



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



“A la libertad por la Universidad”

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO QUÍMICO FARMACÉUTICO.

DISEÑO Y FORMULACIÓN DE ABATE NATURAL A PARTIR DEL EXTRACTO DE LA HOJA DE *Annona muricata* (GUANÁBANA), LEÓN 2011.

INTEGRANTES:

Br. CRISTHIAN DE LOS ÁNGELES MORALES RODRÍGUEZ.

Br. YAMILETH AUXILIADORA MORENO PINEDA.

Br. WILDER YASIR OBANDO OPORTA.

TUTORA: Msc. LISSETT ARÁUZ MOLINA.

ASESOR: Lic. KELVIN NÚÑEZ.

FECHA: LEÓN, Septiembre del 2011.



ÍNDICE

	Nº de página
Introducción.....	1
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos.....	4
Marco Teórico.....	5
Diseño Metodológico.....	45
Resultados.....	54
Análisis de los resultados.....	60
Conclusión.....	61
Recomendaciones.....	62
Bibliografía.....	63
Anexos.....	67



Agradecimiento.

A Dios, por proveernos de su inmensa misericordia y sabiduría.

A nuestros padres, por obsequiarnos la vida y respaldarnos continuamente con su apoyo y dedicación.

A Lic Lissett Aráuz por compartirnos su conocimiento y su tiempo.

A Lic Kelvin Núñez por el tiempo e interés dedicado a la realización de este trabajo investigativo.

A Lic. Clarissa Cárdenas (Responsable del Departamento de Entomología del Mántica Berio) y su equipo de trabajo, por su apoyo incondicional, por la valiosa información brindada para poder culminar nuestro trabajo investigativo en su fase experimental.



Dedicatoria

A Dios, Padre Celestial, por iluminarnos, guiarnos y fortalecer a diario nuestras existencias, por brindarnos la sabiduría para culminar este trabajo lleno de retos, de manera satisfactoria.

A nuestros padres por todo el amor brindado, cariño, apoyo de forma innegable, toleranciaa y educación.



INTRODUCCIÓN

Diversas investigaciones se han enfocado a la búsqueda de nuevos productos naturales, con actividad insecticida y larvicida, que puedan controlar la población de mosquitos, sin presentar riesgos al humano y animales domésticos.

Según la OMS, cada año se producen cerca de 50 millones de infecciones por dengue, incluidos unos 500.000 casos de dengue hemorrágico que requieren hospitalización. Hasta el momento no se dispone de ningún medicamento específico para el tratamiento del dengue, por lo que los únicos métodos para prevenir y controlar la enfermedad consisten en reducir el contacto humano con el vector y controlar los criaderos larvarios de este mosquito. A pesar que existen actualmente una variedad de métodos de control del *Aedes aegypti*, muchos de los cuales han demostrado ser eficaces en diferentes situaciones, el principal método de control sigue siendo el uso de los insecticidas de bajo volumen (IBV) para el control de mosquitos adultos. (1)

En Paraguay el Departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción (UNA), realizó un bioensayo sobre la actividad larvicida de extracto acuoso al 5% de *Annona muricata*, en larvas de *Aedes Aegypti*. (Sanabria L, Segovia EA, González N, Alcaraz P, Vera N de Bilbao). Obteniéndose resultados promisorios em comparación con temefos. (2)

En Colombia se determinó la toxicidad de extractos etanólicos de *Annona muricata*, *Melia azedarach* y *Ricinus communis* sobre larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti* (Gabriel Jaime Henao, Carlos Mario García Pajón, José Miguel Cotes Torres), obteniéndose los siguientes valores de LC₅₀: *Annona muricata* 900 ppm; *Melia azedarach* 1800 ppm, y *Ricinus communis* 860 ppm, concluyendo que los resultados de toxicidad se consideran promisorios por estar debajo de la concentración máxima (5000 ppm) recomendada por la agencia de Cooperación Técnica Alemana.(3)



En Perú se realizaron estudios de las suspensiones acuosas de extractos etanólicos de las semillas, flores, corteza de ramas y corteza de raíces de *Annona muricata* sobre larvas del IV estadio de *Aedes aegypti* para determinar los niveles de susceptibilidad (Miguel Bobadilla y colaboradores). El mayor efecto tóxico correspondió a la suspensión de las semillas con un 100% de mortalidad a las 24 horas a 0.5 mg/mL, seguido por las flores a las 48 horas a 10 mg/mL y hojas a las 36 horas a 100 mg/mL.(4)

En Colombia, nuevamente, se elaboró una monografía sobre pruebas de actividad biológica con dos organismos modelos en acetogeninas de Annonaceae con actividad biopesticida (Lina Marcela Flores Acevedo, Viviana Mesa Salazar). las acetogeninas con mayor actividad biopesticida corresponden a: asimicina, esquamocina y anonacina, que se encuentran presentes en *Annona muricata*. (5)

En Nicaragua han sido pocos los estudios vinculados a la acción larvicida de las plantas y solo encontramos un trabajo investigativo realizado en el año 2003 que consistía en un bioensayo larvicida de *Aedes Aegypti* en 18 extractos hidroalcohólicos de hojas de plantas autóctonas de Nicaragua, de las cuales fueron seis plantas de diferentes especies vegetales las que presentaron actividad: *Annona muricata*, *Cedrela odorata*, *Cojoba catenata*, *Cryosophila warscenwiczii*, *Dendropanax arboreus*, *Pisonia aculeata*, las que contenían algún(os) constituyentes larvicidas, puesto que se obtuvo un 100% de mortalidad de larvas de *Aedes aegypti*.(6)

La DL100 de los seis extractos de hojas de plantas que resultaron activas variaron de acuerdo a las concentraciones mínimas encontradas, por lo cual unas poseían mayor actividad larvicida que otras.



Esta investigación tiene como objetivo la formulación y elaboración de un abate natural a partir de una planta autóctona haciendo uso de su efecto larvicida y así contribuir en un futuro en la lucha contra el agente causal del dengue, que afecta no sólo a nivel nacional sino centroamericano, como alternativa para controlar la población larval e impedir la emergencia del mosquito adulto, debido a que el dengue es una enfermedad epidémica muy común, más frecuente en niños y personas mayores. El dengue se caracteriza por una fiebre de aparición súbita que dura 3 a 7 días acompañada de dolor de cabeza, articulaciones y músculos; la cual, en su recurrencia con brotes epidémicos, cada año se torna en un problema de salud pública.

El presente estudio es de gran importancia ya que traerá beneficios tanto para el Ministerio de Salud como para la población nicaragüense, puesto que brinda una estrategia sobre el manejo y control de larvas a través de un abate natural, haciendo así, mejor uso de los recursos naturales y reducir el uso de los insecticidas órganosintéticos.



OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una formulación de abate natural a partir de la hoja de *Annona muricata* (guanábana).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Buscar la mejor relación droga- vegetal/ solvente que garantice la mayor cantidad de sólidos totales.
- Correlacionar la efectividad de mortalidad de extractos y triturados de hojas de *Annona muricata* sobre larvas de *Aedes aegyptis*.
- Elaborar tableta de a abate natural a partir del extracto de la hoja de *Annona muricata*.
- Determinar tiempo de actuación de la tableta de abate natural en larvas de *Aedes aegypti*.



MARCO TEÓRICO

Formulación de Abate Natural.



MARCO TEÓRICO

El Dengue es una enfermedad infecciosa aguda de etiología viral, transmitida por mosquitos del género *Aedes*. El agente etiológico es el Denguevirus con cuatro serotipos: DENV-1, 2, 3 y 4. La infección viral puede producir un cuadro asintomático, cuadros de fiebre indiferenciada, Fiebre Clásica de Dengue (DC), Dengue Hemorrágico (DH) o Síndrome de Choque por Dengue (SCHD). (7)

El dengue es conocido como «fiebre rompe-huesos», «fiebre quebrantahuesos» y «la quebradora» en países centroamericanos. Importantes brotes de dengue tienden a ocurrir cada cinco o seis años. La ciclicidad en el número de casos de dengue, se piensa que es el resultado de los ciclos estacionales que interactúan con una corta duración de la inmunidad cruzada para las cuatro cepas en las personas que han tenido el dengue. Cuando la inmunidad cruzada desaparece, entonces la población es más susceptible a la transmisión, sobre todo cuando la próxima temporada de transmisión se produce. Así, en el mayor plazo posible de tiempo, se tienden a mantener un gran número de personas susceptibles entre la misma población, a pesar de los anteriores brotes, puesto que hay cuatro diferentes cepas del virus del dengue y porque nuevos individuos son susceptibles de entrar en la población, ya sea a través de la inmigración o el parto.(8)

Epidemiología

El dengue es un problema creciente de salud pública en el mundo. Aproximadamente dos quintas partes de la población mundial están en riesgo y más de 100 países han sufrido brotes de dengue o de fiebre hemorrágica del dengue (dengue hemorrágico). La incidencia del dengue alcanza hasta 50 millones de casos por año, de los cuales 500,000 personas son hospitalizadas y 20,000 mueren. Un noventa y cinco por ciento de todos los casos de dengue hemorrágico ocurre en niños menores de 15 años de edad. (9)



Es probable que la magnitud del problema del dengue hemorrágico en las Américas siga aumentando, debido a un aumento alarmante de la población de *Aedes Aegypti*, así como a la proliferación de asentamientos en la mayoría de las ciudades de América Latina, sin garantía de los servicios básicos necesarios, favoreciendo así el incremento de desechos sólidos y materiales desechables en el medio ambiente, permitiendo criaderos potenciales del vector *Aedes aegypti*.

El deterioro de los programas de control, asociado con condiciones climáticas, prolongaron e intensificaron los efectos de la enfermedad. Los países con mayor número de casos de dengue hemorrágico registrados son: Honduras, Nicaragua, República Dominicana y El Salvador. La enfermedad posee una extensión geográfica similar a la de la malaria, pero a diferencia de ésta, el dengue se encuentra en zonas urbanas en la misma de los países tropicales. Cada serotipo es bastante diferente, por lo que no existe protección y las epidemias causadas por múltiples serotipos pueden ocurrir. (6)

El dengue se transmite a los humanos por el mosquito *Aedes aegypti*, el cual es el principal vector de la enfermedad en el hemisferio occidental, aunque también es transmitido por el *Aedes albopictus*. No es posible el contagio directo de una persona a otra.

Se cree que los casos notificados son una representación insuficiente de todos los casos de dengue que ya existen, puesto que se ignoran los casos subclínicos y los casos en que el paciente no se presenta para recibir tratamiento médico. Con un tratamiento médico adecuado, la tasa de mortalidad por dengue, por consiguiente, puede reducirse a menos de 1 en 1000.

En 1985 se produce la primera gran epidemia de dengue en Nicaragua, la que dio inicio en los meses de Agosto – Octubre, afectando un total de 17,483 personas, con un total de 7 personas muertas, con diagnóstico de dengue hemorrágico. Durante la misma se aislaron los serotipos DEN 1 y DEN 2. Posteriormente se notificaron casos esporádicos hasta 1990,



cuando se produjo un segundo brote de 4,137 casos en Puerto Cabezas, la RAAN. En 1992 el número de casos ascendió a 4.936, principalmente en la ciudad de León, donde se aislaron los serotipos DEN 2 y DEN 4; y en 1993 a 8,938 casos. En el año 1994 se notificaron 20,469 casos con predominio en la zona de occidente y Managua, obligando a que se declarara el estado de emergencia epidemiológica. (11)

Durante la etapa de 1985 a 1996 circularon los cuatro serotipos del virus, los cuales, al momento de su introducción al territorio nacional, fueron causantes de intensos brotes de la enfermedad; ya que la introducción de otro serotipo de dengue hace que la población sensibilizada esté más propensa a presentar la forma más grave de la enfermedad.

Desde Julio a Diciembre de 1998 en Nicaragua, fue establecido el sistema de vigilancia epidemiológica del dengue desde sitios seleccionados (hospitales y centros de salud), usando los criterios de la clasificación de la severidad de la enfermedad de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Según el boletín epidemiológico (en Nicaragua) de la semana 33 del año 2008 publicado por el MINSA, la tasa de mortalidad para dengue fue de 0.04 por cada 100,000 hab, mientras que el año anterior fue de 0.09 x 100,000 hab, ya que se reportaron 5 muertes en el 2007 y 2 muertes en el 2008 respectivamente. (12)

Para esta misma semana a nivel nacional se presentaron 480 casos de dengue clásico confirmado, con una tasa de 8.5 x 10,000 hab; y 24 casos confirmados de dengue hemorrágico, con una tasa de 0.04 x 10,000 hab.

Dengue clásico y hemorrágico confirmados, León 2004- 2011

El comportamiento epidemiológico del dengue clásico según los últimos 6 años, incluyendo el actual, ha variado; en el año 2004 se reportaron 64 casos, en el 2005 los casos incrementaron a 206, en el 2006 hubo una disminución considerable ya que se registraron



56 casos, en el 2007 incrementaron nuevamente reportándose 155, en el 2008 se reportaron únicamente 71, en el 2009 hubieron 177, el 2010 fue el año con más casos reportados siendo éstos 454 y en lo que va del 2011 únicamente se han registrado 13. (13)

Se han presentado menos casos de dengue hemorrágico en comparación con el dengue clásico; en el 2004 se reportaron 7 casos, en el 2005 ocurrieron 24, en el 2006 los casos disminuyeron a 5, en el 2007 incrementaron a 16, en el 2008 no se reportó caso alguno, en el 2009 hubieron 5 casos y el 2010 sufrió un incremento registrándose 30 casos.

Etiología

Tanto la fiebre del dengue como el dengue hemorrágico son causados por el virus del dengue, un virus ARN pequeño pertenecientes al grupo de los arbovirus—llamados así por ser virus transmitidos por artrópodos—, del cual se han descrito cuatro tipos en la actualidad, cada uno con propiedades antigénicas diferentes. Cualquiera de los cuatro tipos del virus es capaz de producir el dengue clásico. Se plantea que una infección inicial crea las condiciones inmunológicas para que una infección subsecuente produzca un dengue hemorrágico; sin embargo, otros plantean que una primera infección por dengue sea capaz de producir de una vez un dengue hemorrágico. (8)



Virus del dengue



Micrografía del virus del dengue

Clasificación de los virus

Grupo: IV (Virus ARN monocatenario positivo)

Familia: Flaviviridae

Género: *Flavivirus*

Especies

- *dengue* (DHF)

multiplicarse en varios sistemas celulares: riñón de mono Rhesus, mosquitos *Aedes Albopictus* y *Aedes Pseudoscutellaris*.

Los serotipos 1 y 2 fueron aislados en 1945, y en 1956 los tipos 3 y 4, siendo el virus tipo 2 el más inmunogénico de los cuatro.

La penetración a la célula del huésped se puede hacer por dos mecanismos: la envoltura viral se puede fusionar con la membrana celular, con la deposición inmediata de la

Los virus dengue pertenecen al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y son partículas esféricas de 40 a 50 nm de diámetro, con una envoltura lipídica que envuelve la nucleocápside isométrica de unos 30 nm de diámetro. El borde de la envoltura tiene finas proyecciones en su superficie constituidas por las proteínas estructurales de la membrana y las de la envoltura. La nucleocápside viral incluye la proteína de la cápside y el genoma ARN. El ARN genómico es infeccioso. No se ha encontrado ARN viral subgenómico en las células infectadas por el virus. Algunas cepas virales se multiplican bien en el ratón lactante inoculado intracerebralmente. El virus dengue es capaz de



nucleocápside dentro del citoplasma. El otro mecanismo consiste en que la membrana plasmática se invagina y forma endosomas alrededor del virus todavía envuelto.

La replicación del ARN se puede descubrir tan temprano como tres horas después de la infección y parece ser que tiene lugar en la región perinuclear de las células infectadas. La liberación de los virus de las células infectadas presumiblemente ocurre por vía de exocitosis secretoria, en forma de vesículas que contienen los virus fusionados con la membrana plasmática .

En las células donde crece el virus, se ha observado la aparición de numerosas vacuolas y vesículas citoplasmáticas, que aumentan en número y tamaño, observándose después agregados cristalinos que contienen numerosas partículas virales en su interior.

La célula diana afectada por el virus del Dengue es el monocito o fagocito mononuclear, en cuyo interior se produce la replicación viral. Pero a diferencia de la FD, en la FHD se produce un fenómeno inmunopatológico que consiste en un aumento de la infección mediado por anticuerpos. O sea, la persona que tiene anticuerpos no neutralizantes contra alguno de los virus del Dengue y resulta infectada por un nuevo virus con serotipo diferente al de la infección primaria va a desarrollar inmunocomplejos (virus Dengue inmunoglobulina G) que van a facilitar la penetración de aquél en el fagocito mononuclear a través del receptor Fc. Esto va a producir una alta replicación viral, elevada viremia y la agresión del virus a muchas células del organismo.

Esta inmunoamplificación del virus del Dengue durante una infección secundaria constituye el fundamento de la llamada teoría secuencial para explicar la FHD. Hay además factores relacionados con el virus como es la capacidad de la cepa viral de replicarse en los fagocitos mononucleares o de tener atributos antigénicos para optimizar la inmunoamplificación como antígenos de superficie o de sitios para su fijación y entrada al leucocito.



Otros vectores, con mayor o menor importancia epidémica son *Aedes Albopictus*, *Aedes Mediovittatus*, *Aedes Polinesiensis*, *Aedes Scutellaris* y *Aedes Niveus*. Tales vectores presentan una distribución variable en Las Américas.

El *Aedes mediovittatuses* muy sensible a la infección oral es capaz de transmitir los virus dengue en forma transovárica. Se le atribuye la responsabilidad de mantener de esta forma la infección durante períodos interepidémicos.

Se ha demostrado que el *Aedes albopictus* puede transmitir los cuatro serotipos del dengue, tanto horizontalmente como verticalmente. También se encontró que la especie es más susceptible a la infección oral con los cuatro serotipos del dengue. Han sido capturados mosquitos *Aedes Albopictus* infectados de forma natural.

Origen de *Aedes aegypti*

El nombre científico de estos mosquitos hace referencia a su origen. Son naturales de África, de la región de Egipto. Llegaron a América con el tráfico de esclavos (siglo XVI). (14)

Morfología de los adultos

Son de color oscuro (castaño oscuro o negro) con rayas blanco-plateadas. El tórax presenta un diseño en forma de lira y las patas son anilladas. El patrón de coloración es igual en machos y hembras. Miden aproximadamente 5 mm de largo. Los machos son de menor tamaño que las hembras. El pico es largo; en los machos es de tipo chupador y en las hembras es de tipo picador-chupador. A los lados del pico están los palpos maxilares, mucho más largos en los machos que los en las hembras (dimorfismo sexual). Las antenas, de función sensorial, son más pilosas en los machos que en las hembras (dimorfismo sexual). Como todos los mosquitos, son insectos dípteros, es decir, el primer par de alas es funcional y el segundo, los halterios, le sirven para el equilibrio durante el vuelo. (14)



Ciclo biológico

Como todos los mosquitos pasan por cuatro estados durante su ciclo biológico o ciclo de vida: huevo - larva - pupa - adulto. Los tres primeros son estados inmaduros. Las larvas y pupas son acuáticas, en tanto que los adultos son de vida terrestre. Se denomina criadero a todo ambiente acuático donde viven y se desarrollan las formas inmaduras. (14)

Los huevos son alargados, en general elípticos, de color claro al momento de ser colocados, pero se oscurecen después de algunas horas de puestos. En general no alcanzan el milímetro de longitud; en términos generales miden unos 0,6 a 0,8 mm. Son colocados individualmente en la pared de recipientes que contengan agua e inmediatamente por encima del nivel del agua. El desarrollo embrionario varía de acuerdo a factores externos como la temperatura; en épocas cálidas el período de incubación, o desarrollo del embrión, es corto, generalmente 2 ó 3 días. Los huevos embrionados pueden resistir la desecación y temperaturas extremas, manteniéndose viables de 7 meses a 1 año.

La larva es esencialmente acuática y dotada de gran movilidad. Presenta el cuerpo dividido en tres regiones: cabeza, tórax y abdomen. La cabeza es rectangular y de color uniforme, donde se distinguen las manchas oculares, antenas y piezas bucales. Entre estas últimas se destacan los cepillos bucales, importantes para la alimentación, la cual se basa en microorganismos presentes en el agua.

Las larvas se dirigen periódicamente a la superficie del agua para respirar, pero cuando están sumergidas el proceso continúa a través del tegumento. En el extremo posterior del abdomen poseen un par de espiráculos (orificios respiratorios), situados en el extremo del sifón dorsal; como el sifón se encuentra dorsalmente, queda perpendicular al eje del cuerpo de la larva.

En líneas generales, la duración del período larval varía alrededor de 8 a 10 días cuando las condiciones ambientales son favorables. Numerosos factores influyen sobre el crecimiento,



algunos inherentes a la propia especie y otros dependen del ambiente como la temperatura, disponibilidad de elementos nutritivos, densidad larval, presencia de predadores.

A medida que las larvas crecen y se desarrollan, deben mudar su exoesqueleto 3 veces, pasando en consecuencia por 4 estadios larvales, al cabo de los cuales alcanzan aproximadamente 0,8 cm. Cuando la larva de cuarto estadio muda, pasa al estado de pupa.

El estado de pupa es un período de transición en el que ocurren profundas transformaciones que llevan a la formación del adulto y al cambio del hábitat acuático por el terrestre. Durante este estado, el individuo no se alimenta y los cambios que ocurren son posibles gracias a la energía acumulada durante el estado larval. En general, la duración del estado de pupa es de alrededor de 2 días en condiciones favorables.

Luego de la emergencia, los mosquitos adultos generalmente procuran lugares húmedos y sin corrientes de aire donde puedan permanecer en reposo, principalmente dentro de las viviendas, dormitorios, baños, cocinas, etc., descansando sobre las paredes, detrás de roperos, cuadros, ropas colgadas, cortinas, etc.

Las hembras son más longevas que los machos; en general, el período de vida de las hembras es de aproximadamente 2 semanas a un mes en clima templado; en algunos casos, tanto en condiciones naturales como de laboratorio, la supervivencia puede ser de 2 ó 3 meses (climas cálidos). Las hembras son antropófilas, es decir, prefieren picar a las personas. Una hembra puede poner entre 80 a 100 huevos luego de ingerir sangre, pudiendo realizar varias ingestas antes de oviponer; realiza varias ingestas a lo largo de su vida y puede depositar en consecuencia una cantidad importante de huevos. Los machos se alimentan de jugos azucarados que obtienen de las plantas (néctar, exudado de frutos maduros); viven la mitad de tiempo que las hembras, o menos aún.

El ciclo completo de huevo a adulto, en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, ocurre en aproximadamente 10-15 días.



Comportamiento y hábitat

Son mosquitos esencialmente domiciliarios. Los sitios de cría consisten principalmente en recipientes artificiales, ubicados cerca de las viviendas o dentro de ellas. Prefieren recipientes con agua limpia, aunque pueden desarrollarse en criaderos con abundante materia orgánica. También pueden desarrollarse en criaderos naturales como huecos en árboles, axilas de hojas de plantas ornamentales y silvestres, etc.

Los huevos son colocados en criaderos ubicados preferentemente a la sombra. Larvas y pupas son fotofóbicas (se alejan de la luz). Las larvas presentan un típico movimiento serpentiforme; poseen un sifón corto por lo que cuando están en la superficie del agua quedan suspendidas casi verticalmente.






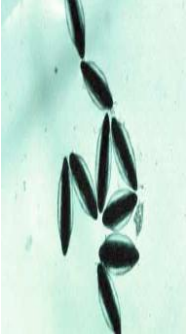
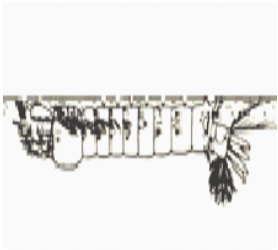

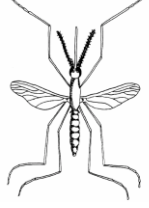
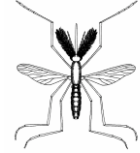
Las hembras son diurnas, silenciosas, prefieren picar en partes bajas del cuerpo como los tobillos. No se dispersan a grandes distancias (100 m), aunque pueden llegar a los 2000 m.

Las hembras intervienen en la transmisión de los virus Dengue y Fiebre Amarilla.




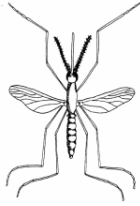
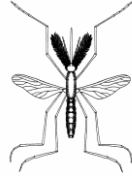
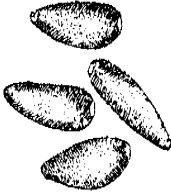
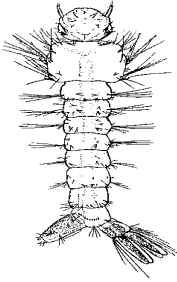


Al momento de recolectarlas larvas en la comarca Leche Cuagos se encontraron diferentes especies de éstas y por ello plasmamos este cuadro comparativo.



Cuadro comparativo entre distintas especies de mosquitos.

Especie	Huevecillos	Larvas	Pupa	adulto
<i>Aedes albopictus</i>				 Hembra  Macho
<i>Anopheles</i>				 Hembra  Macho



<p><i>Culex</i></p>				 <p>Hembra</p>  <p>Macho</p>
<p><i>Aedes aegypti</i></p>				



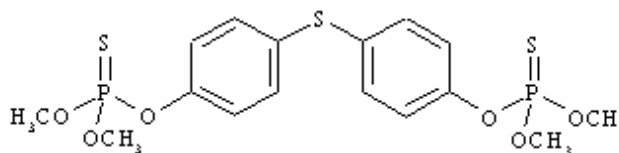
Plaguicida utilizado actualmente.

El temefos, comúnmente conocido por sus dos fórmulas comerciales de nombre Abate (grado técnico 98%), es el plaguicida que ha tenido mayor uso en las Américas, particularmente en programas de salud pública para el control de las larvas del mosquito *Aedes aegypti*, transmisor del dengue. (15)

El temefos es un plaguicida organofosforado no sistémico que actúa por contacto e ingestión. Interfiere la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de la colinesterasa. Se utiliza principalmente como larvicida e insecticida.

Su nombre químico es 0,0,0'-tetrametil-0,0'-tio-di-p-fenileno, N° CAS 3383-96-8, fórmula global C₁₆H₂₀O₆P₂S₃. Peso molecular: 466.48.

Estructura química:





Planta vegetal con actividad larvicida. (16, 17)

Nombre científico: *Annona muricata* L

Familia: *Annonaceae*

Sinónimos: *Annona benplandiona* H.B.K

Annona cearensis barb.

Annona macrocarpa Werckle.

Annona muricata L. var. *borinquensis* Morales

Guanabanus muricatus Gómez

Nombres comunes:

Panamá: guanábana, nejo, suiti.

Descripción botánica:

Árbol perenne pequeño y ramificado. Hojas gruesas y siempre verdes, brillantes en la parte inferior. Flores de 4cm o más, pétalos 6 en 2 series, los externos gruesos y valvados, y las internas imbricadas, sépalos 3. Frutas de 15 a 20 cm o más, de color verde, ovoide con algunas espinas suaves orientadas hacia el ápice, la pulpa posee un jugo blanco ligeramente ácido. (16, 17)

Annona muricata posee los siguientes compuestos: alcaloides isoquinolínicos-anomuricina, anomuricina, anonaína, anoniina, atherospermina, atherosperminin, (+)- coclaurina, (+)-coreximina, (+)-reticulina; alcaloides misceláneos-muricina, muricina; taninos; polifenoles: leucocianidina, ácidos caféicos, y ácido pumárico; compuestos cianogénicos; vitamina C; el aceite fijo en semillas (23.9%), compuesto principal de ácidos insaturados, sustancia insecticida no identificada y sacaroza. Además, se reportan las siguientes lactonas: annomontacina, annonacina, anonacinona, montanacina, solamina muricatacina y murisolina.



De las hojas de *Annona squamosa*, Wagner, et al. (1980) aislaron un alcaloide tetrahidroisoquinolínico, llamado higenamina (desmetilcoclorina) que demostró efecto inotrópico positivo. También contiene diterpenos-kauranos (C A 80: 68394).

Distribución geográfica: Comúnmente cultivadas en todos las zonas del país: 0 – 100 m; Miller 1246. Moreno 12491; desconocida como planta silvestre pero muy ampliamente cultivada. “ Guanábana”.

Usos etnomédicos

En Nicaragua las hojas en forma de infusión se emplean para curar enfermedades renales, enfermedades de la piel (paños) e intestinales (diarrea) y diabetes; los frutos licuados se utilizan para úlceras; y las semillas molidas son, ampliamente, utilizadas como insecticida.

En Costa Rica (Meléndez, 1975) las hojas en forma de infusión se han empleado como analgésico gastrointestinal. La decocción de la hojas y las semillas tostadas y molidas se han administrados como antihelmínticas y antidiarréicas.

En Panamá se usa para úlceras estomacales, indigestión, antihelmíntico y antidiarréico. El extracto de la pulpa se bebe diariamente para el tratamiento de úlceras estomacales. Las semillas son empleadas como insecticidas e ictiotóxicas. Una decocción de la hojas elimina los piojos de la cabeza y las hojas se emplean para exterminar los chinches de las camas.

En Colombia y Cuba (García-Barriga 1975; Roig y Mesa, 1974), la fruta es usada en forma de sorbete para curar afecciones renales. La decocción de las hojas se usan para curar las enfermedades renales, diarreas crónicas y disentería. Sirve para catarros de la vejiga e indigestiones. En Cuba se usa contra la tos y catarros e inflamaciones. El refresco de lafnetta corrige la anuria, facilita la secreción urinaria y alivia la uretritis. El fruto es antiescorbútico y es utilizado para la disentería. En República Dominicana el té se usa durante el parto.



En Guatemala las hojas se usan para la tiña y las afecciones dermatológicas. Las hojas en Guam y en las Islas Virgenes tienen efecto antiasmático y sedante.

Farmacología y actividad biológica

Annona muricata posee las siguientes actividades: depresora cardíaca, insecticida, hipotensiva, espasmogénica en cobayos, estimulación uterina, antimalárica contra *Plasmodium falciparum*, en *Artemia salina* ($LC_{50} = 0.8 \text{ ppm}$), antiparasitaria y contra *Trichomonas vaginalis*.

Toxicidad: pruebas en animales dieron indicaciones que la hoja puede estimular la formación de tumores.

Estudio Fitoquímico de la *Annona muricata*. (18)

NOMBRE DEL COMPUESTO	TIPO DE COMPUESTO	FUENTE	ACTIVIDAD BIOLÓGICA REPORTADA
Cis-annonacina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annomuricin E	Acetogenina	Hojas	Citotóxica
Cohibina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Acetogenina	Acetogenina	Semillas	-----
Ácido butanoico	Aceite	Semillas	-----
Javoricina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Motecristin	Precursor de Acetogenina	Raíz	-----
Cis-solamin	Acetogenina	Raíz	Citotóxica
Acetogenina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annopentocina	Acetogenina	Hojas	Citotóxica
Longicin	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annomutacin	Acetogenina	Hojas	Citotóxica



Acetogeninas

Los compuestos de interés, por su comprobada actividad biológica presentes en las *Annonaceae*, son un grupo de metabolitos secundarios bioactivos conocidos como acetogeninas. Estas acetogeninas poseen un grupo γ -lactónico α , β -insaturado o saturado y uno, dos, o tres anillos tetrahidrofuránicos sobre una larga cadena alquílica; las cuales presentan diferentes bioactividades como antitumoral, inmunosupresiva, pesticida, antiprotozoal y antimicrobiana; usualmente las posiciones α a los anillos son hidroxiladas. Son compuestos de 35 ó 37 carbonos de origen policétido, con una cadena alifática que se presenta, según el caso, hidroxilada, cetonzada y/o acetoxilada. (18)

De las *Annonaceae*, se han reportado numerosas acetogeninas aisladas e identificadas tales como la *Uvaracina*, la primera que fue aislada de la planta de *Uvaria acuminata* en 1982. Las acetogeninas de *Annonaceae* pueden inhibir selectivamente el crecimiento de las células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de células resistentes. Las acetogeninas son potentes inhibidores de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, que es una enzima esencial en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

Un estudio realizado en la Universidad de Purdue en Indiana USA, demostró que las acetogeninas pueden inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerígenas y también inhibir el crecimiento de las células de tumores, resistentes a la adriamicina (fármaco quimioterapéutico), respetando la integridad de las células de los tejidos sanos. En otro estudio realizado por científicos de la misma Universidad, se demostró que las acetogeninas de la guanábana son extremadamente potentes, teniendo una dosis letal 50 (ED50) hasta 10 microgramos por mililitro, con 10,000 veces la potencia de la adriamicina.

Mecanismo de acción de acetogeninas

La actividad larvicida de las acetogeninas podría explicarse por ingesta y por contacto. Por ingesta, porque al alimentarse las larvas mediante filtración y al no poseer una ingestión selectiva de partículas, los larvicidas pueden ingresar libremente produciendo toxicidad



digestiva; y por contacto, mediante tres mecanismos interdependientes: transporte desde la parte exterior de las larvas al sitio de acción, inhibición enzimática y efecto sobre el sistema respiratorio mitocondrial; éste último, por causa de acetogeninas que actúan mediante mecanismo de inhibición de la NADH ubiquinona oxidoreductasa, del complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria, presente en mamíferos e insectos, reduciendo los niveles de ATP y desacoplando ciertos mecanismos de resistencia. (19)

CLASIFICACIÓN DE LAS ACETOGENINAS DE ANNONACEAE

Clasificación según cantidad de anillos en su estructura.

Las acetogeninas de Annonaceae se clasifican según la cantidad de anillos que tengan en su estructura, como son: Mono-Tetrahydrofurano (THF), adyacentes bis-THF, no adyacentes bis-THF y sin anillos mono-THF; éstas estructuras también poseen hidroxilos laterales los cuales pueden estar a uno u otro lado de la estructura, seguida por su clasificación de las γ -lactonas o sustituidas por cetolactonas. Muchas acetogeninas de Annonaceae han sido encontradas y clasificadas por síntesis total o por el método de Ésteres de Mosher. (20)

Clasificación de las Acetogeninas según el tipo y ubicación de los sustituyentes y por su estereoquímica.

Se conocen 6 tipos de acetogeninas: lineales, epoxiacetogeninas, monotetrahydrofuránicas (Mono-THF), bis-tetrahydrofuránicas (Bis-THF), tritetrahydrofuránicas (Tri-THF) y tetrahydropiránicas (THP). En cada uno de los anteriores tipos hay diferenciación con base en el tipo y ubicación de los sustituyentes y en especial por su estereoquímica.

Acetogeninas Lineales:

Son precursores de las epoxiacetogeninas y acetogeninas THF. Se diferencian por el grado de insaturación e hidroxilación en la cadena alquílica. Su estructura general es:

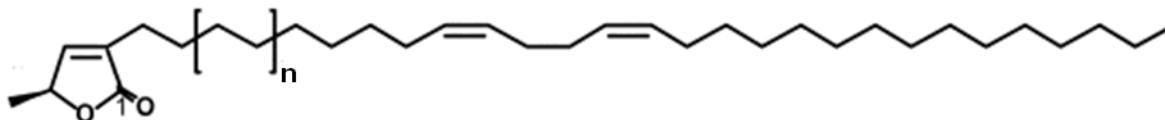


Figura 1. Estructura general de Acetogeninas Lineales

Epoxiacetogeninas:

Las acetogeninas, por lo general poseen uno o dos anillos THF. Cuando este anillo es reemplazado por un grupo epóxido se obtienen las epoxiacetogeninas. Este tipo estructural es considerado como el precursor de las acetogeninas.

Su estructura general es:

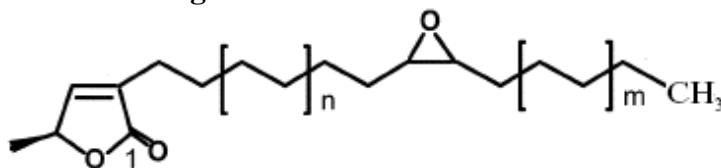


Figura 2. Estructura general de Epoxiacetogeninas

Acetogeninas mono-THF:

Se enmarcan en aquellas que poseen un solo anillo THF; usualmente son de 35 carbonos con diferentes grados de oxidación.

Su estructura general es:

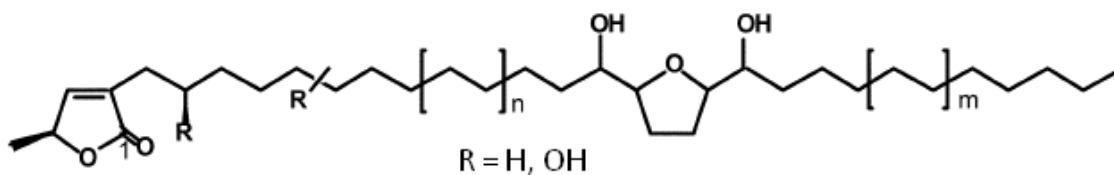


Figura 3. Estructura general de acetogeninas mono-THF



Acetogeninas bis-THF:

Son compuestos que poseen 2 anillos THF, adyacentes o no adyacentes; de 35-37 carbonos, diferenciados entre sí por el grado de oxidación, tipo, número y ubicación del sustituyente, así como de su estereoquímica.

Su estructura general es:

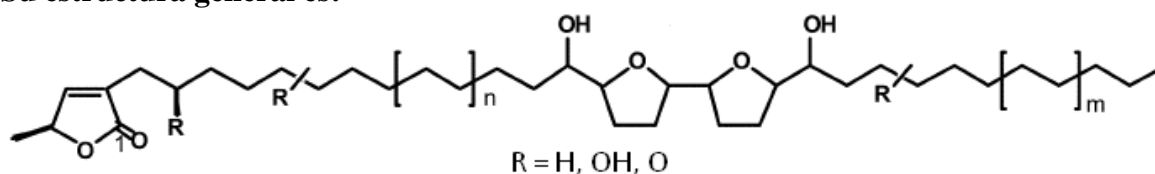


Figura 4. Estructura general de acetogeninas bis-THF

AcetogeninasTri-THF:

Son aquellas que poseen 3 anillos THF. Hasta el momento se conoce la Goniocina aislada de *Goniothalamus giganteus*.

Su estructura es:

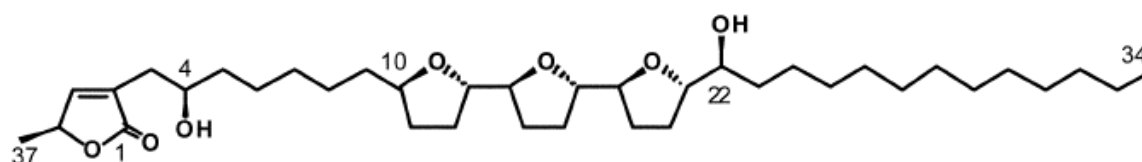


Figura 5. Estructura general de acetogeninasTri-THF

Acetogeninas Tetrahidropiránicas (THP):

Son aquellas que poseen un anillo tetrahidropirano como sustituyente en la cadena alquílica.



Su estructura general es:

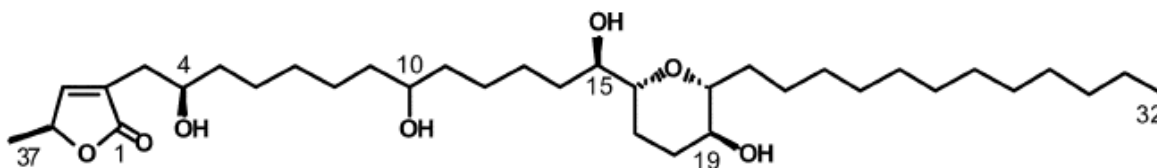


Figura 6. Estructura general de acetogeninas THP

Actividad biológica de las acetogeninas de Annonaceae

Las acetogeninas son sustancias que poseen dos importantes actividades biológicas, tales como: actividad citotóxica y actividad biopesticida. En la actividad citotóxica, una serie de experimentos han mostrado que las acetogeninas son inhibidores de la enzima NADH en el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, esta acción agota el ATP e induce en las células una muerte programada (apoptosis); se ha demostrado que las 20 acetogeninas buscan selectivamente las células cancerígenas para atacarlas y las células normales permanecen intactas. (19)

La toxicidad exhibida por la exposición de insectos a las acetogeninas, incluye una disminución lenta en la movilidad y crecimiento antes de la muerte. Tales síntomas son normalmente atribuidos a los bajos niveles de ATP causados por los inhibidores respiratorios, sin embargo se requiere de estudios futuros para conocer el tipo de organismo susceptible a estos componentes. (19)

Dentro de la actividad biopesticida de las acetogeninas, algunas han mostrado fuerte actividad ovicida y larvicida. Si el anillo γ -lactónico α , β -insaturado está presente, los resultados de actividad biopesticida son mejores que aquellos obtenidos con acetogeninas saturadas. Sin embargo, mezclas de estos compuestos encontrados en extractos crudos, dan



síntomas de efectos sinérgicos que potencian la cobertura de aplicaciones de las acetogeninas como biopesticidas biodegradables.


En general, las acetogeninas de mayor potencia son las bis-THF de anillos adyacentes, seguidas por las bis-THF no adyacentes y, en menor cuantía las mono-THF. (19)

Algunas especies de Annonaceae que presentan bioactividad. (21)

ACETOGENINAS	PLANTA	BIOACTIVIDAD
Uleicina.	<i>Rollinia ulei.</i>	Actividad Leishmanicidal.
Senegalena, Squamocina, Asimicina y Molvizarina.	<i>Annona senegalensis.</i>	Leishmaniasis.
Rolliniastatina.	<i>Rollinia emarginata.</i>	Actividad Leishmanicidal.
Annonacina y Goniotalamicina.	<i>Annona glauca.</i>	Actividad Leishmanicidal.
Argentilactona.	<i>Annona haementantha.</i>	Actividad Leishmanicidal, malaria.
Annonacin, Annonacin A y Anomuricin A.	<i>Annona muricata.</i>	Leishmaniasis, malaria.
Panatelina, Uvariamicina IV, Uvariamicina I, Reticulatacina solamina.	<i>Annona muricata.</i>	Antiparasitaria.



Acetogeninas de Annonaceae con actividad biopesticida. (5)

ANNONACEAS	ACETOGENINAS
<p data-bbox="423 338 667 369">Annona muricata</p> <p data-bbox="480 411 610 443">(semillas)</p>  <p data-bbox="472 726 618 758">Guanábana</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="906 306 1105 338">• Annonacina <li data-bbox="906 348 1105 380">• Corossolina <li data-bbox="906 390 1105 422">• Corossolona <li data-bbox="906 432 1170 464">• Diepomuricanina <li data-bbox="906 474 1138 506">• Gigantetrocina <li data-bbox="906 516 1170 548">• Gigantetrocina A <li data-bbox="906 558 1138 590">• Gigantetriocina <li data-bbox="906 600 1154 632">• Muricatetrocina <li data-bbox="906 642 1187 674">• Muricatetrocina A <li data-bbox="906 684 1089 716">• Murisolina <li data-bbox="906 726 1154 758">• Rolliniastatina 1 <li data-bbox="906 768 1154 800">• Rolliniastatina 2 <li data-bbox="906 810 1073 842">• Solamina

Ensayos de actividad biológica

Los bioensayos o pruebas de toxicidad, son experimentos que miden el efecto de compuestos, en una o más especies, para determinar la potencia de cualquier sustancia fisiológicamente activa cuya actividad se desconoce. (18)

La elección de un organismo de prueba adecuado para un bioensayo depende del efecto que se desea evaluar y de las características del organismo, para así asegurar que la respuesta de una población expuesta a cierto agente tóxico, se deba al efecto de éste y no a variaciones tanto de la sensibilidad de los organismos como de fallas operacionales en la aplicación del método.

Para la realización de los bioensayos es importante determinar la especie e indagar sobre algunos aspectos de la biología básica del organismo (nutrición, ciclo de vida, condiciones óptimas de cultivo y manejo), puesto que es esencial reunir información acerca de los



diferentes aspectos de la fisiología de las especies potencialmente aptas para tal fin. Los bioensayos deben ser simples, rápidos, reproducibles y económicos.

La estimación de la toxicidad de un ensayo de laboratorio está determinada por el diseño experimental y los parámetros a evaluar. A pesar de que no corresponden a efectos tomados directamente en el campo, las condiciones particulares bajo las cuales son llevados a cabo los ensayos, pueden utilizarse para predecir el efecto nocivo de un tóxico. En el laboratorio, la toxicidad se mide bajo condiciones cuidadosamente controladas que permiten obtener resultados precisos, bajo condiciones estandarizadas que aseguran la reproducibilidad en la estimación. (20)

Existen muchas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador comúnmente más utilizado es la mortalidad del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis (o concentración en el alimento, aire o agua) que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50%. Por ejemplo, la dosis letal media es la dosis o concentración que mata al 50% de la población (CL50).

Otro indicador que ha ganado gran popularidad es la dosis o concentración más alta a la cual no se observa ningún efecto (NOEC, No Observed Effect Concentration).

De acuerdo a investigaciones previas realizadas (12) se determinaron cuatro criterios basados en la CL50 para la clasificación de los extractos, otorgando los niveles de actividad consignados en la siguiente tabla:



Clasificación de la actividad biológica de acuerdo a la CL50

CL ₅₀ (ppm)	Actividad
$CL_{50} \geq 1000$	Inactivo
$500 \leq CL_{50} < 1000$	Madianamente activo
$100 \leq CL_{50} < 500$	Activo
$0 \leq CL_{50} < 100$	Muy activo

Actividad Biológica Biopesticida:

Los Biopesticidas o Agentes de Control Biológico (ACB) son productos que contienen un ingrediente activo que se extrae de un ser vivo mediante procedimientos que no alteran su composición química. Pueden ser constituidos por toda o una parte de la sustancia extraída, concentrada o no, adicionada o no, a sustancias coadyuvantes. (5)

Al mismo tiempo los biopesticidas son un grupo de pesticidas que pueden reducir el riesgo de uso de pesticidas.

En general los biopesticidas reúnen las siguientes características:

- Tienen un espectro de acción muy limitado y un modo de acción específico.
- Actúan lentamente.
- Tienen tiempos críticos de aplicación.
- Disminuye, no elimina la población de la plaga.
- Tienen una persistencia limitada en el campo y una vida de almacen limitada.
- Son más seguros a los humanos y al medio ambiente que los pesticidas convencionales.



- No presentan problemas residuales.

Recomendaciones para la recolección de plantas vegetales. (22)

- Las herramientas, como tijeras y cuchillas, que utilicen para cortar hojas, flores o raíces deben estar limpias y en buenas condiciones.
- El producto recolectado no debe tenderse o ponerse sobre el suelo o el piso.
- Las plantas deben recogerse en recipientes o trastes adecuados y secos, tales como sacos, baldes, panas, canastos y tinas.
- La recolección de frutos y semillas, se debe realizar antes que desgranen.
- Tener preparado el lugar de secado y posterior almacenaje.
- Una vez cosechado el producto debe ser llevado rápidamente a secar, en forma natural o artificial.

La preparación de la planta vegetal para el secado es la siguiente:

- Los tallos se atarán en ramilletes y se colgarán boca abajo, unos separados de otros, para permitir una correcta circulación del aire entre ellos.
- Las raíces se lavarán bien para quitarles toda la tierra, se les cortará los nudos y las pequeñas raíces y se cortarán en trozos de unos 2,5 cm, dejándolas secar sobre una rejilla, o bien engarzándolas en cordeles y toldándolas. Estarán secas cuando adquieran un aspecto leñoso. (22)

Secado de plantas

El secado de una planta no es más que el proceso de extraer la humedad que contiene, para evitar que se pudra, enferme o pierda las sustancias activas, además de permitir su almacenamiento por un tiempo determinado antes de su utilización.



Éste se puede realizar con calor natural o artificial; sea cual sea el sistema, el propósito es eliminar progresivamente la humedad contenida en las partes útiles, mediante técnicas adecuadas a cada especie de forma que no se pierdan o devalúen las sustancias que se pretenden retener. Se considera que lo óptimo es llevar el material fresco a un 10 % de humedad.

La rapidez del secado, las temperaturas, y la circulación de aire son factores que determinan un buen secado. El objetivo es proporcionar un producto con un porcentaje mínimo de humedad en sus tejidos, que conserve el color y aroma. Las temperaturas óptimas de secado varían en las diferentes especies, en general van desde los 21° a 27° C.

Tipos de secado

- **El proceso manual** requiere principalmente la utilización de alguna estructura que permita disponer las hierbas sobre la misma, de manera que éstas no estén en contacto con el suelo lo que determinaría la mala calidad y la posible podredumbre de las mismas. Este tipo de secado implica remover manual y frecuentemente el material y protegerlo adecuadamente respecto a las condiciones ambientales (lluvia, humedad, viento, etc). Es una forma barata de secar las hierbas pero con parámetros a veces difíciles de controlar, que determinan la mayor o menor calidad del producto final. (22)

- **El proceso manual realizado sobre una base elevada:** Consiste en colocar las hierbas sobre una base elevada sobre el suelo que permita la circulación del aire entre la materia cortada. Este tipo de secado se utiliza fundamentalmente para aquellas plantas que poseen tallos y hojas tiernas. Por ejemplo: el diente de león, la manzanilla, la ortiga, el perejil, la albahaca o la melisa.

- **Proceso de secado en casa:**



- Si se trata de plantas medicinales con hoja ancha, es conveniente separar las hojas de los tallos y desechar estos últimos.
 - Si se trata de plantas de hojas estrechas, se juntan las plantas formando pequeños ramilletes. Luego se atan sin apretar mucho para que exista una buena ventilación en el interior del ramillete.
 - Para favorecer la ventilación se busca un trozo de malla con agujeros grandes, que se coloca encima de un marco construido con unos listones de madera. Estos listones se asentarán sobre cuatro o seis patas de unos 10 cm de altura, de manera que eleven el conjunto del suelo. Si se dispone de una rejilla metálica, como las que se utilizan para la barbacoa o para la cocina, también puede aprovecharse.
 - Una vez se tenga la base de sustentación del secadero, se deberá colocar una tela fina, mejor si es algodón o lino, sobre la rejilla.
 - Sobre esta tela, se distribuyen las hojas. En el caso que éstas sean anchas se colocarán bien planas sobre la tela, separadas unas de otras para que dejen circular el aire. Los ramilletes se distribuirán también sobre la tela, dejando un espacio de separación entre ellas.
 - Una vez dispuestas sobre la base, se guardarán en un lugar seco y oscuro a una temperatura de unos 24°C.
 - Un buen secado implica que cada día, o cada dos días como mínimo, durante un tiempo de 7 a 20 días, que es lo que más o menos tardan en secarse, deberá darse la vuelta a las mismas.
 - Una vez secas deberán guardarse en el recipiente o en el lugar adecuado.
- **El secado manual realizado con la técnica del colgado:** Consiste en colgar las hierbas atadas con ramilletes. Para ello se puede realizar directamente desde el techo en el cual se ha instalado unas alcatayas que permitirán colocar el hilo. Otra manera de hacerlo es construir unos colgadores con listones o cañas suspendidos del techo, sobre los cuales se irán colgando los manojos. Se debe tener en cuenta que



hay que dejar una distancia mínima de unos 10 cm entre ramilletes y ramillete para favorecer la circulación del aire.

Las mejores plantas que admiten este secado son las plantas aromáticas, medicinales y arbustivas, todas ellas provistas de unos tallos consistentes que resisten el paso del tiempo, manteniéndose rígidas y aguantando bien las hojas. Entre dichas plantas podemos mencionar, por ejemplo, la salvia, el romero, el tomillo y el olivo, entre otras.

El proceso de secado de hierbas aromáticas requiere tener en cuenta una serie de consideraciones:

- El lugar debe estar lo suficientemente ventilado para favorecer el secado e impedir la aparición de hongos.
- El lugar no debe ser demasiado frío ni demasiado cálido. Una temperatura situada sobre los 24°C es la ideal.
- El lugar no debe estar iluminado. La luz altera los componentes.
- El lugar no debe ser ventoso. El viento seca demasiado las plantas y volatiliza los aromas de los aceites. Esto se tiene que tener en cuenta especialmente con las hierbas que van a ser destinadas a la cocina.
- Las hierbas deben secarse lo más rápidamente posible después de recogerse.
- No deben secarse las hierbas sobre hojas de libros o periódicos para evitar que absorban la tinta de los mismos.
- No deben secarse directamente sobre el suelo, sea del tipo que sea.

Dependiendo del tipo de hierba y del método utilizado, el secado puede durar entre unas horas y tres semanas. En general, se puede decir que las hojas ya están secas cuando, al doblarlas un poco, se rompen con facilidad, lo que suele darse en un período de 3 a 6 días en tiempo seco. En el caso de las flores, éstas ya están secas cuando adquieren una textura suave y elástica, como de papel de baño, lo que suele ocurrir en un período de unos 4 a 8 días si el tiempo es cálido.



Molienda de plantas vegetales

Es el proceso de trituración de cualquier parte de la planta para transformarla en partículas más pequeñas, el cual se puede realizar con la ayuda de molinos, mortero y pilón, licuadora, etc.

Tamizaje de las plantas

Los principios activos de las plantas medicinales se obtienen también por un tipo de extracción llamada “sólido-líquido”. Este proceso consta de tres etapas:

1. Penetración del disolvente en los tejidos de los vegetales e hinchazón;
2. Disolución de las sustancias extraíbles;
3. Difusión de las sustancias extraíbles disueltas fuera de la célula vegetal.

La forma de extracción más frecuente es por maceración, este proceso tiene algunas ventajas sobre la percolación y contracorriente. También se puede procesar la extracción mediante métodos que involucran el ultrasonido, el eléctrico, y el vórtice (turbo).

La extracción de los principios activos requiere un cierto equipamiento y conocimiento de procesos químicos.

En su presentación final pueden ser: tinturas (1:10); extractos fluidos (1:2), blandos, con una consistencia parecida a la miel, viscosos o firmes (masas plásticas, que licuan al calentarlas), secos (cuando se ha desecado la mezcla) y nebulizados (obtenidos por atomización del disolvente).

Métodos de extracción:

La extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica; dentro de ésta, los métodos de extracción por maceración y la percolación o lixiviación son los más utilizados.

(23)



Maceración (utilizado en el proceso):

El material crudo previamente triturado se pone en contacto duradero con cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente, durante 2-14 días hasta el agotamiento de la droga vegetal. Puede utilizarse agitación. Posterior a este tiempo la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto. (23)

Percolación o lixiviación:

El material crudo previamente triturado se pone en contacto con cantidad suficiente de solvente, de forma tal que el solvente cubra la capa de solido en el tanque percolador. El solvente se renueva de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La droga residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto.

Clasificación de los extractos vegetales:

Dependiendo del grado de concentración de los extractivos, los extractos pueden clasificarse en:

- Extractos fluidos o líquidos.
- Extractos semisólidos o blandos.
- Extractos secos.

Obtención de extractos:

Es importante establecer los parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto medicinal; por ejemplo parámetros sobre:



- Naturaleza química de la materia vegetal: conocer las características del metabolito o compuesto químico a extraer.
- Selección del solvente: definir la selectividad del solvente a emplear, el solvente óptimo será el que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto de interés.
- Relación sólido-líquido: la proporción más conveniente de trabajo será aquella con la que se alcancen los mayores rendimientos de extracción.
- Tamaño de partícula del sólido: de la forma y dimensión de los sólidos depende en gran medida el éxito de la lixiviación, a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto entre la droga y el disolvente, y por tanto, mayor acceso de los principios activos al medio líquido; no obstante, tamaños de partículas muy pequeños conducen a la formulación de polvos demasiado finos, que pueden causar problemas en el proceso de extracción.
- Temperatura: el aumento de la temperatura favorece la extracción, hay que prestar especial atención cuando la sustancia de interés es termolábil o el menstruo es volátil; además, temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar cantidades excesivas de solutos indeseables.
- Velocidad de agitación y tiempo de extracción: los óptimos valores de estos parámetros serán aquellos que logren extraer un mayor rendimiento del producto. A mayor tiempo de contacto, mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones.
- Viscosidad del medio: no deben seleccionarse solventes de viscosidad relativamente alta.

El extracto vegetal obtenido se debe caracterizar en cuanto a: sustancias activas y marcadores, densidad, solventes residuales, sólidos totales, Ph, control microbiológico y volumen total.

La separación sólido-líquido se realiza con el objetivo de retirar el residuo de la droga después de la extracción. En la actualidad prácticamente en todos los procesos tecnológicos



relacionados con la industria química y médico-farmacéutica, se incluyen etapas de separación sólido-líquido sobre los cuales recae una gran importancia técnico-económica.

La selección de un separador con este fin es una tarea mucho más compleja que la selección de otros equipamientos utilizados en los procesos tecnológicos. En la industria se emplean procedimientos de sedimentación, filtración (filtro nutche, prensa) o centrifugación.

Para la selección del equipo de separación adecuado hay que tener en cuenta el tipo de separación, tamaño de partículas de los sólidos suspendidos, contenido de sólidos en la alimentación, densidad relativa de los componentes, capacidad de procesamiento deseado y capacidad abrasiva, inflamable o explosiva.

Concentración de extractos: toda vez que se ha realizado la etapa de extracción y separación, se procede a eliminar parte del solvente de extracción para aumentar el contenido de sólidos en el extracto. Este proceso se realiza a presión reducida, con lo que se disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente, el retroevaporador es una buena alternativa para trabajos en el laboratorio y es ampliamente usado, mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores). (23)

También pueden utilizarse métodos de precipitación del principio activo, combinados con etapas de filtración, extracción líquido-líquido, entre otros.

Secado del extracto: para preservar los componentes naturales presentes en los extractos de plantas, se emplean métodos de secado para su obtención en forma de polvos. Éstos pueden ser secados por atomización y lecho fluidizado fundamentalmente. En estos procesos es muy importante evaluar las variables: concentración de sólidos, temperatura de secado, humedad, presión, flujo y velocidad de trabajo, así como la utilización de aditivos inertes como coadyuvantes del secado para favorecer el rendimiento.



FORMULACIÓN

Compresión:

La compresión tiene por objeto dar forma estable a sustancias polvorosas o previamente granuladas, y es un fenómeno de contacto que se consigue aproximando fuertemente las partículas para la fuerza de atracción molecular. (24)

Hay tres métodos:

1. Compresión directa.
2. Granulación seca.
3. Granulación húmeda.

Granulación húmeda (utilizada en el proceso):

Este método consiste en humedecer la mezcla por granular. Se efectúa con sustancias estables al calor y la humedad. Se puede utilizar agua o solvente no acuoso dependiendo de la sustancia.

Un granulado ideal debe ser homogéneo en el tamaño y contener de 10 – 15% de finos (polvo), que son necesarios para llenar los espacios entre los gránulos; mayor cantidad causa variación de peso y laminación de las tabletas.

Los lubricantes o excipientes de compresión, son así llamados por su acción lubricante, antiadherente y deslizante.

- a. Lubricantes: reducen la fricción entre las partículas durante la compresión y facilitan la salida de la tableta.



- b. Antiadhesivos: evitan la adhesión del material que se tabletea, a las paredes de la matriz y a los punzones.

- c. Deslizantes: mejoran la fluidez de los gránulos en la tolva.

Casi todos los lubricantes son sustancias hidrófobas; cuando va a fabricarse una tableta soluble en agua, hay que pensar en el lubricante soluble. La cantidad de lubricante varía según su calidad de 0.1 – 5 %.

Precauciones al usar la tableteadora:

1. Antes de conectar la máquina tableteadora, iniciar el proceso de tableteo manualmente, obteniendo unas 5 tabletas, para ver si no chocan los punzones.
2. Cuando la tableteadora esté trabajando, no poner las manos ni objetos extraños en la platina.
3. Observar que la tolva contenga suficiente granulado para no maltratar los punzones por contacto directo.
4. Al terminar, limpiar perfectamente la tolva, matrices y punzones.

Las sustancias que forman una tableta son:

- a. Principio activo.
- b. Aglutinantes.
- c. Desintegrantes.
- d. Lubricantes.
- e. Diluentes
- f. Colorantes.
- g. Saborizantes y aromatizantes.

El proceso de preparación de tabletas por vía húmeda comprende los siguientes pasos:

1. Pesado.



2. Tamizado.
3. Mezclado de polvos.
4. Humectación de los polvos con la solución granulante.
5. Granulación húmeda.
6. Secado del granulado.
7. Triturado del granulado seco.
8. Lubricante del granulado.
9. Comprimido.

Las soluciones granulantes que se puede utilizar son las siguientes:

- a. Alcohol 100 %.
- b. Alcohol – agua 1: 1.
- c. Acacia al 10 % p/v.
- d. Gelatina al 10 % p/v.
- e. Almidón al 10 % p/v.

Las determinaciones físicas de control que deben realizarse a una tableta son las siguientes:

1. Aspecto físico.
2. Color.
3. Forma.
4. Tamaño.
5. Variación de peso.
6. Tiempo de desintegración.
7. Friabilidad.



AGENTES BIOLÓGICOS.

(Este método es el que se realiza actualmente en el departamento de Entomología del MINSA) (25)

1) Microorganismos Entomopatógenos:

Bacterias esporógenas (usos de Aedes, Anopheles y Culex)-Bacillus sphaericus cepas 2362.

- Poseen esporas y cristales (toxinas), cadenas de bacilos cortos.
- Actúan por ingestión, provocando paralización de la pared intestinal de las larvas.
- Acción más lenta. Mueren en 24-72 horas.
- Reciclan.
- Permanecen en el medio 1-12 meses.
- Aplicar en criaderos permanentes.

2) Bacillus thuringiensis Var. Israeliensis. Serotipo H14.

- Poseen esporas y cristales. Cadenas de bacilos largos.
- No reciclan.
- Son de acción más rápida, mueren en 5-24 horas.
- Permanecen de 7-30 días.
- Aplicar en criaderos temporales.

Materiales

Beaker 100ml-----	100
Beaker 20 ml -----	100
Micropipeta microlitros -----	100
H ₂ O declorada o destilada -----	10 litros.



Papel aluminio ----- 2 cajas.

Micropipetas Eppendorf ----- 100 μ l

Procedimientos

Se preparan soluciones basales del biolarvicida, las cuales serán bien homogenizadas para su uso. Estas soluciones darán lugar a las concentraciones que se emplean en este ensayo 1000, 100, 10 y 5 ppm.

Soluciones basales

Soluciones basales N°.	Volumen del biolarvicida (mL).	Agua declorada (mL).	Concentración (Ppm)
1	0.1 ml puro	100	1000
2	1 ml	9	100
3	1 ml	100	10
4	1 ml	200	5

Preparación de las soluciones de trabajo

- ❖ Se preparan soluciones de trabajo del biolarvicida, las cuales serán bien homogenizadas para su uso. Estas soluciones darán lugar a las concentraciones que se emplean en este ensayo 1000, 100, 10 y 5 ppm.
- ❖ Se preparan 20 beakers de 100 ml de agua declorada los cuales serán divididos en 4 grupos. Cada uno representará una concentración diferente a ensayar.
- ❖ En este grupo de 5 beakers deben contener 25 larvas de *Aedes aegypti* con las características antes mencionadas, lo que equivale a un total de 100 larvas para cada concentración a ensayar y 25 larvas como control.
- ❖ En la preparación de las soluciones de trabajo se deben utilizar micropipetas de precisión Eppendorf (100 μ l) con las que se medirán 0.1 ml de las 3 últimas soluciones basales (2,3,4) y se adicionará este volumen a cada uno de los 4 beakers de cada grupo respectivamente.



- ❖ Una vez terminada la adición de las soluciones basales, los beakers deben colocarse a una temperatura de 28 a 30° C durante 72 horas.

Solución de trabajo

Grupo	Beakers usados	Biolarvicidas	Concentración
1	4 réplicas y 1 control	0.1 ml puro	1000 ppm
2	4 réplicas y 1 control	0.1 ml (2)	100 ppm
3	4 réplicas y 1 control	0.1 ml (3)	10 ppm
4	4 réplicas y 1 control	0.1 ml (4)	5 ppm

Se realizarán lecturas de mortalidades a las 24, 48 y 72 horas, así como se revisarán los controles.

Si en los controles se detecta mortalidad entre 5 y 2 % se corrige en la fórmula de Abbot.

Fórmula: $\frac{\% \text{ mortalidad prueba} - \% \text{ mortalidad en los testigos}}{100}$

100 - % mortalidad en los testigos

La prueba se considera satisfactoria si se obtiene hasta un 50 % de mortalidad como mínimo en la dilución a 5 ppm.

El cálculo de la mortalidad de las larvas expuestas se obtiene mediante la fórmula siguiente:

% de mortalidad de larvas: $\frac{\text{total de larvas muertas}}{\text{total de larvas expuestas}} \times 100$

total de larvas expuestas



DISEÑO METODOLÓGICO

Formulación de Abate Natural.



DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio: Experimental.

Área de estudio: El estudio se realizó en el laboratorio de Microbiología y el laboratorio de Química Orgánica de la carrera de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, UNAN-LEON y en las instalaciones del Departamento de Entomología ubicado en el Mántica Berio de la ciudad de León.

Universo: Especies de *Annona muricata* con actividad larvicida en Nicaragua.

Muestra: Hojas de *Annona muricata* procedentes de la Comarca El Platanal del municipio de León.

Unidad de análisis: Extracto de la hoja de *Annona muricata*.

Variables:

- Concentración efectiva de sólidos totales.
- Efectividad de mortalidad.
- Rendimiento.
- Fórmula activa.
- Tiempo de exposición.



Operacionalización de las variables.

Variable.	Definición Conceptual.	Sub-variable.	Indicadores.
Concentración efectiva de sólidos totales.	Concentración de una sustancia que causa una magnitud definida de respuesta en un sistema dado.	Residuo del extracto del material vegetal.	Peso en gr/mL
Efectividad de mortalidad.	Capacidad de obtener la muerte de las larvas.	Efectivo. No efectivo.	mg
Rendimiento	Producto resultante después de someter el extracto a la acción del rotavapor.	Volumen	mL
Fórmula activa.	Forma farmacéutica que presenta acción tóxica sobre la larva de <i>Aedes aegypti</i> .	Activa. Inactiva.	% de larvas muertas. % de larvas sobrevivientes.
Tiempo de exposición.	Tiempo que las larvas permanecen en contacto las tabletas.	5, 15 y 30 1 y 24	Minutos Horas



Procedimiento utilizado:

1. Revisión bibliográfica:

Se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva a través de la Biblioteca del Complejo Docente de la Salud (UNAN-LEÓN), Herbario de la Escuela de Biología (UNAN-LEÓN), instalaciones del MINSA- SILAIS/León y en las redes de INTERNET.

2. Obtención de huevecillos:

a) Recolección :

Las larvas se recolectaron por la mañana en depósitos de agua (pilas y barriles) de hogares pertenecientes a la Comarca Leche Cuagos, municipio de León el día 3 de marzo del 2011, luego se trasladaron al Departamento de Entomología ubicado en el Mántica Berio, ciudad de León.

b) Traslado de mosquitos a jaulas entomológicas y alimentación de los mismos

Se colocaron en baldes cubiertos con malla esperando se completase el ciclo de desarrollo, dos días después se trasladaron los mosquitos a una jaula para formar la colonia, fueron alimentados con sangre humana (mosquitos hembras) y miel (mosquitos machos) durante una semana (del 4 al 11 de marzo); el día 14 de marzo se obtuvieron los huevecillos de *Aedes aegypti*, los que se conservaron de forma segura en ausencia de humedad, hasta el momento de su utilización.

3. Preparación del material vegetal

a) Recolección

Las hojas fueron recolectadas por la mañana en la comunidad El Platanal ubicada al noroeste de la ciudad de León, considerando que la recolección de hojas y flores se debe hacer en la mañana en un día caluroso, después del rocío.



Las hojas se recolectaron jóvenes pero completamente desarrolladas, justo antes de que las flores estén completamente desarrolladas (al inicio de la floración) evitando la manipulación excesiva.

b) Selección

Luego se procedió a la selección del material sano (se evitó utilizar hojas negras, enmohecidas, rotas, dañadas, sucias, deformadas, parasitadas, etc).

c) Lavado

Se procedió a enjuagar con agua a la que se agregó solución hipoclorito, con el propósito de eliminar la tierra y materiales extraños.

Para realizar la labor del lavado debe utilizarse vestimenta adecuada; como gabacha, guantes, gorro y boquilla.

El agua utilizada para el lavado debe estar libre de contaminantes, tales como excrementos y sustancias tóxicas. Además se recomienda agregar por cada litro de agua dos gotas de cloro para desinfectarla.

El lugar donde se realiza el lavado debe estar limpio y no debe permitirse la entrada de animales.

d) Secado

Posteriormente se procedió al secado de las mismas con el objetivo de deshidratar por debajo del 10% y que no puedan actuar las enzimas, evitar el ataque de bacterias y hongos, que provoquen moho y por tanto se pierda la calidad; este proceso se realizó en el Herbario de la escuela de Biología (UNAN-LEÓN) donde se procedió al secado artificial en un horno artesanal.



El secado al horno: otra manera muy rápida de secar las plantas es utilizar el horno de casa. Para ello se puede optar en aprovechar el horno cuando está un poco caliente. La temperatura no debería superar los 33° C. Para ello, hay que esperar que el horno se enfríe hasta conseguir esta temperatura. Luego colocan las hojas grandes sobre la rejilla de cocción, o los ramilletes sobre la misma. La puerta del horno debe mantenerse entre abierta dejando unos 5 centímetros más o menos de abertura. Algunas plantas se secan muy rápido de esta manera, y pueden estar secas a la mañana siguiente o en unas pocas horas.

e) Triturado

La molienda se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Orgánica del Departamento de Farmacia Industrial de la Facultad de Ciencias Químicas (UNAN-LEÓN), utilizando un molino Thomas-Wiley, model 4 (Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, USA).

f) Extracción

Se someten las hojas secas a la acción de una solución hidroalcohólica para obtener un líquido o sólido que contenga los principios activos.

- **Preparación de los extractos**

Se elaboraron extractos en relación 1:5, al 35%, 50%, 70%, y en relación 1:10, al 35%, 50%, 70% respectivamente, con el fin de elegir la que contenga mayor cantidad de sólidos totales, los cuales se calcularon adicionando 5 ml del extracto en prensas filtros y posterior a ello se colocaron en un horno J.P SELECTA (fuse (A):20/2, A: 12.2, W:4600, Hz: 60) a 60-100 °C durante 1 hora y media; finalmente pesamos la prensa filtro con el extracto seco.

La extracción se realizó mediante maceración a una temperatura de 45- 60 °C durante dos horas, posteriormente se prensó el resultante de la maceración con la consiguiente filtración utilizando bomba al vacío WELCH (model N° 25618-50, 115 V, 60 Hz), después el filtrado se concentró en el rotavapor marca Heidolph (tipo: Heizbad, 115 V, 50/60 Hz, 1300 W)



con el objeto de eliminar el alcohol y para finalizar se colocó el extracto en frascos color ámbar.

g) Preformulación.

Procedimiento:

1. Pesar lactosa, almidón y polivinilpirrolidona (P.V.P) por malla # 20 y mezclar.
2. Humedecer la mezcla de polvos del paso anterior con el extracto, y granular por malla # 10.
3. Secar el granulado en el horno a 75 – 89 ° C durante una hora.
4. Una vez seco triturar el granulado pasándolo por una malla # 20.
5. Tamizar el talco por una malla # 40, agregarlo al granulado y mezclar.
6. Comprimir, en una máquina tableteadora (marca Telax A3, 16 A, 500 V) con 3 – 5 Kg / cm² de dureza y con un peso de 300 mg.

Se realizaron tres formulaciones a diferentes concentraciones (tomando como base la concentración efectiva del extracto).

Tipo de formulaciones a diferentes concentraciones.

Fórmula	Piloto A	B	C
Extracto	5 mg	100 mg	250 mg
Almidón	45 mg	45 mg	45 mg
Lactosa	165 mg	165 mg	165 mg
PVP	60 mg	60 mg	60 mg
Talco	30 mg	30 mg	30 mg

Prueba con abate

Para iniciar esta prueba se lavan los beakers y todos los materiales a utilizar.

- 1- Preparar los beakers.
- 2- Recolecta de larvas.



- 3- Colocar los 4 beakers más 1 de control.
- 4- Conteo de larvas por beaker.
- 5- Introducir larvas y tomar datos.
- 6- Lectura a las 24, 48,72 horas hasta completar el tiempo.

MATERIALES:

Cristalería:

Descripción:	Capacidad
• Beaker.....	1000 ml.
• Beaker.....	500 ml.
• Beaker.....	100 ml.
• Pipetas.....	5 ml.
• probetas.....	50 ml.
• Kitasatos.	
• Prensa filtro.	
• Embudos de espiga.	
• Termómetros.	
• Agitadores	

Material de Apoyo:

- Molino.
- Horno.
- Desecador.
- PHmetro.
- Alcoholímetro.
- Soporte para embudos.
- Tamiz.
- Balanza analítica.



- Microscopio binocular.
- Frasco color ámbar.
- Espátula.
- Tableteadora.
- Bomba al vacío.
- Rotavapor.

Material de laboratorio descartable:

- Papel filtro.
- Papel de aluminio.
- Manta.
- Algodón.

Reactivos:

- Agua.
- Alcohol etílico.



RESULTADOS

Formulación de Abate Natural.



RESULTADOS

Criterios de calidad de tabletas

Índice	Resultado	Límite
Friabilidad (%)	< 1	≤ 1
Tiempo de desintegración (min)	2 min	≤ 30
Dureza (kgf)	3.5 kgf	3-5
Uniformidad de peso	304.61 mg	300 ± 5%

Características de las tabletas de *Annona muricata*

Descripción	Resultados
Color	crema
Olor	Característico
Forma	redondas
Peso	300 mg



Tipos de ensayos según relación de extractos

Ensayos	Relación 1:5			Relación 1:10		
	35 %	50%	70%	35 %	50 %	70 %
Rendimiento	16 %	25 %	24 %	55 %	50.5 %	50 %
Características Organoléptica	Color marrón, aspecto límpido, olor característico	Color marrón, aspecto límpido, olor característico	Color Verde musgo, aspecto límpido, olor característico	Color café, aspecto límpido, olor característico	Color café oscuro, aspecto límpido, olor característico.	Color verde musgo, aspecto límpido, olor carácterístico.
Ph	6.27	6.40	6.44	6.39	6.47	6.54
Sólidos totales	4.8001g	4.5309g	4.3974g	4.7605g	4.7294g	4.2222g

Tabletas de *Annona muricata* vs temefos (patrón)

Muestra	Tiempo (introducción de larvas)	24 horas	48 horas	72 horas
Temefos	30 larvas	0 larvas	0 larvas	0 larvas
Muestra conc 1	30 larvas	28 larvas	28 larvas	28 larvas
Muestra conc 2	30 larvas	29 larvas	29 larvas	29 larvas
Muestra conc 3	30 larvas	28 larvas	28 larvas	28 larvas



FORMATO DE PRUEBA CON POLVO DE HOJAS *DE Annona muricata* PARA LA LARVA: *Aedes aegypti* PROCEDENTES DE LA COMARCA LECHE CUAGOS. 2011

Beaker	Cantidad en gramos	Hora de introducción de larvas	Mortalidad						TOTAL de larvas muertas	%	OBSERVACIONES
			15 min	30 min	1 h	24 h	48 h	72 h			
Beaker 1	0.3118	9:17 am	0	0	0	10	10		10	100	
Beaker 2	0.3066	9:17 am	0	0	0	9	10		10	100	
Beaker 3	0.3017	9:17 am	0	0	0	10	10		10	100	
Beaker 1	0.508	9:17 am	0	0	0	10	10		10	100	Todas las Larvas muertas
Beaker 2	0.5028	9:17 am	0	0	0	10	10		10	100	
Beaker 3	0.5122	9:17 am	0	0	0	10	10		10	100	
Beaker 1	1.0079	9:17 am	0	0	0	10	10		10	100	
Beaker 2	1.0011	9:17 am	0	0	0	10	10		10	100	
Beaker 3	1.0032	9:17 am	0	0	0	10	10		10	100	
Beaker 1	1.5051	9:28 am	0	0	0	10	10		10	100	
Beaker 2	1.5001	9:28 am	0	0	0	9	10		10	100	
Beaker 3	1.5124	9:28 am	0	0	0	10	10		10	100	
Total	120 Larvas (10 larvas por Beaker)										
Control 1		9:28 am	0	0	0	0	0		0	0	
Control 2		9:28 am	0	0	0	0	0		0	0	



FORMATO DE PRUEBA CON EXTRACTO DE LA HOJA DE *Annona muricata* PARA LA LARVA: *Aedes aegypti*.

Procedentes de la Comarca Leche Cuago. 06/07/2011

Beaker	Cantidad en ml	Hora de introducción de larvas	MORTALIDAD						Total de larvas muertas	%	OBSERVACIONES	
			15 min	30 min	1 h	24 h	48 h	72 h				
Beaker 1	5	11:30 am	0	0	0	9	10		10	100	Todas las larvas muertas	
Beaker 2	5	11:30 am	0	0	0	8	10		10	100		
Beaker 3	5	11:30 am	0	0	0	10	10		10	100		
Total	30 larvas (10 por beaker)											
Control 1		11:30 am	0	0	0	0	0		0	0		
Control 2		11:30 am	0	0	0	0	0		0	0		



FORMATO DE PRUEBA CON TABLETAS DE HOJA DE *Annona muricata* PARA LA LARVA: *Aedes aegypti* PROCEDENTES DE LA COMARCA LECHE CUAGOS. 30/06/ 2011

Beaker	Lote	Hora de introducción de larvas	MORTALIDAD						TOTAL de larvas muertas	%	OBSERVACIONES
			15 min	30 min	1 h	24 h	48 h	72 h			
Beaker 1	A	9:06 am	0	2	0	0	0	0	2	20	
Beaker 2	A	9:06 am	0	2	0	0	0	0	2	20	
Beaker 3	A	9:06 am	0	1	0	0	0	0	1	10	Quedaron 78 Larvas vivas
Beaker 1	B	9:06 am	0	4	0	0	0	0	4	40	
Beaker 2	B	9:06 am	0	1	0	0	0	0	1	10	
Beaker 3	B	9:06 am	0	1	0	0	0	0	1	10	
Beaker 1	C	9:06 am	0	0	0	0	0	0	0	0	
Beaker 2	C	9:06 am	0	1	0	0	0	0	1	10	
Beaker 3	C	9:06 am	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total	90 Larvas (10 larvas por Beaker)										
Control 1		9:06 am	0	0	0	0	0	0			
Control 2		9:06 am	0	0	0	0	0	0			



ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

La relación empleada fue de 1:5 a una concentración del 35%, presentando mayor cantidad de sólidos totales lo que indica que con ésta se puede extraer una mayor cantidad de principio activo.

Al realizar la comparación de efectividad entre temefos y las tabletas de *Annona muricata*, el temefos presentó una mortalidad larval del 100% a las 24 horas, mientras que las tabletas mostraron resultados no promisorios ya que no se alcanzó ni el 50% de mortalidad.

De las tres pruebas ensayadas (tabletas, extracto y polvo) el triturado resultante de la molienda fue el que mostró mayor actividad larvicida, siendo efectivo en un 100% provocando la muerte total de las larvas, a una concentración de 0.5 g/250 mL en un intervalo de tiempo de 24 horas, este resultado es satisfactorio para el control biológico de la larva de *Aedes aegypti*.

Las tabletas elaboradas con 15% de almidón, 55% de lactosa, 20% de polivinilpirrolidona (PVP) y 10% de talco para cada lote de los elaborados, no presentaron el resultado esperado; las larvas pueden morir tanto por contacto como por ingesta y en esta formulación el extracto se incorporó en forma líquida por lo que la cantidad de principio activo puesto en contacto con las larvas, probablemente, no fue suficiente, o quedó atrapado entre las partículas del polvo, ante ello las larvas se alimentaron mas de excipientes que de principio activo, por lo cual la efectividad de las tabletas no fue satisfactoria.

La diferencia notable de porcentaje de mortalidad de larvas para el lote B, posiblemente, se debió a que este bioanálisis fue realizado en seres vivos (larvas), por tanto al momento de realizar el traslado de las mismas pueden ser maltratadas ya que son muy frágiles.



CONCLUSIÓN

Se elaboraron tabletas de *Annona muricata* (Guanábana), empleando la mejor relación droga vegetal encontrada (1:5 al 35%), las cuales mostraron actividad larvicida en un 15.6%, siendo inferior a la actividad mostrada por el triturado resultante de la molienda de las hojas de *Annona muricata* y del extracto, con los cuales se obtuvo una tasa de mortalidad del 100% a las 48 horas; por ende las tabletas presentaron actividad larvicida, sin embargo dicho resultado no fue satisfactorio.

Los resultados del bioensayo realizado con el triturado y el extracto son muy prometedores, sin embargo presenta mejores características organolépticas (en agua) el triturado.

La hoja de *Annona muricata* puede ser utilizada como abate natural por poseer actividad larvicida, principalmente efectiva en larvas que se encuentran entre los estadíos dos y tres, sin embargo se deben ensayar otras concentraciones de principio activo si el objetivo es llevarla a una formulación.

Las tabletas actuaron a los 30 minutos después de su introducción pero con un porcentaje inferior al 25% , sin embargo no siguieron ejerciendo su actividad larvicida puesto que no se presentó mayor mortalidad larval en las siguientes lecturas realizadas.



RECOMENDACIONES

Que se utilice directamente el polvo resultante de la molienda de hojas de *Annona muricata* lo cual sería fácilmente empleado a nivel domiciliario y además sería una nueva alternativa para el Ministerio de Salud (MINSA).

Practicar nuevas formulaciones en forma de granulados y que la concentración de principio activo empleado sea mayor que la utilizada en las tabletas.

Desarrollar una nueva formulación por compresión directa utilizando el polvo de la molienda de la hoja de *Annona muricata* como principio activo.



BIBLIOGRAFÍA

1. Dengue y Dengue Hemorrágico. Recuperado el 12 de noviembre del 2010. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>.
2. Sanabria, Luis y col (2009). Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). Mem. Inst. investig. Cienc. Salud, vol 7. Universidad Nacional de Asunción (UNA) Paraguay. <http://www.iics.una.py/n/pdf/revista/96.pdf>. 26-31
3. Parra GI., García CM., Cotes JM. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti*, vector del dengue en Colombia. Rev CES Med (2007). <http://www.ces.edu.co/Descargas/Aedes%20aegypti.pdf>. 47-54.
4. Miguel, Bobadilla y col. Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus “Guanábana” sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Dipteria, Culicidae). Rev. Perú. Biol (2005). <http://www.scielo.org.p/pdf/rpb/v12n1/v12n1a14.pdf>. 145-152.
5. Flórez, Lina., Mesa Viviana. Monografía sobre pruebas de actividad biológica con dos organismos modelos en acetogeninas de Annonaceae con Actividad biopesticida. Recuperado el 25 de noviembre del 2010. <http://repositorio.utp.edu.co/xmlhandle/1223456789/351>.



6. Medrano R María., Miranda S Heidi., Sirias S Carolina. Escuela de Farmacia. Bioensayo larvicida en *Aedes aegypti* de 18 extractos de hojas de plantas procedentes de la reserva biológica Indio- Maíz. Bartola, Río San Juan. Enero-marzo 2003. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN- León), Nicaragua.
7. Dengue, enfermedad infecciosa aguda. Recuperado 22 de noviembre del 2010. salud.tamaulipas.gob.mx/epidemiologia/pdfs/introduccion.pdf.
8. Dengue. Recuperado 22 de noviembre del 2010. <http://es.wikipedia.org/wiki/Dengue>.
9. Hoyos R Antulio., Pérez R Antonio: Actualización en aspectos epidemiológicos y clínicos del dengue. Recuperado 24 noviembre. http://bvs.sld.cu/revistas/spu/vol_36_01_10/spu15110.htm.
10. Magnussen S Mariano. El Mosquito *Aedes aegypti*, Principal transmisor del Dengue. Recuperado 24 noviembre 2010. <http://www.grupopaleo.com.ar/naturalezadeargentina/enfermedades.htm>.
11. G Kouri y col: Epidemia de dengue en Nicaragua, 1985. Rev. Inst. med. Trop. Sao Paulo, septiembre- octubre, 1991. <http://.scielo.br/pdf/rimtsp/v33n5/a05v33n5.pdf>
12. Ministerio de Salud. Enfermedades sujetas a Vigilancia Epidemiológica, semana 33 del 2008. Recuperado el 26 de noviembre 2010. http://www.sica.int/busqueda/busqueda_archivo.aspx?Archivo=info_52414_1_08092010.pdf



13. Comportamiento del dengue en León, facilitado por Dr Moreno (Jefe del departamento de Epidemiología de León), Nicaragua.

14. Almirón Walter: ficha técnica de *Aedes aegypti*. Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba, 2009.<http://www.slideshare.net/guest375d93/ficha-tnica-de-aedes-aegypti-2009>.

15. Ficha técnica de temefos. Red de acción en plaguicidas y sus alternativas de América Latina (RAP-AL). Recuperado 1 de febrero 2011. http://www.rap-al.org/articulos_files/Temefos_Enlace_84.pdf.

16. W.D. Stevens, Carmen Ulloa Ulloa, Amy Pool y Olga, Martha Montiel. Flora de Nicaragua. Vol. 85. Tomo 1. Pág 97.

17. 270 plantas medicinales iberoamericanas. Mahabir P. Gupta 1995. 1ra ed. Agosto de 1995. Autores: Jorge Daniel Coussio et al. Pag 26-27.

18. Flórez, Yesid., Martínez, Elizabeth. Obtención y Evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. <http://repositorio.utp.edu.co/tesisdigitales/texto/63441F634.pdf>.

19. García A, Karol. Aislamiento y caracterización de Acetogeninas obtenidas de las semillas de *Annona cherimolia* y *Annona muricata*. Evaluación genotóxica y potencial quimioterapéutico. Instituto Politécnico Nacional, enero 2009. México, D. F.



20. Castro, Lina., Alzate Mónica. Escuela de Química. Estudio preliminar de la Actividad Biológica de Extractos de *Annona Cherimolia* Mill. 2008. Universidad Tecnológica de Pereira.
<http://repositorio.utp.edu.co/tesisdigitales/texto/58322C355.pdf>.
21. Ocampo, Diana y Ocampo, Rogelio (2006). Bioactividad de la familia Annonaceae. Revista Universidad de Caldas. 135-155.
[http://200.21.104.25/udecaldas/downloads/RevistaUC26\(1_2\)_9.pdf](http://200.21.104.25/udecaldas/downloads/RevistaUC26(1_2)_9.pdf).
22. Uso Industrial de Plantas Medicinales. Recuperado el 17 de febrero del 2011.
<http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema5.pdf>
23. Recolección, secado y extracción de plantas Medicinales. Recuperado el 1 de marzo del 2011. <http://www.members.tripod.com/aromaticas/Plantas.html>.
24. Vila Jato, JL. Tecnología Farmacéutica. Vol II. Formas Farmacéuticas. Madrid: Síntesis. 1994.
25. Curso de Vigilancia Entomológica de Vectores. Dirección de Entomología Médica (CNDR). Septiembre 2009. Managua, Nicaragua.
26. Piura Julio: Metodología de la Investigación Científica. Pág. 53-61



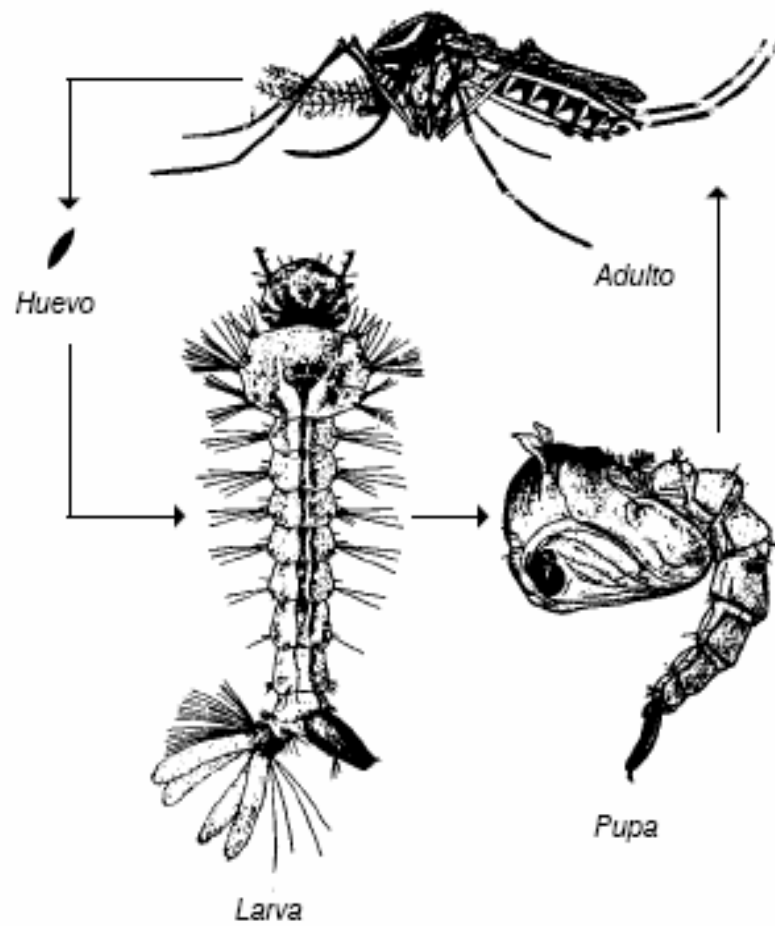
ANEXOS

ANEXOS

Formulación de Abate Natural.

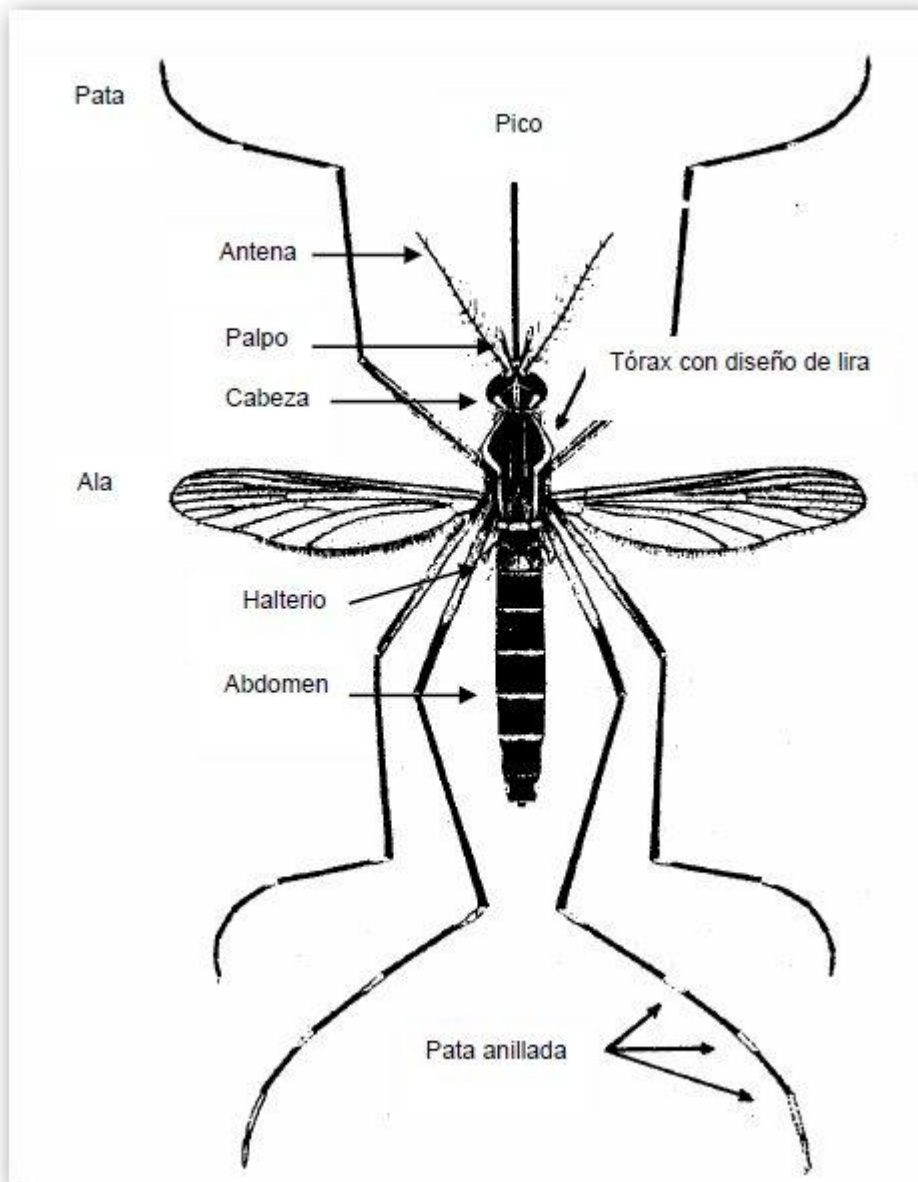


Ciclo de vida de *Aedes aegypti*





Morfología de *Aedes aegypti*





Recolección de hojas



Lavado y secado de hojas



Secado al horno



Hojas deterioradas



Filtrado de extractos



Extractos en relación 1:10



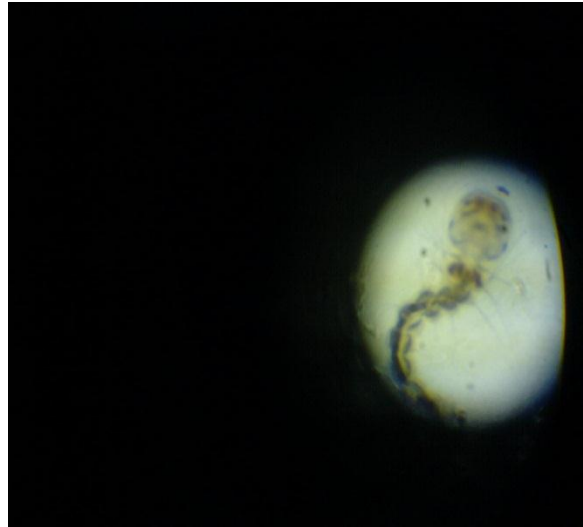
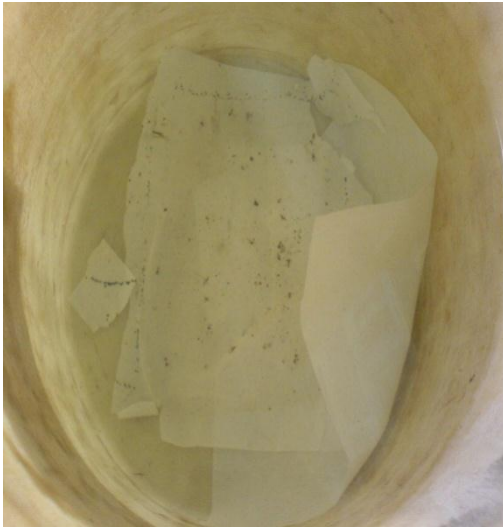
Traslado de mosquitos a jaulas entomológicas



Alimentación de mosquitos



Huevos de Aedes aegypti Larva de Aedes aegypti



Traslado de larvas a beakers Ensayo con tabletas, extracto y polvo

