

**IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS EN DOS ESPECIES DE *Tagetes*  
(Compositae) CON TOXICIDAD PARA LARVAS DE *Aedes aegypti* L**

## **1. INTRODUCCION.**

**En los últimos años en materia de comunicación, terrestre, aérea, marítima y ferroviaria, así como los avances en la industrialización, favorecieron a la movilización de numerosas poblaciones de una zona a otra dentro del contexto mundial.**

**Esto aunado a la proliferación de artículos manufacturados en su mayoría desechables, el aumento en la producción de botellas, frascos, llantas, etc. han provisto condiciones óptimas para el desarrollo y propagación de mosquitos y con ellos la incidencia de enfermedades de origen infeccioso, que amenaza con incrementarse en un futuro inmediato; otros de los factores que actúan en el incremento de los vectores, es sin duda la disparidad entre población y servicios, como: agua potable, pavimentación, drenaje y servicios médicos.**

**En diversas regiones geográficas incluyendo entre ellas a México, todos estos elementos han traído consigo problemas de salud, entre los cuales nos referimos a un padecimiento infeccioso conocido como dengue.**

**El dengue es una enfermedad arboviral altamente trasmisible y la más importante en términos de morbilidad y mortalidad (Grantz, 1991), se caracteriza por síntomas como: fiebres altas, cefaleas, artralgias, mialgias, esto en su forma clásica, sin embargo estas manifestaciones sitomatológicas, tienden a agravarse cuando a ellas se le adicionan varias manifestaciones hemorrágicas, dándole entonces el nombre de dengue hemorrágico, el cual es altamente letal (vector tópic.1980)**

**Aproximadamente 1.5 millones de personas en los trópicos, esencialmente de Asia, la región del pacifico occidental, el caribe, centro y sur América viven bajo la amenaza de infecciones por dengue (Beker y cols,1991)**

**Por lo anterior mencionado, es importante tomar acciones que nos conduzcan a disminuir grandemente las densidades poblacionales de los vectores de esta enfermedad,, ya que desde la perspectiva de prevención y control, el único punto para frenar la cadena de transmisión por la picadura del mosquito es precisamente el vector mismo, desde sus criaderos en muchas ocasiones proporcionadas por el hombre, pasando por controles fisicos (lavado, cambio de agua, tapando depósitos etc) controles químicos hasta el control y / o eliminación de los adultos.**

La idea de combatir a los insectos plaga es realmente antigua; por ejemplo el azufre se utilizó desde el año 1000 A.de.C. Plinio en el año 79 D.C., recomendaba usar arsénico como insecticida y en el siglo XVI los chinos ya aplicaban compuestos de arsénico, (Lagunes 1994) a través del tiempo los insecticidas fueron evolucionando, muchos de estos venenos fueron empleados para el control de insectos y otras plagas, en ocasiones los resultados fueron espectaculares aunque el riesgo para el usuario era aún mayor, entre estos venenos que se utilizaron como insecticidas podemos citar al cianuro de hidrógeno usado generalmente como fumigante, el verde de París usado como insecticida, el uso indiscriminado provocó la desaprobación de estos, por lo que en la búsqueda de nuevos insecticidas vinieron entonces compuestos orgánicos como el alquitrán y los aceites del petróleo. Al inicio de los años treinta comienza la era moderna de los plaguicidas con la introducción de nuevos compuestos orgánicos derivados del tiocianato de alquilo, la salicililamida, el p-diclorobenceno, el naftaleno y la tiodifenilamina (Cremllyn,1985).

En los años cuarenta aparecieron los insecticidas organoclorados, a principio de los cincuenta apareció el segundo grupo de insecticidas residuales, los órgano fosforados, en los sesentas, los carbamatos y a partir de los setentas comenzaron el uso de los piretroides

El uso de plaguicidas de diferentes grupos químicos como organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretrina ha traído consigo problemas ambientales y en otro sentido la aparición de tolerancia a estos grupos químicos por parte de los insectos. En pleno siglo XXI la protección del medio ambiente y la salud es una prioridad en muchos países por lo que se ha impulsado la investigación, desarrollo y producción de productos naturales de origen vegetal, el objetivo de este trabajo es generar nuevas alternativas para el control y/o erradicación de vectores que son perjudiciales para el hombre en cuanto salud pública se refiere, con las atenuantes de ser altamente efectivos y que simultáneamente no acarreen problemas ecológicos, desde esta perspectiva nos encausamos a aquellas plantas que poseen ciertas propiedades medicinales, con el objetivo de obtener sus ingredientes activos, los cuales puedan ser utilizados no sin antes ser sometidas a investigaciones serias para su posterior uso en formulaciones de nuevos plaguicidas.

## 2 ANTECEDENTES.

### 2.1 *Aedes aegypti*

*Aedes aegypti* es un mosquito originario de África y se considera que inicialmente fue silvícola, a finales del siglo XIX penetra a Asia y reemplazó a *Ae. albopictus* como vector de dengue en áreas urbanas (Salas L.1993)

En México existe un numero conocidos de mosquitos el cual comprende 20 géneros, 37 subgéneros y 223 especies (Darise 1995) .

#### Datos Sistemáticos

**Phyllum:** Arthropoda

**Clase:** Hexapoda (Insecta)

**Orden:** Diptera

**Suborden:** Nematocera

**Familia:** Culicidae

**Subfamilia :** Culicinae

**Triba:** Aedeomyiini

**Género:** *Aedes*

**Subgénero:** stegomyia

**Especie:** *aegypt.*

#### 2.1.1 BIOLOGÍA DE *Aedes aegypti*.

##### 2.1.1.1 Huevos

Los huevecillos recién puestos son de color gris y suaves, pero al poco tiempo se toman de un color negro y se endurecen, la cantidad de huevos que una hembra puede ovipositar varía, tiene como mínimo 20 y un máximo de 120, la oviposición es afectada por diferentes factores como tamaño del cuerpo de la hembra, magnitud del volumen de sangre ingerida, calidad proteica de la sangre ingerida etc.(Harwood. 1987)

El lugar donde comúnmente se encuentran los huevos de *Ae. aegypti* es sobre las paredes del recipiente a unos escasos centímetros del nivel del agua a este punto aún con humedad la hembra pega los huevos uno a uno, este aspecto es muy importante de conocer porque además la hembra por lo general no oviposita toda su carga de huevos en un solo lugar sino que lo hace parcialmente.

### 2.1.1.2 Larva:

La antena es un poco mas de un tercio del tamaño de la cabeza, lisa; El penacho antenal representado por un cabello sencillo inserto cerca de la mitad del eje (haz). Pelos de la cabeza: postclipeal 4, algo grande, 3 a 5 ramificaciones; frontal superior 5; casi directamente enfrente del pelo 5. Pelos pro torácicos: 1 medio, de 2 a 5 ramificaciones;

el 2 corto, sencillo; 3 corto, doble ( a veces triple); 4 corto, sencillo o doble; 5 largo, casi siempre doble, 6 largo, sencillo, 7 largo, doble o triple en los segmentos I-V. Peine de ocho segmentos con 7 a 12 escamas en una hilera sencilla y curva; las escamas individuales en forma de espina, con una espina fuerte media y romas, espinas cortas laterales. Índice de sifón de 2.0; pecten de 10 a 19 dientes que alcanzan la mitad del sifón; penacho sifonal de 2 a 5 ramificaciones, inserto mas allá del pecten. El segmento anal con el lomo llegando cerca de 7/8 debajo de los lados; el pelo lateral sencillo o doble, cerca del tamaño del lomo; cepillo dorsal bilateral que consiste de un pelo caudal inferior y un penacho caudal superior de 2 a 4 ramificaciones; el cepillo ventral esta compuesto de cerca de 7 a 10 pelos largos y dobles que están confinados al área enrejada; las branquias cerca de tres veces el tamaño del lomo cada una ancha y redondeada y roma en la punta. (Elizondo,2002).

Las larvas dentro de un mismo criadero varían de instar, numero y tamaño y a veces en origen maternal, se alimentan de protozoarios de viada libre y microalgas, la alimentación la efectúan tanto en el fondo del criadero, como en el intermedio de la columna de agua.



Fig. 1 Larva de *Ae. aegypti*

### 2.1.1.3 Pupa

Después del cuarto instar la larva segrega por todo su cuerpo una cubierta que finalmente la envuelve por completo, dentro de esta cubierta la larva deja de alimentarse y solo flota y nada con sus aletas caudales (Chapman, 1982). Dos trompetas respiratorias en su cabeza le permiten el intercambio gaseoso. El estado pupal es necesario para que los cambios morfológicos se efectúen y así en un futuro inmediato este listo para invadir el espacio aéreo.

### 2.1.1.4 Adulto

Marcado con bandas y rayas de color plateado o amarillo blanquizcos sobre un fondo casi negro, tiene un patrón uniforme sobre el dorso del tórax, las patas están conspicuamente bandeadas y el ultimo artejo de la pata posterior es blanco.

Generalmente se reconocen dos variedades: la variedad *aegypti* es de color café negruzco, ampliamente distribuida pero ausente en el interior de África. ; la *formosus* es negra y esta limitada en África al sur del Sahara donde es la única variedad excepto la área costera. (Harwood1987).



Fig.2 Adulto de *Ae. aegypti* alimentándose

### 2.1.1.5 DISTRIBUCIÓN

*Aedes aegypti* esta ampliamente distribuido dentro de los limites de las latitudes 40°N y 40° S, Nuevo León se encuentra localizado en el Noreste de la República Mexicana entre los paralelos 27° 48' y 23° 09' de latitud Norte, los meridianos 98° 26' y 101° 13' de longitud oeste. El Trópico de Cáncer atraviesa el estado, pasa a 24 kilómetros al sur de la cabecera de Doctor Arroyo y a 3 kilómetros al norte de la de Mier

y Noriega. El estado presenta forma romboidal, y su longitud máxima de norte a sur es de 504 kilómetros y de este a oeste de 225 kilómetros, y su extensión total es de 64,555 kilómetros cuadrados. (Elizondo, 2002).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

El dengue es una infección viral de los trópicos y sub. Trópicos, originado por mosquitos con posibles consecuencias epidémicas; Esta es una enfermedad infecciosa altamente transmisible se caracteriza por síntomas como: Fiebre alta, dolores agudos de cabeza, articulaciones y músculos de ahí el nombre de fiebre rompe huesos, sin embargo, en varias regiones del mundo las infecciones características se convierten en una enfermedad endémica y altamente letal, conocida con el nombre de fiebre hemorrágica del dengue, la sintomatología observada es fiebre alta y varias manifestaciones hemorrágicas. La fiebre hemorrágica se ha extendido ampliamente hacia el pacífico occidental, sureste de Asia y América latina, este síndrome es una de las principales causas de hospitalización y muerte de niños de ocho países del trópico Asiático en donde se han reportado mínimamente 1.5 millones de hospitalización y treinta y tres mil muertes desde su primera aparición en la década de 1950 (Gratz, 1991)

En América latina durante el programa de erradicación del vector *Aedes aegypti* L, en 1947, muchos países fueron declarados libres de mosquito. En décadas pasadas varios países de América latina fueron re infectados ocurriendo desde entonces serias epidemias.

En 1977, en Puerto Rico se notificaron alrededor de 355 mil casos. En Brasil se presentó en 1986 y hubo más de tres mil reportes de dengue (Reyes, 1991)

Así mismo durante 1990 y 1991, se reportaron 36,167 casos de dengue de los cuales 237 fueron diagnosticados como dengue hemorrágico (Gómez, 1992)

Entre 1989-1990 se notificaron en Venezuela 12200 casos de dengue de los cuales 3108 se diagnosticaron como fiebre hemorrágica con 73 muertes estimadas (Gratz, 1991).

Casos esporádicos de dengue se reportaron en trece países del Caribe, Centro y Sur América incluyendo México, en el cual en los periodos de 1980-1990 correspondieron a

México con el 22%. A la par con Colombia son de los países con una transmisión muy activa (Gómez, 1992)

En México se sabe que el dengue entró por Tapachula a finales de los años setenta y se dispersó por el territorio en menos de 10 años.

Así mismo encontramos que el informe comprendido de 1978-1994 asciende a 254,168 siendo en 1980 el año con mayor número (20%) (Gómez, D.H y Robles, M.J. , 1995)

En datos epidemiológicos en la semana 21 de 1997 se reportaron para seis entidades federativas los siguientes datos:

Campeche(103), Colima(235), Morelos(74), Tabasco(231), Veracruz(255), Yucatán, (197) (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 1997).

En Nuevo León durante los años 2000-2001 hubo un total de 25 casos, 22 de dengue clásico y 3 hemorrágicos, 52% de los casos ocurrieron el municipio de Monterrey, 12% en San Nicolás y Apodaca, 8% en Guadalupe y 4% en Allende.

Actualmente el sistema único de información para la vigilancia epidemiológica hace un informe preliminar de los casos por entidad federativa en la semana 21 para el dengue clásico donde destacan los siguientes estados: Colima(141), Chiapas (9), Guerrero (12)y Veracruz(61)

El dengue hemorrágico hasta la semana 23 de este año se han reportado los siguientes casos para las diferentes entidades federativas: Campeche (1), Guerrero (12) y Yucatán (2).

Aunque en el comunicado de prensa n°138 correspondiente a la fecha del 18 de agosto de 2002. la SSA informa que se han confirmado un total de 3032 casos de dengue en lo que va del año en todo el territorio nacional, de los cuales 2,638 corresponden dengue clásico y 394 a dengue hemorrágico, incluidas cuatro defunciones, una en colima una en Oaxaca y dos en Veracruz



### 2.3 GENERALIDADES DE *Tagetes*.

El genero *Tagetes* se caracteriza por tener cabezuelas heterógamas de tamaño diverso, solitarias o carimbosas, con las flores amarillas. Las flores marginales femeninas, linguadas, a veces ausentes; las de disco hermafroditas y tubulosas. Involucro cilíndrico o acampanado, con las bracteas uniseriadas, soldadas hasta cerca del ápice; receptáculo plano, desnudo o algo ciliado, anteras redondeadas en la base; estilos de las flores femeninas con las ramas truncadas en el ápice. Aquenios lineares o fusiformes, comprimidos o angulares. Hierbas o arbustitos con glándulas oloríferas epidérmicas, especialmente en las bracteas involucrales, hojas enteras o pinatisectas, opuestas.(Sánchez S,O.1980)

*Tagetes lucida*

Datos sistemáticos

**Orden:** Campanulate

**Familia:** compositae

**Subfamilia:** Tubuliforme

**Tribu:** Helienieae

**Genero:** *Tagetes*

**Especie:** *lucida*



Fig. 3 *Tagetes lucida*(yernanis)

*Tagetes lucida* (pericon, hierbanis, etc.)

Hierba de tallos derechos, que mide 30-40 cm de altura, hojas opuestas, sésiles, oblongas, finamente aserradas, aromáticas, miden 2.5-3.5 cm de largo por 7-9 mm de ancho. Cabezulas pedunculadas con el involucro de 7-9 mm de alto, flores amarillas, linguas de 3-4 mm. Florece de agosto a octubre (Sánchez,S.O. 1980)

Usos comunes.

Comúnmente se usa en infusión para curar cólicos menstruales, dolores estomacales, enfriamientos de la matriz y matriz caída, los frutos tradicionalmente son usados en forma de té actúa como sedante en el tratamiento de personas nerviosas los Huicholes mezclan esta planta con tabaco a la cual le llaman "ye", se han reportado efectos alucinógenos al fumarla (Linares E & Bye , A 1986), también al quemarla sirve para ahuyentar a los mosquitos (Sánchez, S.1980)

## Distribución.

*Tagetes lucida* se encuentra ampliamente distribuida en veinte estados de la Republica Mexicana y en los Estados Unidos en Arizona, Colorado, Nuevo México y Texas (Linares E & Bye , A 1986).

### 2.4 *Tagetes erecta*:

Datos sistemáticos de la planta.

Orden: Sinandarae

Familia: compositae

Subfamilia: Tubuliforme

Tribu: Helienieae

Genero: *Tagetes*

Especie: *erecta*

*Tagetes erecta* (Flor de muerto, campasuchil, clavelón, copetona)

Planta herbácea dicotilidonea de 50 a 60 cm de altura, tallo aéreo, herbáceo con numerosas estriaciones longitudinales, cabezuelas carimbozas, heterogamas de tamaño diverso con flores amarillas, receptáculo marcadamente convexo, pedúnculo largo antenas redondeadas en la base con filamentos libres, presentan glándulas oloríferas epidérmicas especialmente en las bracteas y hojas sesiles de disposición opuesta. (Martínez G, 1997).

Usos comunes:

Es de gran importancia en la floricultura por su gran inflorescencia, uniformidad y resistencia a diferentes climas, es ampliamente usada en la industria alimenticia como colorante, se han reportado usos medicinales como antipalúdico y nematocida, se han aislado diferentes compuestos como carotenoides, ácidos grasos etc.

Distribución.

Es originaria de México, se encuentra en gran abundancia en el valle central y en general en todas las regiones calientes del país.

## 2.4 CONTROL QUÍMICO

El desarrollo de los plaguicidas orgánicos a partir de la segunda guerra mundial creó una revolución en el control, de plagas. Para 1955, la producción de plaguicidas orgánicos sintéticos en EUA había alcanzado 227 millones de Kg. (Lagunes, 1994), en 1940 se descubrieron las propiedades insecticidas del DDT por lo que causó que se usara amplia y cotidianamente en la agricultura y en los hogares en prácticamente todo el mundo, sus condiciones de usos y sus propiedades trajeron como consecuencia que la industria química buscara masivamente otros productos con propiedades similares (Albert, 1990). La aparición de nuevos grupos químicos como los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretrinas y el mal uso de ellos trajeron, una serie de cambios acelerados e indeseables como la contaminación al medio ambiente y en otros términos la resistencia por parte de los insectos ocasionando la proliferación del insecto plaga por lo antes mencionado y al no contar con enemigos naturales que por lo general son más susceptibles (Metcalf, 1990).

Razón por la cual en la actualidad se estudian diversas alternativas, desde la utilización de patógenos hasta depredadores (Rodríguez-Monroy y Col, 1991).

Tomando en cuenta los graves problemas que han ocasionado el mal uso y abuso de los insecticidas se comienza con nuevos métodos y estrategias de control como el uso de entomopatógenos como virus, bacterias, protozoarios, nemátodos y hongos.

Algunos de estos patógenos pueden ser bastante comunes y son los causantes de las epizootias en las poblaciones naturales de los insectos (Maddox, 1977). Se tiene evidencia de que los entomopatógenos conocidos comercialmente no afectan a los animales de sangre caliente y tienen la ventaja de no causar daños al medio ambiente por ser biodegradables. Entre los entomopatógenos más usados están los insecticidas microbianos.

## 2.5 CONTROL MICROBIANO.

Los insecticidas microbianos comúnmente tiene efecto en un corto tiempo, las principales ventajas de estos son la seguridad y especificidad del hospedero (Maddox, 1977), pueden ser aplicados como polvos líquidos, pellets o cebos. Existen dos grandes

grupos que han llamado mayormente la atención como insecticidas microbianos, los b $\acute{a}$ culovirus y las bacterias formadoras de esporas (Metcalf, 1990).

Lagunes 1994, menciona a *Bacillus pomilliae* y *B. thuringensis*, como bacterias formadoras de esporas, as $\acute{ı}$  mismo hace referencia que preparaciones de *B. thuringensis* var *kurstaki*, son efectivas contra larvas de lepid $\acute{o}$ pteros, por otro lado *B. thuringensis* var *israelensis*, es efectivo contra larvas de mosquitos y quironomios. La acci $\acute{o}$ n de *B. thuringensis* es despu $\acute{e}$ s de la ingesti $\acute{o}$ n, la inclusi $\acute{o}$ n se solubiliza en el intestino medio de los insectos liberando toxinas prote $\acute{i}$ nicas (Gal $\acute{a}$ n, 1996) tales como delta exotoxina, especifica contra lepid $\acute{o}$ pteros, beta exotoxina, especifica contra mosca, gama exotoxina de amplia acci $\acute{o}$ n insecticida.

Sin embargo no solo el control microbiano a sido usado como un m $\acute{e}$ todo alternativo en el control de los insectos en la actualidad s $\acute{e}$  han retomado las investigaciones tendientes a extraer de las plantas ingredientes activos con p $\acute{r}$ opiedad biol $\acute{o}$ gica para luego sintetizarlos.

## 2.6 CONTROL BOT $\acute{A}$ NICO Y SUS COMPUESTOS ACTIVOS.

Una de estas alternativas es el estudio de algunas plantas con ciertas propiedades medicinales atribuidas en tiempos pasados al tratamiento de alguna enfermedad o malestar, Mart $\acute{i}$ nez, A. 1976, sugiere la utilizaci $\acute{o}$ n de las mismas pero siguiendo una pauta que bajo investigaciones bot $\acute{a}$ nicas, m $\acute{e}$ dicas y qu $\acute{i}$ micas de explicaciones por m $\acute{a}$ s satisfactorias de los elementos o compuestos que se involucran para resolver dicha problem $\acute{a}$ tica, tal es el caso de los insecticidas bot $\acute{a}$ nicos, que en t $\acute{e}$ rminos ambientales prevean seguridad y efectividad.

Las plantas han evolucionado por mas de 400 millones de a $\acute{o}$ os, para oponerse al ataque de los insectos como la repelencia y la acci $\acute{o}$ n insecticida, se sabe de muchas plantas cuyos extractos poseen propiedades insecticidas, sin embargo solo se han aprovechado algunos entre los cuales est $\acute{a}$ n, el tabaco, el piretro, de el derris, la riania y la sabadilla.

Se sabe que el principio activo del tabaco es la nicotina, de el Derris es la rotenona, de la Riania la raniodina y de la Sabadilla la veratridina (Lagunes, 1994)

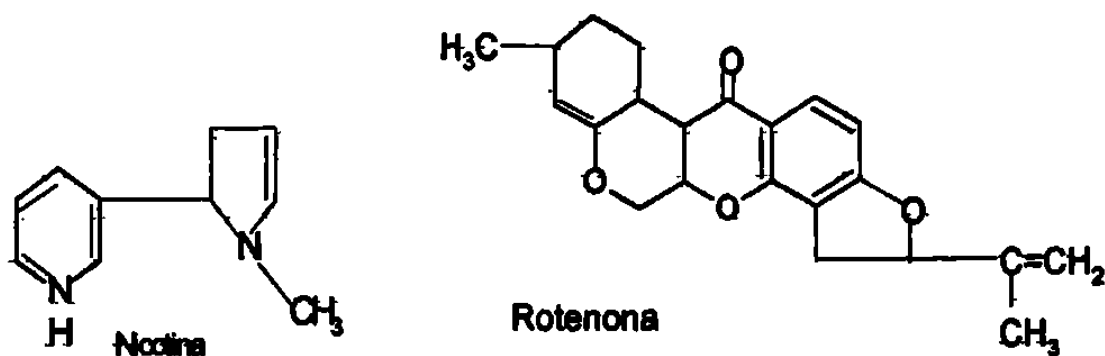


Fig. 4 Estructuras químicas de principios activos de Nicotina y Derris.

Recientemente el árbol de neem ha sido objeto de estudio tanto en el campo de la entomología como en la fitoquímica Mulla & Tianyun Su, 1999, se han obtenido de seis especies de neem 35 principios biológicos activos en diferentes insectos (mosquitos, moscas, triatominos, cucarachas) con diferentes modos de acción, entre los cuales tenemos: regulador de crecimiento, esterilización y supresión de la fecundidad, en repelencia y atracción en la oviposición, también se han encontrado actividad insecticida los aceites de *Helietta parvifolia* contra *Musca domestica* (Bocanegra.1982) o los alcaloides de *Annona squamosa* los cuales actúan sobre sistemas fisiológico de animales e insectos (Saxena y Tikku 1990).

Diferentes partes de plantas con ciertas propiedades han sido estudiadas con el objetivo de encontrar a los ingredientes responsables de dicha actividad, tal es el caso de *Solenostemma argel* de la cual se han encontrado en extractos acuosos del pericarpio de la fruta seca, de las flores y sus raíces actividad larvicida contra *Culex quinquefasciatus*, donde el pericarpio fue la más efectiva con una  $LC_{50}$  de 0.49 mg/ml las flores y las raíces mostraron una  $LC_{50}$  de 1.74 mg/ml y 3.02 mg/ml respectivamente (El-Kamali 2001).

Por otro lado el uso de los compuestos aislados de las plantas también se han usado como repelentes e incluso se han hecho comparaciones con repelentes que existen comercialmente, Trigg 1996, hace referencia al eucalipto cuyo principal ingrediente activo p-metilo-3,8-diol ha sido evaluado en el campo en comparación con el DEET contra *Anopheles gambiae* y *An. funestus* donde se observó una protección entre 6 y 7.75 horas no habiendo diferencia significativa con el Deet

Con respecto a las plantas en estudio podemos decir que pertenecen a una familia muy amplia y diversificadas, así como de mayor dificultad para su estudio, muchas son cultivadas como el girasol, la lechuga, el guayule, la margarita, el crisantemo, la dalia, la manzanilla, etc. (Sánchez S, 1980) y otras se desarrollan de manera silvestre.

Importantes géneros y especies de esta familia ha sido estudiadas exitosamente al poder aislarse importantes compuestos, tal es el caso de las piretrinas aisladas de *Chrysanthemum L.*

## 2.7 COMPUESTOS BIOACTIVOS AISLADOS DEL GENERO *Tagetes*

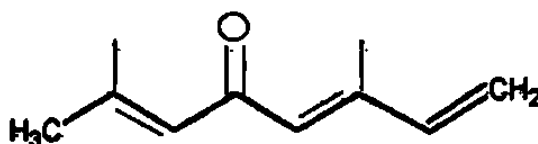
El genero *Tagetes* es tan amplio que dentro de sus especies se han realizado estudios químicos encontrando constituyentes volátiles como monoterpenoides, sesquiterpenos y aromáticos, comprobando que aún en el mismo género pero diferentes especies existen diferencias químicas por lo que hacen más atractivo su estudio (Rodríguez y Marby 1977).

La caracterización biológica y química en estos extractos son importantes debido a que se han observado en mosquitos adultos los clásicos síntomas de envenenamiento (excitación, seguida de parálisis y finalmente la muerte) similar a los síntomas producidos por las piretrinas (Quraishi 1977).

Se han probado extractos de *T. erecta*, *T. patula*, *T. dimimuta* contra larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi* (Perich, J.M. et al 1994) resultando tener buena actividad biológica.

Las investigaciones de las diferencias químicas señalan que especies de *Tagetes* contienen esteres monoterpenoides estrechamente relacionados, conocidos como tiofenos, de tal manera que se han estudiado por separado, mencionando que la actividad larvicida de los extractos de *T. minuta* es causado por el componente ocimenona, Fig 5 (Maradufu, et al 1978)

(E)-ocimenone

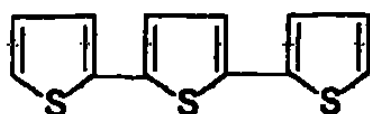


*Tagetes minuta L.*

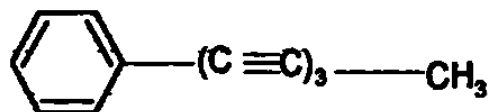
También se hace mención de que este componente no es el único de la actividad larvívica sino que también existen aceites responsables de dicha actividad.

Así tenemos que para *T. Patula* es el alfa-tertienil el responsable de la actividad larvívica contra *Aedes aegypti* del cuarto estadio por el método de inmersión y expuesto bajo L.U.V por 30 minutos a una LD<sub>50</sub> 1.0 ppm en un tiempo de 24 h obteniendo el 100% de mortalidad y el Fenil heptatrieno con una LD<sub>50</sub> 1.0 ppm y una LD<sub>90</sub> 2.7 ppm (Dev, S. & Koul, O. 1997).

Alfa-Terthienyl



Phenylheptatriyne



*Tagetes patula* L.

Fig 6 Estructuras químicas de los ingredientes activos de *T. patula*

También se ha observado que en el alfa terthienyl la actividad se incrementa con la luz, produciendo una acción fototóxica. (Arnason et al. 1981) así mismo se han aislado dos fototoxinas del género *Tagetes*: erythrosin-B y el alpha tertiofeno o alfa -T donde se ha comprobado que el alfa T es seguro para los mamíferos (Science, 1995).

Por otro lado en extractos de *T. erecta* se ha visto que poseen actividad larvívica contra larvas de *Culex pipiens quinquefasciatus* con una LD<sub>50</sub> 75 ppm y una LD<sub>90</sub> 185 ppm, pero no se conoce con precisión el responsable de dicha actividad (Martínez, G. 1997).

De *Tagetes lucida* se aisló e identificó un principio activo responsable del efecto bactericida lográndose dilucidar su estructura química por métodos espectroscópicos (U.V., RMN, Cromatografía de gases) el compuesto identificado es la 7-metoxi coumarina reportada como Herniarina I. (Salgado, G. 2000) fig. 7.

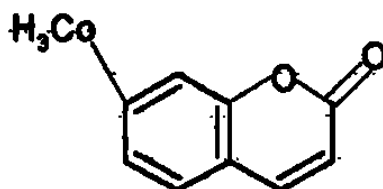


Fig. 7 Estructura química de la Herniarina I

## **HIPOTESIS.**

**Los compuestos extraídos de dos especies de *Tagetes* podrían tener actividad biológica contra larvas de *Aedes aegypti***

## **OBJETIVO GENERAL.**

**Extraer e identificar de dos especies de *Tagetes* los compuestos con actividad larvicida en *Aedes aegypti***

## **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- a) Obtener extractos de dos especies de *Tagetes* con solventes de diferente polaridad y Probar la actividad biológica de *Tagetes lucida* contra larvas de *Aedes aegypti*.**
- b) Probar diferentes vehículos con los extractos de *Tagetes lucida* para su posterior formulación**
- c) Separar las fracciones de los extractos activos *Tagetes lucida* y probar la actividad biológica de cada una contra larvas**
- d) Aislar, purificar y caracterizar químicamente los compuestos activos de *Tagetes lucida***
- e) Evaluación estadística**



### 3 MATERIAL Y METODO.

#### 3.1 Obtención de los extractos.

Se partió de la maceración de la plantas *Tagetes lucida* y *Tagetes erecta* , se pesaron 40 y 200 g., respectivamente, los cuales se depositaron en matraces de 500 y 1000 ml, se pusieron en agitación continua en un agitador Dual Actino Shaker Lab Line, con hexano (solvente no polar) dejándolo por un periodo de siete días a 3000 r.p.m



Fig. 8 Extracción por Agitación continua

Posteriormente con ayuda de un embudo de Vidrio (pyrex) y papel filtro (watman N° 2) se realizó la separación del extracto hexánico.

El filtrado obtenido se sometió al rota vapor donde se eliminó la mayor parte del solvente, posteriormente se dejó que el hexano se evaporara en un vaso de precipitado por un período de 24 horas a temperatura ambiente, el precipitado se recogió con ayuda de una espátula de aluminio, se pesó y se depositó en viales de vidrio de 2 ml, para posteriores pruebas químicas. La misma metodología se siguió para *T.erecta* donde solo se utilizaron los pétalos y además se extrajo con metanol siendo este extracto el que se utilizo finalmente.



Fig. 9 Rotavapor modelo R-3000

### 3.2 Material Biológico.

Las larvas se obtuvieron del insectario del laboratorio de Entomología medica, las cuales provenían de huevos de una cepa de la ciudad de Escobedo N.L.

Los huevos se pusieron a eclosionar en charolas de plástico que contenían agua reposada, a las cuales se les adicionó aproximadamente 0.05 g de levadura con el objeto de bajar la cantidad de oxígeno, el ambiente de crianza de las larvas y adultos de *Ae. aegypti* en el insectario fluctuó de entre 26 a 29°C y una humedad relativa del 70 %, (figura 9).

Una vez que los huevos eclosionaron, las larvas fueron alimentadas con croquetas molidas de perro previamente desengrasadas (figura 10). Las pupas se recolectaron y fueron colocadas en cámaras de emergencias dentro de una jaula, con el propósito de mantener la colonia. Las hembras se alimentaron con sangre humana cada tercer día y los machos con una solución azucarada preparada al 10%. Se colocaron tiras de papel secante sumergidas parcialmente en agua, para que sirviera como superficie de oviposición

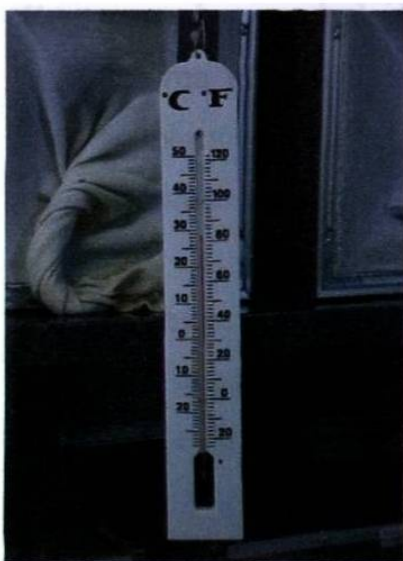


Fig. 10 Registro de la temperatura ambiente del insectario.



Fig. 11 Charolas con larvas de *Ae. aegypti*

### **3.3 Métodos Químicos de Identificación.**

Se tomó una pequeña porción del extracto crudo y se resuspendió en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada, se homogenizó en el vortex y de aquí se partió para efectuar las siguientes pruebas químicas:

**Liberman-Burchard:** Prueba para triterpenos y compuestos esteroidales.

**Reactivo:** 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfrió 0°C y se le añadió una gota de ácido sulfúrico. La prueba es positiva si hay formación de colores azul, verde, rojo anaranjado etc. Y se espera por un espacio de tiempo de 15, 30 y 60 minutos entre cada aparición de color.

**Dragendroff:** Prueba para alcaloides.

**Reactivo:** Se disolvieron 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 mL de ácido nítrico y 27.2 g de KI en 50 mL de agua, se mezclaron las dos soluciones y se dejaron reposar por 24 h. Se decantó la solución y se aforó a 100 mL con agua destilada. La prueba fue positiva cuando apareció un precipitado anaranjado-marrón.

**Wagner:** prueba para alcaloides.

Se disolvieron 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua; la solución se aforó con 100 mL de agua destilada, un precipitado anaranjado-marrón indicaría positividad

**Cloruro Férrico:** Hidroxilos fenólicos.

Se disolvió una pequeña cantidad de la muestra en una solución metanólica o acuosa de tricloruro de hierro al 5%, un color azul, verde ó violeta. Indicaría la prueba como positiva

**Fehling:** Azucres.

Se utilizaron dos soluciones, A y B, se disolvió la muestra en agua y se agregaron partes iguales de las soluciones. si se forma un precipitado rojo ladrillo la prueba es positiva.

**Bromo: Instauraciones.**

**Reactivo:** Solución de bromo al 5% en tetracloruro de carbono, mas 2 mg de la muestra, se le añadió gota a gota hasta que la coloración resistió varios minutos. La prueba es positiva si en un principio la coloración del bromo desaparece, es indicativo de instauraciones.

**Shinoda: Flavonoides.**

**Reactivo:** HCl concentrado, más trocitos de magnesio más el extracto, si da una coloración roja, anaranjada con desprendimiento de calor. La prueba se considera positiva

**Baljet: Sesquiterpenlactonas;**

El reactivo se preparó con dos soluciones que se mezclaron en volúmenes iguales antes de usarse, solución A: 1 g de ac pícrico en 100 ml de etanol, solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua destilada. Se agregan 8 gotas de muestra y 3-4 gotas de reactivo, la prueba es positiva si se forma una coloración naranja o roja oscura.

### 3.4 Bioensayos

#### Preparación de la Solución stock.

Se partió de los extractos crudos, hexánico y metanólico de *T. lucida* y *T. erecta*, respectivamente, se pesaron en una balanza analítica la cantidad de 0.72 mg y se siguió el siguiente protocolo.

solución stock para *T. lucida* :

$$\text{ppm} = \frac{\text{masa}}{\text{Vol}} \times 10^6$$

$$\text{ppm} = \frac{0.72\text{mg}}{100\text{ml}} \times 10^6 = 7200\text{ppm}$$

Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes para cada dosis con la siguiente fórmula:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

$$V_1 = ?$$

$$C_1 = 7200 \text{ ppm.}$$

$$V_2 = 250 \text{ mL}$$

$$C_2 = [25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110]$$

Para 90 ppm:

$$V_1 = \frac{V_2 C_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(250\text{ml})(90\text{ppm})}{(7200\text{ppm})} = 3.1\text{ml}$$



Fig.12 Soluciones stock de los extractos de *Tagetes sp*

### 3.4.1 Pruebas preliminares.

Una vez obtenidos los extractos crudos, se procedió a realizar los bioensayos con cada uno. Con la solución Stock ya preparada, se inició para dar con la dosis mínima (no menor del 8 % de mortalidad) y la máxima (arriba del 90 % de mortalidad)



Fig.13 Bioensayo para evaluar la actividad de *Tagetes sp* sobre larvas de 3<sup>er</sup> estadio tardío y 4<sup>o</sup> temprano de *Ae aegypti*

### 3.4.2 Evaluación de la actividad larvicida de los extractos.

Determinadas las dosis de referencia se procedió a trabajar con cinco dosis: 15 , 45 , 75 , 115 y 140 ppm, para el caso de *T. erecta* ( repitiendo cada una por cuadruplicado) y un testigo por cada dosis, también por cuadruplicado, el cual solo contenía agua destilada sin el extracto.

Para *T. lucida* se trabajó con siete dosis: 25, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 ppm, cada dosis se repitió nueve veces, además de sus controles (positivos y negativos) con las mismas repeticiones

Posteriormente a cada vaso conteniendo el volumen indicado (250 mL) mas sus dosis correspondientes, se les agregó con la ayuda de una red un lote de 25 larvas del 3er estadio tardío y cuarto temprano, previamente separadas en vasos de menor volumen. La mortalidad se registró a las 24 h. tanto en los vasos problema como en el control.

Los datos obtenidos fueron evaluados por análisis probit método de máxima verosimilitud (Finney 1971)

**Criterio de mortalidad larval:**

Se consideró muertas aquellas larvas que quedaron inmóviles en el fondo y las que no reaccionaron al ser tocadas con un objeto.

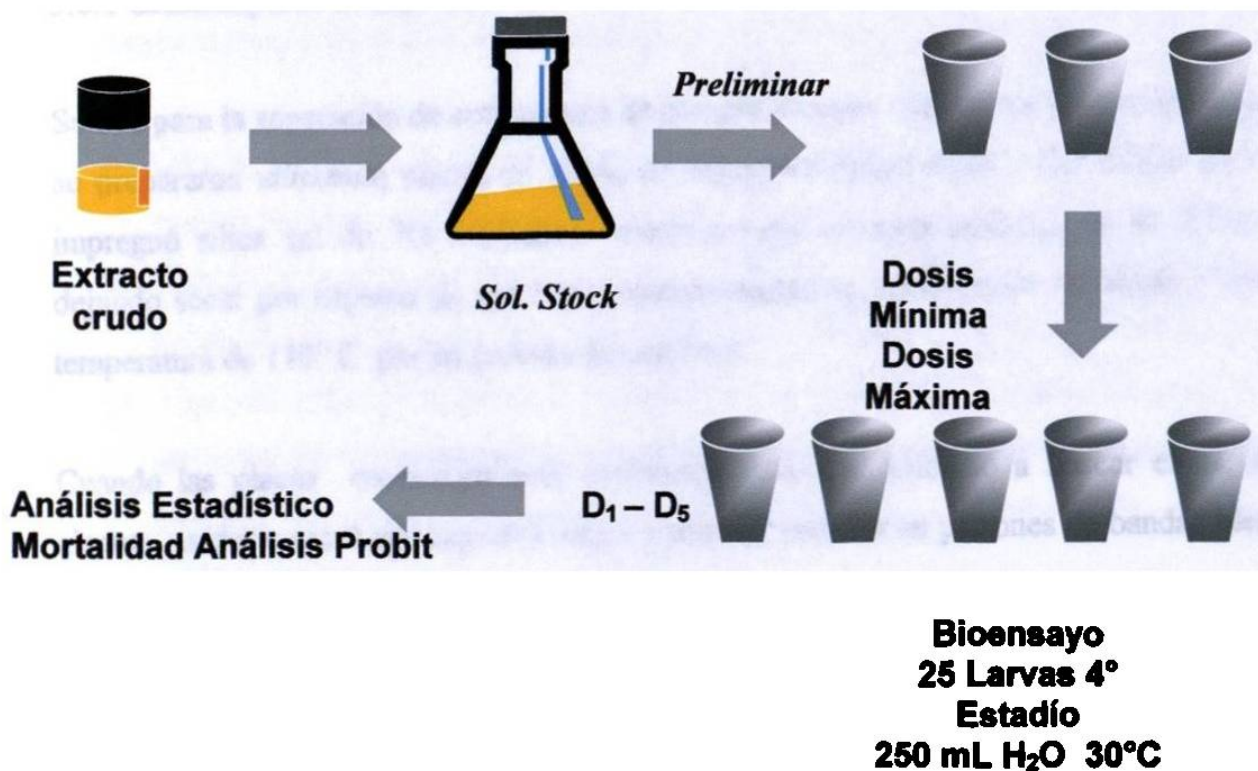


Fig. 14 Diagrama de flujo del bioensayo para probar la actividad de los extractos de *Tagetes sp* sobre larvas de *Ae aegypti*.

### **3.5 Pruebas con diferentes vehículos**

Se utilizaron tres vehículos: Tierra de Diatomeas, Termolita, silica gel de 7G J.T.Baker  
Se pesaron 5 g de cada vehículo y se saturó con 10 ml del extracto hexánico de *Tagetes lucida* a tres concentraciones diferentes 80 ppm, 160ppm y 7200 ppm , posteriormente se pesó un gramo de la mezcla y se sometió a una prensa manual para la elaboración de pastillas. Una vez realizado lo anterior se efectuaron bioensayos siguiendo la metodología como se describe en el punto 8.2.2 con 5 repeticiones por cada concentración más su testigo

### **3.6 Separación por métodos cromatográficos.**

#### **3.6.1 Cromatografía en capa fina.**

Se usó para la separación de compuestos de nuestra muestra. Las placas cromatograficas se prepararon utilizando placas de vidrio de diferentes dimensiones, a las cuales se le impregnó silica gel de 7G J.T.Baker mediante una solución saturada de la misma, dejando secar por espacio de una hora, posteriormente se activaron en la estufa a una temperatura de 110° C por un periodo de una hora.

Cuando las placas cromatográficas estuvieron listas, se procedió a buscar el mejor eluente, es decir aquel que separara mejor a nuestro extracto en patrones de bandas bien definidas y separadas.

La metodología abajo descrita se utilizó tanto para la elección del ó los eluente como para la corrida cromatográfica preparativa

- 1) Para esto la muestra se depositó en la parte inferior de la placa con la ayuda de un capilar, aproximadamente 1cm arriba con respecto al borde inferior de la misma.
- 2) El ó los solventes elegidos se depositaron en un recipiente de vidrio segundos después de haber realizado el inciso anterior.
- 3) Se introdujo la placa con la muestra del extracto en el recipiente de vidrio conteniendo al eluente, este es absorbido por la placa movilizandó al extracto



por su superficie y separándola en fracciones de acuerdo a las interacciones polares entre la muestra y el solvente.

- 4) Antes de que el eluyente llegara a la parte superior de la placa (aproximadamente 0.5 cm) se sacó del recipiente y se esperó a que esta se secara.
- 5) Posteriormente se observó la placa en la cámara de luz ultravioleta y se apreció el patrón de bandas

### 3.6.2 Cromatografía preparativa

Una vez realizada la cromatografía en capa fina y haber observado el número, tamaño y coloración de las bandas obtenidas, se procedió a recolectar las bandas de mayor tamaño para la cual se utilizaron placas de vidrio de 20 X 20 cm

- a) Con la ayuda de una espátula de aluminio se inició a raspar la fracción de nuestro interés cuidando no mezclar dichas fracciones.
- b) Cuando la banda que deseamos no se percibe a simple vista se procede a la utilización de la lámpara de U.V. y entonces se procede como en el inciso A.
- c) Una vez realizado lo anterior se depositan las fracciones en vidrios de reloj por ser estos de un diámetro considerable y retener mayormente la sílica con la fracción adsorbida, posteriormente se depositan en tubos de ensayo cuidadosamente.
- d) Ya en los tubos de ensayo la sílica con la fracción se resuspendió con 3ml de metanol con la finalidad de separar al componente de la sílica.
- e) Se agitó vigorosamente con la ayuda de un vortex y se centrifuga a 3000 r.p.m por espacio de cinco minutos, este paso se repitió tres veces
- f) Finalmente se depositó el sobrenadante en cajas petri con la ayuda de una pipeta Pasteur, se dejó a temperatura ambiente esperando que se evapore el solvente.

### 3.7 Bioensayo con las fracciones.

Cada fracción contenida en las cajas petri se resuspendió nuevamente con 2 ml de etanol, se agitó con movimientos envolventes, para posteriormente ser recolectadas con pipetas Pasteur, a tubos de ensayo.

Una vez realizado lo anterior se seleccionaron 10 larvas del 2° estadio tardío y se depositaron en un vaso desechable conteniendo 50 ml de agua, con sus respectivos controles, a cada lote de larvas previamente separadas se les adicionó la fracción correspondiente, para el control se le añadió 2 ml de etanol absoluto, se registro la mortalidad a las 24 horas.

### 3.8 Pruebas químicas para la identificación de grupos químicos en fracciones.

#### Prueba de la vanillina.

Para terpenos, el reactivo se roció sobre los cromatogramas ya corridos de los extractos y se colocó en la estufa a 100°C, por espacio de 8 minutos. Es positivo al observar en la placa coloraciones rojas o azules (El reactivo se prepara con 4 g de vanillina en 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

#### Prueba de Dragendorff.

Modificación de Mumier y Machelobuf, para alcaloides. El reactivo se roció sobre el cromatograma y la prueba se consideró positiva al observar en la placa coloraciones rojo o naranja, persisten por algunas horas. El reactivo se preparó con dos soluciones: solución A: se disuelve 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 ml ácido acético glacial y 40 ml de agua. Solución B: Se disolvió 8 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua ( El reactivo se prepara mezclando 5 ml de la solución A y 4 ml de la solución B y 100 ml de agua, el reactivo es estable por un año).

#### Prueba 2,4-dinitrofenilhidracina.

Para grupo carbonilo. En un tubo de ensayo se disolvieron 10 gotas de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 ml de etanol caliente, se agregaron 10 gotas de la muestra, se

calento a baño maría por 10 a15 minutos, se dejó en reposo y luego se enfrió en un baño con hielo, la aparición de un precipitado indicara la presencia del grupo carbonilo.

### **3.9 Identificación por métodos espectroscópicos.**

La identificación del compuesto activo se realizó por medio de cromatografía de gases acoplado a espectro de masas

### **3.10 Pruebas de citotoxicidad.**

La prueba de citotoxicidad fue realizada en The University of Arizona College of Medicine , por la M.C. Maria del Pilar Carranza Rosales por el método colorimétrico de la reducción del MTT (Mosmann, 1983).