



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

Recinto Universitario "Rubén Darío"
Facultad de Ciencias e Ingenierías
Departamento de Biología

Monografía para optar al título de Licenciadas en Biología con mención en Educación Ambiental y Administración de Recursos Naturales.

Evaluación de la actividad biocida de extractos de hojas y semillas de guanábana (*Annona muricata* L.) en el tercer estadio larval del mosquito *Aedes aegypti* L. Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. Diciembre 2017 – noviembre 2019.

Autores: Br. Diana Estefanía Bermúdez Hernández
Br. Esther Nohemí Carballo Castillo

Tutora: Ing. Ena Rivers Carcache

Asesores: Lic. Samantha Miranda Calero
MSc. Josué Pérez Soto
PhD. Lester Rocha

Managua, Nicaragua
Diciembre de 2019

Dedicatoria

Dedico a Dios este logro tan importante en mi vida profesional, por mostrar en mi vida, su gracia y su amor.

A la memoria de mi abuela, Lidia Estabana Calero, quien fue mi principal motor en esta vida, por enseñarme e instruirme en el camino de Dios.

A mi abuelo, Miguel Hernández por ser el pilar fundamental de nuestra familia.

A mi madre, María Hernández Calero, por ser mi modelo a seguir, por la oportunidad de ser su hija y sobre todo darme el regalo más grande que es su amor.

A mi padre, Rolando Bermúdez M, por su presencia, constancia y su cariño.

A mi padre, Ignacio Moreira Meléndez, gracias por verme como su hija, y aconsejarme para que sea una buena persona.

Al núcleo familiar de mis hermanas: Lidia Bermúdez y a su esposo Marvin Lara. Elieth Bermúdez y a su esposo Yalí Ezequiel, gracias por su apoyo incondicional, por compartir momentos de calidad.

A mi esposo Aarón Flores, por todo su amor y comprensión, gracias por estar presente en mi vida.

A mis sobrinos Israel Lara, Nicol Lara, a mis gemelitos: Isaac B. y Rubén B., Sofía Chow, Mike Rosales, Isabelita Rosales, Fernandito Rosales, por ser motivo de nuestra alegría familiar. A aquellos que están en desarrollo, esperamos pronto su venida.

A mis tías: Fidel H., Silvia H., Nemesia H., por brindarme su apoyo y sus consejos.

A mis primas y primos: Jacqueline, Eymi, Gris, Claudia, Wendy, Karen, Miguel y Germán, por permanecer siempre unidos ante las pruebas que se nos presentan.

A Damaris, Froylan y Josué, por su cariño, comprensión y apoyo a nuestra familia.

A Doña Adela Vásquez, don Aarón Flores Monge, Elsa Flores y Marcel Chow, por ser mi nueva familia.

Diana Bermúdez Hernández

Dedicatoria

La presente investigación se la dedico con mucho amor a todas las personas que directa o indirectamente han influido en mi vida y en este logro.

Esther Nohemí Carballo Castillo

Agradecimientos

Agradezco a Dios por estar en cada proceso de mi vida guiando mi camino.

Al Laboratorio de Entomología del Complejo de Salud Concepción Palacios por su donación de ejemplares, capacitación en identificación y manejo del ciclo reproductivo del mosquito. A la UNAN-Managua por contribuir en nuestra formación profesional y especialmente a los Fondos para Proyectos de Investigación (FPI).

Al Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua, en especial a la Dra. Martha Lacayo Romero por darnos la oportunidad de realizar esta investigación. Sin duda alguna agradezco a mi tutora, Ing. Ena Rivers Carcache, por su apoyo incondicional y sobre todo su comprensión. A nuestros asesores, Lic. Samantha Miranda, Dr. Lester Rocha, MSc. Josué Pérez Soto, quienes hicieron grandes aportes en este estudio.

Demuestro mi profunda gratitud a la Lic. Janeth Fernández y a David Centeno, por su apoyo en la donación de ejemplares de *Aedes aegypti* en etapa de huevo. A las analistas Ing. Anielka Dávila y MSc. Elda González por su ayuda en el análisis físico-químicos de agua. A todo el personal técnico del Laboratorio de Biotecnología, en especial a Lic. Martha Jarquín, Dra. María Teresa Plata y Lic. Jorge Esquivel, por sus continuas palabras de motivación.

A mis compañeros Oneyda Martínez, María José Martínez, Kathia Pavón y Elvis Conde, quienes fueron gran apoyo en el proceso de monitoreo del bioensayo. A Nancy Hernández, Taryn Suazo, Cindy Martínez por sus aportes fotográficos. Con mucho aprecio al profesor Octavio Saldaña, Dr. Asdrúbal Flores, Lic. Milton Úbeda, Lic. Félix López, y a mis amigas: Lic. Ruth Guerra, Lic. Marcela Peña, Yoleydi Mejía y Adriana Picado, por su constante apoyo en esta investigación.

Hago presente mi gran afecto hacia ustedes, familia, que de una u otra forma hicieron posible la culminación de mi carrera. A mi esposo Aarón Flores y familia.

Para finalizar agradezco de todo corazón el aporte de Tintín y Alberto (Q.E.P.D).

Diana Bermúdez Hernández

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por darme la vida y crecer en un núcleo familiar, en donde no faltó cariño, salud y educación, en especial a mi padre José Carballo Hernández que no dudó en darnos todo su amor y sacrificio para enseñarnos a ser una persona de bien.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua) por darme la oportunidad de estudiar en ella, a los maestros por todo el conocimiento que nos transmiten, al Laboratorio de Biotecnología (UNAN-Managua) por permitirme realizar mi monografía, contribuyendo con su personal, conocimientos y equipos.

Gracias a los Fondos Para Investigación (FPI) por haber puesto toda su confianza y colaboración en el presente estudio monográfico.

Al Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA), en especial al Ing. Henry Pedroza por su colaboración en la captación de muestras de hojas de guanábana en el Centro de Desarrollo Tecnológico (CDT) Campos Azules.

Gracias a la Dra. Martha Lacayo Romero por la oportunidad de desarrollarme, abriéndome las puertas del Laboratorio, a nuestra asesora Lic. Samantha Miranda, por su apoyo y confianza, a nuestra tutora Ing. Ena Rivers por su cariño, ayuda incondicional, conocimientos y paciencia, al Dr. Lester Rocha por su tiempo y conocimientos estadísticos.

Agradezco a Diana Bermúdez Hernández por su colaboración siendo co-autora de este estudio, dedicando tiempo, conocimientos y amistad en la monografía.

Gracias a Josué Pérez, Luis Moreno, Asdrúbal, Octavio Saldaña, María Guerra, Danfer Duarte, Oneyda, María José, Elvis Conde, Kathia Pavón y demás personas que tuvieron el amor y compañerismo para lograr la culminación de esta investigación.

Esther Nohemí Carballo Castillo



Carta Aval del Tutor

Managua, viernes 08 de noviembre de 2019

MSc. José David Quiroz

Director

Departamentos de Biología / Facultad de Ciencias e Ingeniería

UNAN-Managua

Su despacho. -

Estimado Maestro Quiroz:

Reciba un cordial saludo de mi parte.

Me dirijo a usted en carácter de tutor de la tesis de grado titulada: **“Evaluación de la actividad biocida de extractos de guanábana (*Annona muricata* L.) en el tercer estadio larval del mosquito *Aedes aegypti* L. Laboratorio de Biotecnología, UNAN-Managua. Diciembre 2017 – noviembre 2019”**, presentada por las estudiantes: Diana Estefanía Bermúdez Hernández (Nº Carnet: 12040821) y Esther Nohemí Carballo Castillo (Nº Carnet: 10040656) para optar al título de Licenciatura en Biología con mención en Educación Ambiental y Administración de Recursos Naturales.

Este proyecto de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua y financiando en conjunto con los Fondos para Proyectos de Investigación (FPI), y por este medio hago constar que cumple los requisitos para ser sometido a su presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

Agradeciendo la atención a la presente, me despido.

Atentamente,

Ing. Ena Mabel Rivers Carcache

¡A la libertad por la Universidad!

Resumen

En la actualidad el mosquito (*Aedes aegypti* L.) es el principal vector para la transmisión de virus causantes de enfermedades infecciosas de alta reactividad patogénica como el dengue, chikungunya y zika, que pueden ser letales asociadas a factores de riesgo o poca atención médica y que generan un elevado costo a los sistemas de salud pública relacionado con su diagnóstico y tratamiento. La carencia de un método de control efectivo de este vector representa un creciente problema debido a su fácil proliferación y al incremento de su resistencia a insecticidas históricamente efectivos, propiciando el uso excesivo de químicos que afectan la salud humana y el ambiente. Como alternativa a esta problemática a nivel internacional se promueve la utilización de extractos de plantas que representen un menor impacto sanitario y ambiental. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad biocida de los extractos etanólicos de hoja y semilla de guanábana (*Annona muricata* L.) obtenidos mediante dos métodos de extracción (reposo y Soxhlet) como una alternativa para el control del estadio larvario III de este vector. Para tal fin, se determinó el contenido proximal de las matrices en estudio según las metodologías establecidas por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), realizando bioensayos que incluyen diferentes tratamientos o concentraciones de los extractos. Los resultados obtenidos reflejaron que la composición proximal de la harina de hojas presentó 9.54% humedad, 90.46% materia seca, 8.38% de cenizas y 3.86% de extracto etéreo, mientras que en la harina de semilla se determinó 3.84% de humedad, 96.16% de materia seca, 1.43% de cenizas y 32.46% de extracto etéreo. Finalmente, los resultados del bioensayo evidenciaron que las diferencias existentes entre las muestras dependen no solo de la matriz (hoja o semilla) sino también de la procedencia de las mismas. Asimismo, se constata el efecto larvicida de los extractos de semilla y hoja de guanábana sobre el estadio larval III del mosquito, sin embargo su efectividad está en dependencia del método de extracción. El efecto biocida del solvente y el medio sobre el organismo de prueba fue desestimado mediante la inclusión y el análisis de controles durante el bioensayo.

El método Soxhlet presentó la menor concentración letal media (CL₅₀) del grupo analizado (4076 ppm). Los hallazgos encontrados sobre la composición proximal corresponden en gran medida con referencias internacionales, sin embargo, en los resultados del potencial larvicida se evidencia el efecto de las condiciones ambientales sobre las concentraciones de componentes activos de las muestras en estudio.

Palabras claves: *Aedes aegypti*, *Annona muricata* L., composición proximal, guanábana, larvicida.

Índice

Capítulo I.....	1
1.1.Introducción.....	1
1.2.Planteamiento del problema.....	3
1.3.Justificación.....	4
1.4.Objetivos de investigación.....	5
Capítulo II.....	6
2.1.Antecedentes.....	6
2.2.Marco teórico.....	8
2.2.1.Generalidades de <i>Annona muricata</i>	8
2.2.1.1.Taxonomía de la <i>A. muricata</i> L.....	8
2.2.1.2.Características morfológicas.....	8
2.2.1.3.Aplicaciones de la guanábana	9
2.2.1.4.Acetogeninas del género <i>Annona</i>	10
2.2.1.5.Composición proximal de la semilla y hojas de guanábana	11
2.2.2.Generalidades de <i>Aedes aegypti</i> L.....	12
2.2.2.1.Clasificación de <i>Aedes aegypti</i> L.....	12
2.2.2.2.Ciclo de vida	12
2.2.2.3.Ciclo gonotrófico de la hembra de <i>A. aegypti</i>	15
2.2.2.4.Identificación de la especie en estadio larval.....	15
2.2.2.5.Principales enfermedades transmitidas por el mosquito <i>A. aegypti</i> ..	16
2.2.2.6.Estrategias de manejo del <i>A. aegypti</i> L.	17
2.2.3.Técnica estandarizada para detectar resistencia a insecticidas	18
2.2.4.Parámetros físicos-químicos del agua con influencia sobre el organismo	
de estudio	19
2.2.4.1.Temperatura	19
2.2.4.2.pH	19
2.2.4.3.Cloro	19
2.2.4.4.Turbidez.....	19
2.2.5.Biocidas.....	20
2.2.6.Bioensayos.....	20
2.2.6.1.Concentración letal media (CL ₅₀).....	20
2.2.7.Hipótesis.....	21
Capítulo III.....	22
3.1.Diseño metodológico	22
3.1.1.Descripción del área de estudio	22
3.1.2.Tipo de estudio	22
3.1.3.Población.....	23
3.1.4.Muestra.....	23
3.1.5.Definición y operacionalización de las variables.....	24
3.1.6.Materiales y métodos	25

3.1.6.1. Materiales, instrumentos y equipos de recolección de información	25
3.1.6.2. Materiales para el procesamiento de la información.....	26
3.1.7. Diseño del estudio	26
3.1.7.1. Colecta y caracterización de las muestras	26
3.1.7.2. Determinación del contenido proximal de la semilla	27
3.1.7.3. Extracción de compuestos activos.....	28
3.1.7.4. Análisis físico-químico del agua potable utilizada para la eclosión y mantenimiento de las larvas	29
3.1.7.4.1. Colecta de la muestra de agua.....	29
3.1.7.4.2. Medición de pH y temperatura.....	29
3.1.7.4.3. Medición de la turbidez.....	30
3.1.7.4.4. Análisis de cloro	30
3.1.7.5. Pie de cría y mantenimiento del espécimen en estudio.....	30
3.1.7.6. Diseño experimental y condiciones de los bioensayos.....	31
3.1.7.7. Procesamiento y análisis de los datos.....	34
Capítulo IV.....	36
4.1. Análisis y discusión de resultados	36
4.1.1. Composición proximal	36
4.1.2. Evaluación de la letalidad de los extractos etanólicos según método de extracción	40
4.1.2.1. Efecto de los controles en la mortalidad	41
4.1.2.2. Efecto de los parámetros físicos de los extractos etanólicos sobre la mortalidad de las larvas	42
4.1.3. Concentración letal media (CL ₅₀) en extractos de hojas y semillas de <i>A. muricata</i>	44
Capítulo V.....	47
5.1. Conclusiones.....	47
5.2. Recomendaciones.....	48
5.3. Referencias bibliográficas	49

Anexos

Siglas, acrónimos y abreviaturas

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

ATP: trifosfato de adenosina

CL: cloro libre

CL₅₀: concentración letal media y concentración letal 50

cm: centímetros

HR: humedad relativa

INTA: Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria

Lm: luminosidad

m: metro

h: horas

MINSA: Ministerio de Salud

mm: milímetros

ml: mililitros

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

ND: no determinado

OMS: Organización Mundial de la Salud

ppm: partes por millón

RSD: *Relative Standard Deviation* (Desviación estándar relativa)

U/E: unidad experimental

WHO: *World Health Organization*

µl: microlitros

°C: grados Celsius

%: porcentaje

pH: potencial de hidrógeno

mV: milivoltios

Capítulo I

1.1. Introducción

En Nicaragua a partir del año 2013 se ha registrado un incremento en las tasas de personas afectadas por enfermedades asociadas al vector *Aedes aegypti* L., (Alfaro, 2017). Dentro de las medidas normadas por la OMS para el control del vector, se encuentra el uso de químicos como temefos en las diferentes fases de su ciclo (Abate®) (OMS, 2016). La ineficiencia de los insecticidas tradicionalmente ha contribuido al uso irracional y práctica excesiva de estos compuestos tóxicos para el medio ambiente y salud humana (Amador, 1993).

Por lo antes mencionado resulta imperativa la evaluación de nuevas opciones para el control del *A. aegypti*, que a su vez representen un menor impacto sanitario y ambiental. La utilización de extractos vegetales constituye un acervo que posee estas características debido a que son degradadas rápidamente (Lannacone y Lamas, 2002) y exhiben una disminución en la tendencia de los organismos a crear resistencia debido a la presencia de múltiples compuestos activos.

Dentro de las nuevas alternativas potenciales se encuentra a la guanábana (*Annona muricata* L.), esta especie con importancia alimenticia, medicinal e industrial posee propiedades biocidas asociadas a los compuestos activos presentes en todas las partes de la planta entre los cuales destacan las acetogeninas, inductores de apoptosis al inhibir la coenzima NADH que transporta la energía necesaria para la formación del ATP (Flórez. y Martínez, 2010).

En el presente estudio se realizó la caracterización proximal de las hojas y semillas de guanábana utilizadas para la obtención de extractos vegetales y se evaluó el potencial de dichos extractos a escala de laboratorio para el control del tercer estadio larval de *A. aegypti*, con el propósito de determinar las dosis efectivas sobre el ciclo inmaduro del organismo en estudio.

De igual manera se contrastaron los resultados contra la dosis de temefos establecida por la OMS y controles de solvente y ambiente para desestimar su efecto sobre el organismo.

Los resultados obtenidos fueron contrastados contra referencias regionales establecidas por (Bobadilla *et al.*, 2005), Jiménez y Prada (2016), (Vit *et al.*,2014), Guerra y Poveda (2016), entre otros, a fin de analizar el efecto de las condiciones edafoclimáticas sobre la concentración de compuestos activos, la composición proximal y la eficiencia de los métodos de extracción utilizados, así como la sensibilidad de las larvas de mosquito utilizadas en el estudio.

1.2. Planteamiento del problema

Las enfermedades virales como dengue, chikungunya, fiebre amarilla y zika, son patologías de transmisión vectorial asociadas al mosquito *A. aegypti* que afectan predominantemente a los países tropicales y constituyen un problema creciente para los sistemas de salud pública. En Nicaragua para el año 2019, se registró 110,727 casos sospechosos de personas infectadas con dengue, aproximadamente 9295 casos confirmados y 19 personas fallecidas por dengue severo (MINSa, 2019).

En Nicaragua, el programa estatal de prevención de estas patologías se basa en el control de criaderos de larvas de *A. aegypti* a través del control físico (eliminación), químico (aplicación de temefos granulado en hogares y rociados para eliminar adultos), complementado con campañas de limpieza. Sin embargo, aunque el MINSa ha recurrido a todas estas medidas, no ha logrado el control vectorial total y actualmente los casos de dengue continúan en aumento, reportando para el año 2017 (2493 casos) en el año 2018 (1501 casos), para el 2019 (9295 casos) confirmados de dengue (MINSa, 2019).

Una de las causas más influyentes en la proliferación del mosquito se relaciona con el uso excesivo, rutinario y prolongado de los insecticidas tradicionales que ha generado la aparición de resistencia en poblaciones de *A. aegypti*, es así como actualmente este vector presenta resistencia aproximadamente a 16 insecticidas (IRAC, 2011), conllevando a que las dosis deban potenciarse y generando un mayor impacto ambiental (Castillo y Ramos, 2016).

En este contexto se identifica claramente la necesidad de evaluar opciones que contribuyan con la solución de esta problemática sin incrementar el riesgo a la vida humana (Ortega, 2014), razón por la cual la presente investigación evaluó una alternativa para el control de este vector a escala de laboratorio utilizando el potencial biocida de extractos de hojas y semillas de *A. muricata* L., un cultivo tradicional del país.

1.3. Justificación

El control de enfermedades virales de transmisión vectorial como el dengue, chikungunya y zika requiere indiscutiblemente del control del *A. aegypti* para evitar el surgimiento de epidemias y pandemias que deterioren la calidad de vida de las poblaciones e incrementen los costos asociados en la salud pública (Rodríguez, 2002).

La eliminación de criaderos de *A. aegypti* de recipientes artificiales constituye la piedra angular de cualquier esfuerzo para la prevención de enfermedades asociadas a este vector (Rodríguez, 2002). Esto se debe a que el estadio larval se encuentra focalizado, facilitando su erradicación. De esto deriva la relevancia del desarrollo de estrategias que sirvan para un mejor manejo de esta etapa e incluyan la utilización de extractos vegetales que representan un acervo de compuestos activos con propiedades biocidas, baja tendencia al desarrollo de resistencias y con reducido impacto ambiental.

El género *Annona* ha sido uno de los más representativos para el manejo integrado del mosquito transmisor del dengue, debido a los componentes activos (acetogeninas) presentes en esta planta (Bobadilla *et al.*, 2005). La importancia y el aporte de este estudio radica en el establecimiento de la composición proximal y la evaluación del potencial larvicida de los extractos de hoja y semilla de guanábana, así como la definición del método de extracción con mayor efecto letal sobre el organismo de prueba, brindando las pautas para el desarrollo de productos que contribuyan con la erradicación de este vector.

1.4. Objetivos de investigación

General:

Evaluar la actividad biocida de extractos de hojas y semillas de guanábana (*Annona muricata* L.) en el tercer estadio larval del mosquito *Aedes aegypti* L.

Específicos:

- Determinar la composición proximal de las muestras de hojas y semillas de guanábana.
- Seleccionar el método de extracción con mayor efecto letal sobre el organismo de prueba.
- Estimar la concentración letal media (CL₅₀) de los extractos sobre el tercer estadio larval del vector.

Capítulo II

2.1. Antecedentes

A nivel internacional diversos estudios describen la aplicación de extractos de *A. muricata* L. sobre mosquitos pertenecientes a la familia *Culicidae*, dentro de los cuales destacan las conclusiones de Bobadilla *et al.* (2005) sobre la toxicidad de suspensiones de extractos etanólicos de semillas, hojas, flores, corteza de ramas y corteza de raíces sobre larvas de *A. aegypti* y la determinación de sus niveles de susceptibilidad.

Jiménez y Prada (2016) valoraron los extractos de la semilla de *A. muricata* y extractos de bulbos de *Allium sativum* sobre el cuarto estadio larval del *A. aegypti*, determinando que el extracto de guanábana logró una mortalidad del 97% en concentración de 500 ppm en un periodo de 48 horas; en cambio los extractos de *A. sativum* alcanzaron una mortalidad de 85% en concentración de 2000 ppm en el mismo período de exposición.

González *et al.* (2013) resalta la importancia de utilizar extractos de plantas para el control de culícidos, determinando que los extractos de *A. muricata*, *Carica papaya* y *Azadirachta indica* presentaron los mejores resultados al matar con 1000 ppm a aproximadamente el 80% de la población de *Culex tarsalis* desde las 24 h. Amariles, García y Parra (2013) valoraron la actividad insecticida de extractos vegetales sobre dos cepas de *A. aegypti*, registrando CL₅₀ de 6.48 ppm para cepas Rockefeller y 7.26 ppm para cepas silvestres.

Otros estudios demuestran que la utilización de compuestos activos presentes en distintas especies de plantas, han marcado gran relevancia para el manejo de vectores de importancia sanitaria, tal como lo menciona Rozo *et al.* (2008) en su estudio de la evaluación del efecto tóxico de extracto de *Eupatorium microphyllum* L.F. (Asteraceae) sobre larvas de *A. aegypti*.

Por otro lado, debido a que las condiciones edafoclimáticas tienen un efecto directo sobre la expresión de los compuestos presentes en las plantas, la caracterización proximal de la muestra en estudio constituye un aspecto fundamental. A nivel internacional existen reportes de los componentes químicos presentes en la harina de hoja y harina de semilla de guanábana.

Cuello *et al.* (2017) describe los siguientes resultados para muestras de hojas provenientes de Cuba: 2.74% de humedad, 8.71% de cenizas y 8.48% de extracto etéreo; asimismo enfatiza que las hojas de guanábana presentan mayor concentración de principios activos, sin embargo, el fruto ha sido más estudiado.

Vit *et al.* (2014) analizaron la composición proximal de hojas y las semillas de guanábana proveniente de Venezuela, definiendo la siguiente composición para la hoja: 9.87 % de humedad, 7.17 % de cenizas y 2.94 % de extracto etéreo. Por otro lado, en la caracterización de la semilla de este estudio indicaron 9.87% de humedad, 90.13% de materia seca, 1.44% cenizas y un elevado contenido de extracto etéreo (25.75%).

Onimawo, I. (2001) analizó la composición proximal y las propiedades fisicoquímica de la semilla, pulpa y aceite de *A. muricata* proveniente de Nigeria, determinando 2.40% de humedad, 8% de cenizas y 47% de extracto etéreo.

A nivel nacional el estudio realizado por Guerra y Poveda (2016) define la composición proximal de semilla de guanábana obtenida en el mercado local de Managua. Los resultados indicaron 4.30% de humedad, 95.70% de materia seca, 1.34% de cenizas y 31.14% de extracto etéreo, siendo este último el parámetro predominante.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Generalidades de *Annona muricata* L.

La guanábana es una planta de regiones tropicales, el tipo de suelo para su reproducción debe ser arenosos, con buen drenaje y un pH de 5.5 y 6.5, los frutos presentan diferentes formas, ovoides, acorazonada o irregular con una pulpa carnosa, blanca, aromática y con variación del sabor dulce al ácido (Tórrez y Uriarte, 2003).

2.2.1.1. Taxonomía de la *A. muricata* L.

Tabla 1. Ubicación taxonómica de *A. muricata* L.

<i>Annona muricata</i> L.	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Supra orden	Magnolianaes
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Género	<i>Annona</i>
Especie	<i>Annona muricata</i> L.

Fuente: Stevens W., Ulloa C., Pool A. & Montiel O. (2001).

2.2.1.2. Características morfológicas

Es un árbol perenne de tamaño mediano que puede alcanzar alturas de 6 a 12 m y unos 15 cm de diámetro, posee copa abierta e irregular y un tronco de corteza lisa de color castaño a gris oscuro (Salas, 1993).

Las hojas son simples, alternas, con forma oblonga a ovadas miden alrededor de 12 – 20 cm de largo, 4.50 – 9 cm de ancho, con ápice obtuso a cortamente aguda, base cuneada a redondeada, glabras y lustrosas en el haz, envés de color verde

claro, nervios secundarios divergentes, con domacios en las axilas de los nervios laterales; pecíolos 0.30 – 0.60 cm de largo (Buñay y Cantos, 2017).

Las flores son solitarias, caulifloras, pedicelos de 1.10 - 2.10 cm de largo, sépalos triangular-ovados, 0.60 cm de largo y de ancho (Stevens *et al.*, 2001). Además, presentan las siguientes características:

- Ápice agudo, escasamente puberulentos; pétalos exteriores ampliamente ovados, hasta 3.50 cm de largo y 2.50 cm de ancho.
- Ápice redondeado, en la base adelgazados en forma de uña, amarillos, con cuerpos alimenticios cremas y dispuestos en la parte interna a lo largo de los márgenes hacia la base.
- Estambres de 4.50 mm de largo, filamentos de 1 mm de largo, conectivos ensanchados, discoides, menudamente papilados, receptáculo setáceo en las bases de los estambres.
- Ovarios de 3 mm de largo, furvescentes a ferrugíneo-estrigosos, estigmas capitados (Stevens *et al.*, 2001)

El fruto es compuesto (sin carpo) tras la fusión de carpelos, alrededor de un receptáculo carnoso, y de forma alargada – cónica, algunos frutos presentan una forma acorazonada, la cáscara está cubierta de espinas carnosas y encorvadas, pulpa blanca cremosa, jugosa, comestible con sabor dulce, ligeramente agria, contiene muchas semillas de color negro lustroso o castaño, oblongas (Buñay y Cantos, 2017).

2.2.1.3. Aplicaciones de la guanábana

El fruto de la guanábana tiene un sabor característico dulce, esto hace que posea aplicaciones comestibles y se utilice para diversos productos tales como refrescos, yogures, helados, jaleas y postres (Tacán, 2007). Por otro lado, en zonas rurales este tipo de recurso es muy utilizado como fuente de energía (leña), establecimiento de cercas vivas y creación de herramientas de trabajo usados en

campo, debido a su fácil acceso por crecer en los patios de los hogares (Hernández *et al.*, 2013).

Ceide (2017) define una amplia gama de aplicaciones etnomedicinales, tales como: anti-parasitaria, anti-inflamatoria y anti-fúngica. La forma más común de suministro es por cocción de hojas, semillas, flores y raíces, ayudando a reducir los problemas de salud digestivos como el estreñimiento y la obesidad, y a la vez se recomienda en caso de enfermedades cardíacas e hipertensión. También en algunas comunidades utilizan los bordes de las hojas tiernas como un antidiabético y para el tratar pediculosis (Arroyo *et al.*, 2009).

En años recientes, la industria farmacéutica ha encontrado componentes químicos en las hojas y semillas de guanábana como las acetogeninas que han demostrado ser tóxicas frente a algunos organismos causantes de enfermedades, dicha toxicidad se ha probado positivamente en oncología, actividades antiparasitarias y antimicrobianos (Alonso, 2004).

2.2.1.4. Acetogeninas del género *Annona*

La familia annonaceae actualmente comprende a un grupo de más de 430 compuestos naturales que presentan un amplio rango de actividad biológica con múltiples aplicaciones. Las acetogeninas son sustancias cerosas que resultan de la combinación de ácidos grasos de cadena larga de hidrocarburos, su actividad biológica depende de su grado de concentración y la parte de la planta evaluada. (Schlie *et al.*, 2009).

Una de las ventajas de estas sustancias activas es que se aplican en concentraciones bajas y son letales en larvas y pupas, son soluble en agua (lo que facilita los métodos de dispersión) y poseen resistencia a la luz, con lo que supera las desventajas de otros insecticidas químicos (Parra *et al.*, 2007).

Gonzales (2005) describe que la estructura de acetogeninas se caracterizan por una cadena alifática larga comprendiendo alrededor de 35 a 37 átomos de

carbono, y que éstas presentan un grupo de anillos tetrahidrofuránicos (THF) (Figura 1). Su clasificación va en dependencia de cómo están compuestos sus anillos (THF) y la ubicación de la lactona (anexo 1).

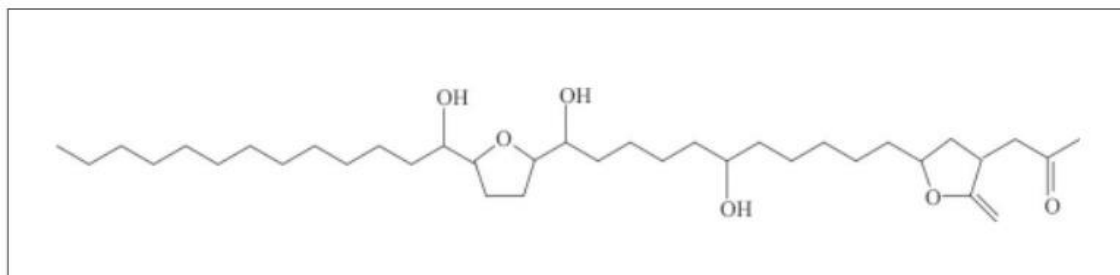


Figura 1. Estructura general de acetogeninas. Fuente: Gonzales, 2005

2.2.1.5. Composición proximal de la semilla y hojas de guanábana

Son análisis que se realizan sobre materias primas y alimentos para determinar su composición y evaluar sus características y componentes, indicando el contenido de materia seca, humedad, cenizas, extracto etéreo, entre otros (Acosta y Díaz, 2016). La humedad de una matriz se refiere a la cantidad de agua que contiene, debido a que todos los alimentos contienen humedad en mayor o menor proporción. El procedimiento se basa en el secado de una muestra en horno y se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso, debido a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas.

El contenido de cenizas de un alimento es un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. La muestra es sometida a altas temperaturas hasta obtener un contenido de residuos para la determinación de minerales, término que engloba a elementos orgánicos como carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre (Reyes y Mendieta, 2000).

Finalmente, el análisis de extracto etéreo permite determinar el porcentaje de grasa que posee una matriz a través de métodos de extracción utilizando

solventes para la obtención de sustancias oleosas. La grasa se mide por pérdida de peso de la muestra o por cantidad de muestra removida (Márquez, 2014).

2.2.2. Generalidades de *Aedes aegypti* L.

Aedes aegypti (Díptera, Culicidae) es un mosquito cuyo origen se ubica en la región etiópica, su rango de distribución prevalece en las regiones de clima tropical y sub-tropical. Es de gran importancia sanitaria debido al rango epidemiológico por ser el vector que inocula diversos arbovirus tales como la fiebre amarilla, dengue, zika y chikungunya. Hasta el momento es el único vector del dengue en las Américas, de hábitat domiciliario y muy antropofílico (Salvatella, 1996).

2.2.2.1. Clasificación de *Aedes aegypti* L.

Tabla 2. Ubicación taxonómica del mosquito *Aedes aegypti* L.

Reino	Animalia
Phyllum	Artrópoda
Clase	Insecta
Orden	Díptera
Familia	Culicidae
Subfamilia	Culicinae
Tribu	Aedinii
Sub género	Stegomya
Género	<i>Aedes</i>
Especie	<i>Aedes aegypti</i> L.

Fuente: Patiño (2001).

2.2.2.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida del *Aedes aegypti* L, es un proceso metamórfico completo conocido como holometábolo, es decir que durante su desarrollo cumple con fases tales como huevo, larva, pupa y adulto (Figura 3). En condiciones de laboratorio este ciclo puede realizarse en un periodo aproximado de 10 días.



Figura 2. Ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti* L. Fuente: Bermúdez y Carballo, 2019

Según Montero (2009) el ciclo de vida comprende de dos fases: una fase acuática conocida como fase inmadura desarrollada en agua y comprende tres etapas (huevo, larva y pupa); y una fase aérea donde el individuo eclosiona.

2.2.2.2.1. Fase acuática

2.2.2.2.1.1. Huevo

Esta fase dura aproximadamente de 12 a 24 horas. La hembra es la encargada de producir los huevos, previamente al ser ovopositados la coloración de los huevecillos son blancos, posterior a unas horas se tornan negro, miden alrededor de 1 mm de longitud y tienen forma de cigarrillos. El número de producción de huevos varía en algunas oviposiciones y las hembras llegan a producir entre 30 hasta 100 huevos por ovoposición.

2.2.2.1.2. Larva

La fase larval es el periodo de mayor alimentación y crecimiento. Las larvas que emergen empezarán una fase de crecimientos de 4 estadios larvales o instar (I, II, III, IV). Poseen un cuerpo bien definido conformado por cabeza, tórax y abdomen. Presenta otras características que permiten rápidamente su identificación tales como un segmento posterior (anal) del abdomen, un sifón para la respiración en la superficie del agua y escamas del peine.

Su mecanismo de desplazamiento en el agua es un movimiento serpenteante característico en estos individuos, de igual forma presenta una posición de reposo cuyo individuo está en una posición vertical. Cabe resaltar que durante el crecimiento larval estas mudan de piel y que la duración del desarrollo larval depende de las condiciones de los medios tales como la temperatura del agua (25 a 29°C), el pH (5 a 7), la alimentación y la densidad de larvas en el recipiente. Esta fase en condiciones de laboratorio dura aproximadamente 5 - 6 días.

2.2.2.1.3. Pupa

Es la última etapa acuática, en esta fase no hay alimentación, los individuos presentan un estado de reposo debido a las modificaciones anatómicas que ocurrirán en el individuo, hasta que aparezca el adulto. El período pupal dura de 1 a 3 días en condiciones favorables.

2.2.2.2. Fase aérea

El individuo al emerger de la pupa, presenta un periodo de reposo que le permite el endurecimiento de su exoesqueleto y sus alas. Las formas adultas tienen dimorfismo sexual, pueden diferenciarse machos y hembras por las características de las antenas plumosas y palpos más largos en los primeros y desnudas en las segundas.

La etapa reproductora del insecto puede surgir en un rango de 24 horas tras la emergencia de la pupa, el apareamiento en general se realiza durante el vuelo, las

hembras poseen una alimentación hematófaga, esta alimentación sanguínea es necesaria como fuente de proteína para el desarrollo de los huevos, mientras que los machos se alimentan de néctares.

2.2.2.3. Ciclo gonotrófico de la hembra de *A. aegypti*

Este ciclo hace referencia al periodo de tiempo que tarda la hembra en la toma de alimento, seguido de la digestión de la sangre, maduración de los oocitos, la ovoposición y su próxima alimentación sanguínea (Conde, 2003).

2.2.2.3.1. Ovoposición

Este proceso se lleva a cabo mediante una herramienta conocida como ovitrampa, los mosquitos hembras depositan sus huevos en cualquier receptáculo que contenga agua. La hembra grávida es atraída hacia recipientes oscuros o sombreados con paredes duras, sobre las que deposita sus huevos a nivel de la interfase agua/aire y prefiere aguas relativamente limpias con poco contenido de materia orgánica. Una hembra, oviponiendo cada tres o cuatro días en condiciones óptimas, puede llegar a poner alrededor de 700 a 1,000 huevos en el curso de su vida.

2.2.2.4. Identificación de la especie en estadio larval

Es importante el conocimiento de la forma inmadura del mosquito, esto es posible incluyendo claves que definen caracteres fácilmente reconocibles y fundamentales para la determinación de las especies (Rossi y Martínez, 2013). Las claves dicotómicas describen las características únicas para esta especie y están presentes en las regiones de la cabeza, donde sobresalen piezas bucales que en la mayoría de las larvas constituyen un grupo de cerdas largas y finas; en las depredadoras, aparecen como varillas curvadas a modo de ganchos para atrapar a sus presas.

Las antenas tienen forma de tubo y están localizadas anterior y lateralmente; también llevan cerdas que varían en forma, tamaño y localización en las distintas

especies. El tórax está dividido en tres segmentos donde hay diferencias en los grupos de cerdas, el abdomen está conformado por ocho segmentos, de los cuales tres están modificados para la respiración y nadar (Rossi y Almirón, 2004).

2.2.2.5. Principales enfermedades transmitidas por el mosquito *A. aegypti*

2.2.2.5.1. Dengue

Martínez (2008) describe que el dengue es una enfermedad viral que a nivel mundial está considerada como la de mayor importancia médica y se han descrito 4 serotipos de virus (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4). La OMS ha reconocido la clasificación del dengue en: fiebre del dengue (FD), fiebre hemorrágica del dengue (FHD) con o sin síndrome de choque por dengue (SCD).

Los cuadros clínicos van en dependencia de la clasificación del dengue. En el dengue clásico se puede manifestar diversos síntomas desde cuadros febriles de intensidad variable, erupción cutánea, dolores musculares y articulares. El dengue hemorrágico se caracteriza por fiebre, dolor abdominal, vómitos persistentes, hemorragias y dificultad para respirar. Es una complicación que puede ser mortal al presentar cuadros graves de choque hipovolémico.

2.2.2.5.2. Zika

Espinoza (2017) indica que esta enfermedad trata de un virus del género flavivirus que puede ser transmitido por diversas vías, tales como: la picadura de mosquitos, principalmente *A. aegypti*, mediante relaciones sexuales, y por vía perinatal o congénita durante el embarazo. Los síntomas consisten en fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolores musculares, manifestaciones neuro-oftalmológicas y complicaciones neurológicas.

2.2.2.5.3. Chikungunya

Martínez y Torrado (2015) hace referencia que a este cuadro clínico generalmente se le denomina fiebre Chikungunya y se trata de un virus ARN del género alphavirus, cuya patogenia se divide en 3 estadios: intradérmico: sanguíneo y el de

afectación de los órganos diana. Los síntomas se caracterizan por la aparición súbita de fiebre, generalmente acompañada de dolores articulares. Otros síntomas frecuentes son: dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas, también se han descrito casos ocasionales con complicaciones oculares, neurológicas, cardíacas y molestias gastrointestinales.

2.2.2.5.4. Fiebre amarilla

Valente y García, (2017) indican que esta enfermedad se da por un arbovirus del género flavivirus perteneciente a la familia flaviviridae. Los mosquitos vectores tienen transmisión transovárica. No hay transmisión humano-humano, sin embargo, existen reportes de transmisión por lactancia materna y transfusión sanguínea.

2.2.2.6. Estrategias de manejo del *A. aegypti* L.

Gómez *et al.*, (2011) señalan que el dengue, zika y chikungunya, representan uno de los principales problemas de salud a nivel regional y Mesoamérica, por lo que la OMS ha puesto en marcha un marco de respuesta estratégica y un Plan de operaciones para el control vectorial (OMS, 2016) que incluyen diversos componentes:

2.2.2.6.1. Control ambiental

La finalidad del control ambiental es solucionar las principales deficiencias en las condiciones de gestión integral de sistema de agua potable y sistemas de alcantarillados en zonas domiciliarias, con el fin de prevenir o minimizar la propagación de los vectores. Este componente incluye la reducción de focos que está enfocada en el control vectorial en la fase inmadura del mosquito, eliminando cualquier recipiente no esencial que contengan larvas (OMS, 2016). También se debe realizar la protección personal a fin de limitar el contacto entre los mosquitos y las personas. Estas actividades incluyen la aplicación de repelente en la piel, ropa que proteja la piel y barreras físicas tales como mosquitero, uso de cedazo en ventanas y puertas, uso de aire acondicionado.

2.2.2.6.2. Control químico

Es una de las estrategias más utilizadas y comprende cinco grupos toxicológicos (Tovar, 2016): organofosforados, organoclorados, piretroides, carbamatos y reguladores de crecimientos tanto en fase acuática como fase adulta del mosquito (abatización o aplicación de temefos y rociado espacial intradomiciliar).

2.2.2.6.3. Control biológico

Incorporación de organismos predadores o competidores de la especie de interés, que de algún otro modo reducen su población, por ejemplo: BTI: *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis*, peces y *Toxorhynchites* (género de mosquito).

2.2.2.6.4. Concientización y capacitación

Mediante la realización de campañas de promoción radial, televisiva, campañas de educación en escuela y comunidades, además de talleres de capacitación a profesionales de la salud y técnicos de campo.

2.2.3. Técnica estandarizada para detectar resistencia a insecticidas

El propósito de las pruebas de susceptibilidad es determinar el efecto de insecticidas en las poblaciones de larvas de mosquito *A. aegypti* para poder establecer nuevos planes de control una vez que dichos insecticidas no hagan efectos (WHO, 1981)

Tabla 3. Soluciones estándar regidas por WHO (1981) para diversos insecticidas.

Insecticida	Concentraciones			
Malation	781.25 mg/l	156.25 mg/l	31.25 mg/l	6.25 mg/l
Temefos	156.25 mg/l	31.25 mg/l	6.25 mg/l	1.25 mg/l
Bromofos	31.25 mg/l	6.25 mg/l	1.25 mg/l	0.25 mg/l
Clorpirifos	6.25 mg/l	1.25 mg/l	0.25 mg/l	0.05 mg/l

Fuente: WHO (1981).

2.2.4. Parámetros físicos-químicos del agua con influencia sobre el organismo de estudio

2.2.4.1. Temperatura

Es el factor más importante y permitirá al individuo desarrollarse en óptimas condiciones (mantenimiento, crecimiento y producción). Si la temperatura no es óptima puede causar situaciones de estrés térmico (por calor o frío, respectivamente). En el laboratorio, las temperaturas letales para el mosquito son mayores a 41°C, pero se ha reportado que a 36°C se presenta un intenso bloqueo de la reproducción.

2.2.4.2. pH

Goyenola (2007) define que el pH, es el grado de acidez o basicidad de una solución en una escala de 0 a 14. Una solución con un pH menor a 7 es ácida, mientras que si es mayor a 7 se clasifica como básica. Una solución con pH 7 se considera neutra.

2.2.4.3. Cloro

Moreno y López (1991) indican que la cloración es uno de los procesos químicos más utilizados para la desinfección del agua, eliminando microorganismos patógenos para el humano hasta alcanzar un nivel que no represente un peligro para la salud. La determinación del cloro permite comprobar la calidad del agua que se distribuye a la red de suministro para toma domiciliaria.

2.2.4.4. Turbidez

Carpio (2007) enfatiza que la determinación de turbidez es de gran importancia para determinar la potabilidad del agua para consumo humano. La turbiedad es una expresión de la propiedad óptica que causa la luz al ser dispersada y absorbida en vez de transmitida sin cambios en la dirección del nivel de flujo a través de la muestra de agua.

2.2.5. Biocidas

Son sustancias que tienen la capacidad de ejercer un control sobre otros organismos nocivos por medios químicos o biológicos, inhibiendo sus funciones vitales, esto va a depender el tiempo de exposición y la concentración, entre mayor sean estos dos factores, mayor serán los daños al organismo hasta neutralizarlo. (Repetto y Sanz, 1995).

2.2.6. Bioensayos

Los bioensayos permiten medir el efecto y el grado de toxicidad de una sustancia química, sobre organismos vivos, mediante la comparación del efecto del agente con el de una solución patrón o “standard” (Gámez y Ramírez, 2008). Guerra y Poveda (2016) definen que un bioensayo tiene como objetivo evaluar la respuesta de un organismo vivo a la actividad de un compuesto químico, orgánico o sintético. Estas pruebas pueden ser directas para cada sustancia de una muestra de dosis umbral, o indirectas cuando para cada sustancia se considera una curva dosis/respuesta.

2.2.6.1. Concentración letal media (CL50)

Se utiliza para encontrar datos de toxicidad para determinadas sustancias, que se espera que mate al 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas. Uno de los principales objetivos de este análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos exponiéndolos al factor tiempo con el fin de comparar y estimar la potencia relativa del estímulo (Peña *et al* 2001).

2.2.7. Hipótesis

H₀:

Los extractos de hoja y semilla de *Annona muricata* L. no presentan efecto biocida sobre el tercer estadio larval de *A. aegypti* en condiciones de laboratorio.

H_a:

Los extractos de hoja y semilla de *Annona muricata* L. presentan efecto biocida sobre el tercer estadio larval de *A. aegypti* en condiciones de laboratorio.

Capítulo III

3.1. Diseño metodológico

3.1.1. Descripción del área de estudio

La colecta de las muestras de hojas fue realizada en el Centro de Desarrollo Tecnológico (CDT) Campos Azules, INTA, ubicado en el municipio de Masatepe del departamento de Masaya. Su ubicación geográfica es 11°52'05.3" N y 86°09'18.8".8 W con altura promedio de aproximadamente 465 msnm y está clasificada como baja y seca con un periodo lluvioso de seis meses, siendo la precipitación promedio de 1,500 mm, temperatura media anual de 24°C y humedad relativa entre 70 y 80% (INETER, 2010). El suelo se clasifica taxonómicamente en el orden de los Andisoles, sub-orden Andepts, gran grupo Durandeps y sub-grupo Typic Durandeps (Catastro, 1971).

La colecta de las muestras de frutas se realizó en el comercio del Mercado Oriental (12°08'57.3" N y 86°15'41.6" W) y Mercado Mayoreo (12°13'55" N y 86°19'45" W) del departamento de Managua.

La fase experimental y de análisis se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua) ubicado a 12°07'00.1" N y 86°16'26.4" W.

3.1.2. Tipo de estudio

Según el alcance el estudio es descriptivo y correlacional debido a la manipulación de una o más variables y a la vez se especifican las características de los grupos que se someten a análisis (Sampieri *et al.*, 2010).

3.1.3. Población

Debido al enfoque de la investigación se han incluido tres poblaciones:

- Plantaciones de árboles *A. muricata* L. cultivados en el CDT Campos Azules del INTA.
- Frutos de *A. muricata* L. disponibles en el comercio local del Mercado Oriental y Mercado Mayoreo de Managua.
- Cinco masas de huevos de *Aedes aegypti* L. que contenía 100 individuos aproximadamente, colectadas, criadas y facilitadas por el Laboratorio de Entomología del Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios perteneciente al MINSA y eclosionadas en el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua, totalizando 500 individuos para el proceso de reproducción.

3.1.4. Muestra

- Las muestras de hojas de *A. muricata* L. fueron captadas de las plantaciones del CDT Campos Azules tomando en cuenta su edad y condiciones fitosanitarias (plagas y enfermedades). Se seleccionaron cinco árboles de los cuales se colectaron aproximadamente 100 hojas, las que fueron tratadas, homogenizadas y transformadas en harina para la elaboración de los extractos.
- Las semillas fueron obtenidas de 20 frutos de guanábana en estado de madurez comprado en el Mercado Oriental y Mercado Mayoreo de Managua, los cuales fueron caracterización, tratadas, homogenizadas y transformadas en harina para la preparación de los extractos.
- Las larvas de *A. aegypti* L. incluidas en el estudio corresponden a 1,600 especímenes eclosionados en el Laboratorio de Biotecnología a partir del pío de cría obtenido del Laboratorio de Entomología del MINSA y seleccionados según su etapa de crecimiento (tercer estadio larval).

3.1.5. Definición y operacionalización de las variables

Tabla 4. Definición y operacionalización de las variables

Objetivo general	Objetivos específicos	Variable	Variable operativa	Clasificación de la variable	Tipo de variable
Evaluar la actividad biocida de extractos etanólicos de guanábana (<i>Annona muricata</i> L.) en el tercer estadio larval del mosquito <i>Aedes aegypti</i> L.	Determinar la composición proximal de de las muestras de hojas y semillas de guanábana	Composición proximal	Porcentaje de humedad	Cuantitativa	Independiente
			Porcentaje de materia seca		
			Porcentaje de cenizas		
			Porcentaje de extracto etéreo		
		Comparación de porcentajes de composición proximal en base a referencias internacionales	Porcentaje reportado	Cualitativa	
			Porcentaje de humedad		
			Porcentaje de materia seca		
			Porcentaje de cenizas		
	Comparación de métodos de extracción	Porcentajes de mortalidad según método	Cuantitativa		
				Monitoreo de parámetros físicos de los extractos	Temperatura
					pH
				Monitoreo de condiciones ambientales	Temperatura
Humedad relativa					
Estimar la concentración letal media (CL ₅₀) de los extractos sobre el tercer estadio larval del vector	Concentración letal	Mortalidad	Cualitativa Cuantitativa	Dependiente	

3.1.6. Materiales y métodos

3.1.6.1. Materiales, instrumentos y equipos de recolección de información

Los reactivos, materiales, instrumentos y equipos utilizados en campo y laboratorio se resumen en la tabla 5. La cristalería utilizada corresponde a clase A. Los equipos e instrumentos empleados se encontraban debidamente calibrados. Los formatos fueron diseñados por el Laboratorio de Biotecnología dentro de su Sistema de Gestión de la Calidad (SGC).

Tabla 5. Materiales, equipos e instrumentos utilizados en la investigación.

Clasificación	Descripción
Reactivos	Productos químicos de calidad analítica (desde grado ACS hasta HPLC) necesarios para el procesamiento de las muestras, la obtención de extractos, análisis proximal, la aplicación y control del bioensayo, dentro de la fase de laboratorio. Cada procedimiento detalla los reactivos utilizados.
Cristalería	Material de cristal empleado para la realización de diferentes procedimientos técnicos, se incluyen: Beakers, probetas, pipetas serológicas, pipetas volumétricas, buretas, magnetos, pinzas, Erlenmeyer, botellas ámbar de 500 y 1000 ml, balones volumétricos, desecador, balones fondo plano para extracción, condensador Liebig, equipo de destilación Soxhlet.
Materiales	Insumos de plástico y otros materiales necesarios para los procesos de colecta, análisis y control. Entre ellos: termos, bandejas, tamices, marcadores, bolsas de colectas, dedos de celulosa, papel aluminio, guantes, papel toalla.
Equipos e instrumentos de laboratorio	Equipos empleados para realizar análisis, extracciones y controles del bioensayo a escala de laboratorio. Se incluyen: GPS, baño maría termómetros, campana extractora de gases, balanza analítica y de precisión, formato de colecta de campo, formatos para registro de mortalidades, formato para control de medio, formato para control ambiental, hidrómetro, medidor de pH, turbidímetro, medidor de cloro, horno de convección por gravedad, mufla.

De igual manera la observación *in situ* es un procedimiento primordial dentro del método científico que permitió evaluar el comportamiento de los individuos a lo

largo del estudio, facilitando adecuar las estrategias, instrumentos y procedimientos para la recopilación de la información.

3.1.6.2. Materiales para el procesamiento de la información

Los datos obtenidos fueron procesados utilizando Software como Excel, InfoStat para el análisis Probit y finalmente el R Core Team para el análisis del efecto de los extractos y el medio.

3.1.7. Diseño del estudio

La presente investigación comprendió tres grandes etapas que incluyeron la caracterización proximal de las muestras de hoja y semillas a utilizar, la obtención de los extractos vegetales por el método Soxhlet y reposo, y finalmente la realización del bioensayo para estimar el potencial biocida y las CL₅₀ de cada extracto (anexo 2).

3.1.7.1. Colecta y caracterización de las muestras

Las hojas de guanábana fueron colectadas de manera aleatoria de cinco árboles cultivados en el CDT Campos Azules del INTA, completando aproximadamente 100 hojas por árbol (Anexo 3). Las muestras se trasladaron al Laboratorio a temperatura ambiente bajo la cadena de custodia establecida por el Laboratorio.

Las hojas fueron desinfectadas, secadas a temperatura ambiente por 7 días y en horno de convección a 40°C durante 24 horas (Anexo 4). Posteriormente se colocaron en un molino manual a fin de obtener la harina necesaria para las etapas posteriores. El producto se homogenizó, tamizó (tamiz N° 40) y se almacenó en frascos ámbar en refrigeración para evitar su degradación.

Las semillas de guanábana se obtuvieron de 20 frutos colectadas en el comercio de Managua (Mercado Oriental y Mercado Mayoreo). Las muestras fueron desinfectadas, transportadas y procesadas en el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua en condiciones controladas para evitar su degradación. Las

semillas fueron extraídas del fruto (Anexo 5) se lavaron con agua potable y agua destilada, y al igual que las muestras de hojas, se secaron a temperatura ambiente durante 7 días y en horno de convección a 40°C durante 24 horas, posteriormente se homogenizó la muestra en un molino RETSCH con tamaño de poro de 0.5 mm, la harina obtenida se almacenó en recipientes herméticos color ámbar a 4°C.

3.1.7.2. Determinación del contenido proximal de la semilla

La composición química se obtuvo utilizando metodologías establecidas por la AOAC. La determinación de humedad y materia seca, cenizas y extracto etéreo se realizaron según: AOAC 925.1, AOAC 923.03 y AOAC 920.39, respectivamente. Todos los análisis se realizaron por triplicado con controles negativos (blancos) y controles de calidad internos (Anexo 6 y 7). Los datos obtenidos fueron evaluados para determinar su reproducibilidad y exactitud.

3.1.7.2.1. Humedad y materia seca

Se realizó empleando un horno de convección por gravedad al someter a las muestras a 130°C hasta llegar a peso constante. La diferencia del peso de la muestra húmeda y seca corresponde al contenido de agua presente en la muestra.

3.1.7.2.2. Cenizas

Utilizando una mufla a 550°C, se realizó la determinación gravimétrica por diferencias de peso después de la incineración (ceniza).

3.1.7.2.3. Extracto etéreo

En un equipo de extracción Soxhlet a temperatura de ebullición del solvente, se extractaron los componentes solubles de la matriz por un período de 8 horas. Por diferencia de peso entre la masa del balón que contiene el residuo y el balón vacío, se determinó el residuo lipídico extraído.

3.1.7.2.4. Control de calidad de los parámetros proximales

Durante los análisis se incluyeron controles de calidad de los procedimientos analíticos tales como: réplicas de laboratorio, blancos de laboratorio, enriquecidos y agregados, cumpliendo los lineamientos establecidos por la AOAC. Estos controles garantizan la veracidad de los resultados, la ausencia de contaminación tanto de los reactivos como de los materiales utilizados, la precisión analítica y la exactitud del método y del analista.

La reproducibilidad de los resultados de la muestra, se evaluó por medio de réplicas de la muestra (por triplicado en cada uno de los análisis), con la finalidad de mostrar el grado de representatividad de las muestras. La precisión de los resultados obtenidos se refleja a través de RSD. La exactitud se evaluó a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos en los blancos y muestras enriquecidas de harina de hojas y harina de semillas de guanábana. Estos se utilizan para demostrar la fiabilidad y se consideran aceptables cuando la recuperación del 90 % de los análisis de interés se encuentra entre un porcentaje mayor de 90% 100%.

3.1.7.3. Extracción de compuestos activos

Se utilizaron 25 g de muestras de harina de semilla y hojas para cada extracto. Los extractos evaluados fueron preparados por los métodos de reposo y Soxhlet por triplicado. En el método de reposo la harina se colocó en frascos de vidrios ámbar con el solvente (etanol 96%) y permaneció por 7 días a temperatura ambiente (Anexo 8). Posteriormente fue filtrado hasta obtener la solución y se almacenó en frascos ámbar o cubiertos con papel Kraft a 4° C (Anexo 9).

Para el método Soxhlet la harina se colocó en un dedal de hemicelulosa dentro del sistema Soxhlet y se extrajeron con el solvente (etanol 96%) en períodos distintos de tiempo debido a la diferencia en la naturaleza oleosa de las matrices. En la matriz hoja el tiempo de extracción fue de 8 horas (Anexo 10), mientras que en semillas la extracción demoró 16 horas (Anexo 11 y 12). Posteriormente los extractos obtenidos se almacenaron en frascos oscuros a 4°C.

3.1.7.4. Análisis físico-químico del agua potable utilizada para la eclosión y mantenimiento de las larvas

Realizado en base al *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (2012).

3.1.7.4.1. Colecta de la muestra de agua

La muestra se colectó directamente del grifo que provee agua a las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología dejando que el agua fluyera por unos minutos hasta obtener una apariencia óptima para su recolección y los análisis correspondientes (Tabla 6). La muestra fue almacenada en un recipiente plástico, tapado herméticamente identificando hora y fecha de muestreo.

Tabla 6. Métodos físico-químicos para el análisis de agua según metodología del *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (2012) del agua potable.

Parámetro	Método	Equipos
Temperatura	4500-H ⁺ B.	Medidor de pH y temperatura portátil
pH	Método potenciométrico	Milwaukee pH55
Cloro total	Método DPD	Lamotte LTC 3000we
Cloro residual		Lamotte LTC 3000we
Turbidez	2130 B. Método nefelométrico	Lamotte LTC 3000we

3.1.7.4.2. Medición de pH y temperatura

Para la medición de estos parámetros se utilizó el equipo Milwaukee pH 55 calibrado con soluciones buffers pH 4 y 7. El electrodo se sumerge en la muestra y automáticamente aparecerá la lectura correspondiente al valor de pH en la pantalla (LCD principal) mientras que la temperatura se mostrará en la parte inferior (LCD secundario) (Anexo 13).

3.1.7.4.3. Medición de la turbidez

Este análisis se realizó mediante el método nefelométrico. El equipo se calibró con estándares de rango menor (blanco) a un punto de calibración de 1 o 10 (NTU). Una vez que el equipo se encontró calibrado se realizó la lectura de la muestra, tomando en cuenta el límite de detección 0.05 NTU.

3.1.7.4.4. Análisis de cloro

Para el análisis de cloro se requiere que el equipo de medición esté calibrado. La muestra de agua se deposita en la celda donde se agrega una tableta DPD, agitando por inversión durante 10 segundos, posteriormente se añade al equipo para obtener lectura de cloro libre. El valor de cloro total se obtendrá de la misma muestra, agregando la segunda tableta de DPD, se agita por 10 segundos y se lleva a lectura (Anexo 14 y 15).

3.1.7.5. Pie de cría y mantenimiento del espécimen en estudio

Para garantizar la identidad del mosquito, los huevos de larvas se obtuvieron en el Complejo Nacional de Salud Concepción Palacios donde se realiza la selección de los mismos de acuerdo a sus características morfológicas. El proceso de reproducción del espécimen fue realizado según la metodología del CENAPRECE (2015). Cinco masas de huevos de 100 individuos aproximadamente (totalizando 500 individuos) fueron inicialmente eclosionados para el proceso de reproducción utilizando agua libre de cloro en condiciones controladas (temperatura de 27°C a 30°C y humedad relativa de 70%) (Anexo 16). Las larvas del mosquito fueron identificadas utilizando las claves ilustradas según Rossi y Almirón (2004) (Anexo 17).

Desde el primer estadio se les proporcionó alimento (concentrado para conejos) y se reemplazó cada tres días, al igual que el agua debido a los desechos expuestos (mudas). Terminada la fase larval pasan a estado pupa manteniéndose sin alimento por 2 días, durante esta fase fueron resguardados en una cámara entomológica en frascos ámbar o cubiertos hasta la eclosión de los mosquitos

adultos que fueron utilizados como progenitores para la creación del pie de cría necesario para la realización de los bioensayos (Anexo 18).

Para la alimentación de los mosquitos machos se colocaron trozos de algodón impregnados con una solución azucarada, mientras que las hembras fueron alimentadas con sangre utilizando como fuente de alimento a un roedor (*Ratus ratus L.*) de ocho meses de edad, esto debido a su comportamiento hematófago. Durante este proceso se siguieron los lineamientos establecidos por Fuentes, Mendoza, Rosales y Cisneros (2008) y las recomendaciones recibidas del Laboratorio de Entomología del MINSA. Este proceso de alimentación se realizó por un período de tres días a la semana. (Anexo 19).

3.1.7.6. Diseño experimental y condiciones de los bioensayos

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos, donde los factores evaluados fueron matriz (extractos de hojas y semillas), tipos de métodos de extracción (reposo y Soxhlet) y concentración de extractos de *A. muricata* (100, 750, 1500, 3000, 5000 ppm). La unidad experimental utilizada consistió en recipientes que contenían 10 individuos de *A. aegypti* en tercer estadio larval. Cada unidad experimental fue sometida a un tratamiento (que consiste en una concentración específica de extracto), o bien, fue utilizada como control del bioensayo.

Se evaluaron cinco tratamientos o concentraciones preparadas a un volumen final de 100 ml. Para cada tratamiento se utilizó una unidad experimental más cuatro repeticiones. Las lecturas de mortalidad se registraron cada 8 horas (08h, 16h, 24h, 32h, 40h y 48h) posterior a la exposición de los tratamientos, totalizando 48 horas de observación. Los individuos fueron alimentados una sola vez durante el período de evaluación (Anexo 20).

Paralelamente se utilizó un diseño completamente al azar para comprobar el efecto de controles: control negativo (agua), control positivo (Abate®) y control

reactivo (etanol 96%), sobre la mortalidad de individuos (Tabla 7). Tanto el número de repeticiones (y número de individuos por recipiente) como los tiempos de las mediciones fueron iguales que aquellos usados en el bioensayo (Anexo 21).

Tabla 7. Tratamientos o concentraciones evaluadas por cada matriz y método de extracción.

Matriz	Método	N° de tratamiento	Concentración	Lectura de mortalidad a diferentes horas
Hoja	Reposo	1	100 ppm	8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas
		2	750 ppm	
		3	1500 ppm	
		4	3000 ppm	
		5	5000 ppm	
Hoja	Soxhlet	1	100 ppm	
		2	750 ppm	
		3	1500 ppm	
		4	3000 ppm	
		5	5000 ppm	
Semilla	Reposo	1	100 ppm	
		2	750 ppm	
		3	1500 ppm	
		4	3000 ppm	
		5	5000 ppm	
Semilla	Soxhlet	1	100 ppm	
		2	750 ppm	
		3	1500 ppm	
		4	3000 ppm	
		5	5000 ppm	
Control negativo			Agua Destilada	
Control positivo			Abate	
Control reactivo			Etanol al 96%	

Se monitoreó continuamente la temperatura y el pH de los medios (Anexo 22), así como la temperatura ambiental y la humedad relativa para conocer la relación entre los parámetros: humedad relativa y temperatura ambiental, así como el pH y la conductividad de los medios con la finalidad de conocer su efecto sobre los resultados obtenidos.

Se debe mencionar que los recipientes fueron asignados de forma aleatoria para la combinación de los tratamientos, con la finalidad de obtener mayor confiabilidad en los resultados y garantizar que el adecuado mantenimiento del espécimen en las condiciones de laboratorio utilizadas durante el bioensayo (Anexo 23). Todos los resultados fueron sistematizados en formatos de colecta de información (Anexos 24 – 26).

Para la ejecución del bioensayo se tomaron en cuenta condiciones de los extractos y factores ambientales, donde fueron expuestos los organismos de prueba. En la tabla se refleja las concentraciones evaluadas en el bioensayo, con intervalos de lectura cada 8 horas post exposición.

3.1.7.7. Procesamiento y análisis de los datos

Para conocer el efecto de la concentración de extractos, del método de extracción y la matriz en el porcentaje de mortalidad de individuos de *A. aegypti* se utilizó un modelo lineal mixto generalizado con una función de error binomial. Los factores anteriores fueron considerados factores de efectos fijos, y los factores tiempo de medición y repeticiones como factores de efectos aleatorios.

El modelo completo consistió en el ajuste de efectos principales e interacciones. En todos los casos, después de ajustar el modelo completo, los términos no significativos fueron removidos paso a paso y los sub-modelos fueron comparados usando la prueba de razón de verosimilitud y el criterio de información de Akaike (AIC) como medida para comparar el ajuste de los diferentes modelos. El modelo con AIC más bajo se consideró ser el modelo más parsimonioso. Debido a la presencia de sobre dispersión en el modelo ajustado, se incluyó una variable sintética (modelada como factor de efecto aleatorio) que capturará la sobre-dispersión presente.

Para comprobar el efecto de los controles sobre el porcentaje de mortalidad de individuos de *A. aegypti* se utilizó un modelo lineal mixto generalizado con una función de error binomial. El factor solvente de extracción fue considerado efecto

fijo y los factores tiempo de medición y repeticiones fueron considerados factores de efectos aleatorios. Debido a la presencia de sobre dispersión en el modelo ajustado, se incluyó una variable sintética (modelada como factor de efecto aleatorio) que capturara la sobre-dispersión presente. Fueron realizadas comparaciones múltiples usando la prueba honesta de Tukey. Todos los análisis fueron realizados con el software estadístico R (R Core Team, 2019).

Debido a que un componente del proyecto financiado por los FPI constituye la estimación de la CL_{50} , la misma se realizó utilizando el software estadístico Infostat (Di Rienzo, *et al.*, 2011) debido a la característica simplicidad de su interfaz. Se utilizaron los resultados de mortalidad total (excluyendo la variación en el tiempo) obtenidos en el bioensayo aún si no existía diferencia significativa entre sus resultados a fin de contrastar con referencias internacionales. Se estimaron los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancia (relación dosis-respuestas), se ajustó los datos de mortalidad mediante las tablas Probit, convirtiéndolos en porcentajes de efecto, los cuales fueron transformados a unidades Probit y finalmente a unidades de concentración (ppm).

Debe mencionarse que la estimación de la CL_{50} no analiza las interacciones entre los factores método y concentración, que sí es incorporada en el análisis multivariado con R.

Capítulo IV

4.1. Análisis y discusión de resultados

4.1.1. Composición proximal

El componente predominante en la determinación del contenido proximal de las muestras fue la materia seca. El resultado de este componente en la hoja fue 90.46 ($\pm 0.10\%$) y en semilla de 96.16 ($\pm 0.07\%$), por tanto, el contenido de humedad determinado presentó valores variantes para ambas matrices (9.54 $\pm 0.10\%$ en hoja y 3.84 $\pm 0.07\%$ en semillas). Esto es de gran utilidad para determinar la estabilidad de las matrices en estudio. Por otro lado, el contenido de cenizas presentó un valor promedio en hojas de 8.38 $\pm 0.13\%$ y 1.43 $\pm 0.006\%$ en semillas. En cuanto al extracto etéreo, la semilla presentó un mayor contenido (32.46 $\pm 0.06\%$) con respecto a la hoja (3.86 $\pm 0.01\%$) (Figura 3).

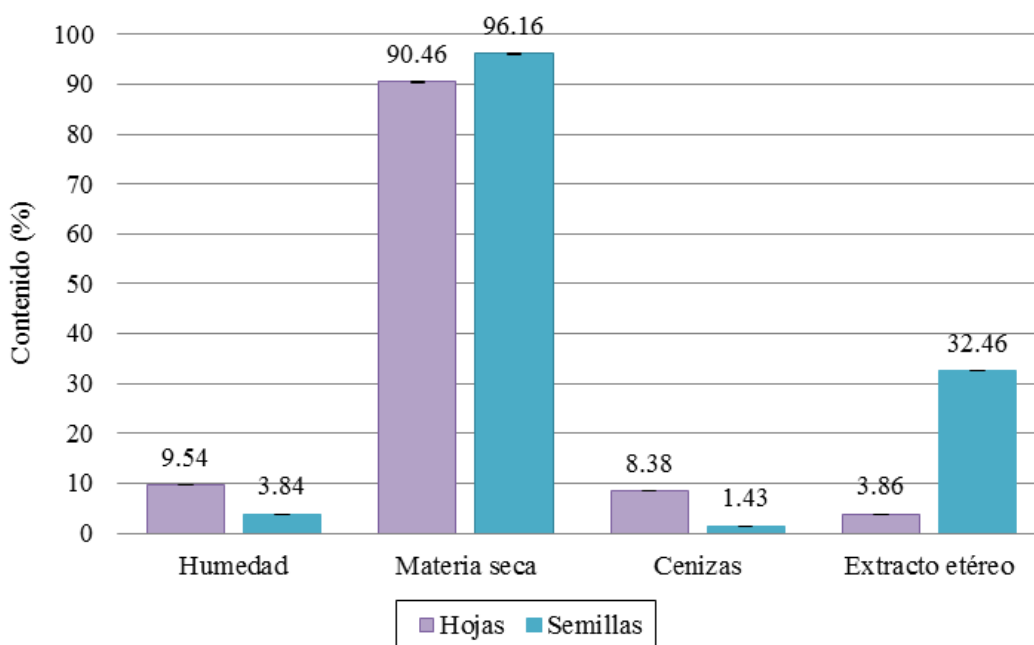


Figura 3. Composición proximal (%) de las muestras de hojas y semillas de *A. muricata* L.

Al contrastar los resultados obtenidos en la composición proximal de la semilla de guanábana, encontramos que los valores obtenidos de cenizas presentan gran similitud a los descritos por Vit *et al.* (2014) en Venezuela (1.44%) y diferencia a lo establecido por Kimbonguila *et al.* (2010) en Congo (9.70%) y Onimawo (2002) en muestras provenientes de Nigeria (8.00).

El contenido de extracto etéreo determinado por Vit *et al.* (2014) (25.75%) es el menor de las referencias bibliográficas seleccionadas, difiriendo de los resultados obtenidos en este estudio (32.46%) que presentaron alta similitud a lo reportado por Guerra & Poveda (2016) (31.14%), aunque presentan menor contenido con respecto a los resultados descritos por Kimbonguila *et al.* (2010) y Onimawo (2002) (40 y 47%, respectivamente). La semilla nacional también reporta mayor contenido de materia seca que el obtenido por Vit *et al.* (2014) (90.13%) y de manera general los resultados son semejantes a la otra referencia nacional (Guerra & Poveda, 2016) (Figura 4).

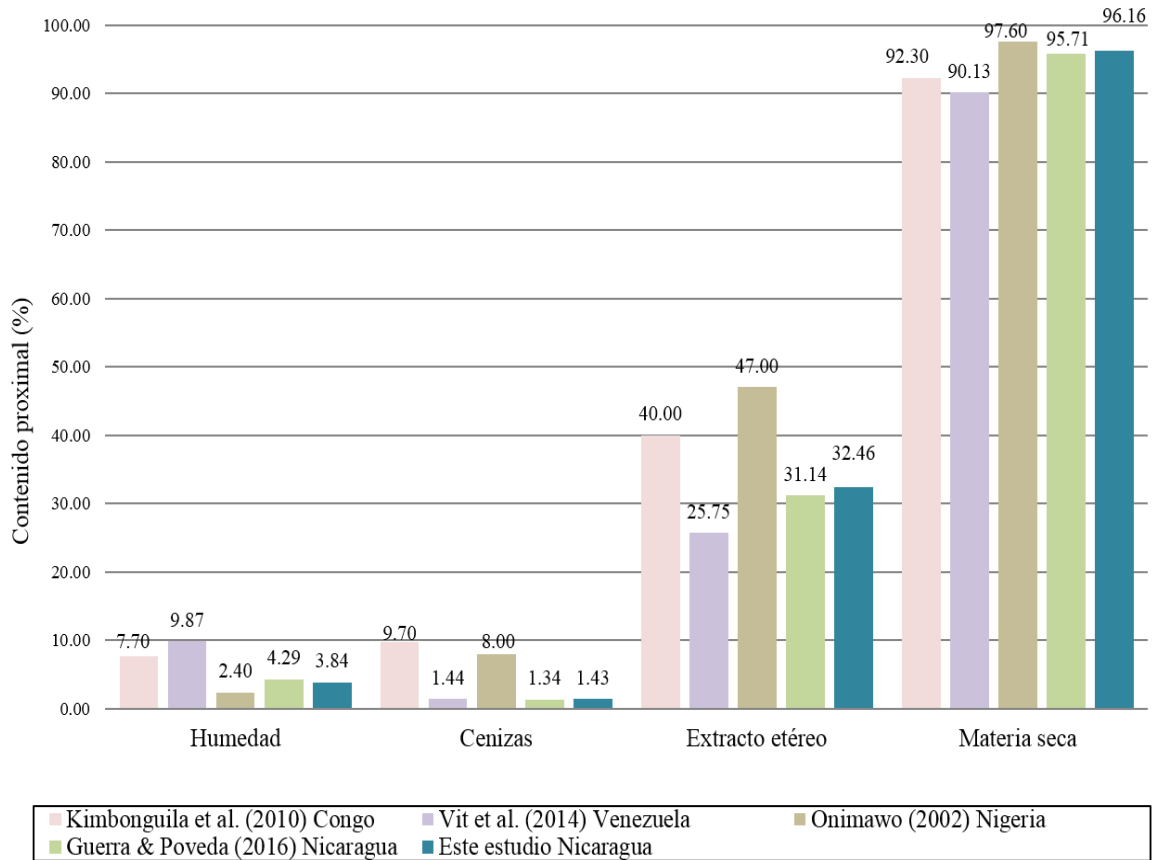


Figura 4. Comparación de la composición proximal (%) de las muestras de semillas de *A. muricata* L. utilizadas en este estudio con respecto a referencias internacionales.

Por otro lado, en la comparación de referencias internacionales de la composición de la hoja con respecto a lo establecido por Cuello *et al.* (2017) se encontró similitud en el contenido de cenizas (8.71%) mientras que existe divergencia en el extracto etéreo (8.48%) y la humedad (2.74%) establecida en esta referencia (Figura 5).

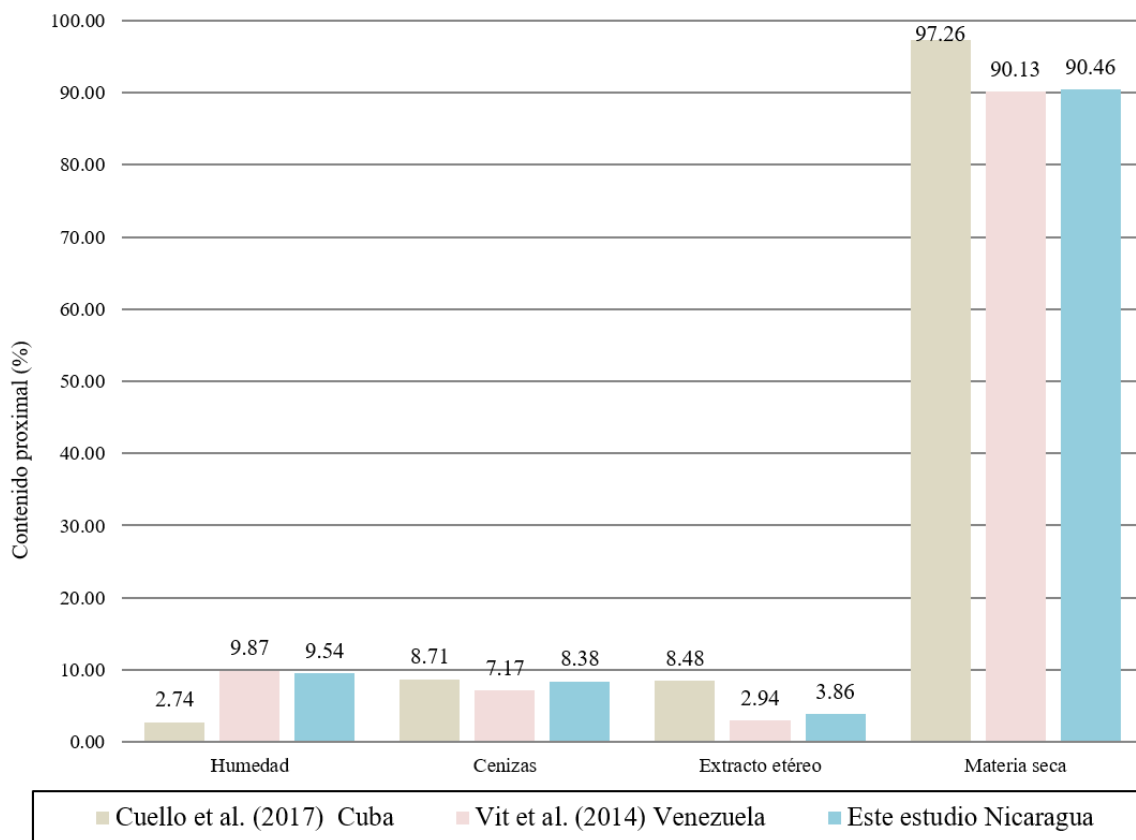


Figura 5. Comparación de la composición proximal (%) de las muestras de hojas de *A. muricata* L. utilizadas en este estudio con respecto a referencias internacionales.

Los resultados obtenidos en el estudio, difieren a los presentados en otras investigaciones y varían en dependencia al órgano de la planta utilizado. La harina de semilla nacional alcanza el segundo mayor contenido de grasas totales (extracto etéreo) con respecto a las otras referencias. Esta variación en el contenido proximal de las muestras puede deberse o asociarse a las condiciones

edafoclimáticas, edad de la plantación y manejo agroforestal en que se desarrolla la planta de la cual se obtiene la muestra. De igual manera la variedad de la guanábana (ácida, sub-ácida o dulce), es un aspecto que a la fecha no ha sido explorado y que puede aportar diferencias significantes en la composición de las muestras en estudio.

4.1.2. Evaluación de la letalidad de los extractos etanólicos según método de extracción

El efecto de la concentración de extractos etanólicos de *A. muricata* sobre la mortalidad larval varía según el método de extracción ($P < 0.05$) (Figura 6). Así, las concentraciones de 750 y 1500 ppm obtenidas por el método Soxhlet presentan una mayor letalidad que aquellas obtenidas por el método de reposo ($P = 0.002$ y $P = 0.004$, respectivamente). El porcentaje de mortalidad en las concentraciones 750 y 1,500 ppm corresponden a 3 y 3.24%, respectivamente, mientras que en el método de reposo los resultados fueron de 0.66 y 0.94% en ambas concentraciones. Las concentraciones restantes tuvieron un efecto sobre la mortalidad indistintamente del método de extracción. Por otra parte, no se encontró efecto de los extractos de hojas y semillas (matriz) sobre la mortalidad de individuos.

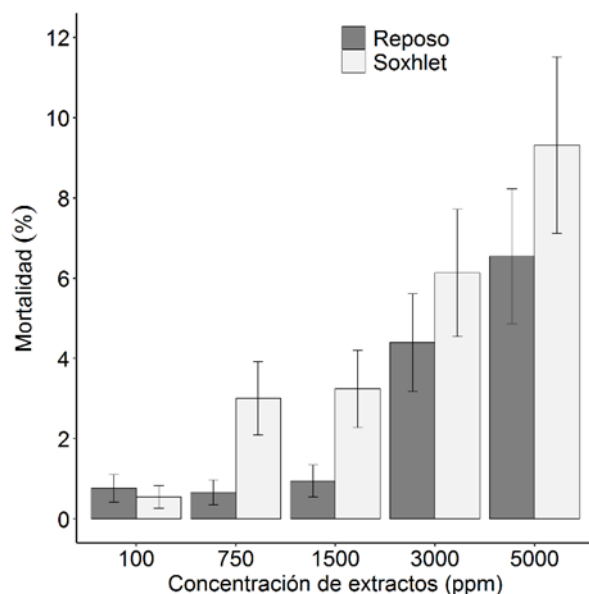


Figura 6. Mortalidad larval media (± 1 error estándar) en función de la concentración de extractos de *A. muricata* y del método de extracción.

La sensibilidad de los organismos al método de extracción es un punto clave, ya que tal y como lo define Rozo *et al.* (2008), la probabilidad que dos extractos sean iguales es mínima debido a la presión que ejerce sobre el organismo de prueba no es siempre la misma, por tanto es de mucha utilidad conocer las concentraciones en las cuales el método representa un punto clave. Por otro lado, a pesar que existieron diferencias entre el efecto letal de las matrices utilizadas (hoja y semilla) el método de análisis utilizado no señaló estas divergencias como significativas, encontrándose mayor diferencia con las letalidades causadas por los dos métodos comparados. Estos resultados corresponden parcialmente a lo descrito por Bernabé *et al.* (2009) que indica que el letal sobre larvas de *A. aegypti* utilizando extractos acuosos de guanábana presentan diferencias significativas entre los valores órgano – extracto - dosis.

4.1.2.1. Efecto de los controles en la mortalidad

La evaluación de los controles se ejecutó con el fin de constatar que el porcentaje de mortalidad obtenida se debió a la actividad biocida y que el solvente utilizado para la obtención de los extractos no influye en los resultados Sanabria *et al.*,

(2002). La concentración elegida en el control reactivo (etanol) se definió en base a la mayor concentración utilizada en los extractos (5,000 ppm). El porcentaje de mortalidad del control reactivo etanol fue de 1.1% (Figura 7), comprobando así que la mortalidad registrada en el bioensayo con los extractos etanólicos de hojas y semillas de *A. muricata* se debe principalmente a compuestos activos que influyen directamente en la muerte larval de *A. aegypti*.

El insecticida organofosforado (Abate®) utilizado como control positivo alcanzó un porcentaje de mortalidad de 5%. La dosis suministrada (0.01562 g / 100 ml) se realizó en base a las recomendaciones de la OMS (WHO, 1981). El control negativo (agua) presentó el 0.2% de mortalidad durante el bioensayo, donde 100 individuos se expusieron a este control y solo 3 de ellos se registraron muertos. Estos valores de mortalidad posiblemente se deban a la susceptibilidad asociada a la densidad larval experimentada por los individuos durante el proceso de reproducción, tal como lo define Francia y Maciá (2011).

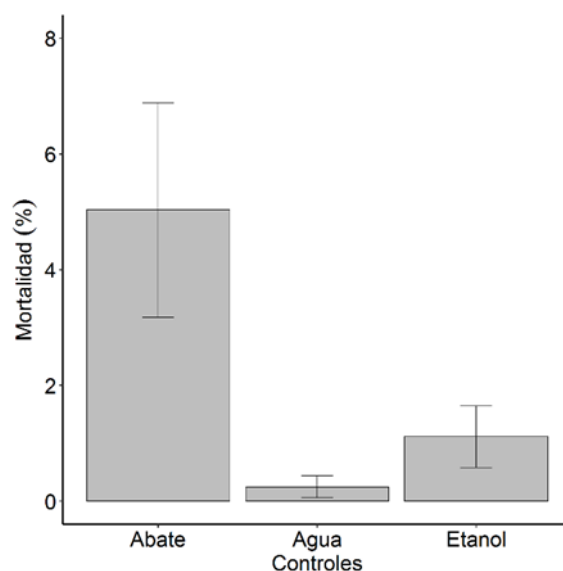


Figura 7. Mortalidad larval media (± 1 error estándar) en función de los controles.

4.1.2.2. Efecto de los parámetros físicos de los extractos etanólicos sobre la mortalidad de las larvas

Se evaluó la temperatura y pH de los extractos etanólicos con el fin de monitorear las condiciones de desarrollo y sobrevivencia de las larvas. La temperatura es uno

de los factores del cual dependen las larvas de *A. aegypti*, su traspase a estadio pupal se ve interrumpida si se encuentran en una temperatura menor de 13°C, estos organismos son resistentes a temperaturas entre 10 a 45°C, sin embargo, se han planteado rangos de temperaturas óptimos para el desarrollo larval y oscilan entre 25 a 29°C (Eiman *et al.*, 2016).

Los valores medios obtenidos reflejan que los rangos de temperatura de los extractos oscilaron entre 20.5 a 27°C para las matrices hojas y semillas. Las lecturas de estos parámetros realizadas en intervalos de 8 horas durante la evaluación del bioensayo se comportaron de forma estable (Figura 8).

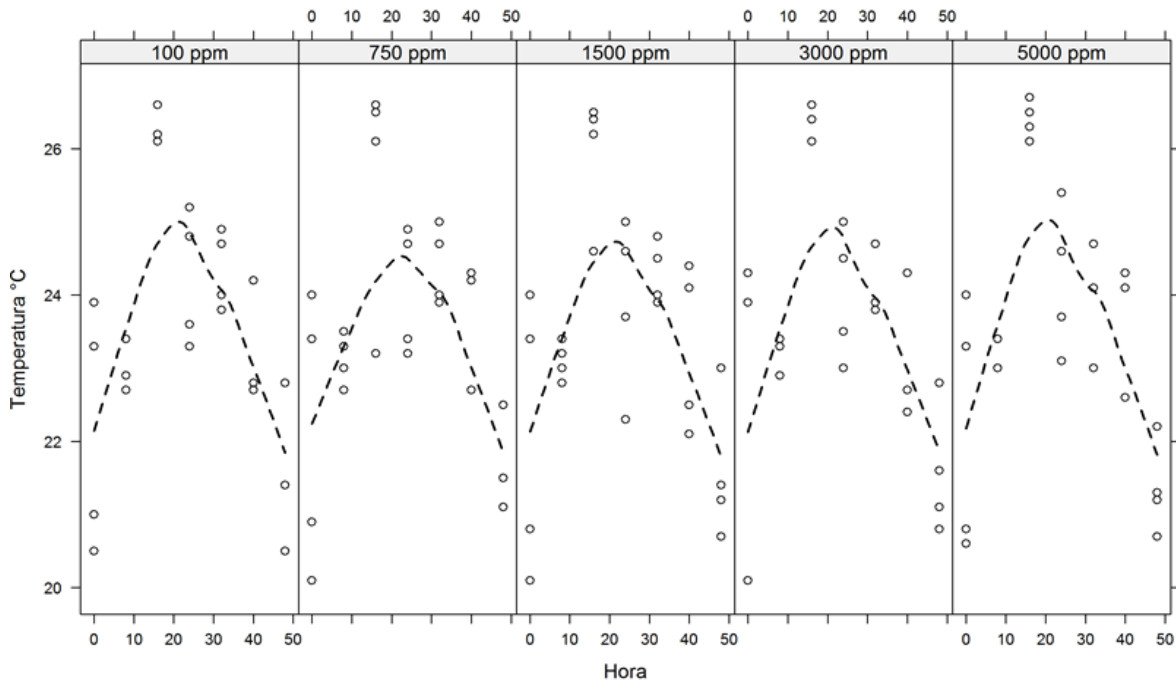


Imagen 8. Temperatura del medio en cada concentración de *A. muricata* durante el bioensayo. La línea punteada representa una regresión ponderada localmente (LOESS).

El pH influye en el crecimiento larval. Díaz *et al.* (2015) describe que el nivel de tolerancia a los rangos de acidez va en dependencia del estadio larval. El pH ácido de 3.5 influye de manera directa aumentando los porcentajes de mortalidad en larvas del estadio I, y se reduce en larvas del estadio IV. Los valores de pH

durante el bioensayo presentaron un rango amplio (5 - 7), tanto para hojas como semillas, sin embargo, estos no afectan significativamente en la mortalidad larval considerando que el rango más bajo reportado fue 5.0 (Figura 9).

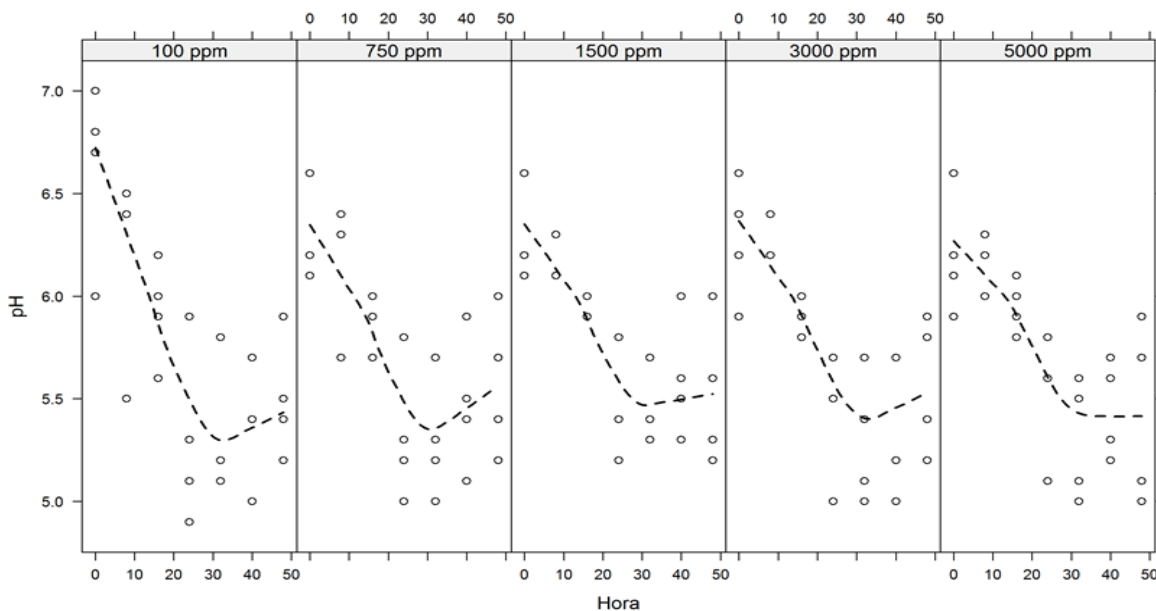


Figura 9. Valores de pH del medio en cada concentración de *A. muricata* durante la duración del bioensayo. La línea punteada representa una regresión ponderada localmente (LOESS).

Según Quispe *et al.*, (2014) las condiciones ambientales óptimas de temperatura para el desarrollo de *A. aegypti* en fases larvales son de $22^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ y 75-80% en humedad relativa en laboratorio.

4.1.3. Concentración letal media (CL₅₀) en extractos de hojas y semillas de *A. muricata*.

La CL₅₀ de los extractos de *Annona muricata* (hojas y semillas) permite determinar el rango de tolerancia de las larvas del tercer estadio de *A. aegypti*. La proporción de mortalidad larvaria en unidades Probit (Figuras 10 y 11) se observa en cada uno de los extractos valorados en el bioensayo durante 48 horas de exposición.

El patrón de CL₅₀ es homogéneo en tres extractos etanólicos a excepción del extracto etanólico de hojas de guanábana. Para el método reposo la CL₅₀, corresponde a 4,517 ppm y 4,340 ppm para el extracto de hoja y semilla respectivamente, en cuanto al método Soxhlet se reporta para el extracto de hojas y semillas valores de 2,715 y 4,076 ppm.

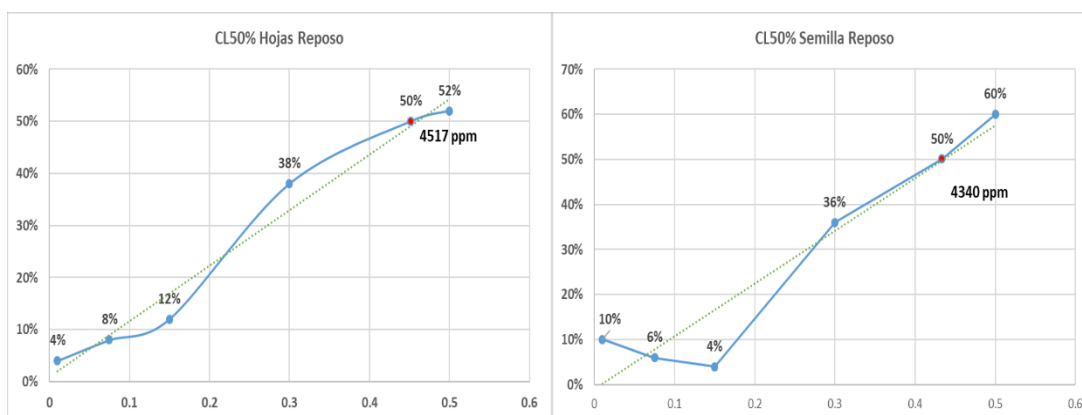


Figura 10. CL₅₀ por método de extracción de reposo (se contrasta porcentaje de mortalidad con concentración en porcentaje).

Sin embargo, los resultados de este estudio difieren de los obtenidos por Amariles *et al.*, (2013) que determinaron la concentración letal media de *Sapindus saponaria*, *Gliricidia sepium* y *A. muricata* (semilla), sobre dos cepas de *A. aegypti*. donde la CL₅₀ para cepas Rockefeller correspondió a 6.48 ppm y 7.24 para cepas silvestres. Jiménez y Prada (2016) reportaron que los extractos de *A. muricata*, fueron efectivos a una concentración de 90.16 ppm en comparación a los extractos de *Allium sativum*, cuya concentración letal fue de 2,000 ppm en un periodo de 48 horas.

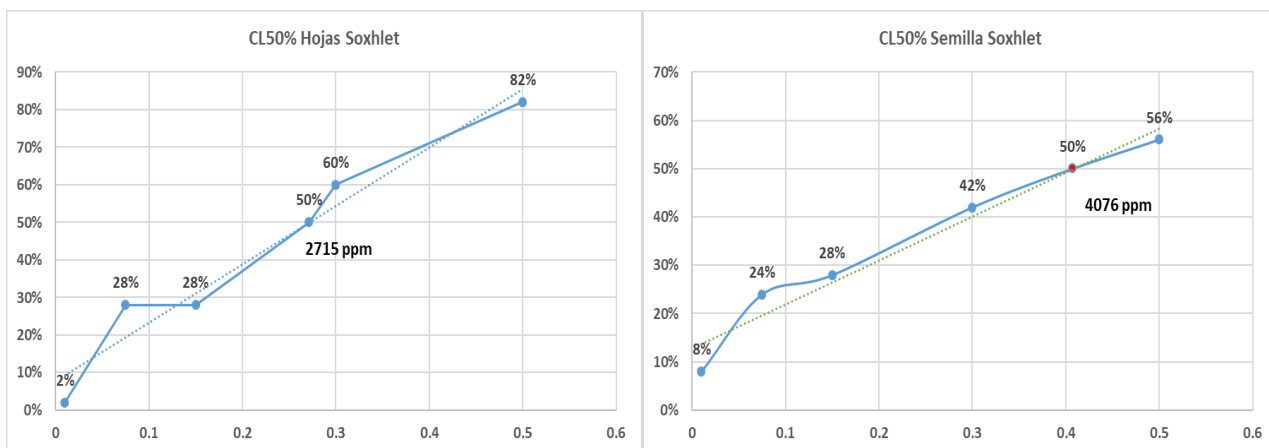


Figura 11. CL₅₀ método de extracción Soxhlet (se contrasta porcentaje de mortalidad con concentración en porcentaje).

Bobadilla *et al.*, (2005), cuya CL₅₀ para la matriz hoja correspondió a 8250 ppm en un periodo de 36 Horas. El extracto a base de semilla de guanábana presentó mejor actividad a una menor concentración y a un corto período de exposición, siendo la CL₅₀ de 20 ppm, en 24 horas. En este estudio se constata el efecto de los extractos de *A. muricata* sobre el tercer estadio larval de *A. aegypti*, valorando un rango de concentraciones amplias (100, 750, 1500, 3000, 5000 ppm) en un corto período de tiempo. Sin embargo, los resultados obtenidos difieren con otros estudios internacionales, aunque estas diferencias pueden estar asociadas a la concentración de compuestos activos (distintos a acetogeninas), el compuesto activo predominante (acetogeninas u otros metabolitos secundarios), la eficiencia del método de extracción, el tiempo de extracción, la concentración de acetogeninas en los órganos y la fisiología del vector, tal como describe Bobadilla *et al.*, (2005).

Capítulo V

5.1. Conclusiones

En base a las consideraciones anteriores, se concluye:

1. La composición proximal determinada para la muestra de harina de hojas de guanábana es: 90.46% de materia seca, 9.54% de humedad, 8.38% de cenizas y 3.86% de extracto etéreo, parámetros que difieren con referencias internacionales. Asimismo, se determinó la composición proximal de la muestra de harina de semillas de guanábana reportando: 96.16% de materia seca, 3.84% de humedad, 1.43% de cenizas, 32.46% de extracto etéreo. La diferencia existente en la composición proximal de las muestras depende no solo de la matriz (hoja o semilla) sino también de la procedencia de las mismas.

2. Se constata el efecto larvicida de los extractos de semilla y hoja de guanábana sobre el estadio larval III del *Aedes aegypti*, aunque su efectividad está en dependencia del método de extracción. Cabe mencionar que el efecto de la mortalidad larval en los grupos controles, se comportó de forma similar en los grupos agua y etanol, sin embargo, el grupo abate fue superior.

3. La CL_{50} se estimó con el análisis de regresión Probit utilizando las mortalidades totales. Para el método de reposo la CL_{50} fue de 4,517 ppm para el extracto etanólico de hojas, y 4,340 ppm para el extracto de semilla de guanábana. Para el método Soxhlet la CL_{50} fue de 2,715 ppm para el extracto de hoja y 4,076 ppm para semilla.

En general se puede concluir que la evaluación del efecto biocida de los extractos etanólicos de *A. muricata* L. sobre el tercer estadio larval del *A. aegypti* L. permitió confirmar su efectividad (incluso superior a la dosis del controlador químico establecido por la OMS), desestimando la influencia del medio y las condiciones por lo que se rechaza la hipótesis nula H_0 , y se acepta la hipótesis alterna H_a .

5.2.Recomendaciones

- A investigadores y estudiantes de la carrera de Biología, se recomienda ejecutar bioensayos para comparar el potencial biocida de órganos de *Annona muricata* L. que no han sido evaluados en estudios previos, ya que la presencia de compuestos activos está influenciada por el órgano de la planta utilizada (tallo, corteza, flores, hojas y semillas).
- A futuros estudiantes que realicen investigaciones de grado, realizar pruebas de campo para verificar la estabilidad y eficacia de dichos extractos, estandarizando una concentración letal, para el control de estadios larvales de *A. aegypti*. También se recomienda evaluar la efectividad de los extractos con los nuevos patrones y métodos de control establecidos por el MINSA.
- Al Laboratorio de Biotecnología, evaluar la toxicidad de *A. muricata* sobre otros organismos de importancia sanitaria o plagas de interés comercial., así como valorar el efecto de bio-acumulación en los organismos de prueba, así como aislar y caracterizar estructuralmente las acetogeninas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
- A investigadores y estudiantes de la carrera de Medicina, se recomienda ejecutar programas para la prevención de enfermedades asociadas al vector *Aedes aegypti* L. bajo el convenio marco de cooperación científico - técnico de la UNAN-Managua y la OPS/OMS.

5.3 Referencias bibliográficas

- Acosta, R y Díaz, B. (2016). Evaluación composicional, capacidad antioxidante de pulpa y cáscara de la *Annona muricata* (guanábana). (Tesis de pregrado inédita), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.
- Alfaro, J. (2017). Caracterización epidemiológica de la epidemia de dengue en el distrito seis de Managua Nicaragua 2015. (Tesis de Maestría inédita) Centro de Investigaciones y Estudios de la Salud (CIES), Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua), Managua, Nicaragua.
- Alonso, J. (2004). Tratado de fitofármacos y nutracéuticos. Argentina: Corpus.
- Amador, R. (1993). *Neurotoxic effects from organophosphate insecticide exposure in Nicaragua. Methodological and epidemiological studies*. Licenciante Thesis. Karolinska Institute. Stockholm, Sweden.
- Amariles, S., García, C y Parra, G. (2013) Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Díptera Culicidae. *Revista CES Medicina*. 27 (2), 193-203.
- Arroyo, A., Martínez, J., Ronceros, G., Palomino, R., Villareal, A., Bonilla, P., Palomino, C y Quino, M. (2009). Efecto hipoglucemiante coadyuvante del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento de glibenclamida. *Anales de la Facultad de Medicina*, 70(3),163-167.
- Association of Official Analytical (AOAC/1980) *Oficial Methods of Analysis* (13ed) Washington.
- Bartell, D., Beauliev, J. & Shewfett, R. (2010) Color, flavor, texture and nutritional quality of fresh- cut fruits , and vegetables: desirable levels, instrumental and

sensory measurement, and the effects of processing. *Crit. Rev. Food. Sci.* 50: 369-389.

Benavides, A. (s, f) Caracterización numérica de germoplasma de guanábana (*Annona muricata* L) muestreado in situ en el Pacífico y Norte de Nicaragua. *Revista científica LA CALERA*, 29-35.

Bendaña, F y Rodríguez, A. (2016). Vigilancia entomológica de larvas de *Aedes aegypti* L, mediante larvitrapas en el Recinto Universitario Rubén Darío. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. (UNAN-Managua), Managua, Nicaragua. Tesis de grado, 79.

Bioversity International CHERLA (2008) Descriptors for Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill). *International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI) Málaga-España, 1-49.

Bobadilla, M., Zavala, F., Sisniegos, M., Zavaleta, G., Mostacero, J y Taramona, L. (2005). Evaluación larvicida de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus (Guanábana) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Díptera: Culicidae). *Revista Peruana de Biología* 12(1); 145-152.

Bruhn, C. (2007) *Aspect of quality and food safety of interest to the consumer. In post-harvest technology of fruit and vegetable products.* University of California, Division of Agriculture and Natural resources, Oakland, USA.

Buñay, M y Cantos, J, (2017) Actividad larvicida del extracto de semilla de guanábana *Annona muricata* en mosquitos de *Aedes aegypti*. (Tesis de grado inédita) Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.

Carpio, T. (2007). *Turbiedad por nefelometría.* Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. República de Colombia, 1-9.

Castillo, J y Ramos J. (2016). *Evaluación de la eficacia temefos (Abate®) en condiciones de laboratorio y su utilidad en el control de larvas de Aedes aegypti, vector del dengue y Chikungunya en el barrio Bóer.* (Tesis de grado inédita) Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua), Managua Nicaragua.

Catastro e inventario de recursos naturales de Nicaragua. (1971). Levantamiento de suelos de la región del pacífico de Nicaragua. Parte 2. Descripción de suelos. Managua. NI. 2 v. 591 p.

Ceide, M. (2017). Diseño de un nuevo producto: té de hojas de guanábana, a través del estudio de la evidencia científica que justifica el desarrollo de un producto de estas características en el mercado ecuatoriano. Tesis de grado, UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ, Quito, Ecuador.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2019) National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). Dengue. Recuperado de <https://www.cdc.gov/dengue/index.html>

Conde, A. (2003). *Estudio de la longevidad y el ciclo gonotrofico del Aedes aegypti (Stegomyia) (Linnaeus, 1752) Cepa Girardot (Cundinamarca) en condiciones de laboratorio.* (Tesis de grado inédita) Universidad Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Cuello, M., Jaramillo, G., Canchingre, E., Pérez I, JC., Castro, C y Cabrero, O. (2017). Determinación de componentes nutricionales presentes en las hojas secas de *Annona muricata* L. Guanábana. *Revista Cumbres* 3(1) 09-16.

- Cuiñaz-Díaz, M., Durango, I., García, D y Niño, J (2015) Tolerancia de *Aedes aegypti* L, a un gradiente de pH y salinidad. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Tablada, Y. C. (2011). InfoStat versión 2011. 8, 195-199. Argentina. Recuperado el 27 de Febrero de 2016, de <http://www.infostat.com.ar>
- Eiman., Introini y Ripoll, C. (2016) Directrices para la prevención y control de *Aedes aegypti* Ministerio de Salud de la Nación República de Argentina.345.
- Espinoza, M. (2017) Aspectos clínicos de la infección por el virus Zika. *Revista Anales de la Facultad de Medicina*, 78(1) 79-82.
- Fasakin A, Fehintola, E., Obijole, O & Oseni, O (2008) Compositional analyses of the seed of sour sop, *Annona muricata* L., as a potential animal feed supplement. *Scientific Research and Essay*. 3 (10), 521-523.
- Flórez, Y y Martínez Muñoz, E. (2010). Obtención y evaluación de extractos bioactivos presentes en semillas de *Annona muricata* de la región cafetera. (Tesis de grado), Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Francia, A., Maciá, A. (2011) Efectos de la competencia larval en los mosquitos de contenedores artificiales, *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) en condiciones semi-controladas. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 70 (3),305-315.
- Fuentes, F., Mendoza, R, Rosales, A., Cisneros, R (2008) Guía de manejo y cuidado de animales de Laboratorio: Ratón. Centro Nacional de Productos Biológicos. Ministerio de Salud del Perú, Lima, Perú. Recuperado de:

http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIA_ANIMALES_RATIO.pdf

Gámez Rojas, C y Ramírez Riveros, E (2008). Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida ROUNDUP 747. Sobre ecosistemas acuáticos, mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. (Tesis de grado inédita), Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.

Gómez-Dantés, H., San Martín, J., Danis-Lozano, R y Manrique-Saide, P. (2011) La estrategia para la prevención y control integrado del dengue en Mesoamérica. *Salud Pública Mexicana* 53 (3) 349-357.

González, A. (2005) La familia Annonaceae en Chiapas y sus metabolitos. *Revista Ciencia y Tecnología en la Frontera* 2(3) 41-52.

González, R., Flores, M., Guerrero, E., Mendoza, R., Cárdenas, E., Aguirre, L y Cerna, E. (2013). Efecto insecticida de extractos vegetales, sobre larvas de *Culex tarsalis* (Díptera: Culicidae) en laboratorio. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4 (2); 273-284.

Goyenola, G (junio, 2007) Determinación del pH. Red de Monitoreo Ambiental Participativo de Sistemas Acuáticos.

Guerra, M y Poveda, J. (2016). Composición proximal y potencial insecticida de la semilla de *Annona muricata* L, para el control de *Spodoptera frugiperda* J.E Smith (Lepidóptera: Noctuidae), Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua). Managua, Nicaragua.

Hernández, L., Gómez, R y Agustín, J. (2013). *Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo de guanábano*. Instituto Nacional de

investigadores forestales, agrícolas y pecuarias. México. Libro Técnico Núm.345

Lannacone, J y Lamas G. (2002). *Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador Chrysoperla externa*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, Lima, Perú. 65,92-101.

Insecticide Resistance Action Committee, IRAC (Comité de Acción para la Resistencia a los Insecticidas). (2011). Clasificación del Modo de Acción de Insecticidas y Acaricidas IRAC. Recuperado de http://www.irac-online.org/content/uploads/modo_de_accion_Oct11.pdf

Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales, INETER. (2010). Departamento de estadística de meteorología. Managua, Nicaragua.

Jiménez, S y Prada, R. (2016) Control de larvas de cuarto estadio de *Aedes aegypti*, con extractos de éter de petróleo de *Allium sativum* (Ajo) y *Annona muricata* (Guanábana) en condiciones de laboratorio. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá- Colombia.

Kimbonguila, A., Nzikou, J., Matos, L., Loumouamou, B., Ndangui, C., Pambou-Tobi, N., Abena, A., Silou, Th., Scher, J & Desobry, S (2010). Promixate composition and physicochemical properties on the seeds and oil of *Annona muricata* grow in Congo-Brazzaville. *Journal of Environmental and Earth Sciences*, 2 (1),13-18.

Márquez-Siguas, M. (2014). Refrigeración y congelación de alimentos terminologías definiciones y explicaciones (Tesis de grado inédita) Universidad Nacional de San Agustín Arequipa, Perú.

Martínez, A., Galeano, E., Cadavid, J., Miranda, Y., Llano, J., y Montalvo, K. (2007) Acción insecticida de extractos etanólicos de esponjas del golfo de

Urubá, sobre larvas de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*. *Revista de la facultad de Química farmacéutica*, 14 (2), 90-94.

Martínez, E. (2008) Dengue. *Revista USP*, 22(64) 33-52.

Martínez, L y Torrado, Y. (2015). Fiebre Chikungunya. *Revista Cubana de Medicina*, 54 (1), 74-96.

Méndez, J. (2003). Perfil de mercado y productivo de la guanábana. Guatemala: Abt Associats Inc.

México, Centro Nacional de programas preventivos y control de enfermedades (2015). Guía para la instalación y mantenimiento del insectario de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Informe Técnico.

Montero, G. (2009). Biología del *Aedes aegypti*. 11(09), 4. Recuperado de http://www.produccion animal.com.ar/fauna/Fauna_insectos/79 Aedes_aegypti.pdf

Núñez, L y Vidaurre, J. (2015) Conocimientos, actitudes y prácticas sobre la prevención y control de dengue de habitantes entre los 14 a 45 años de edad del casco urbano de la ciudad de Somoto, Madriz. (Tesis de grado inédita) Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-Managua, Managua, Nicaragua.

Omosho, E., Iheagwam, F., Noiki, I., & Omini, J. (2018) Comparative study on chemical composition and antioxidant activity of *Annona muricata* plant parts cultivated in Covenant University, Ota, Ogun State, Nigeria. *Current Research in Nutrition and Food Science*. 6 (3), 807-815.

- Onimawo, I. (2001) Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of sour sop (*Annona muricata*). *Plant Foods for Human Nutrition*. 57, 165-171.
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Plan nacional de Nicaragua en el Marco del Plan Mesoamericano para mejorar la prevención y control del dengue. Recuperado de [http://www.proyectomesoamerica.org:8088/smsp/phocadownload/Institucional/PlanesNacionales/PNDengue/NIC PN Dengue.pdf](http://www.proyectomesoamerica.org:8088/smsp/phocadownload/Institucional/PlanesNacionales/PNDengue/NIC_PN_Dengue.pdf)
- Ortega, J. (2014) Estudio comparativo de métodos de extracción en la extracción de extractos promisorios con actividad larvicida contra el mosquito *Culex quinquefasciatus* a partir de residuos frutícolas. (Tesis de grado inédita, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia) Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/49625/1/53012495.042015.pdf>
- Parra, G., Cortez, K y Corradine, D. (2017). Efecto del extracto etanólico de semillas de *Annona muricata* (guanábana) para el control de larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus*. *Revista Intropica*, 12 (1); 23-30. doi: 10.21676/23897864.2034.
- Parra, G., García, C., Cotes, J (2007) Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector del Dengue en Colombia. *Revista CES Medicina* 21 (1), 47-54. Recuperado de <http://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/34>
- Patiño B., R.M (2001). Bionomía de *Aedes aegypti* L, vector del dengue, en el sur del estado de Jalisco, México. Tesis de posgrado Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey-Nuevo León, México.

- Peña, C., Carter, D y Ayala-Fierro, F. (2001). Toxicología ambiental, evaluación de riesgo y restauración ambiental. Southwest Hazardous Waste Program University of Arizona
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Repetto, M y Sanz, P. (1995). Glosario de términos toxicológicos. Asociación Española de Toxicología, España. Recuperado de <http://buscatox.com/05pub/Glosario%20terminos%20toxicologicos%20toxicologia%20Repetto.pdf>
- Reyes-Sánchez, N y Mendieta B. (2000). Determinación del valor nutritivo de los alimentos. Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Recuperado de <http://repositorio.una.edu.ni/3125/1/nq04r457.pdf>
- Rice, E., Baird, R., Eaton, A & Clesceri, L (2012) Standard Methods for the examination of water and waste water. Baltimore, Maryland Estados Unidos: Port City Press.
- Rodríguez, Rodolfo. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), 189-201.
- Romero, J y Altamirano, Y. (2013) Características clínicas de laboratorio de pacientes con dengue confirmado, Servicio de pediatría –Hospital Alemán Nicaragüense. (Tesis de grado inédita) Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. (UNAN-Managua), Managua, Nicaragua.
- Rossi, G y Almirón, W. (2004) Clave Ilustrada para la identificación de larvas de mosquito de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la

Argentina, Buenos Aires, Argentina. Recuperado de <https://www.mundosano.org/download/bibliografia/Monografia%205.pdf>

Rossi, G y Martínez M. (2013) Lista de especies y clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos (Diptera, Culicidae) halladas criando en recipientes artificiales en Uruguay. Boletín de la sociedad Zoológica del Uruguay (22): 2, 49-65. Recuperado de http://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/10192/CONICET_Digital_Nro.12666.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Rozo, A., Zapata, C y Bello, F. (2008) Evaluación del efecto tóxico de extractos de *Eupatorium microphyllum* L.F. (Asteraceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio. Revista Ciencias de la Salud 6 (2), 64-73. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732008000200006&lng=en&tlng=es.

Salas, J. (1993). Árboles de Nicaragua. Instituto Nicaragüense de Recursos Naturales y del Ambiente.

Salvatella Agrelo, R (1996). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (Díptera, Culicidae) y su papel como vectores en las américas. La situación de Uruguay. Revista Médica de Uruguay.12: 28-36. Recuperado de <http://www.rmu.org.uy/revista/1996v1/art5.pdf>

Sampieri, R., Fernández, C & Baptista, M. (2010). *Metodología de la Investigación*. McGraw-Hill; Sexta Edición. Interamericana Editores, S.A. México D.F; 736. ISBN: 978-1-4562-2396-0.

- Sanabria, L., Segovia, E., González, N., Alcaraz, P y Vera, N. (2009) Actividad larvívica de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). *Mem. Inst. Investig. Cienc.Salud.* 7(2),26-31.
- Sanchez, M., Haba, M., Guerrero, J., Garrido, A y Perez, D. (2011) Testing of a local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS Instrument. *Postharvest Biol Technol*, 60: 130-135.
- Schlie-Guzmán, M. A., González-Esquinca, A. R., y Luna-Cázares, L. M. (2009). Las Acetogeninas de Annonaceae: Efecto anti proliferativo en líneas celulares neoplásicas. *Boletín Latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 245-257.
- Stevens, W. D., Ulloa, C., Pool, A & Montiel, O. M. (2001). *Flora de Nicaragua*. Vol. 85, tomos I, II y III. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis Missouri.
- Tacán, M (2007). Caracterización agro morfológica e identificación de zonas potenciales de conservación y producción de guanábana (*Annona muricata*) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- Tórrez, U y Uriarte, E. (2003). Caracterización y evaluación preliminar in situ de 69 accesiones de guanábana (*Annona muricata* L.) en la región del Pacífico y Norte de Nicaragua. (Tesis De grado inédita) Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.
- Tovar, I. (2016) Fluctuación de *Aedes aegypti* (Linnaeus,1972), susceptibilidad a insecticidas y el efecto de atrayentes, para su posible manejo en Baja California Sur, México. (Tesis de posgrado inédita), Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Baja California Sur, México.

Usunobun, U., Okilie,N., Anyanwu,O y Adegbeji, A (2014) Phytochemical screening proximate composition of *Annona muricata* leaves. European Journal of Botany Plant Science and Pathology. 2 (1), 18-28. Recuperado de <http://www.eajournals.org/wp-content/uploads/Phytochemical-Screening-and-Proximate-Composition-Of.pdf>

Valente, B., y García, J. (2017) Fiebre amarilla: revisión concisa ante el actual escenario epidemiológico. *Revista Medicina Interna de México* 33 (5), 648-654.

Vit, P., Santiago, B y Perez-Perez, E. (2014) Composición química, actividad antioxidante de la pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata*. *Revista Interciencia* 39 (5), 350-353.

World Health Organization (1981). Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.

World Health Organization (2016). Determination of equivalence for public health pesticides and pesticide products, Geneva, Switzerland.

ANEXOS

Anexos

Anexo 1. Clasificación de las acetogeninas.

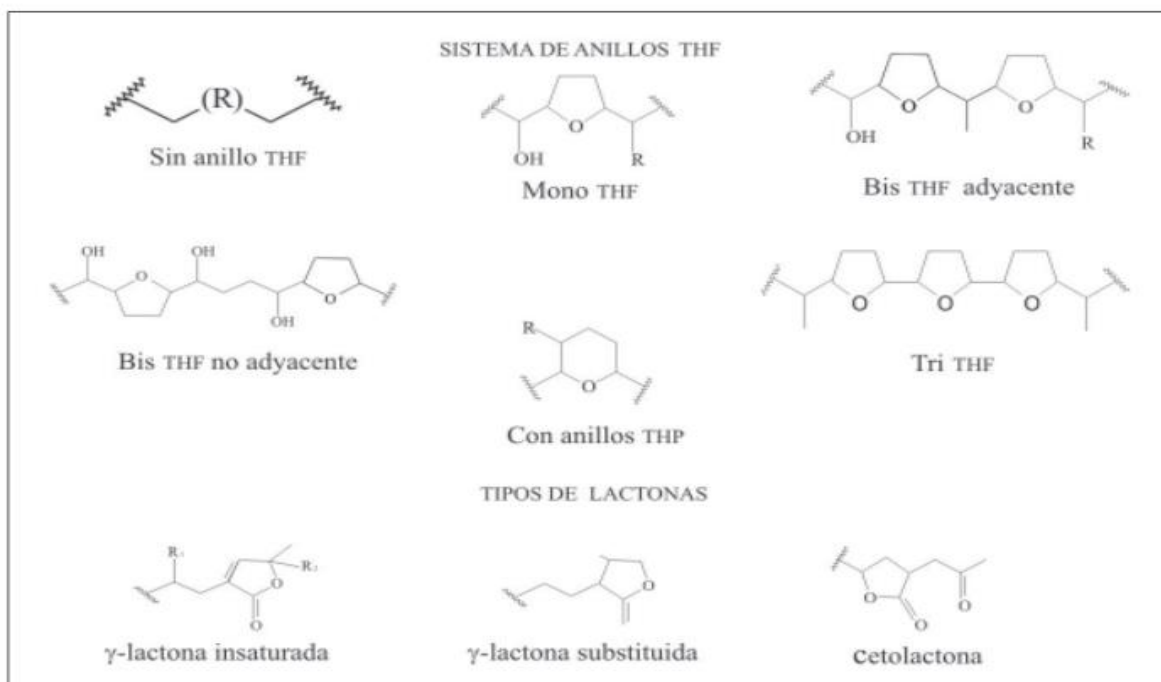


Figura 12. Clasificación de las acetogeninas según los anillos THF y el tipo de lactona terminal. Fuente: Gonzales (2005).

Anexo 2. Esquema de los componentes del estudio.

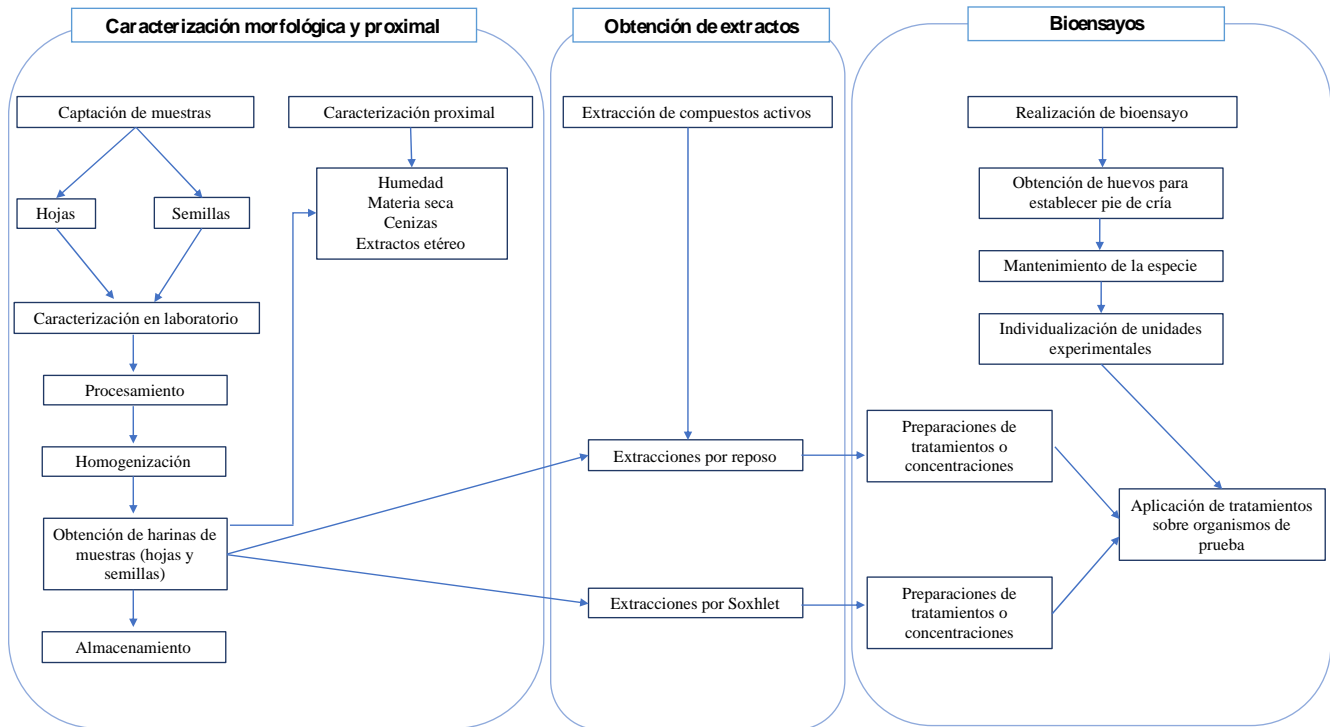


Figura 13. Resumen de los componentes y las etapas del estudio para determinar el potencial biocida de los extractos de hojas y semillas.

Anexo 3. Muestreo y procesamiento de las muestras.



Figura 14. Fase de recolección y obtención de las muestras.

- a) Árboles del CDT Campos Azules (INTA), sitio donde se realizó el muestreo.
- b) Traslado de las muestras a las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología.
- c) Obtención del fruto de guanábana en comercios locales de Managua.

Anexo 4. Procesamiento de las muestras de hojas de guanábana en el Laboratorio.

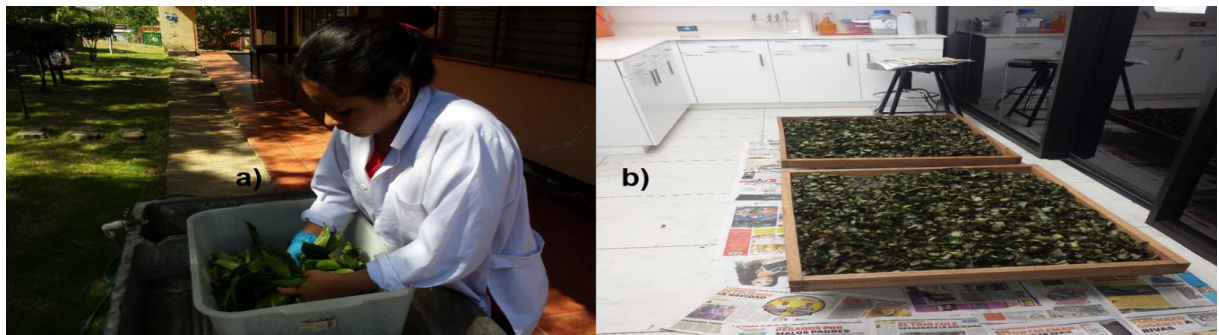


Figura 15. Procesamiento de la muestra de hojas.

- a) Lavado de hojas de guanábana. b) Secado a temperatura ambiente.

Anexo 5. Procesamiento de *Annona muricata* L. en Laboratorio.

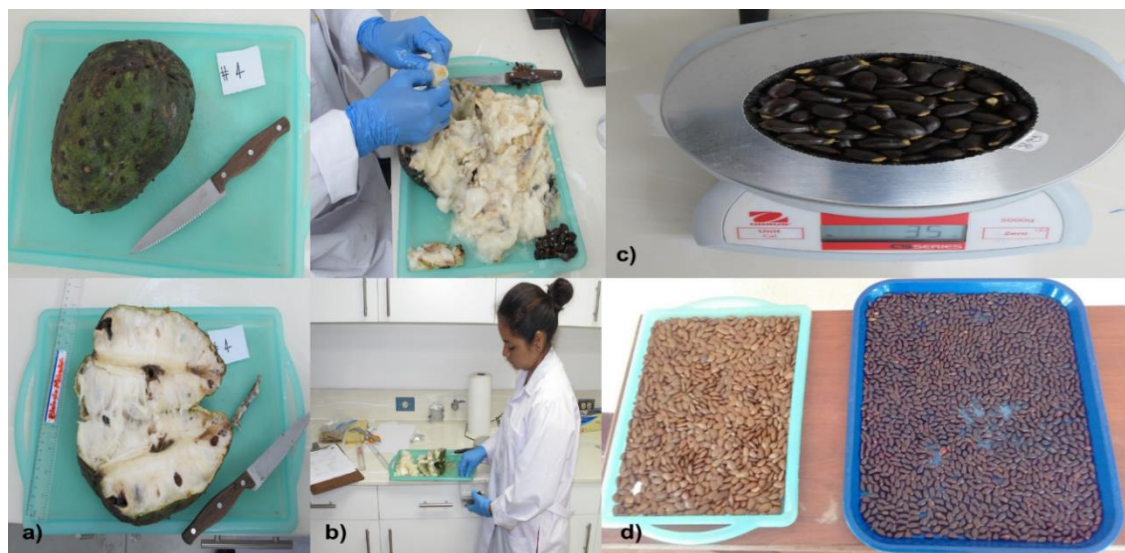


Figura 16. Extracción de semillas de guanábana.

- a) Descripción externa e interna del fruto de guanábana. b) Separación de las semillas de la pulpa. c) Pesaje del total de semillas de un fruto. d) Lavado y secado de las semillas para su procesamiento.

Anexo 6. Análisis proximal de las muestras de frutos y semillas de guanábana.

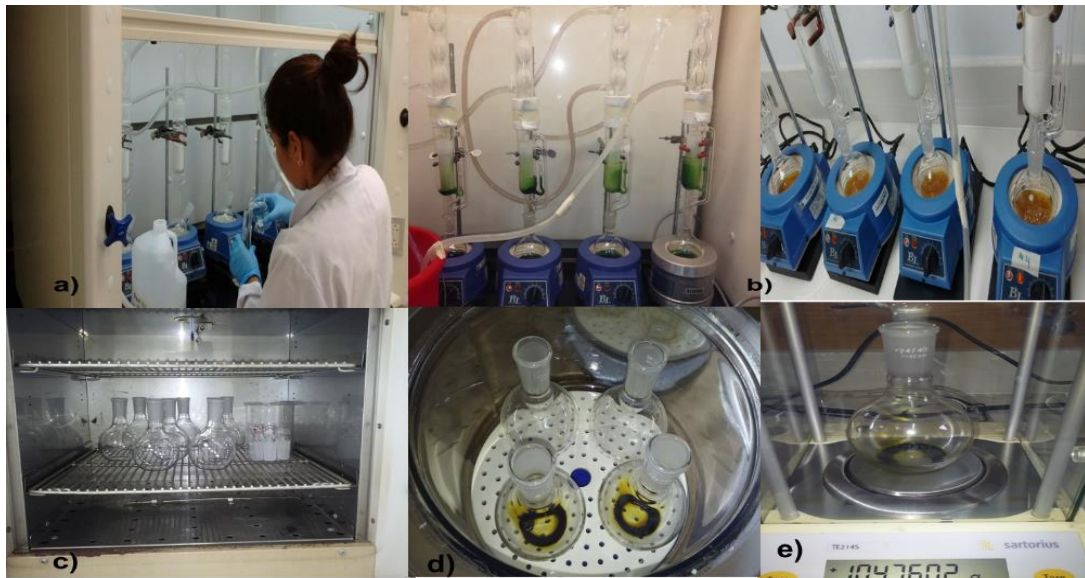


Figura 17. Composición proximal análisis de extracto etéreo.

- a) Preparación del equipo para análisis. b) Muestra de harina de hojas y de harina de semilla. c) Balones en horno tipo mufla. d) balones con extracto. e) Pesaje de balones para determinación del contenido grasas.

Anexo 7. Análisis de cenizas de las muestras de frutos y semillas de guanábana.



Figura 18. Análisis de cenizas.

a) muestras húmedas de hojas y de semillas. b) secado de muestra en horno tipo mufla. c) muestras de cenizas de las matrices en estudio. d) pesaje de la muestra calcinada.

Anexo 8. Obtención de extractos etanólicos por método de reposo.

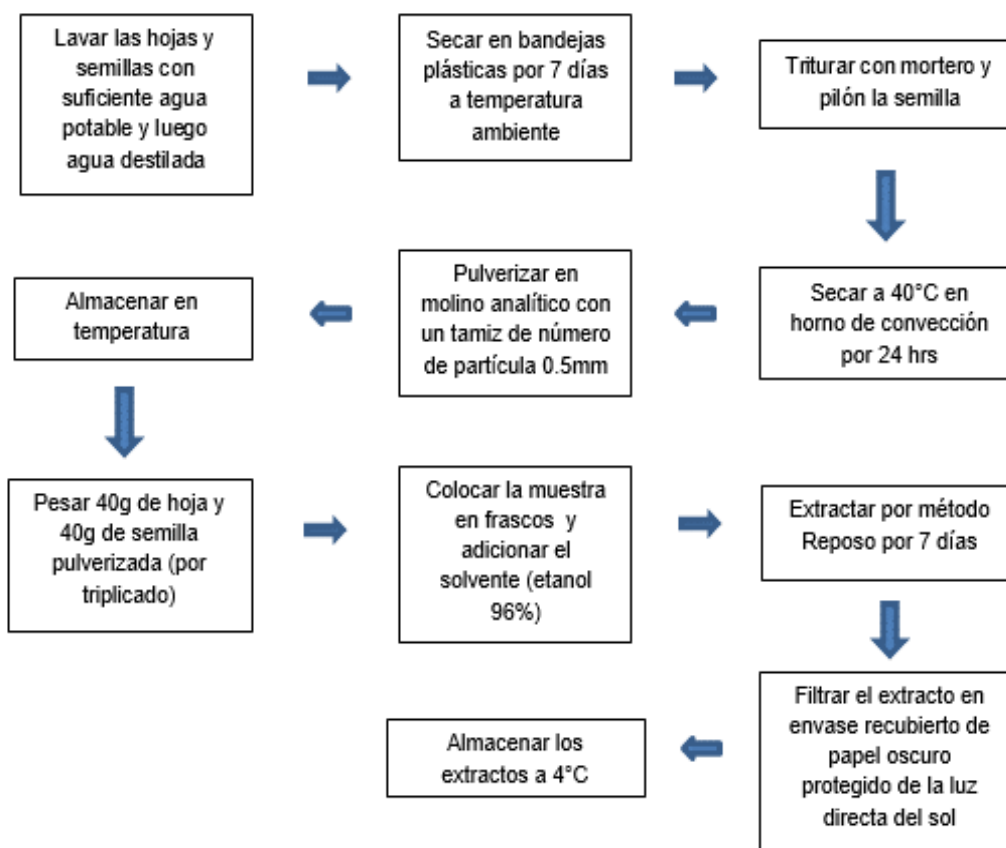


Figura 19. Flujograma del procesamiento de las muestras por el método de extracción por reposo.

Anexo 9. Obtención de extractos etanólicos de semilla por método de Soxhlet.

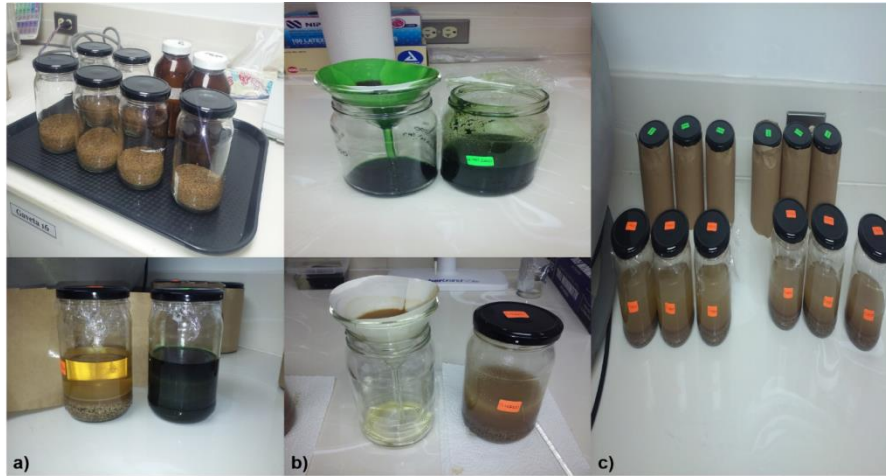


Figura 20. Método de extracción por reposo. a) Harina de hojas y de semillas con etanol al 96. b) Proceso de filtración de los extractos. c) Rotulación y almacenamiento de los extractos.

Anexo 10. Obtención de extractos etanólicos de hoja por método de Soxhlet.

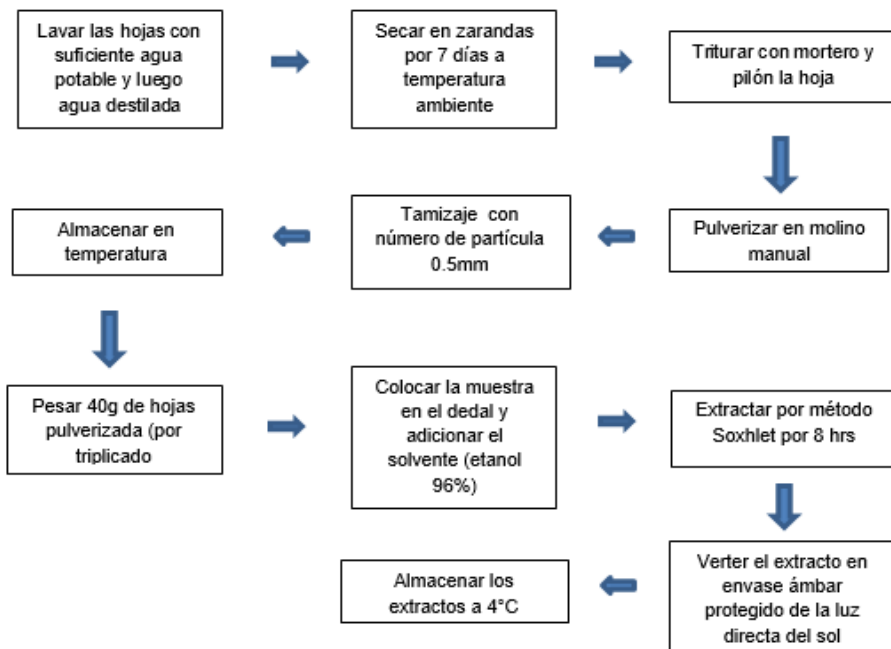


Figura 21. Flujograma del procesamiento de las muestras de hojas para la obtención de extractos etanólicos por el método de Soxhlet.

Anexo 11. Obtención de extractos etanólicos de semilla por método de Soxhlet.

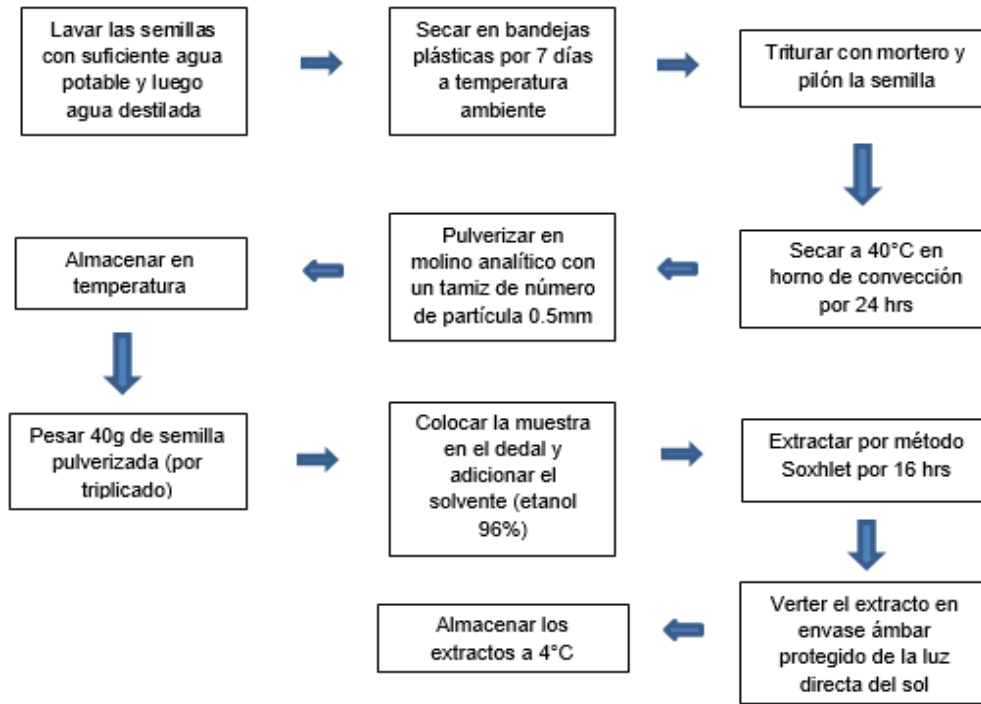


Figura 22. Flujograma del procesamiento de las muestras de semillas para la obtención de extractos etanólicos por el método Soxhlet.

Anexo 12. Método Soxhlet para obtención de extractos.

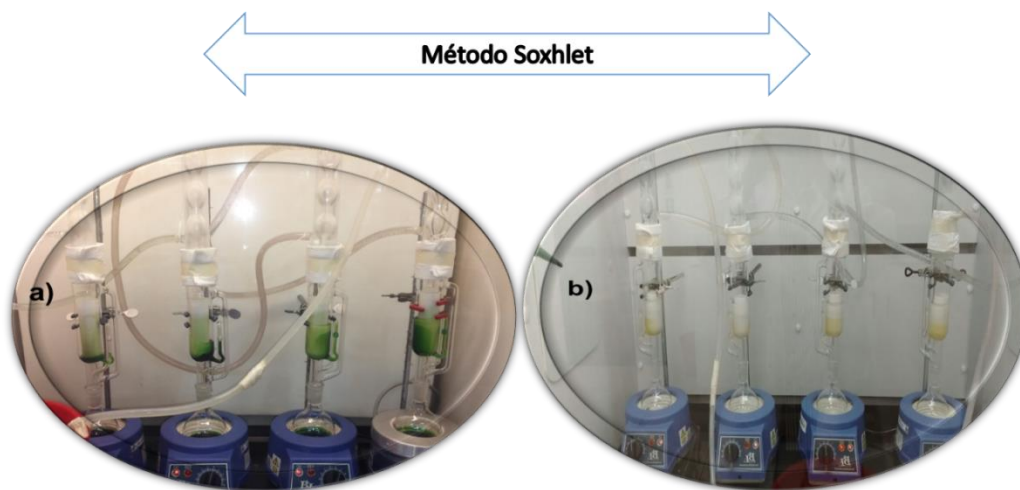


Figura 23. Método de extracción por Soxhlet. a y b) Obtención de extractos etanólicos por método de extracción Soxhlet de hojas y semillas de guanabana.

Anexo 13. Análisis de temperatura y pH (Milwaukee pH 55) del agua potable para el proceso de crianza de larvas de *A. aegypti*.

Procedimiento

- Calibrar el equipo previo a su uso según indicaciones del fabricante, una vez calibrado se realiza enjuague con agua desionizada para evitar errores de lecturas.
- Sumergir el electrodo en la solución a medir, se procede a esperar a que el equipo estabilice a lectura (el símbolo del reloj de arena se apaga).
- El equipo automáticamente mostrará los valores de pH en la pantalla (LCD principal) mientras que la temperatura se mostrará en el LCD secundario (parte inferior).
- Para apagar el equipo apretamos el botón on/off, el mensaje “OFF” aparecerá en el segundo display.

Nota:

- Calibrar el equipo.
- Realizar enjuagues al inicio de operaciones, después de cada lectura de solución y al final de operaciones.

Anexo 14. Medición de cloro libre y residual (Lamotte LTC 3000we) del agua potable para el proceso de crianza de larvas de *A. aegypti*.

Procedimiento

- Calibrar el equipo previo a su uso según indicaciones del fabricante.
- Limpiar la parte interior de las celdas enjuagándolas con agua desionizada, y la parte exterior con papel kleenex.
- Depositar la muestra a un volumen de 10 mL en la celda, adicionando la tableta no.1 (DPD), agitando por inversión durante 10 segundos.
- Introducir la celda en el equipo para obtener lectura de cloro libre.
- Retirar la celda del equipo y agregar la tableta No.2, agitar la muestra por 10 segundos, y llevarlo a lectura de cloro total.
- Obtenidos los resultados, se retiran las celdas del equipo, la muestra se descarta, y se enjuaga las celdas.
- Realizado el análisis, se apaga el equipo apretando el botón on/off,

Nota:

- Calibrar el equipo.
- Realizar enjuagues al inicio de operaciones, y después de los análisis.

Anexo 15. Equipos y reactivos requeridos para el análisis de cloro en agua.



Figura 24. Medición de cloro en agua.

- a) Kit de pastillas DPD utilizadas para la medición de cloro en agua potable. b) Muestras de agua. c) Lectura de cloro con el equipo LaMotte.

Anexo 16. Eclosión de huevos de *A. aegypti* L.

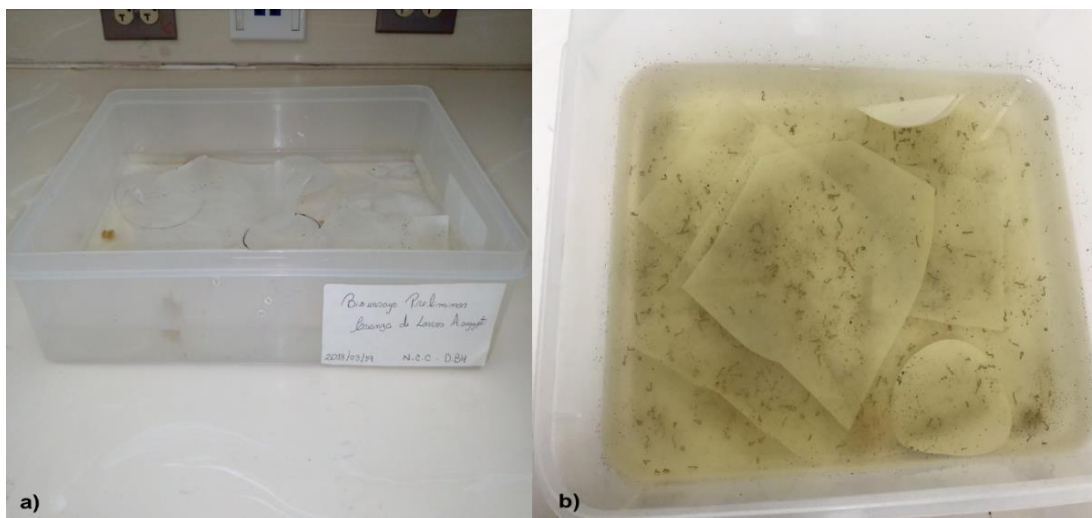


Figura 25. Obtención de pie de cría

- a) Masas de huevos puestas a eclosionar. b) Larvas obtenidas tras el proceso de eclosión.

Anexo 17. Visualización microscópica de larvas de *A. aegypti* L.

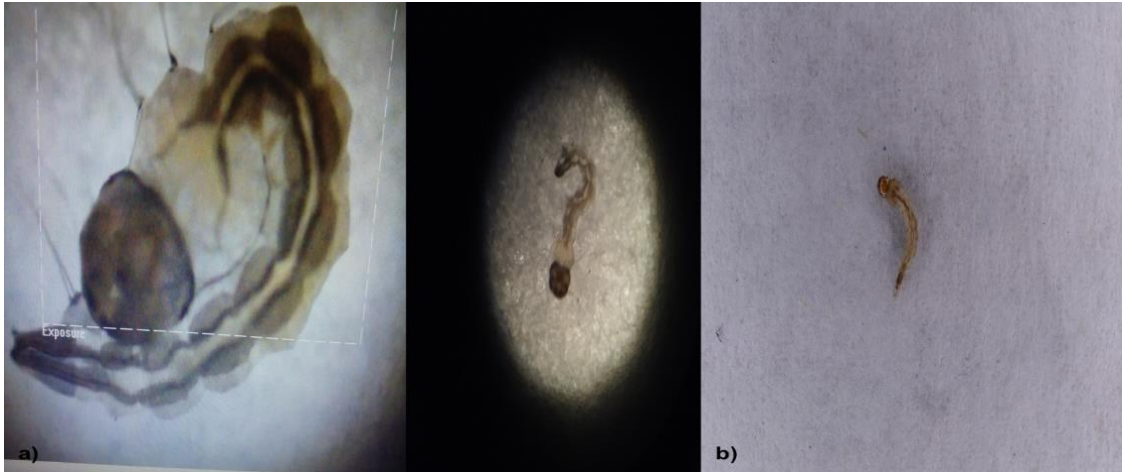


Figura 26. Identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario según claves dicotómicas para la identificación de la especie.

Anexo 18. Reproducción de larvas de *A. aegypti* L.

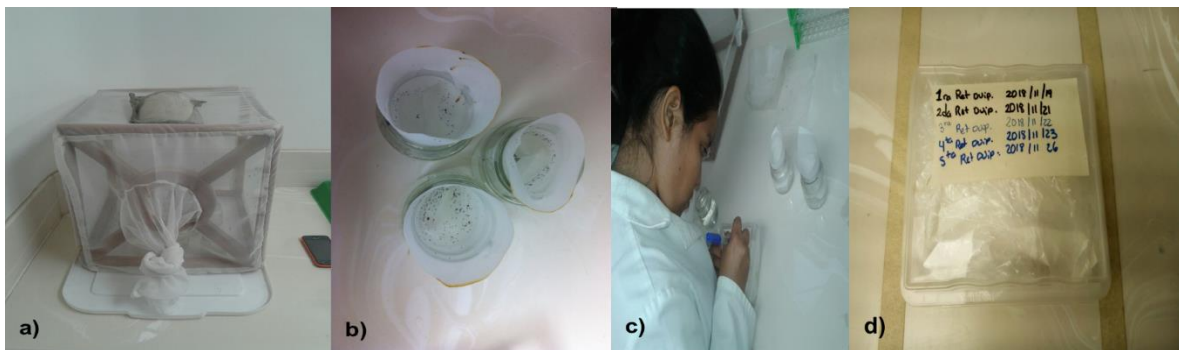


Figura 27. Proceso de reproducción en fase adulta.

- a) Cámara entomológica para reproducción de mosquito. b) Huevos obtenidos tras ovipostura. c) Rotulación de número de ovipostura recolectada. d) Almacenamiento de masa de huevos de *A. aegypti*.

Anexo 19. Proceso de alimentación de especímenes.

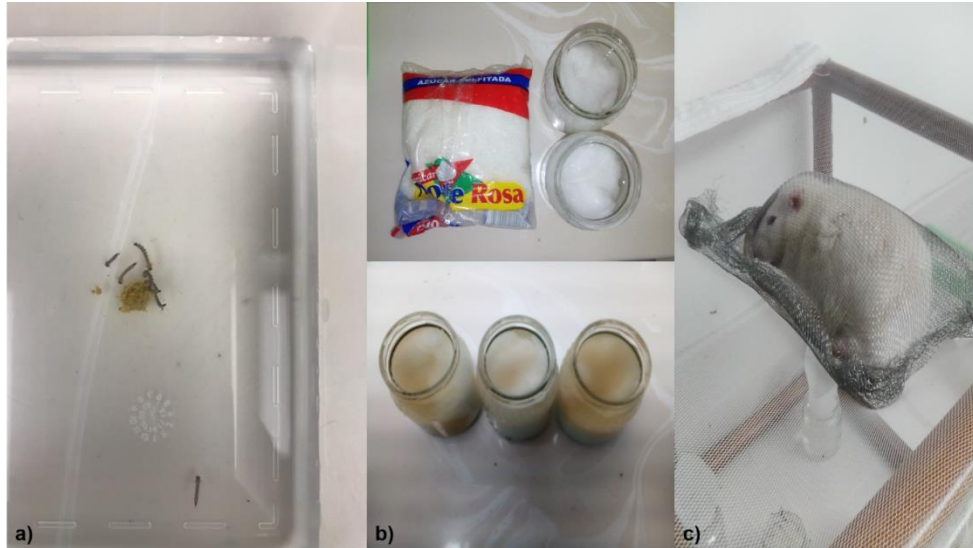


Figura 28. Proceso de alimentación de *A. aegypti* L.

- a) En etapa larval la alimentación consistió de concentrado para conejos. b) Alimentación del mosquito macho con solución azucarada. c) Comportamiento hematófago del mosquito hembra de *A. aegypti* L.

Anexo 20. Preparación para montaje y ejecución del bioensayo

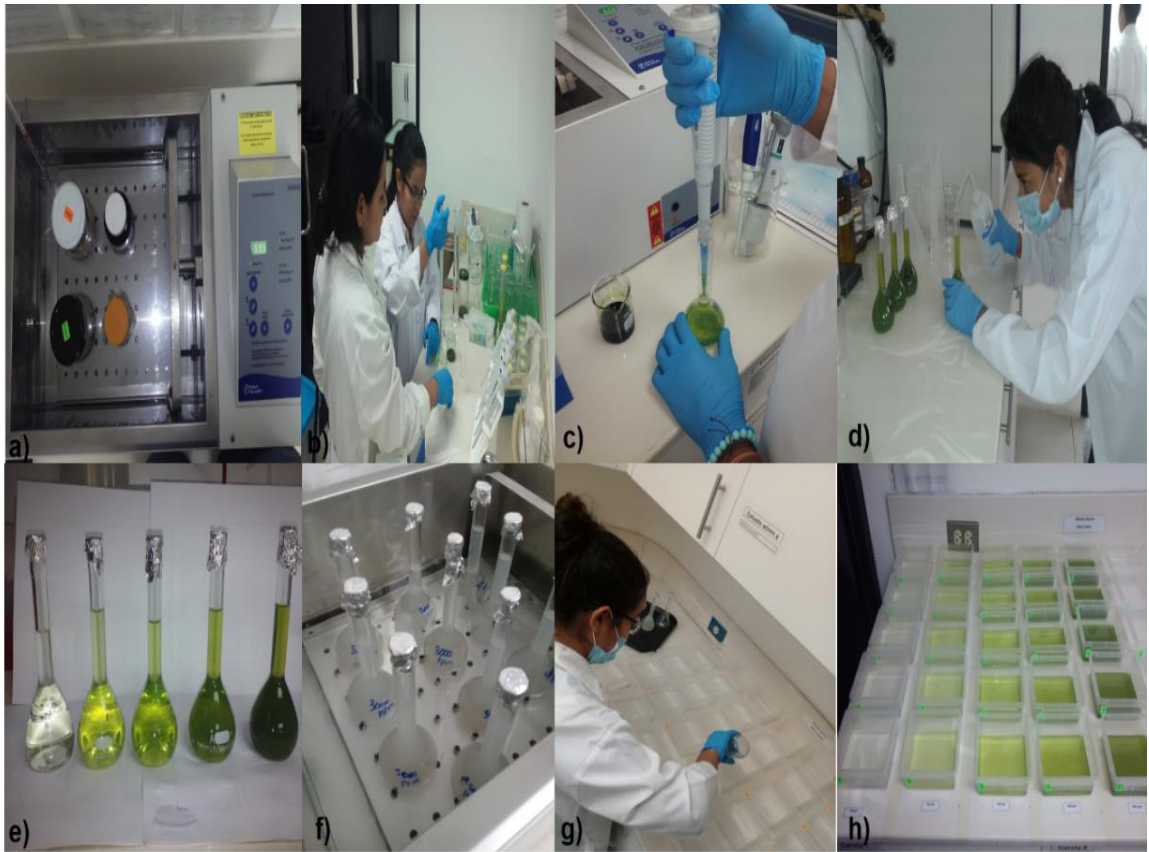


Figura 29. Preparación de los tratamientos evaluados en el bioensayo.

- a) Agitación y calentamiento de los extractos en baño maría con agitador. (b-c) Preparación de los tratamientos según las dosis evaluadas. d) Proceso de aforo a un volumen de 100 ml.
- e) Tratamientos en diferentes concentraciones 100, 750, 1500, 3000, 5000 ppm. f) Homogenización de la muestra, en baño maría con agitador. g) Incorporación de los tratamientos en recipientes.
- h) Tratamientos distribuidos por concentración y repetición.

Anexo 21. Concentraciones o tratamientos utilizados en el bioensayo.

Tabla 8. Tratamientos y grupos controles empleados en el bioensayo.

Concentración de tratamientos	Valor concentrado	Volumen de aforo	Solvente utilizado	Observaciones
100 ppm	38 μ l	100 ml	Etanol 96%	Agua desionizada utilizada para aforo. Proceso de agitación y temperatura (60°C), en baño maría por 10 minutos.
750 ppm	281 μ l	100 ml	Etanol 96%	
1500 ppm	562 μ l	100 ml	Etanol 96%	
3000 ppm	1,125 μ l	100 ml	Etanol 96%	
5000 ppm	1875 μ l	100 ml	Etanol 96%	
Abate*	0.01562 gr	100 ml	Abate	
Etanol*	1875 μ l	100 ml	Etanol 96%	

*Al abate no se le aplico temperatura, solo agitación en baño maría.

Anexo 22. Instrumentos utilizados para el monitoreo ambiental del bioensayo.

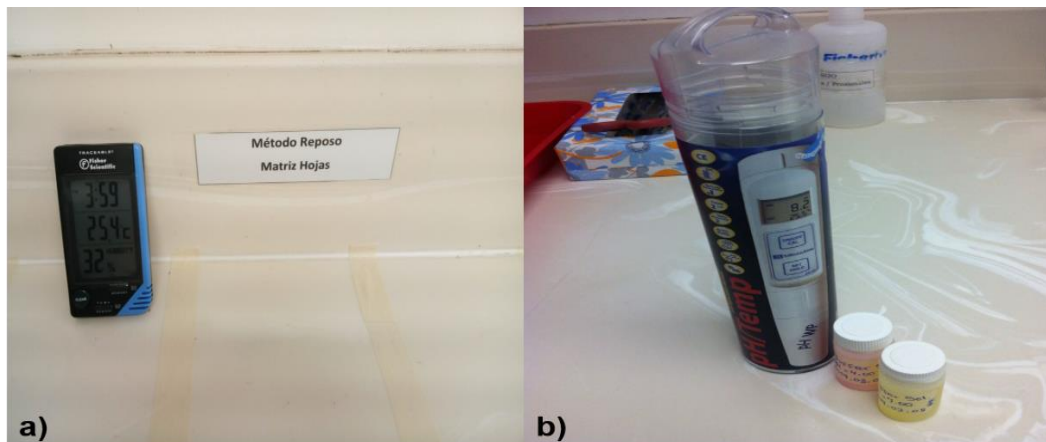


Figura 30. Equipos de medición utilizados durante el bioensayo.

- a) Higrómetro utilizado para la medición de la temperatura ambiental y la humedad relativa. b) Medidor de pH y temperatura utilizado para monitorear el medio.

Anexo 23. Monitoreo del bioensayo.

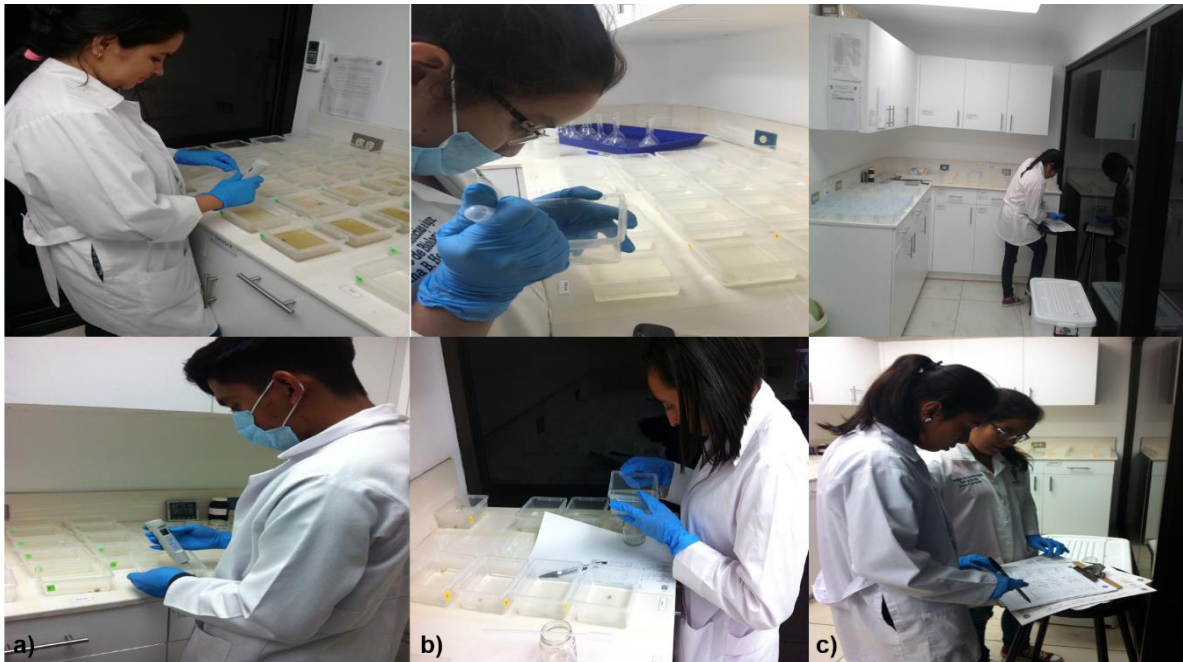


Figura 31. Monitoreo del bioensayo.

a) Verificación de pH y temperatura de los extractos. b) Conteo de individuos muertos. c) Verificación de los datos.

Anexo 24. Formato de recolección de datos de la mortalidad larval de los tratamientos y controles.



Laboratorio de Biotecnología
UNAN-Managua
Formato de Recolección de datos del Bioensayo
Actividad biocida de extractos de guanábana
(*Annona muricata* L.) en estadio III larval del mosquito *Aedes aegypti* L (Diptera: Culicidae)



Matriz: _____ Método: _____ Fecha: _____ Iniciales _____

Tiempo (horas)	08					M	16					M	24					M	32					M	MT
Dosis	I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V		
100 ppm																									
750ppm																									
1500ppm																									
3000ppm																									
5000ppm																									
Agua																									
Abate																									
Etanol																									

Tiempo (horas)	40					M	48					M	MT
Dosis	I	II	III	IV	V		I	II	III	IV	V		
100 ppm													
750ppm													
1500ppm													
3000ppm													
5000ppm													
Agua													
Abate													
Etanol													

Figura 32. Formato de recolección de datos de mortalidad larval.

Anexo 25. Formato de recolección de datos para el control del medio durante el bioensayo.



Laboratorio de Biotecnología UNAN-Managua

Evaluación de la actividad biocida de extractos de guanábana (*Annona muricata* L), en el III estadio larval del mosquito *Aedes aegypti* L (Diptera: Culicidae)



Formato Control del medio del bioensayo.

Número de lectura	Hora	Concentración ppm	T° C	pH	Iniciales
Observaciones:					

Figura 33. Formato de registro para el control del medio.

Anexo 26. Formato de recolección de datos para el control ambiental durante el bioensayo.



Laboratorio de Biotecnología UNAN-Managua

Evaluación de la actividad biocida de extractos de guanábana (*Annona muricata* L), en el III estadio larval del mosquito *Aedes aegypti* L (Diptera: Culicidae)



Formato Control ambiental del bioensayo.

Número de lectura	Hora	Temperatura ° C	Humedad relativa	Iniciales
Observaciones:				

Figura 34. Formato registro control ambiental durante el bioensayo.

Anexo 27. Comparación de la composición proximal de las muestras de semillas con respecto a muestras internacionales y nacionales.

Tabla 8. Comparación de la composición proximal en harina de semillas de *Annona muricata* L con muestra provenientes de otros países.

Parámetros proximales (%)	Kimbonguila <i>et al.</i> (2010)	Vit <i>et al.</i> (2014)	Onimawo (2002)	Guerra & Poveda (2016)	Este estudio
	Congo	Venezuela	Nigeria	Nicaragua	Nicaragua
Humedad	7.70	9.87	2.40	4.29	3.84
Cenizas	9.70	1.44	8.00	1.34	1.43
Extracto etéreo	40.00	25.75	47.00	31.14	32.46
Materia seca	92.30	90.13	97.60	95.71	96.16

Anexo 28. Comparación de la composición proximal de las muestras de hojas con respecto a muestras internacionales.

Tabla 9. Comparación de la composición proximal en harina de hojas de *Annona muricata* L con muestra provenientes de otros países.

Parámetros proximales (%)	Cuello <i>et al.</i> (2017)	Vit <i>et al.</i> (2014)	Este estudio
	Cuba	Venezuela	Nicaragua
Humedad	2.74	9.87	9.54
Cenizas	8.71	7.17	8.38
Extracto etéreo	8.48	2.94	3.86
Materia seca	97.26	90.13	90.46

Anexo 29. Controles de calidad de los parámetros proximales en harina de hojas de Guanábana.

Tabla 10. Controles de calidad de los parámetros proximales en harina de hojas de Guanábana.

Parámetros	Control de calidad	% RSD	% Recobro
Humedad	Muestra por duplicado	0.01	-
	Muestra enriquecida (agregado)	0.57	-
Cenizas	Muestra por duplicado	1.65	-
	Muestra por duplicado	1.65	-
Extracto etéreo	Muestra enriquecida	0.33	100.64
	Blanco enriquecido	1.01	99.92

Anexo 30. Controles de calidad de los parámetros proximales en harina de semilla de Guanábana.

Tabla 11. Controles de calidad de los parámetros proximales en harina de semillas de Guanábana.

Parámetros	Control de calidad	% RSD	% Recobro
Humedad	Muestra por duplicado	0.02	-
	Muestra enriquecida (agregado)	0.59	-
Cenizas	Muestra por duplicado	0.45	-
	Muestra por duplicado	0.45	-
Extracto etéreo	Muestra enriquecida	0.55	101.25
	Blanco enriquecido	1.02	101.65

Anexo 31. Evaluación físico- química y organoléptica del agua potable según normativa CAPRE.

Tabla 12. Evaluación físico- química y organoléptica del agua potable según normativa CAPRE.

Parámetro	Método	Resultado	Lm detección	Unidad	Norma CAPRE Valor Recomendado	Valor máximo permisible
Temperatura	Método potencio- métrico	27		° Celsius	18-30	
pH		7				
Cloro	Método DPD	1.6		Mg/L	0.5 a 1.0	5 mg/l *
Turbidez	Método nefelo- métrico	0.02 <LD**	0.05	UNT	1	5

*Este porcentaje de valor máximo depende de la normativa de los países tal como lo define Romo, M. (2001).

**El valor esta menor que el límite por eso se establece la desviación estándar cero.