



Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Veterinarias
Corrientes – Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

OPCIÓN: CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES.

TÍTULO: “*DESARROLLO DE UN FITOTERÁPICO PARA EL CONTROL DE LA GARRAPATA Rhipicephalus (B) microplus*”,

TUTOR EXTERNO: MV Jorgelina Josefina Lozina

TUTOR INTERNO: Dra. Laura Lozina

RESIDENTE: Matías Nicolás Bogado

e-mail: mnicolasbogado07@gmail.com

Año 2022.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis, a mis padres por creer en mí y su sacrificio para ayudarme a cumplir esta meta. A Ximena por acompañarme en este proceso y ayudarme en esta etapa. A la Facultad de Ciencias Veterinarias por darme la posibilidad de cumplir mi objetivo y a mi tutora Laura Lozina por guiarme en este camino de la investigación.

AGRADECIMIENTOS

Simplemente quiero agradecer a todas las personas anteriormente nombradas, a mi familia por su apoyo incondicional, a mi tutora interna por su predisposición para conmigo durante toda la carrera y realización de este trabajo y a todas las personas que se cruzaron en este camino y de alguna u otra forma ayudaron mi capacitación y formación académica.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS PARTICULARES	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
CONCLUSIONES	15
BIBLIOGRAFÍA	16

RESUMEN

El presente trabajo fue realizado con el objetivo de evaluar la eficacia ixodicida de principios activos de origen botánico, sobre de garrapatas de la especie *Rhiphicephalus microplus*, y desarrollar una formulación que contenga concentraciones efectivas para el control del ectoparásito. Los extractos a partir de frutos verdes de *Melia azedarach* (paraíso) se llevaron a cabo mediante técnicas de extracción continua y para la obtención de aceites esenciales se partió de hojas de *Cymbopogon winterianus* (citronela) mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua. Para evaluar la actividad ixodicida de los extractos se realizaron distintas diluciones en solución acuosa mediante la prueba de inmersión de adultos siguiendo el protocolo de Drummond, para los que se utilizaron garrapatas de referencia sensible pertenecientes a la cepa SENASA de *R. microplus*. Se realizaron distintas diluciones acuosas para evaluar la actividad de cada extracto sobre teleoginas adultas y larvas, por las técnicas de inmersión de adultos y paquete larvario. Con respecto a la inmersión de las garrapatas, se incubaron a 28 °C y más de 80% humedad relativa durante 14 días, se retiraron las teleoginas, se pesaron los huevos, y se conservaron en iguales condiciones, durante 25 días más. Finalmente, el día 39 se determinó visualmente el porcentaje de eclosión y se estableció la Reproducción Estimada (RE) y el porcentaje de eclosión del control (%C). En los grupos tratados se evidencio que, con las concentraciones menores del extracto ensayado, no se produjeron cambios significativos en la oviposición de las teleoginas, observándose un comportamiento similar a los obtenidos en el grupo control. Para la técnica del paquete larvario se utilizaron larvas de entre 14 y 21 días de edad, se realizó la impregnación de papeles Whatman con cada dilución correspondiente. Se realizaron tres replicas por tratamiento y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Con la ayuda de un pincel y un estilete se recolectaron larvas de los tubos contenedores y cada papel impregnado fue cargado con 100 larvas aproximadamente el cual se cerró herméticamente con clips tipo Bulldog en sus tres extremos libres e incubado a 27°C y 80% de humedad durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas, los sobres fueron retirados de la incubadora y con la ayuda de una bomba de succión se fueron contando las larvas vivas y larvas muertas. Con estas pruebas se lograron obtener concentraciones eficaces de los extractos botánicos sobre las garrapatas y a partir de los

resultados obtenidos se extrapolaron en una forma farmacéutica para un posible uso en bovinos.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias son algunos de los factores que afectan la producción de rumiantes en todo el mundo, representando grandes pérdidas económicas debido a un retraso en el crecimiento, pérdida de peso, reducción del consumo de alimentos, menor producción de leche, deterioro de la fertilidad y, en casos de infecciones, altas tasas de mortalidad (Cavalcante *et al.*, 2009).

Entre las parasitosis más frecuentes que encontramos en nuestra región, las ectoparasitosis tienen gran relevancia, que además de los problemas anteriormente mencionados, transmiten diversas enfermedades y provocan grandes limitantes a la hora de comercializar animales a zonas libres o en lucha activa contra ciertos ectoparásitos como las garrapatas. La infestación de bovinos por *Boophilus microplus* y las enfermedades transmitidas por este ácaro, causan perjuicios a la economía agropecuaria, no solamente por la disminución de la producción de carne, leche y la eventual muerte del animal, sino también por la depreciación de su cuero. A estas pérdidas se suman los gastos con los tratamientos químicos que, además de no resolver definitivamente el problema, pueden favorecer la aparición de cepas resistentes y contaminar el medio ambiente (Martins, R. M. 2006).

Rhipicephalus microplus es la especie de garrapata con mayor relevancia mundial para la producción pecuaria (Jongejan y Uilemberg, 2004). En Argentina, en las zonas ubicadas al norte de los paralelos 30°-31° S, *R. microplus* ocasiona fuertes limitaciones al desarrollo de la ganadería (Guglielmone y Nava, 2013).

Diversas estrategias han sido implementadas para tratar de eliminar distintos tipos de plagas, destacando el uso de diversos insecticidas sintéticos (malation, dimetoato, cipermetrina, azadiractina sintética e imidacloprid). Sin embargo, este tipo de compuestos se han correlacionado con efectos tóxicos sobre el ecosistema. (Cobarrubias Carapia, S. 2020). A pesar de se han utilizado diferentes estrategias para controlar estos ectoparásitos como ser el control inmunológico por medio de vacunas, hongos, etc, el manejo farmacológico sigue siendo el de elección, llevando al uso indiscriminado de compuestos químicos como piretroides, organofosforados, carbamatos, fipronil y lactonas macrocíclicas que han favorecido la residualidad en diferentes componentes del

ecosistema y la selección de poblaciones de garrapatas resistentes, hasta hacer ineficaz su uso. Por otro lado, Clark & Sánchez (1982) publicaron resultados que muestran la intoxicación de los animales sometidos a consecutivos baños de acaricidas químicos y que, sumados al estrés físico del tratamiento, predisponen los bovinos a otras enfermedades. Debido a esto, se requieren de nuevas estrategias de lucha que no tengan efectos adversos sobre la flora, fauna u otro tipo de insectos polinizadores. Es importante el desarrollo de productos que sean económicamente viables mediante métodos de preparación y estabilización apropiados (Cobarrubias Carapia, S. 2020).

En respuesta a esta problemática y buscando disminuir los costos que implica la creación de nuevas moléculas farmacológicamente activas, se ha despertado el interés por investigar la presencia de principios farmacológicos en aquellas plantas, que, por tradición popular, son reconocidas en estudios de etnobotánica como antiparasitarias. A lo largo del tiempo se ha aprovechado la actividad de algunas plantas para su aplicación como insecticidas botánicos, diversos extractos de plantas con efecto insecticida, pero sin dudas uno de los más importantes ha sido el extracto de piretro, obtenido de flores secas de margarita piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), cuyos componentes activos son piretrinas, cinerinas y jasmolinas. Así mismo, se ha utilizado como insecticida el extracto acuoso de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), cuyo principio activo es la nicotina, de efecto tóxico al solo contacto con el insecto (Velez Ramos, 2008).

Furlong *et al.*, 2000 reportaron el efecto ixodicida del extracto etanólico y acuoso de las hojas de *Azadirachta indica*, sobre larvas de garrapatas *R. microplus*. Estos extractos también fueron probados en la fisiología reproductiva de hembras ingurgitadas. Se conoce un gran número de especies vegetales que pueden suministrar sustancias para la producción de insecticidas (Huang *et al.*, 1999; Pungitore *et al.*, 2005). Dos especies de la familia Meliaceae, ampliamente investigadas, son *Azadirachta indica* A. Juss (neem) y *Melia azedarach* L. (paraíso), de las cuales se han aislado metabolitos secundarios del tipo limonoide con efectos negativos sobre insectos y otros artrópodos (Schmutterer, 1990). *Melia azedarach*, nativa de Asia, es ampliamente distribuida en casi todos los países tropicales y subtropicales (Burks, 1997).

La gramínea *Cymbopogon winterianus* J, conocida como Citronel, ha sido descrita en la literatura como portadora de cualidad controladora de hongos, nematodos, y principalmente de insectos coleópteros y lepidópteros. Más recientemente la “mosca del

cuerno" (*Haematobia irritans L.*), fue controlada por el uso de extractos de la Citronela (Martins, R. M. 2006).

De acuerdo con las investigaciones realizadas sobre el efecto insecticida y repelente de extractos vegetales se seleccionaron las especies botánicas *Melia azedarach* (árbol de paraíso), y *Cymbopogon winterianus* (citronela) considerando la presencia de estas en la zona, la reciente creación del Centro de Investigaciones de Fármacos Garrapaticidas en nuestra unidad académica y la disponibilidad de bovinos infestados artificialmente con garrapatas, se puede estudiar la eficacia de estos extractos naturales en los diferentes estadios parasitarios de manera controlada. Una vez hallada la eficacia *in vitro* de estos extractos se extrapolará a un concentrado emulsionable en forma de pour on o aspersión para uso en bovinos. Borges *et al.* 2003, evaluaron la eficacia de los extractos brutos de frutos maduros de paraíso, extraídos con diferentes disolventes, sobre larvas y hembras de *R. (B.) microplus*, verificaron elevada tasa de mortalidad de larvas y alta eficacia sobre las hembras ingurgitadas, siendo que el extracto no mató a las hembras adultas, pero inhibió total o parcialmente la producción de huevos y la embriogénesis. Estos autores concluyeron que los extractos menos polares de frutos maduros de *M. azedarach*, utilizando hexano como disolvente, a la concentración del 0,250%, presentaron mejor eficacia tanto sobre hembras como sobre larvas de esta garrapata. En otro experimento, al estudiar la acción del extracto hexánico de frutos de *M. azedarach* sobre *R. (B.) microplus* en terneros artificialmente infestados, Borges *et al.* 2005 observaron interferencia de la planta en el desarrollo de la garrapata sobre los animales infestados artificialmente.

Los estudios fitoquímicos de *Melia azedarach* revelan en su composición diversas sustancias, muchas de ellas tienen sus efectos comprobados y otras vienen siendo investigadas. Una de las actividades más estudiada de las plantas de la familia Meliaceae es la acción fago-inhibidora, siendo que los productos con esta acción contienen como sustancia activa, la azadiractina. Se ha demostrado que la azadiractina actúa como un regulador de crecimiento (Al-Sharook *et al.*, 1991). De acuerdo con el trabajo de Vieira & Fernandes 1999, interfiere en el funcionamiento de las glándulas endocrinas que controlan la metamorfosis en los insectos, impidiendo la ocurrencia de la ecdisis. La azadiractina se concentra en los frutos, siendo que en las otras partes de la planta se encuentran cantidades muy bajas (Ermel *et al.*, 1987).

Martins, R. M. 2006 demostró la eficacia *in vitro* del aceite esencial de Citronela en bovinos infestados artificialmente con larvas de la cepa CPVDF (Centro de Pesquisas Veterinaria Desidério Finamor – FEPAGRO, RS – Brasil) de *R. (B.) microplus* utilizando la técnica de inmersión de adultas, aunque variando el modo de visualización al realizado en este trabajo.

Las pruebas para determinar susceptibilidad a un producto acaricida son variadas; sin embargo, la técnica de inmersión de adultos, descrita por Drummond *et al.* (1973) para teleoginas (garrapatas hembras ingurgitadas) y el Test de inmersión de larvas de Stone y Haydock (1962), son las técnicas de referencia a nivel mundial aprobadas por la FAO para la detección de resistencia (FAO, 2004). Estas pruebas realizadas *in vitro* son una aproximación del comportamiento del principio activo *in vivo* y son las que se proponen en el presente trabajo para la obtención de las concentraciones efectivas a ser extrapoladas en la forma farmacéutica ixodicida.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la eficacia ixodicida de activos de origen botánico sobre *R. microplus* y desarrollar una formulación conteniendo concentraciones efectivas para el control del ectoparásito.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtención de aceites esenciales de *Cymbopogon winterianus*.
- Obtención de extractos de frutos verdes de *Melia azedarach*.
- Estandarización de los métodos de bioensayos para evaluar principios activos de origen botánico sobre garrapatas.
- Desarrollo de una formulación que contenga los bioactivos de origen botánico propuestos para uso en bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo: Cátedra de Farmacología y Toxicología y Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste. Calle Sargento Cabral 2139 Corrientes (Capital) CP 3400 Teléfono: 03794-425753 Interno 146.

Mantenimiento de la cepa SENASA sensible de *R. microplus*: El ciclo parasitario se realizó sobre bovinos de raza Hereford provenientes de campos de áreas libres de garrapatas y sin tratamientos acaricidas previos. Se realizaron tres infestaciones semanales con 20.000 larvas por animal (Fig. 1 A). Luego de 11 parasitaciones, los bovinos se subieron a una jaula que facilitó la recolección diaria de las hembras plenamente ingurgitadas. El ciclo extraparasitario se mantuvo en una incubadora colocando las teleoginas recogidas en cajas de Petri (Fig. 1 B) e incubándolas a 28 °C y más de 80% de humedad. Luego de 18 días se extrajeron las keneoginas y la masa de huevos depositada se colocó en tubos de eclosión (Fig. 1 C), conservándose éstos en las mismas condiciones de temperatura y humedad. Las larvas así obtenidas fueron empleadas en parasitaciones posteriores permitiendo de este modo el mantenimiento de la cepa.

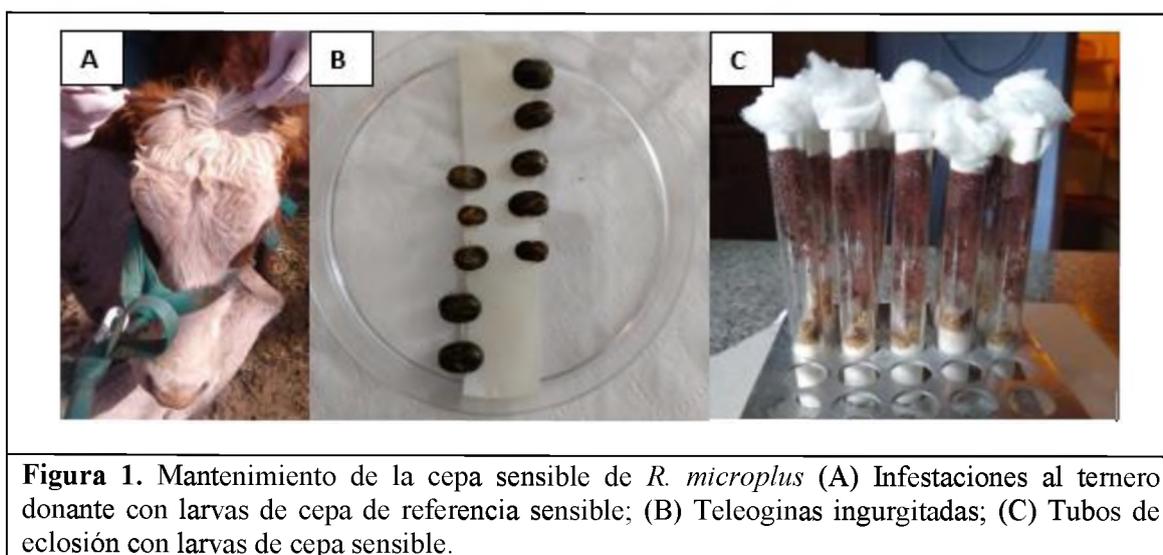


Figura 1. Mantenimiento de la cepa sensible de *R. microplus* (A) Infestaciones al ternero donante con larvas de cepa de referencia sensible; (B) Teleoginas ingurgitadas; (C) Tubos de eclosión con larvas de cepa sensible.

Obtención de los principios activos de origen botánico: muestras de las dos especies botánicas propuestas fueron colectadas y se enviaron para la identificación y depósito en

herbario de referencia en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE). Frutos verdes de paraíso (*M. azedarach*) fueron colectados y el material vegetal fue secado en una estufa a 40°C durante 72 horas y posteriormente molido usando un molinillo mecánico, (Fig 2 A, B, C). La elaboración del extracto se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNNE, 20 gramos del material previamente molido fue sometido a extracción continua usando un equipo de Soxhlet y metanol como solvente. El mismo fue rotaevaporado y conservado a 4°C hasta su uso siguiendo la técnica de Borges-Argáez *et al.*, 2007. Para la obtención de aceites esenciales a partir de las hojas de *C. winterianus*, obtenidas del pequeño jardín botánico ubicado en la FCV-UNNE, se realizó la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua, comenzando con la extracción mediante corte manual del material, luego del oreado el cual se realizó a temperatura ambiente durante 36 horas, extendiendo el material vegetal sobre el piso limpio, bajo techo en una galería con suficiente intercambio de aire. El proceso de destilación se realizó a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles (citronelal, citronelol y geraniol) por efecto de una corriente directa de vapor de agua. Los vapores que salen del destilador se enfriaron en un refrigerante donde regresan a la fase líquida, agua y aceite esencial, y finalmente se separan en un decantador (García, T. R. 201)



Figura 2. Procedimientos para la extracción de principios activo de semillas de paraíso (A) Frutos verdes, (B) Frutos desecados, (C) Frutos molidos.

Evaluación de la actividad acaricida de los diferentes extractos: los ensayos de eficacia ixodicida se llevaron a cabo aplicando la prueba de inmersión de adultos, siguiendo el protocolo de Drummond *et al.*, 1973. El extracto rotaevaporado, en una concentración de 10000 ppm, se disolvió en solución acuosa y se realizaron distintas diluciones a saber, 2%, 1%, 0,50%, 0,25% y 0,125%. Para el aceite esencial de citronela los tratamientos estuvieron constituidos por las siguientes concentraciones: 0,5%, 1%, 25%

y 50%. Para evaluar la actividad acaricida de los bioactivos presentes en estos productos naturales, se utilizaron garrapatas desprendidas del bovino en las 24 horas previas a los ensayos. Se formaron 5 grupos con pesos homogéneos, de 10 teleoginas cada uno (media de 4,5±0.5 gr. por grupo); 4 de ellos fueron tratados con las soluciones previamente mencionadas, oficiando el último como control. El Día 0, se utilizaron 20 ml de cada dilución del extracto para la inmersión de las teleoginas, cada grupo fue mantenido, agitando suavemente, durante 1 minuto. Transcurrido este tiempo, se descartó el líquido con la ayuda de un colador y se colocaron las garrapatas sobre papel absorbente; se secaron y acondicionaron en Cajas de Petri para permitir su oviposición (Fig. 3). Las mismas se incubaron a 28 °C y más de 80% humedad relativa durante 14 días. Asimismo, el grupo control fue inmerso en igual volumen de agua destilada, siguiendo el mismo protocolo y condiciones de mantenimiento. El Día 14, Se retiraron las teleoginas de las Cajas de Petri y se registró el peso de la ovipostura. Estos huevos fueron mantenidos en iguales condiciones durante 25 días más. El Día 39, la tasa de eclosión (%) de las distintas cajas se determinó visualmente, comparando la masa total de huevos eclosionados con la masa de los no eclosionados. El mismo procedimiento se siguió para evaluar las distintas concentraciones del aceite esencial de citronela. La eficacia de ambos productos fue determinada de acuerdo con los cálculos de reproducción estimada y porcentaje de control, propuesto por Drummond *et al.*, 1973, para cada grupo.

$$\text{Reproducción estimada (RE)} = \frac{\text{Peso de huevos (mg)} * \text{porcentaje de eclosión (\%)}}{\text{Peso de hembras (mg)}}$$

$$\text{Porcentaje de control (\%C)} = \frac{\text{RE control} - \text{RE tratado}}{\text{RE tratado}} * 100$$

Además del Bioensayo por inmersión de adultos se realizó el ensayo *in vitro* mediante la Test de Paquete Larvario, (del inglés LPT) (Stone y Haydock, 1962), para lo cual se utilizaron larvas entre 14 y 21 días de edad. Los extractos fueron disueltos en una mezcla de tricloroetileno y aceite de oliva (2:1) y se trabajó con dos concentraciones, 25

ppm y 50 ppm de cada extracto. Luego se llevó a cabo la impregnación de papeles para lo cual se utilizaron papeles Whatman N°1 con un tamaño de 8,5 cm por 7,5 cm embebidos con 0,67 ml de cada dilución correspondiente (Fig. 4 A). Se realizaron tres replicas por tratamiento y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas (Fig. 4 B).

Con la ayuda de un pincel y un estilete se recolectaron larvas de los tubos contenedores (Fig. 5 A) y cada papel impregnado fue cargado con 100 larvas aproximadamente (Fig. 5 B) el mismo se cerró herméticamente con clips tipo Bulldog en sus tres extremos libres e incubados a 27°C y 80% de humedad durante 24 horas (Fig. 5 C). Igual procedimiento se realizó para el grupo control con la mezcla de tricloroetileno + aceite de oliva.

Determinación de la mortalidad:

Transcurridas las 24 horas, los sobres fueron retirados de la incubadora y con la ayuda de una bomba de succión se fueron contando las larvas vivas (capaz de trasladarse) y larvas muertas (sin movimiento). Para determinar el porcentaje de mortalidad se realizó el siguiente cálculo comparando con los resultados del grupo control.

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de larvas muertas}}{\text{N}^\circ \text{ de larvas totales}} \times 100$$

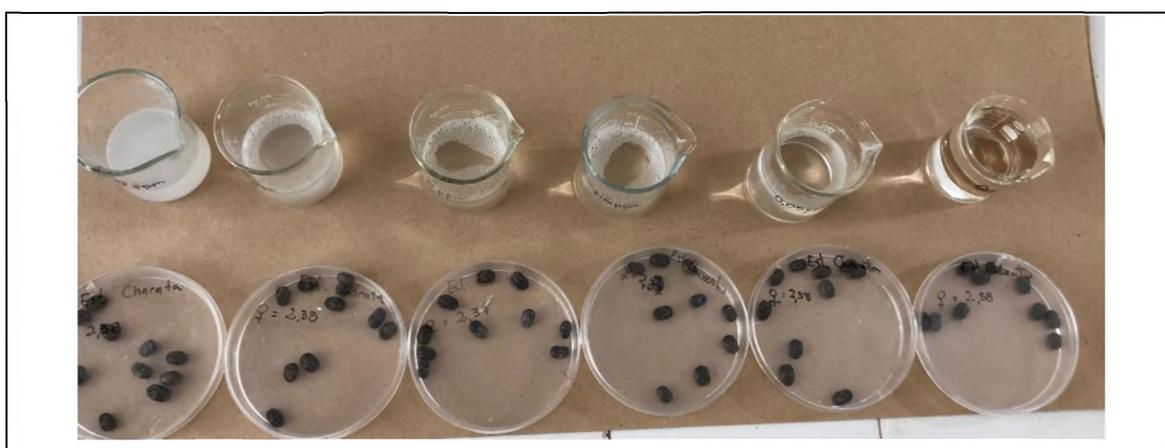


Figura 3. Procedimientos de bioensayos por inmersión de adultas. Garrapatas ya secadas y acondicionadas en Cajas de Petri antes de ser incubadas, obsérvese el líquido descartado luego de sumergir las teleoginas ingurgitadas.

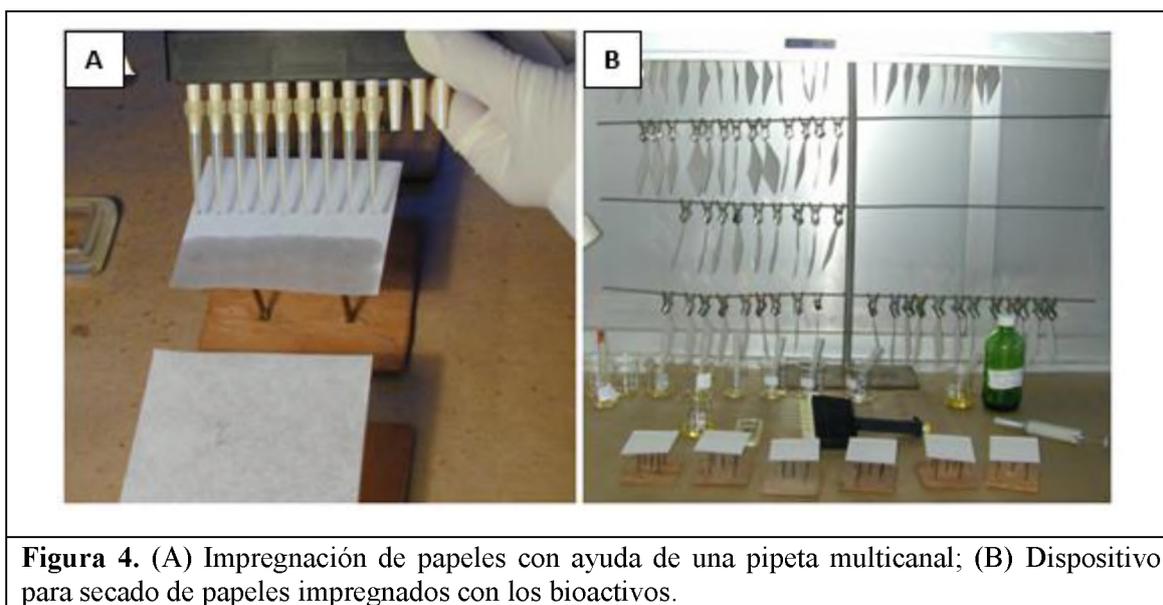


Figura 4. (A) Impregnación de papeles con ayuda de una pipeta multicanal; (B) Dispositivo para secado de papeles impregnados con los bioactivos.

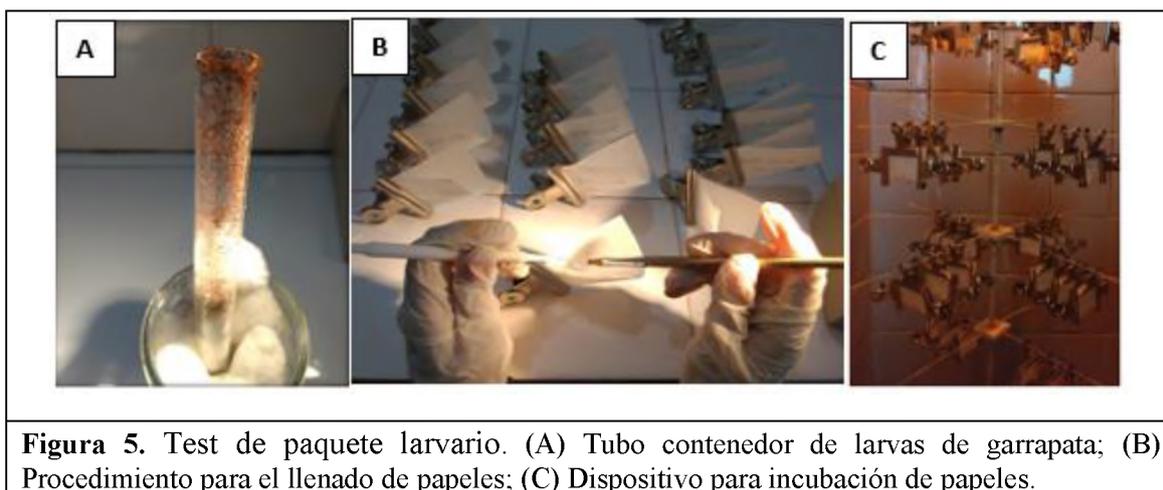


Figura 5. Test de paquete larvario. (A) Tubo contenedor de larvas de garrapata; (B) Procedimiento para el llenado de papeles; (C) Dispositivo para incubación de papeles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de los principios activos

La identificación taxonómica de los dos ejemplares botánicos fue confirmada por los profesionales del IBONE. A partir de frutos verdes de paraíso sometidos al proceso de extracción y posterior rotaevaporación se obtuvo un extracto blando con un rendimiento del 0.25%, respecto del peso de la materia prima bruta. En cuanto al aceite esencial de citronela, éste tuvo un rendimiento del 0,7%.

Obtención de cepas sensibles

La infestación artificial de los animales, previamente estandarizada por el equipo de trabajo, fue satisfactoria, lo que permitió la recolección diaria de un gran número de teleoginas las que fueron utilizadas en el desarrollo de los distintos bioensayos. Los efectos aquí observados del extracto de paraíso sobre *R. microplus* parecieran estar más relacionados a una alteración en la reproducción observándose en la mayor concentración ensayada una acción acaricida.

Eficacia *in vitro* por técnicas de inmersión de adultos

En la Tabla 1, se observa el comportamiento del estadio extraparásitario de las teleoginas control (Fig. 6 A) y las sometidas a la acción del extracto de paraíso, se pudo observar que el extracto al 2% inhibió la ovipostura de las teleoginas inmersas (Fig. 6 B), por lo que se determinó un 100% de control, mientras que al 1% hubo un 78% (Fig. 6 C), con las concentraciones menores del extracto ensayado (0,5%, 0,25% y 0,125%) no se produjeron cambios significativos en la oviposición de las teleoginas observándose un comportamiento similar a los obtenidos en el grupo control (Fig. 6 D, E y F). A diferencia de lo expuesto por Vieira & Fernandes 1999, referente a que la azadiractina actúa impidiendo la ocurrencia de la ecdisis y evitando la muda de un estadio a otro, en este trabajo se observó que en las concentraciones mayores del extracto evaluado demostraron una inhibición y reducción de la ovipostura. Además, para la concentración (1%), se observaron huevos secos y otros con apariencia normal pero que no eclosionaron (Fig. 7 A-B), lo que se traduce en la infertilidad de los mismos y la reducción del valor de la reproducción estimada de las hembras (RE).

Tabla 1. Resultados de las pruebas de inmersión de adultos usando Extracto de paraíso

*NC: valor que no puede ser calculado a partir de la fórmula de Drummond et al., 1973

Concentración (%)	Peso de hembras (g)	Peso de huevos (g)	Porcentaje de eclosión	Reproducción Estimada (RE)	Porcentaje de Control (%C)
CONTROL	3,04	1,64	95	51	NC*
2%	3,05	0,0	-	-	100
1%	3,03	0,8	40	11	78
0,5%	3	1,01	65	22	56
0,25%	3,01	1,41	75	35	31
0,125%	2,94	1,43	80	39	24



Figura 6. Oviposura D1 4 de teleogini

nas expuestas a los extractos de paraíso. Estadio extraparasitario de las teleoginas (A) Control, (B) expuestas al extracto al 2%, (C) 1%, (D) 0,5%, (E) 0,25%, (F) 0,125%.

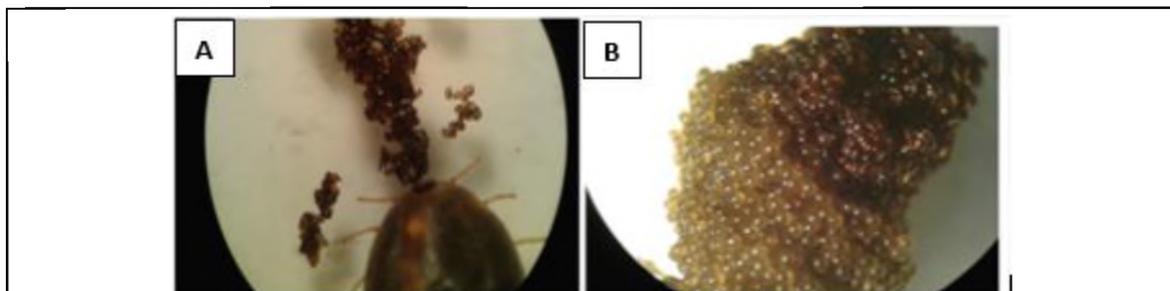


Figura 7. (A) Imagen ampliada de la oviposición de una teleogina expuesta al extracto al 1%, (B) se aprecian huevos secos y otros con apariencia normal pero que no eclosionaron.

En cuanto al tratamiento con las distintas diluciones del aceite esencial de citronela *in vitro* observó un efecto ascendente a medida que fueron aumentadas las concentraciones. En la tabla 2 podemos ver que el producto al 50% proporcionó una mayor inhibición en la ovipostura de las hembras expuestas, en relación a los demás, y un porcentaje de eclosión del 50%, aproximadamente. En cuanto al porcentaje de control obtenido con la máxima concentración evaluada, este arrojó un valor de 68%, muy por debajo de lo expresado por Martins, R. M. 2006 quien obtuvo un 100% de eficacia en concentraciones

de hasta 10% tratándose de una cepa deferente.

Concentración (%)	Nº de larvas muertas	Porcentaje de Control (%C)
Paraíso 50 ppm	83	60,4%
Paraíso 25 ppm	43	44,8%
Citronela 50ppm	100	100%
Citronela 25 ppm	100	100%

Tabla 2. Aceite esencial de citronela: resultados de las pruebas de inmersión de adultos.

*NC: valor que no puede ser calculado a partir de la fórmula de Drummond et al., 1973.

Eficacia *in vitro* por técnicas de paquete larvario

De acuerdo con el porcentaje de mortalidad, el extracto de paraíso a una concentración de 50 ppm registro, en promedio, 83 larvas muertas equivalente al 60,4% mientras que con el extracto de 25 ppm se obtuvieron 43 larvas muertas (44,8%). Se puede observar que con el extracto alcohólico (metanol) el porcentaje de mortalidad fue mayor al 50% lo cual coincide con los estudios realizados por Borges *et al* (2003) quienes probaron dos extractos utilizando hexano y metanol como solventes y también con lo expuesto por Al-Sharook *et al*, 1991 sobre su papel como regulador de crecimiento.

Podemos inferir que la efectividad del acaricida dependió de la concentración extracto, cuanto más concentrado mejor porcentaje de mortalidad de larvas. Sería interesante utilizar mayores concentraciones para hallar la dosis letal 99.9 y la dosis discriminatoria.

Por su parte el aceite esencial de citronela, provoco en las técnicas de LPT la muerte del estadio larvario en las dos concentraciones ensayadas (25 y 50 ppm).

A partir de estos resultados se extrapolaron en la formulación del concentrado

emulsionable para ser usado por aspersión, cuya composición se detalla a continuación.

La composición cuali-cuantitativa fue la siguiente:

Aceite esencial de citronela.....	25%
Extracto metanolico de paraíso.....	20%
Alcohol estearilico.....	20%
Triton x100.....	1%
Cera lanette.....	20%
Aceite de oliva csp.....	100%

Las enfermedades parasitarias en especial los ectoparásitos, tales como las garrapatas que son relevantes en la producción ganadera y que ocasiona grandes pérdidas económicas, no solo en nuestro país, sino que es de conocimiento mundial, lleva al uso indiscriminado de productos químicos de diferentes índoles que buscan controlar estos ectoparásitos con el perjuicio de crear resistencia a los mismos, como así también actuar en deterioro del ecosistema por sus efectos residuales en distintos componentes del mismo (Cavalcante *et al.*, 2009). Es por ello que, en búsqueda de respuestas a esta problemática, es de interés conocer y estudiar alternativas que permitan disminuir los costos, y que nos ofrece la naturaleza, a través de plantas populares, que tienen efectos antiparasitarios importantes, si bien la obtención de los principios activos no es fácil tarea, es una herramienta útil no solo para el beneficio del ganado bovino sino también contribuir con nuestro planeta.

A una concentración del 2% del extracto de paraíso se observó la inhibición de la ovipostura por las técnicas de inmersión de adultos y para el caso de citronela a la concentración 50% se observó un 68% de control sobre las garrapatas estudiadas.

En el primer caso, el extracto botánico ensayados dieron un alto poder de sensibilidad, y en el caso de citronela se evidenció que son necesarias concentraciones elevadas del mismo. Comparando las técnicas de larvas se observó que los extractos de paraíso son menos eficaces, mientras que, en las dos concentraciones evaluadas para citronela se observó un gran poder de letalidad en las condiciones en el que fue realizado el presente trabajo.

Como la formulación propuesta se pretende un mecanismo de acción por contacto, es que se tendrán en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de inmersión, proponiéndose un concentrado emulsionable que este al 20% de extracto de paraíso para

ser disuelto en 1000 ml de agua para la aspersión llegando a una concentración final del 2%. En el caso de citronela no se extrapolo directamente según el resultado de inmersión, debido al escaso rendimiento de los bioactivos, por lo que propone en esta fórmula un 25% de citronela, esperando un sinergismo entre los bioactivos de ambos extractos y considerando la propiedad de repelencia de este aceite esencial justificando su menor concentración. Asimismo, se observó que la actividad de citronela sobre el estadio larvario podría ser mayor según los resultados obtenidos en el presente trabajo, esto último también justificaría el menor contenido en la formula final.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que los ensayos *in vitro* de los bioactivos extraídos de Paraíso y Citronela demostraron tener gran actividad en el tratamiento sobre diferentes etapas del

ciclo de la garrapata, por ese motivo resulta interesante y muy promisorio el poder extrapolar estos resultados a ensayos *in vivo* con una forma farmacéutica para uso en bovinos a fin de ajustar la solución con las concentraciones efectivas para animales a campo, permitiendo de esta manera implementar su uso como parte de los protocolos en el manejo integral de plagas, siendo además una alternativa más económica, sustentable y ecológica que podrían el futuro reemplazar a los fármacos sintéticos que muchas veces son mal utilizados produciendo efectos negativos a la naturaleza.

Así mismo, esta experiencia abre paso a otras investigaciones acerca de diferentes protocolos y técnicas de extracción de los principios activos o sobre las concentraciones y combinaciones posibles para obtener mejores resultados, así como también sobre el uso de otros principios activos de origen botánico y al estudio comparativo de como estos afectan al ecosistema en el cual se utilizan para evaluar el impacto ambiental de los mismos en relación a los fármacos más utilizados en la actualidad. Es de interés fomentar este tipo de estudios que permiten aprovechar de los recursos naturales existentes en la zona, no solo por razones económicas sino también favorables para el planeta.

Los cambios socioculturales de la población que diariamente tiende a optar por productos más ecológicos, han permitido establecer la importancia de desarrollar programas que evalúen los efectos a la salud por contaminantes químicos y promover la reducción de los mismos, así como sistemas de vigilancia y normas de niveles permisibles de contaminantes basados en efectos a la salud, mejorando su calidad de vida, sobrevida y control de enfermedades crónicas, por lo que las organizaciones médicas, científicas y gubernamentales deben respaldar medidas estrictas para su vigilancia.

BIBLIOGRAFÍA

- Borges, L. M. F.; Ferri, P.H.; Silva, W. J.; Silva, W. C. In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Medical and Veterinary Entomology*, Oxford, v. 17, p. 228-231, 2003.
- Borges, L. M. F.; Ferri, P. H.; Silva, W. C.; Silva, W. J. Acao do Extrato Hexanico de Frutos Maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bezerros infestados artificialmente. *Revista de Patologia Tropical*, Goiania, v. 34, p.53-59, 2005.
- Borges-Argáez, R.; Canche-Chay, C.I.; Peña-Rodríguez, L.M.; Said-Fernández, S. & Molina-Salinas, G.M. 2007. Antimicrobialactivity of *Diospyrosanisandra*. *Fitoterapia*, 78: 370.
- BURKS, K. C. *Melia azedarach*. Fact sheet prepared by the Bureau of Journal Aquatic Plant Management, Department of Environmental Protection, State of Florida, Tallahassee, Florida, 1997.
- Cavalcante, C.R., Vieira, L.S., Chagas, A.C.S., Molento, M.B., 2009. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle, 1st ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 603.
- Cerpa, M.G. 2007. Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización. Tesis Doctoral, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Valladolid. pp. 25-53.
- Cobarrubias Carapia, S. (2020). Formulación y caracterización de nanoemulsiones utilizando fitoquímicos con actividad insecticida.
- Clark, LG y Sánchez, SJ (1983). Asociación de la toxicosis por pesticidas con algunos factores de salud durante el programa de erradicación de garrapatas en Puerto Rico.
- Di Rienzo J.A.; Casanoves F.; Balzarini M.G.; González L.; Tablada M. & Robledo C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Drummond, R.O.; Erns, S.E.; Trevino, J.L.; Gladney, W. J. & Graham, O.H. 1973. *Boophilusanulatus* and *B. microplus*. Laboratory Tests of Insecticides. *J. Econ Entomol* 66: 130-133.
- Ermel, K., Pahlich, E. & Shumutterer, H. Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity, and light. In: SCHUMETTERER, H. & ASCHER, K. R. S. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. *Proceedings of the III International Neem Conference*. Nairobi, Kenya, GTZ, Eschborn, p.171-184, 1987.

- FAO. 2004. Guideline resistance management and integrated parasite control in ruminants. Agriculture Department. Animal Production and Health Division, FAO, Roma. Italia-
- FURLONG, J. Controle estrategico de endo e ectoparasitos em bovinos de leite na regio do Brasil-Central. In: Bressan, M.; Martins, C.E.; Vilela, D. (eds.). Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil, Juiz de Fora, Embrapa Gado de leite, Minas Gerais, p.165-174. 2000.
- Furlong J.; Costa Junior L.; Chagas A. & Reis E. 2002. CL50 e CL90 dos extractos alcóolico e aquoso de nim indiano (*Azadirachta indica*) em larvas de *Boophilus microplus*. Anais do XII congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- García, R. T. (2015). Obtención de aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) extraído por arrastre con vapor a escala piloto: estudio de la influencia de variables en el rendimiento y la calidad del aceite.
- Guglielmone AA, Nava S. 2013. Epidemiología y control de las garrapatas de los bovinos en la Argentina. En: Enfermedades Parasitarias con Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes: Fundamentos Epidemiológicos para su Diagnóstico y Control (ed. A. Nari y C.Fiel), Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires. Pp. 441–456.
- Jongejan, F. y Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129(Suppl 1): S3-S14.
- Jurado B. 2010. Preparación de extractos y estudio fitoquímico de plantas biocidas. Universidad del Perú. Lima, Perú. p. 1-26.
- Lock O. 1999. Métodos de estudio de Productos naturales. Perú: Fondo Editorial Investigación Fitoquímica. 183-195.
- Martins, R. M. (2006). Estudio in vitro de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 8(2), 71-78.
- Pulido Suárez, N. J. & Cruz Carrillo, A. 2013. Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1), 91-97.
- Rodríguez Á.; Rodríguez, C. & Cruz, A., 2010. Efecto ixodicida de los extractos etanólicos de algunas plantas sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista MVZ Córdoba*, 15(3), 2175-2184.

- Sanabria G.; López I. & Gualdro R., 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre Artemisa salina de plantas colombianas. Revista Colombiana CienciasQuímicaFarmaceut (26):15-9.
- Stone, BF, Haydock, KP.1962. A methods for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick Boophilus microplus. (Can) Bulletin of Entomology research, bol.53, pat3.
- Schmutterer, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. Annual Review of Entomology, v.35, p.2168-2174, 1990.
- Velez Ramos, Y. M. 2008. “Rendimiento del cultivo de col quintal (brássicaoleracea), utilizando dos tipos de abonos orgánicos (humus y biol) en la parroquia el airo, del cantón espíndola”. Universidad Nacional de Loja, Ecuador.
- Vieira, P. C. & Fernandes, J. B. Plantas Inseticidas. In: SIMÕES, C. M. O., coord. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. Da UFSC, p.739-754, 821p, 1999.