

Extracción, análisis químico y bioactividad
de aceites esenciales de *Eucalyptus spp* y
sus principales componentes sobre *Aedes
aegypti* (Diptera, Culicidae)



Ing. Forestal. Msc. Alejandro Lucia

Directores:

Dr. Eduardo Zerba

Dr. Héctor Masuh

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencia y Tecnología Mención Química
Universidad Nacional de General San Martín
Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental

Marzo de 2010

Resumen

El mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) está considerado como uno de los principales vectores de los virus causantes de enfermedades virales, como el dengue y dengue hemorrágico. En ausencia de vacuna para la enfermedad, el control químico del vector es una de las principales herramientas para disminuir el riesgo de transmisión vectorial. El rociado espacial de insecticidas en el esfuerzo de controlar el mosquito adulto y el tratamiento focal para controlar los estadios inmaduros son las principales herramientas del control químico.

En la actualidad, en diversas partes del mundo se ha detectado resistencia a los insecticidas más utilizados como el organoclorado DDT, los organofosforados malatión y temefós y a piretroides en Cuba y Brasil presentándose casos de resistencia cruzada.

En este contexto, la búsqueda de nuevos principios activos de origen natural podrían ser una alternativa viable y desafiante que debe ser tenida en consideración para el estudio y desarrollo de nuevos productos para el control de *Aedes aegypti* y amigables con el ambiente. Este trabajo tiene como objetivo establecer un Aceite esencial (AE) de *Eucalyptus spp* o componente como principio activo adulticida o larvicida potencialmente formulable para el control del *Aedes aegypti* y de esta manera sentar las bases del desarrollo de insecticidas botánicos a partir de Aceites esenciales (AEs) de *Eucalyptus*.

En este trabajo se evaluó la actividad larvicida y adulticida (efecto de volteo) de AEs obtenidos de 28 especies del género *Eucalyptus* (myrtaceae). Asimismo se determinó las relaciones posibles entre la actividad de volteo y actividad larvicida de los AEs de las diferentes especies de *Eucalyptus* y la abundancia relativa de sus principales componentes. A partir de estas relaciones se obtuvieron modelos de regresión que explican en gran medida la actividad biológica de los AEs de *Eucalyptus* a partir de la concentración relativa de muy pocos componentes. Con el fin de validar estos modelos generados a partir de los primeros 13 AEs de *Eucalyptus*, se procedió a ampliar la cantidad de especies a un total de 28.

Por otro lado se evaluó la actividad biológica de los principales componentes de estos aceites (α -Pineno, β -Pineno, 1,8-Cineol, *p*-Cimeno, α -Terpineol y 4-Terpineol) y se determinaron las relaciones posibles con sus respectivas propiedades fisicoquímicas como la Presión de vapor y el Coeficiente de partición Octanol-Agua (Log P).

El AE de *Eucalyptus* utilizado inicialmente fue obtenido por hidrodestilación de material vegetal (Hojas frescas) recolectado de las siguientes especies; *E. saligna*, *E. grandis*, *E. dunnii*, *E. globulus ssp Maidenii*, *E. globulus ssp globulus*, *E. cinerea*, *E. sideroxylon*, *E. gunnii*, *E. viminalis*, *E. tereticornis*, *E. camaldulensis*, *E. grandis x tereticornis* y *E. grandis x camaldulensis*.

Las 13 especies fueron plantadas en una parcela experimental ubicada en el CIPEIN (CITEFA-CONICET) y a los 18 meses fueron cosechadas. Los AEs de las distintas especies de *Eucalyptus* se analizaron por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Para todos los bioensayos fue utilizada una cepa de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) originada en la cepa Rockefeller.

Para evaluar la actividad larvicida de los AEs y de sus principales componentes se aplicaron en soluciones acetónicas y como material biológico se utilizaron larvas correspondientes al estadio III o IV temprano de la cepa susceptible CIPEIN. La mortalidad se determinó a las 24 hs obteniendo según la metodología el valor de mortalidad promedio o la concentración letal media (CL₅₀ (ppm)).

Para evaluar la actividad adulticida (efecto de volteo), se desarrolló en el laboratorio una metodología para tal fin, se registró el número de mosquitos volteados para una dosis fija durante un tiempo determinado y con las observaciones se calculó el parámetro tiempo de volteo medio (TV₅₀ (min.)).

Los AEs utilizados para la validación de los modelos de predicción de la actividad larvicida y adulticida (*E. badjensis*, *E. badjensis x nitens*, *E. benthamii* var *Benthamii*, *E. benthamii* var *dorrigoensis*, *E. botryoides*, *E. dalrympleana*, *E. fastigata*, *E. nobilis*, *E. polybractea*, *E. radiata* ssp *radiata*, *E. resinífera*, *E. robertsonii*, *E. robusta*, *E. rubida* y *E. smithii*) se obtuvieron a través de la hidrodestilación de hojas frescas cosechadas de una plantación de *Eucalyptus* situada en la EEA Concepción del Uruguay (INTA).

El valor del coeficiente de partición octanol-agua para cada componente evaluado fue estimado a partir de la metodología de contribución de fragmentos y/o átomos, mientras que los valores de presión de vapor para los mismos componentes fue calculada experimentalmente a partir de datos cromatográficos obtenidos experimentalmente.

De los resultados se desprende que los AEs de *Eucalyptus* evaluados presentan una gran diversidad de componentes, siendo el 4-Terpineol, α -Terpineol, *p*-Cimeno, 1,8-Cineol y α -Pino los cinco componentes comunes a la gran mayoría de los aceites analizados. Pudiendo agruparse a las especies según el o los componentes que predominen con mayor abundancia. Siendo en muchos casos, el 1,8-Cineol el componente mayoritario.

El rendimiento en AE de las diferentes especies de *Eucalyptus* varió entre 0,21 y 2,48 % p/p, siendo *Eucalyptus cinerea* quien mostró el valor más alto. Se pudo determinar que a medida que el AE se hace rico en el componente 1,8-Cineol el rendimiento en AE es mayor.

Los valores de efecto de volteo fueron expresados como tiempo de volteo 50 % (TV₅₀ (min)) y oscilaron entre 4,19 y 12,03 min. El AE más efectivo fue el de *Eucalyptus viminalis*, mostrando un valor de TV₅₀ de 4,19 min. Se determinó que a medida que el AE de una especie de *Eucalyptus* se hace rico en el componente 1,8-Cineol el tiempo de volteo disminuye, indicando una mayor actividad volteante sobre *Aedes aegypti*. Estos resultados han sido validados satisfactoriamente por la posterior incorporación de 15 nuevos AEs de *Eucalyptus*, obteniendo de esta manera 2 modelos alternativos para estimar el efecto de volteo del AE de *Eucalyptus* a partir de la cantidad relativa del componente 1,8-Cineol en el mismo, Pudiendo estimar estos modelos el efecto de volteo del AE para un amplio rango de concentración relativa del 1,8-Cineol.

De la evaluación del efecto de volteo de los componentes individuales el 1,8-Cineol fue el componente más efectivo, ratificando estos resultados la importancia del mismo en la efectividad total del aceite.

Los valores de la actividad larvica oscilaron entre 20,98 y 100,60 ppm, siendo el AE más efectivo el de *Eucalyptus gunnii*, mostrando un valor de CL_{50} (ppm) de 20,98. La actividad larvica de los AEs de *Eucalyptus* depende fuertemente de la composición química de los mismos, siendo las especies más efectivas aquellas que tienen en su composición química baja concentración del componente 1,8-Cineol. Asimismo, se obtuvo un modelo que podría predecir valores de actividad larvica de AEs de *Eucalyptus* a partir de la concentración de tres componentes; *p*-Cimeno, 1,8-Cineol y α -Pino.

Estos resultados han sido validados satisfactoriamente por la posterior incorporación de 15 nuevos AEs de *Eucalyptus*, obteniendo de esta manera 2 modelos alternativos para estimar la actividad larvica de los AEs de *Eucalyptus* a partir de la cantidad relativa de los componentes *p*-Cimeno, 1,8-Cineol y α -Pino en el mismo.

De los resultados de la actividad larvica de los componentes comunes de los AEs de *Eucalyptus* se desprende que el γ -Terpineno fue el componente más efectivo, siendo el 1,8-Cineol el menos efectivos. Estos resultados ratifican aún más la tendencia anteriormente mencionada, la cual describe y en parte puede predecir el efecto larvica de los AEs de *Eucalyptus* tomando como variables predictoras a la cantidad relativa de los componentes 1,8-Cineol, *p*-Cimeno y α -Pino en el mismo.

Analizando la relación entre el efecto de volteo de los principales componentes de los AEs de *Eucalyptus* y su respectiva presión de vapor y Log P, se observó que la interacción de las 2 variables (Presión de vapor x Log P) está fuertemente relacionada con su efecto de volteo. Sin embargo, cuando se separaron los componentes en monoterpenos oxigenados e hidrocarburos terpénicos, los dos modelos explicaban el 99,85 % y el 97,44 de los resultados respectivamente.

Respecto a la actividad larvica de los monoterpenos, su correlación con el Log de P da lugar a un modelo que puede explicar el 94,95 % de la variabilidad de los datos. Cuando se evaluó el grupo de los hidrocarburos terpénicos se pudo establecer que este modelo explica el 98,91 % de la variabilidad de los datos, de acuerdo a esta correlación, a medida que aumenta la presión de vapor y disminuye el valor de Log P del componente, el valor de CL_{50} disminuye indicando una mayor actividad larvica sobre *Aedes aegypti*. Estos resultados sugieren la posibilidad de una cierta especificidad del blanco celular o molecular en que actúa cada grupo de estos compuestos. Este efecto toxico podría estar asociado a una interacción fisicoquímica en el blanco. Es interesante plantear como futura investigación el aumento de monoterpenos a evaluar, debido a las limitaciones que introducen en este análisis el bajo número de compuestos considerados.

Índice

Resumen	6-8
Abstract	9-11
1. Introducción	
1.1- Introducción general	12
1.2- <i>Aedes aegypti</i>	13-20
1.3- Evolución histórica de <i>Aedes aegypti</i> en la Argentina	21
1.4- Dengue	22-23
1.5- Historia del dengue en Argentina	24-26
1.6- Situación actual	27-28
1.7- Estrategias actuales en el control de <i>Aedes aegypti</i>	29-31
1.8- Innovación en estrategias de control	32-33
1.9- Productos Naturales - Aceites esenciales	34-40
1.10- Extracción de Aceites esenciales	41-44
1.11- El género <i>Eucalyptus</i> y sus Aceites esenciales	45-48
1.12- Composición química y propiedad insecticida de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus spp</i>	49-50
1.13- Modo y sitio de acción de aceites esenciales	
1.13.1- Neurotransmisores en Insectos	51-52
1.13.2- Actividad inhibitoria de Aceites Esenciales sobre la Acetilcolinesterasa	52-53
1.13.3- Actividad inhibitoria de Aceites Esenciales sobre sitios octopaminérgicos	54-55
1.13.4- Actividad inhibitoria de Aceites Esenciales sobre sitios GABA	55

1.14- Relación estructura-actividad	56
2. Objetivos de esta tesis	57
3. Materiales y Métodos	
3.1- Material Vegetal	58-60
3.2- Extracción y rendimiento de aceites esenciales	
3.2.1- Obtención del aceite esencial y características del proceso.	61-62
3.2.2- Equipo de hidrodestilación.	63-67
3.2.3- Determinación del rendimiento en aceite esencial	67
3.3- Análisis químico de los Aceites Esenciales	68-70
3.4- Productos químicos y sus propiedades físico-químicas	
3.4.1- Compuestos químicos	71-74
3.4.2- Estimación de los valores del coeficiente de partición Octanol/agua (Log p) de los principales componentes de aceites esenciales de <i>Euclayptus</i> .	75-83
3.4.3- Determinación de la Presión de Vapor de los principales componentes de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus</i> .	84-86
3.5- Material biológico.	87-88
3.6- Ensayo larvicida.	89-91
3.7- Ensayo Adulticida.	92-94
3.8- Validación de los modelos de predicción	
3.8.1- Plantación experimental de especies del genero <i>Eucalyptus</i> en la EEA - Concepción del Uruguay (INTA)	95-98
3.8.2- Extracción y composición química de los nuevos aceites esenciales	99
3.8.3- Ensayo larvicida y adulticida de los nuevos aceites esenciales	100
3.9- Procesamiento de los datos y análisis estadístico	101-105

4. Resultados y discusión

Sección 1

4.1- Análisis químico de los aceites esenciales.

4.1.1- Composición química del aceite esencial de <i>E. grandis x camaldulensis</i> .	106-107
4.1.2- Composición química del aceite esencial de <i>E. grandis x tereticornis</i> .	108-109
4.1.3- Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus grandis</i> .	110-111
4.1.4- Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus tereticornis</i> .	112-113
4.1.5- Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	114-115
4.1.6- Composición química del aceite esencial de <i>E. globulus ssp globulus</i> .	116-117
4.1.7- Composición química del aceite esencial de <i>E. globulus ssp maidenii</i> .	118-119
4.1.8- Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus viminalis</i> .	120-121
4.1.9- Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus cinerea</i> .	122-123
4.1.10- Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus sideroxylon</i> .	124-125
4.1.11- Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus dunnii</i> .	126-127
4.1.12- Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus gunnii</i> .	128-129
4.1.13- Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus saligna</i> .	130-131
Resumen de resultados y discusión de la sección 1	132-135

Sección 2

4.2- Cálculo del rendimiento en aceite esencial de las diferentes especies de *Eucalyptus* y su relación con la composición química del mismo.

4.2.1- Determinación de los valores de rendimiento en aceite esencial de las diferentes especies de <i>Eucalyptus</i> .	136-137
4.2.2- Asociación entre el rendimiento en aceite esencial y su composición química.	138-141

Sección 3

4.3- Cálculo y estimación de los parámetros Físico-Químicos de los principales componentes de los aceites esenciales de *Eucalyptus*.

4.3.1.- Cálculo de los valores de Presión de vapor de los principales componentes de los aceites esenciales de *Eucalyptus*. 142-143

4.3.2- Estimación de los valores del coeficiente de partición Octanol/agua (Log p) de los principales componentes de los aceites esenciales de *Eucalyptus*. 144-149

Sección 4

4.4- Efectividad adulticida de los Aceites esenciales de *Eucalyptus spp* y de sus principales componentes sobre *Aedes aegypti*, asociación con su composición química.

4.4.1- Efectividad adulticida de los aceites esenciales de las diferentes especies de *Eucalyptus*. . 150-151

4.4.2- Asociación entre el efecto de volteo de los aceites esenciales de *Eucalyptus* y su composición química. 152-160

4.4.3- Efectividad adulticida de los aceites esenciales de las nuevas especies de *Eucalyptus* utilizadas para la validación de los modelos. 161-162

4.4.4- Validación del modelo predictivo para estimar la efectividad adulticida de los aceites esenciales de *Eucalyptus*. 163-167

4.4.5- Efectividad adulticida de los principales componentes de los aceites esenciales de *Eucalyptus*. 168-169

Resumen de resultados y discusión de la sección 4 170-174

Sección 5

4.5 - Efectividad larvica de los Aceites esenciales de *Eucalyptus spp* y de sus principales componentes sobre *Aedes aegypti*, asociación con su composición química. 175-177

4.5.1- Efectividad larvica de los aceites esenciales de las diferentes especies de *Eucalyptus*. 178-185

4.5.2- Asociación entre la actividad larvica de los aceites esenciales de *Eucalyptus* y su composición química. 186-187

4.5.3- Efectividad larvica de los aceites esenciales de las nuevas especies de *Eucalyptus* utilizadas para la validación de los modelos. 188-192

4.5.4- Validación del modelo predictivo para estimar la efectividad larvica de los aceites esenciales de *Eucalyptus*. 193-194

4.5.5- Efectividad larvica de los principales componentes de los aceites esenciales de *Eucalyptus*.

Resumen de resultados y discusión de la sección 5 195-196

Sección 6

4.6- Asociación entre el efecto de volteo y la actividad larvica de los principales componentes de los aceites esenciales de *Eucalyptus spp* y sus respectivas propiedades físico-químicas.

4.6.1- Asociación entre el efecto de volteo de los principales componentes de los aceites esenciales de *Eucalyptus* y sus propiedades físico-químicas. 197-211

4.6.2- Asociación entre la actividad larvica de los principales componentes de los aceites esenciales de *Eucalyptus* y sus propiedades físico-químicas. 212-220

Resumen de resultados y discusión de la sección 6 221-223

5. Conclusiones generales y futuras investigaciones 224-228

6. Bibliografía 229-242

7. Apéndice 242-260