

Nota científica

Efectos ovicida y larvicida del spinosad en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)Ovicidal and larvicidal effects of spinosad in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)ANA L. ARGUETA¹, JAVIER VALLE² y CARLOS F. MARINA³

Resumen: Se evaluaron los efectos ovicida y larvicida del spinosad (Tracer 480SC) en *Aedes aegypti* a concentraciones de 0,1, 5 y 10ppm, a diferentes tiempos de exposición en condiciones controladas de temperatura (25±1°C). En el primer experimento se observó un efecto ovicida bajo (promedio 6,6-8,2% de no eclosión y periodos de 12 a 96h de exposición) y en el segundo un efecto mediano (promedio 27,9-31,9% de no eclosión expuestos a spinosad de 1 a 12 semanas). La mortalidad de larvas se incrementó significativamente a mayor concentración de spinosad (100% a 10ppm a 6h) y a mayor tiempo de exposición (99,9% a 1ppm a 12h). Este bioinsecticida puede ser una buena herramienta para el control de inmaduros de insectos vectores como el mosquito *A. aegypti* por sus características insecticidas y el bajo impacto sobre organismos no blanco y la salud humana. Está claro que su potencial en el control de vectores reside en su efecto larvicida más que en su actividad ovicida.

Palabras clave: Control de vectores. Mortalidad. Toxicidad. Dengue.

Abstract: The ovicidal and larvicidal effects of spinosad were studied in *Aedes aegypti* treated with concentrations of 0.1, 5 y 10 ppm spinosad (Tracer 480SC) during different periods of exposure at a constant temperature of 25±1°C. In a first experiment the ovicidal effects were low (6.6-8.2% of non-eclosion averaged over 12-96h exposure periods), whereas in a second experiment ovicidal effects were moderate (27.9 - 31.9% of non-eclosion in eggs exposed to spinosad suspension of 1-12 weeks old). Mortality of larvae increased significantly with increasing concentration and increasing duration of exposure to this product. Although spinosad has clear applications as a mosquito control product for control of vectors such as *A. aegypti*, it is clear that its vector control potential resides in its larvicidal effects rather than its ovicidal activity.

Key words: Vector control. Mortality. Toxicity. Dengue.

Introducción

El mosquito *Aedes aegypti* (L., 1758) es considerado el principal vector del dengue en el continente Americano. Sin embargo, se sospecha que *A. albopictus* (Skuse, 1894) puede ser un vector secundario, aunque no ha sido involucrado de manera fehaciente en la transmisión de la enfermedad (San Martín *et al.* 2010). El principal método de control de estos vectores es a través de la aplicación de insecticidas químicos, principalmente organofosforados y piretroides de amplio espectro. Sin embargo, el uso excesivo de los insecticidas puede provocar daños a la salud de los seres humanos y al ambiente (Attaran *et al.* 2000; Walker 2000). Por otra parte, un número importante de especies vectores ha desarrollado resistencia hacia los insecticidas sintéticos (Sina y Aultman 2001), por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera necesario el desarrollo de métodos alternativos de control de estos insectos (WHO 1995).

El spinosad, es un bioinsecticida producto de la fermentación del actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz y Yao, 1990). Este bioinsecticida ha demostrado ser altamente tóxico para larvas de *A. aegypti* y otros mosquitos en experimentos de laboratorio y campo (Hertlein *et al.* 2010). Sin embargo, los efectos ovicidas del spinosad no han sido determinados de manera clara (Romi *et al.* 2006; Pérez *et al.* 2007). Debido a esto, Hertlein *et al.* (2010) sugieren realizar nuevos estudios para corroborar la actividad ovicida del spinosad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar el efecto

ovicida y larvicida del spinosad en huevos de *A. aegypti* en varias concentraciones y tiempos de exposición a través de bioensayos en laboratorio.

Materiales y Métodos

Los huevos de *A. aegypti* se obtuvieron de una colonia aislada y establecida en 2006 en el Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP) en Tapachula, Chiapas; México. Larvas de esta colonia registraron susceptibilidad de 100% en bioensayos realizados en el laboratorio acorde al protocolo estándar (WHO 2005). Por otra parte, otras cepas de *A. aegypti* originarias de Tapachula han registrado susceptibilidad a piretroides (Saavedra-Rodríguez *et al.* 2007). La edad máxima de los huevos en los experimentos fue de 15 días. Los huevos y las larvas se mantuvieron en condiciones controladas a una temperatura de 25±1°C. Las larvas se alimentaron con una dieta compuesta a base de proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y cenizas. La suspensión de spinosad que se utilizó fue una formulación comercial (Tracer 480SC), con ingrediente activo de 480g/L. Para el primer experimento lotes de 200 huevos de *A. aegypti* se expusieron en volúmenes de 100ml, a concentraciones de 0,1, 5 y 10 ppm de spinosad en vasos de plástico de 150ml, por tiempos de exposición de 12, 24, 48 y 96h. En los tiempos de exposición de 48 y 96h se realizaron observaciones cada 24h para registrar la eclosión de huevos y emergencia de larvas de aquellos que permanecían sin eclosionar durante las primeras 24 h de experimen-

¹ Licenciada Química Farmacobióloga. Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Químicas. Tapachula Chiapas 30700, México. ² M. Sc. ECOSUR. Tapachula Chiapas 30700, México. ³ Ph. D. Centro Regional de Investigación en Salud Pública - INSP, Tapachula Chiapas 30700, México. jmarina@insp.mx Autor para correspondencia.

tación. En el segundo experimento se prepararon las mismas concentraciones de spinosad, las cuales permanecieron en el laboratorio a una temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ desde el inicio hasta el final del experimento que constó de 12 semanas. Cada semana, lotes de 200 huevos de *A. aegypti* se expusieron por 24h a dichas concentraciones. Después del periodo de exposición, los huevos se sometieron a un lavado para eliminar los residuos de spinosad. Los lotes de huevos expuestos al spinosad se sumergieron por tres minutos en un recipiente conteniendo 100ml de agua. Este paso se realizó cuatro veces. Después, los lotes de huevos se pusieron a eclosionar en agua de clorada por 48h. Luego se registró el número de huevos eclosionados. Las larvas que eclosionaron se criaron por 48h para registrar la sobrevivencia en cada tratamiento.

Se realizaron cuatro repeticiones de cada experimento. Los promedios de la proporción de huevos de mosquitos que no eclosionaron fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores. Uno de los factores fue la concentración del spinosad y el otro el tiempo de exposición de los huevos. Las comparaciones múltiples se hicieron a través de la prueba de Tukey. Debido a que en el primer experimento no hubo una interacción positiva entre las concentraciones y el tiempo, las comparaciones se hicieron con los promedios generales de los tratamientos. Para normalizar la distribución de los porcentajes de huevos no eclosionados, los datos fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. El número de larvas sobrevivientes fue analizado a través de un modelo de regresión logística tipo Probit con estructura de error binomial para verificar las diferencias estadísticas entre los diversos tratamientos. En este modelo una de las covariables fue el logaritmo de la concentración +1 y la otra fue el logaritmo del tiempo. Los datos influyentes fueron detectados mediante un análisis de residuales y excluidos de los análisis posteriores debido a que alteraban los supuestos de normalidad e igualdad de varianza. En el segundo experimento se excluyó una repetición de spinosad a 10ppm en la semana cinco que tuvo 79% de huevos no eclosionados y en la semana siete una repetición de la concentración a 1ppm y otra de 5ppm que tuvieron 66 y 54% de no eclosión respectivamente.

Resultados y Discusión

En el primer experimento hubo huevos no eclosionados en todos los tratamientos (Tabla 1). El promedio más bajo del porcentaje de huevos que no eclosionaron se registró en el control con 2,5% y fue significativamente menor a los promedios registrados en los tratamientos de spinosad (6,6–8,2%) ($F_{3;48}=4,36$; $P=0,007$). No se encontraron diferencias significativas al contrastar los tiempos de exposición ($F_{3;48}=0,76$;

$P=0,5$). Por otra parte, se observó que la mortalidad de larvas se incrementó significativamente a mayor concentración de spinosad ($\chi^2=10,294,5$; $gl=1$; $P<0,0001$). También se observó que a mayor tiempo de exposición la mortalidad de las larvas se incrementó significativamente ($\chi^2=2,063,5$; $gl=1$; $P<0,0001$).

En el segundo experimento se observaron proporciones de huevos no eclosionados más altos que en el primer experimento. Sin embargo, las proporciones de huevos no eclosionados fueron significativamente mayores en los tratamientos de spinosad comparados con el tratamiento control ($F_{3;141}=63,5$; $P<0,0001$). Asimismo, se observaron diferencias significativas en las proporciones de huevos no eclosionados con respecto al tiempo ($F_{11;141}=95,4$; $P<0,0001$). Estas diferencias se registraron entre la segunda y octava semana, y en la décima semana del experimento (Tabla 2). Por otra parte, la mortalidad de larvas *A. aegypti* fue del 100% en las tres concentraciones de spinosad durante las primeras semanas del experimento. Sin embargo, la mortalidad decreció a partir de la cuarta semana en el tratamiento spinosad a 1ppm y en la séptima a 5ppm, en tanto que a 10ppm la mortalidad se mantuvo a 100% durante todo el experimento ($\chi^2=124,8$; $gl=1$; $P<0,0001$). La mortalidad de las larvas en los tratamientos de spinosad fue significativamente dependiente de la concentración del bioinsecticida ($\chi^2=21,594,9$; $gl=1$; $P<0,0001$).

Los resultados de este estudio demuestran que el spinosad tiene un ligero efecto ovicida en *A. aegypti*. Sin embargo, difieren con los obtenidos por Romi *et al.* (2006) quienes observaron en colonias de mosquitos establecidas por más de 30 años que huevos de *A. aegypti* tratados con spinosad a 10 y 1ppm bajo condiciones controladas el 71,5 y 81,5% de los huevos respectivamente, no eclosionaron. Asimismo, observaron que el mayor porcentaje de huevos no eclosionados (85,0%) fue en el tratamiento de 50 ppm que representa una concentración extremadamente alta. También reportaron un 100% de efecto ovicida en huevos de *Anopheles stephensi* (Liston, 1901).

En contraste, Pérez *et al.* (2007) no observaron diferencias significativas en el porcentaje de eclosión de huevos de *A. aegypti* de la cepa Rockefeller expuestos en condiciones controladas a 5 y 20ppm de spinosad. Las diferencias encontradas en los resultados de estos estudios pueden ser debidas a varios factores. Es posible que las cepas de las cuales provienen estas poblaciones de mosquitos difieren en el grosor o consistencia de las capas de protección de los huevos como la cutícula serosa, el exocorión y el endocorión, las cuales les confieren diferente susceptibilidad. La cutícula serosa de huevos en *A. aegypti* está compuesta por quitina y está asociada con la resistencia a la desecación y su impermeabilidad puede impedir el paso del spinosad (Rezende *et al.* 2008).

Tabla 1. Porcentaje promedio de huevos de *A. aegypti* no eclosionados expuestos a concentraciones de spinosad a 1,5 y 10ppm a diferentes tiempos de exposición, bajo condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$).

	Tiempo (horas)				Promedio
	12	24	48	96	
Control	1,4 \pm 1,0	2,1 \pm 0,8	3,9 \pm 0,3	2,7 \pm 1,1	2,5 \pm 0,5 ^b
Spinosad 1 ppm	6,1 \pm 0,8	9,7 \pm 3,2	6,0 \pm 1,0	5,5 \pm 0,6	6,8 \pm 0,9 ^a
Spinosad 5 ppm	9,6 \pm 2,5	7,4 \pm 0,8	5,6 \pm 1,6	4,6 \pm 0,6	6,6 \pm 0,8 ^a
Spinosad 10 ppm	6,7 \pm 2,2	13,1 \pm 4,6	7,4 \pm 1,1	5,5 \pm 2,3	8,2 \pm 1,5 ^a

* Letras diferentes en la columna significan diferencias significativas según la prueba de ANOVA, ($F_{3;48}=4,36$; $P=0,007$), y comparación múltiple por prueba de Tukey $P=0,05$.

Tabla 2. Porcentaje promedio de huevos de *A. aegypti* no eclosionados expuestos a concentraciones de spinosad a 1,5 y 10ppm. Las concentraciones de spinosad después de preparadas permanecieron en condiciones controladas de temperatura ($25\pm 1^\circ\text{C}$). El periodo de exposición a spinosad fue de 24h.

Control	Tiempo (semanas)												Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Control	8,9±0,5 ^a	4,0±1,9 ^a	6,9±1,5 ^a	8,4±1,4 ^a	19,7±1,4 ^b	0,2±0,2 ^b	3,2±0,3 ^c	8,1±3,1 ^b	49,0±1,7 ^a	43,4±1,7 ^b	12,5±0,6 ^a	11,0±2,1 ^a	14,6±2,2
Spinosad 1 ppm	9,6±2,0 ^a	31,7±4,4 ^{ab}	32,0±6,7 ^b	27,5±3,8 ^b	31,5±9,9 ^a	3,5±0,3 ^{ab}	7,5±0,3 ^{bc}	24,1±2,7 ^a	50,1±5,0 ^a	86,1±2,1 ^a	16,5±3,2 ^a	9,6±1,5 ^a	27,9±3,4
Spinosad 5 ppm	9,9±2,0 ^a	22,4±4,2 ^b	23,2±4,8 ^b	48,5±4,9 ^a	28,6±1,9 ^a	11,5±4,5 ^a	13,2±6,2 ^{bc}	25,7±3,4 ^a	46,9±4,5 ^a	80,5±4,0 ^a	17,9±2,4 ^a	17,0±3,5 ^a	29,1±3,1
Spinosad 10 ppm	4,9±0,4 ^a	39,1±4,2 ^a	51,1±6,4 ^a	44,0±7,9 ^a	33,3±7,6 ^a	6,9±2,2 ^a	20,9±4,6 ^a	26,2±4,8 ^a	49,0±2,6 ^a	72,1±1,5 ^a	19,1±1,6 ^a	17,1±1,8 ^a	31,9±3,0

* Letras diferentes en las columnas de las semanas significan diferencias significativas según la prueba ANOVA ($F_{11,141} = 95,4$; $P < 0,0001$) y Prueba de Tukey $P=0,05$.

Otra razón puede ser que haya habido algunas diferencias en las condiciones de exposición de los huevos en los experimentos ya que en este estudio los huevos fueron sumergidos en los tratamientos, y en los anteriores las hembras ovipositaron en ellos. Asimismo, la manera de evaluar la eclosión puede ser un factor en las diferencias ya que Romi *et al.* (2006) pusieron a secar las tiras de huevos por 24h después de la exposición, en tanto que Pérez *et al.* (2007) los pusieron a eclosionar de inmediato, y en este estudio se realizó una eliminación del exceso de spinosad y se pusieron a eclosionar. La razón de este procedimiento fue para tener un mejor control del tiempo de exposición al bioinsecticida y ha sido utilizado con los mismos propósitos para investigar los efectos subletales de un virus patógeno en larvas de *A. aegypti* (Marina *et al.* 2003). Por otra parte, se observó en el tratamiento control que del 1,4 a 3,9% en el primer experimento y del 0,2 a 49,0% de los huevos no eclosionaron en el segundo experimento. En tanto que Romi *et al.* (2006) reportaron que no eclosionaron los huevos en el tratamiento control del 14,0 al 22,0% y Pérez *et al.* (2007) del 51,3 al 60,5%. Esto puede ser debido características biológicas de la especie, a que no todos los huevos eclosionan al mismo tiempo, o a un factor desconocido.

Factores abióticos como temperatura, bajos o altos niveles de precipitación pueden influir en el retraso de la eclosión de los huevos de mosquitos como se observó en *A. triseriatus* (Say, 1823) (Khatchikian *et al.* 2010). Por otra parte, en *A. albopictus* se demostró que la edad de los huevos no influye en el retraso de la eclosión y que los embriones pueden ser capaces de detectar señales concernientes a la estabilidad o riesgo inherente en el hábitat y responder a través de su plasticidad fenotípica a ese potencial riesgo (Vitek y Livdahl 2009). Este estudio demuestra que el spinosad tiene bajo efecto ovicida. También corrobora los altos niveles de mortalidad en larvas de mosquitos observados en estudios anteriores. El spinosad tiene potencial para utilizarse en los programas de control de inmaduros de insectos vectores como el mosquito *A. aegypti* por sus características insecticidas y el bajo impacto sobre organismos no blanco y la salud humana (Bond *et al.* 2004, Hertlein *et al.* 2010, Marina *et al.* 2011). Los resultados de este estudio sirven para evidenciar que su potencial no reside en su efecto ovicida sino en su alta eficiencia larvicida.

Agradecimientos

Agradecemos a Antonio Morales responsable del insectario del CRISP por habernos proporcionado el material biológico; a Nelva Chirino por su apoyo en el laboratorio y a Trevor Williams por los comentarios al manuscrito. También agradecemos al COCYTECH por el apoyo financiero a través de la beca de Ana L. Argueta y al proyecto CHIS-2005-C03-011, otorgado a C. F. Marina.

Literatura citada

- ATTARAN, A.; ROBERTS, D.; CURTIS, C.; KILAMA, W. 2000. Balancing risks on the backs of the poor. *Nature Medicine* 6 (7): 729-731.
- BOND, J.; MARINA, C.; WILLIAMS T. 2004. The naturally-derived insecticide Spinosad is highly toxic to *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*. *Medical and Veterinary Entomology* 18 (1): 50-56.
- HERTLEIN, M.; MAVROTAS, C.; JOUSSEAUME, C.; LYSSANDROU, M.; THOMPSON, G.; JANY, W.; RITCHIE, S. 2010. A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 26 (1): 67-87.
- KHATCHIKIAN C.; DENNEHY, J.; VITEK, C.; LIVDAHL, T. 2010. Environmental effects on bet hedging in *Aedes* mosquito egg hatch. *Evolutionary Ecology* 24 (5): 1159-1169.
- MARINA, C.; BOND, J.; CASAS, M.; MUÑOZ, J.; OROZCO, A.; VALLE, J.; WILLIAMS, T. 2011. Spinosad as an effective larvicide for control of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, vectors of dengue in southern Mexico. *Pest Management Science* 67 (1): 114-121.
- MARINA C.; IBARRA, J.; ARREDONDO-JIMÉNEZ, J.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; LIEDO, P.; WILLIAMS, T. 2003. Adverse effects of covert iridovirus infection on life history and demographic parameters of *Aedes aegypti*. *Entomologia Experimentalis et applicata* 106 (1): 53-61.
- PÉREZ, C.; MARINA, C.; BOND, J.; ROJAS, J.; VALLE, J.; WILLIAMS, T. 2007. Spinosad, a naturally-derived insecticide, for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): Efficacy, persistence and elicited oviposition response. *Journal of Medical Entomology* 44 (4): 631-638.
- REZENDE G.; MARTINS, A.; GENTILE, C.; FARMESI, L.; PELAJO-MACHADO, M.; PEIXOTO A.; VALLE, D. 2008. Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Developmental Biology* 8: 82.

- ROMI, R.; PROIETTI, S.; DI LUCA, M.; CRISTOFARO, M. 2006. Laboratory evaluation of the bioinsecticide spinosad for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 22 (1): 93-96.
- SAAVEDRA-RODRIGUEZ K.; URDANETA-MARQUEZ, L.; RAJATILEKA, S.; MOULTON, M; FLORES, A.; FERNANDEZ-SALAS, I.; BISSET, J.; RODRIGUEZ, M.; MCCALL, P.; DONNELLY, M.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; BLACK IV, W. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 16 (6): 785-798.
- SAN MARTÍN J.; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; SOLÓRZANO, J.; BOUCKENOOGHE, A.; DAYAN, G.; GUZMÁN, M. 2010. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (1): 128-135.
- SINA, B.; AULTMAN, K. 2001. Resisting resistance. *Trends in Parasitology* 17 (7): 305-306.
- VITEK, C.; LIVDAHL, T. 2009. Hatch plasticity in response to varied inundation frequency in *Aedes albopictus*. *Journal of Medical Entomology* 46 (4): 766-771.
- WALKER, K. 2000. Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control. *Medical and Veterinary Entomology* 14 (4): 345-354.
- WHO. 1995. Vector control for malaria and other mosquito borne diseases, Report of a WHO study group, Technical report series No. 857. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP. World Health Organization, Geneva.

Recibido: 17-ago-2010 • Aceptado: 22-abr-2011