-634.
- [13] Quispe MA, Callacondo RD, Rojas CJ, Zavala CD, Posso RM, Vaisberg WA. Efecto citotóxico de las semillas de *Annona cherimola* en cultivos de cáncer de cérvix, mama y leucemia mieloide crónica. *Acta Med Per*. 2009; 26: 156-161.
- [14] Lagunes A, Arenas C, Rodríguez C. Extractos acuosos y polvos vegetales con propiedades insecticidas. CONACYT-CPUACH-INIA-DGSV. México: Editorial Futura. 1984. p. 203.
- [15] Rodríguez C, Nieto A. Anonáceas con

propiedades insecticidas. En: Anonáceas, produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimólia). Brasil, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 1997. p 229-239.

[16] Bobadilla AM, Zabaleta EG, Gil FF, Pollack VL, Sisniegas GM. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller “chirimoya” Miller and *A. muricata* Linnaeus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. Rev Peru Biol. 2002; 9: 64-73.

[17] Fournier G, Leboeuf M, Cavé A. Annonaceae essential oils: a review. Journal of essential oils: A review: J Essential Oil Res. 1999; 11:131-142.

[18] Wele A, Ndoye I, Badiane M. Fatty acid and essential oil compositions of the seed oil of five *Annona* species. Nig J Nat Prod Med. 2004; 8: 62-65.

[19] Ferreira L, Perestrelo R, Camara JS. Comparative analysis of the volatile fraction from *Annona cherimolia* Mill. cultivars by solid-phase microextraction and gas chromatography–quadrupole mass spectrometry detection. Talanta. 2009; 77: 1087-1096.

[20] Rios MY, Castrejón F, Robledo N, León I, Rojas G, Navarro V. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Annona cherimolia* (Annonaceae). Rev Soc Quím México. 2003; 47: 139-142.

[21] Idstein H, Herres W, Schreier P. High-resolution gas chromatography-mass spectrometry and -fourier transform infrared analysis of cherimoya (*Annona cherimolia*, Mill.) Volatiles. J Agric Food Chem. 1984; 32: 383-389.

[22] Organización Panamericana de la Salud. [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=4494&Itemid=2481]. Revisada: 07 de junio de 2011.

[23] Organización Panamericana de la Salud. Información regional de dengue: número de casos. [http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=view&id=264&Itemid=363&lang=es]. Revisada: 27 de Septiembre de 2011.

[24] Kouri G. El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. Rev Panam Salud Pública. 2006; 19: 143-145.

[25] Amer A, Mehlhorn H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex larvae* (Diptera, Culicidae). Parasitol Res. 2006; 99: 466-472.

[26] Rose R. Pesticide and Public health: Integrated methods of mosquito management. Emerg Infect Dis. 2001; 7: 17-23.

[27] Rodríguez, C. Plantas contra plagas: potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. México. D.F. Edit de la RAPAM; 2000.

[28] Kamaraj C, Rahuman A, Bagavan A, Zahir A, Elango G, Kandan P, Rajakumar G, Marimuthu S, Santhoshkumar T. Larvicidal efficacy of medicinal plant extracts against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Trop Biomed. 2010; 27: 211-219.

[29] Kihampa C, Joseph CC, Nkunya MHH, Magesa SM, Hassanali A, Heydenreich M, Kleinpeter E. Larvicidal and IGR activity of extract of Tanzanian plants against malaria vector mosquitoes. J Vector Borne Dis. 2009; 46: 145-152.

[30] Sandra P, Bicchi C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Huethig, Heidelberg 1987.

[31] Adams R. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream IL, USA. Allured Publishing Corporation; 2007.

[32] Davies N. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 M phases. J Chromatogr A. 1990; 503: 1-24.

[33] World Health Organization. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticide. WHO/VBC/81.807.

[34] Bandoni AL. Las plantas aromáticas. En: Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Bandoni (Ed.). Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 2002, p 12-26.

[35] Bobadilla M, Zabala F, Sisniegas M, Zabaleta G, Mostacero J, Taramona L. Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). Rev Peru Biol. 2005; 12: 145-152.

[36] Kiran SR, Bhavani K, Devi PS, Rao BRR, Reddy KJ. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Bioresour Technol. 2006; 97: 2481-2484.

[37] Costa EV, Macedo L, Ramos de Jesús HC, De Lima PC, De Souza R, Salvador MJ, De Holand S, La Corte R, Do Nascimento AP. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). Nat Prod Commun. 2011; 6: 907-912.