

ACTIVIDAD REPELENTE Y ACARICIDA DEL ACEITE Y ALGUNAS FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS DEL PASTO *Melinis minutiflora* FRENTE AL *Boophilus microplus*

Libardo Hernández*
Danilo Parra**
Augusto Ahumada***

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad repelente y acaricida del aceite del pasto *Melinis minutiflora* y de algunas fracciones cromatográficas (A,B,C,D,E y F) frente a *Boophilus microplus*. Para evaluar la acción acaricida se utilizó la técnica del emparedado de Shaw. La acción repelente se evaluó utilizando una caja de repelencia. El aceite al 20% produjo una mortalidad e inhibición de oviposición del 100% en las garrapatas adultas a las 24 horas. Estas acciones están en relación directa con la concentración. Las fracciones cromatográficas no mostraron actividad acaricida frente a las garrapatas adultas. En los ensayos de repelencia realizados con el aceite sobre las larvas de *Boophilus microplus*, se observó una mayor actividad a la concentración del 20%. Todas las fracciones cromatográficas mostraron acción repelente.

La fracción A fue más efectiva, obteniéndose repelencia del 96% cuando se utilizó al 2%. La actividad del aceite es proporcional a la concentración y al tiempo de exposición, presentando su máxima actividad del 20%.

A esta concentración la mortalidad fue del 79% a las 24 horas, del 92% a las 48 horas y del 95% a las 72 horas. Las fracciones A,B,C y D mostraron mayor actividad larvicida que el aceite.

SUMMARY

The objective of the present work was the determinations of the repellent and acaricidal activity against the tick *Boophilus microplus* of the oil obtained by extraction with petro-

leum ether from the grass *Melinis minutiflora* and some chromatographic fractions (A,B,C,D,E and F) of the oil. The acaricide activity was evaluated by the technics of the sandwich of Shaw, and the repellent action using a repellent box. The oil in concentration of 20% produced 100% of mortality and inhibition of the oviposition was directly related to the concentration.

The chromatographic fractions did not exhibit acaricide activity on the adult tick, however the activity on the larvae was greater than the observed on the adult ticks. All the chromatography fractions exhibited repellent activity where fraction. A was the most active showing 96% of repellent action in concentration of 2%. The activity of the oil was related to the exposition time and concentration, and the major activity was observed at concentrations of 20%. At this concentration the mortality of the larvae was 79% at 24 hours, 92% at 48 hours and 96% at 72 hours. The Chromatography fractions were more larvicide activity than the oil of the grass.

INTRODUCCION

La infestación por garrapatas constituye uno de los factores limitantes para el desarrollo de la ganadería en los países tropicales, siendo causa determinante de cuantiosas pérdidas económicas en Colombia y el mundo.

Datos de los años 1970, 1974 y 1979, indican que el incremento de la población bovina es lento (1,2). Este limitado crecimiento se debe a muchos factores, entre los cuales ocupan lugar importante las secuelas dejadas por las garrapatas y los hemoparásitos transmitidos por ellas (3).

Entre los daños ocasionados por las garrapatas tenemos elevada mortalidad, especialmente en los animales jóvenes, bajos rendimientos en la producción de leche, carne y pieles y la dificultad de llevar razas seleccionadas a las regiones más afectadas por estos ectoparásitos, los cuales crean un estado favorable para algunos agentes patógenos y abren la puerta a

* La presente publicación es un extracto parcial del Trabajo de Tesis de Grado para optar el título de Magister Scientae en Farmacología.

** Departamento de Farmacia - Universidad Nacional de Colombia A.A. 14490. Bogotá, Colombia.

*** Laboratorios de Investigaciones Médicas Veterinarias (LIMV). Estudiante de Posgrado.

*** Médico Veterinario. Estudiante de Posgrado.

gérmenes mórbidos por las irritaciones y perforaciones que causan en los tejidos.

Para el control de las garrapatas tradicionalmente se ha recurrido al uso de productos de diferente composición química, tales como organofosforados, organoclorados, arsenicales, carbamatos y piretroides entre otros, dejando como consecuencia un alto grado de contaminación ambiental por acumulación residual, además de la aparición de resistencia de las garrapatas a estas sustancias; de ahí la importancia de buscar otras opciones en productos de origen natural para controlarlas evitando o disminuyendo el empleo de productos químicos que pueden llegar a producir alteraciones ecológicas irreparables.

Esta investigación se realizó teniendo en cuenta que los métodos para controlar las garrapatas no ofrecen una garantía total por la aparición de cepas resistentes y considerando que los trabajos preliminares efectuados con el pasto *Melinis minutiflora* reflejaron resultados alentadores, además teniendo como objetivo determinar cuál o cuáles de las fracciones cromatográficas del aceite determinar cuál o cuáles de las fracciones cromatográficas del aceite de este pasto poseía (n) mayor actividad frente a la garrapata *Boophilus microplus*.

El presente trabajo hace parte del Proyecto Cooperativo entre la Universidad Nacional, y el Instituto Colombiano Agropecuario. ICA.

Aproximadamente el 90% de la ganadería del país pasta en zonas endémicas de garrapatas y de los hemoparásitos transmitidos por ellas (3). Mediante estudios realizados por las Naciones Unidas y la FAO para Colombia (4), se dedujo que los parásitos externos (garrapatas y otros) en un 35% y los parásitos internos (hemoparásitos y otros) en un 15% son los causantes de las pérdidas en el ganado.

Las pérdidas producidas por las garrapatas y hemoparásitos en el año 1975 fueron de \$6.070 millones de pesos (3). El Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, en Abril de 1980 estimó en \$4.047 millones de pesos las pérdidas económicas producidas por las garrapatas, sin incluir retardo en el desarrollo, utilización de drogas, muertes, etc. (5), parámetros que sí se consideraron en el año de 1975.

Una revisión bibliográfica reciente sobre las especies de garrapatas en América Latina puso de manifiesto el gran número de ellas; 169 que corresponden a casi la cuarta parte, 23% del gran total de 794 especies reportadas por Hoogstraal en el mundo (6).

El *Boophilus microplus* es la garrapata que mayores daños causa en América Latina. Afecta principalmente a los bovinos, pero también a los equinos, caprinos y caninos (7).

El control de las garrapatas utilizando productos químicos debe limitarse a tratamientos estratégicos

de acuerdo con la ecología y dinámica de las poblaciones, evitando el uso irracional de los ixodicidas químicos (8), situación que hace necesario investigar sustancias naturales como el aceite del pasto *Melinis minutiflora*, que puede tener efectos favorables.

En general, la resistencia de los artrópodos a los compuestos químicos es un problema serio y de características universales. En el caso específico de la garrapata *Boophilus microplus* ya se ha reportado resistencia a los compuestos organofosforados, organoclorados, arsenicales y carbamatos (9).

El Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), realizó estudios sobre la Bioecología de la garrapata *Boophilus microplus* en los Llanos Orientales, encontrando que el pasto *Melinis minutiflora* presentaba niveles de infestación bajas y estables (10).

Otras investigaciones de campo realizadas por este Instituto en Carimagua durante el período comprendido entre 1978 a 1981 sobre las gramíneas *Melinis minutiflora* (Yaragúa), *Hiparrhenia rufa* (Puntero), *Trichipogon vestitus* (Paja llanera), *Brachiaria decumbens* y *Andropogon gayanus* demostraron que el *Melinis minutiflora*, a diferencia de los otros pastos, eran inhóspitos para las larvas del *Boophilus microplus* (10).

El estudio sobre "Acción repelente y acaricida del *Melinis minutiflora* sobre el *Boophilus microplus* (11), demostró que el extracto de éter de petróleo del pasto *Melinis minutiflora* tiene acción repelente la cual no es de naturaleza física debido a los pelos glandulares de la planta como se pensaba, sino que es de naturaleza química, producida por el aceite de esta gramínea segregada en estos pelos.

Estudios semejantes, realizados con dos especies de *Stylosantes* nativas de Suramérica, han demostrado una reducción de la población de las diferentes especies de garrapatas cuando crece mezclada con gramíneas (12).

El Pasto *Melinis minutiflora* crece en alturas comprendidas entre los 200 y los 2.500 m. sobre el nivel del mar, en climas cálidos y templados. Es una forrajera rústica, poco exigente, invasora y de rápido desarrollo. En Colombia se conoce con los nombres de Yaragúa, Chopin y Gordura; se encuentran ampliamente diseminado en América del Sur. (2,5,13,14).

PARTE EXPERIMENTAL

El aceite y las seis fracciones cromatográficas del pasto *Melinis minutiflora* denominadas A,B,C,D,E y F, que se utilizaron en esta investigación fueron suministradas durante el proceso de elaboración del Trabajo "AISLAMIENTO, PURIFICACION E IDENTIFICACION PRELIMINAR DE ALGUNOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL EXTRACTO ETereo DEL PASTO *Melinis minutiflora* (14).

Garrapatas adultas.

Se obtuvieron a partir de las larvas de *Boophilus microplus*, las cuales se depositaron sobre 4 terneros mestizos de 7 meses de edad, colocados en unidades de aislamiento adecuadas hasta que las garrapatas alcanzaran el estado adulto.

Larvas

Se obtuvieron a partir de Teleoginas *Boophilus microplus*. Una vez efectuada la oviposición, los huevos permanecieron en el incubador hasta la eclosión y obtención de las larvas.

DILUCIONES

Para la solubilización del aceite y de las 6 fracciones cromatográficas utilizadas en la evaluación de la acción acaricida se emplearon los solventes y emulsificantes del Cumafos 20%, en tanto que el material empleado en la evaluación de la actividad repelente y larvicida se diluyó con acetona.

METODOLOGIA

Para evaluar la acción acaricida del aceite y de las fracciones cromatográficas se empleó una modificación de la técnica del emparedado de Shaw (15).

Con el aceite se utilizaron nueve concentraciones diferentes con sus respectivos controles, mientras que con las fracciones se emplearon únicamente dos concentraciones y sus respectivos controles.

La acción repelente del aceite y de las fracciones se evaluó empleando una caja de repelencia de acuerdo a la técnica de los Laboratorios Wellcome (16).

El aceite se ensayó e 5 diferentes concentraciones, con sus respectivos controles. Las fracciones se utilizaron en diferentes concentraciones debido a que cuando se observaba que la acción repelente se encontraba por debajo del 50%, no se efectuaban más diluciones de la fracción correspondiente.

Así tenemos que con la fracción A se emplearon 8 concentraciones, con B y C se ensayaron 6 concentraciones, con la D se investigaron 5 y con las fracciones E y F se ensayaron únicamente 2 concentraciones.

Para evaluar la acción larvicida del aceite y de las fracciones a las 24, 48 y 72 horas se empleó la técnica de los sobres de Stone y Haydock (17). Seis concentraciones con sus respectivos controles, se ensayaron con el aceite, mientras que con las fracciones cromatográficas se emplearon las mismas concentraciones utilizadas al evaluar la acción repelente.

La corrección de los resultados obtenidos al investigar la acción repelente y larvicida del aceite y de las fracciones se realizó mediante la fórmula de Tattersfiel, Morris y Abbot (18,19).

En la realización de los ensayos con el aceite se llevaron a cabo 5 replicaciones, mientras que con las fracciones se efectuaron 3.

RESULTADOS**Actividad Acaricida**

La actividad del aceite en concentración del 20% sobre las garrapatas produjo inhibición de la ovoposición y mortalidad. El número de huevos aumentó a medida que disminuyó la concentración del aceite. Las concentraciones empleadas por debajo del 10% no causaron mortalidad ni cambios en la actitud, ni el calor de las Teleoginas del *Boophilus microplus* (Tabla 1).

TABLA 1

ACTIVIDAD ACARICIDA DEL ACEITE DEL PASTO *Melinis minutiflora* AL 20% Y DEL CUMAFOS FRENTE A LAS TELEOGINAS DEL *Boophilus microplus*

Peso Garrapatas	Concentración del aceite %	Mortal %	Ovipos. %	Actitud	Color
2.4	20	100	0	-	Oscuro
2.4	10	0	25.0	N	N
2.4	5	0	56.0	N	N
2.5	2.5	0	57.0	N	N
2.5	1.25	0	84.0	N	N
2.5	0.62	0	85.0	N	N
2.3	0.31	0	85.0	N	N
2.3	0.15	0	89.5	N	N
2.5	0.1	0	90.0	N	N
2.5	Cumafos	100	0	-	Oscuro
2.5	Control	0	100.0	N	N

N = Normal

No se observó efecto acaricida con las dos concentraciones de las fracciones ensayadas, siendo normales la actitud y el color. No hubo marcada diferencia en la ovoposición.

Actividad Repelente

La mayor actividad se observó cuando se utilizó el aceite en concentración del 20%, donde se obtuvo una repelencia del 88.5%. A medida que la concentración disminuyó, la actividad repelente se hizo menor (Tabla No. 2).

Todas las fracciones manifestaron acción repelente, destacándose la fracción A, con la cual se obtuvo una repelencia del 96%, seguida de la B y la C con 79% y 77% respectivamente, cuando se emplearon a la concentración del 2.5%. La menos activa, igualmente en su concentración máxima, fue la F, manifestando solamente 30.5% de eficacia (Tabla 3).

TABLA 2

**ACTIVIDAD REPELENTE DEL ACEITE
Melinis minutiflora FRENTE
A LAS LARVAS DE *Boophilus microplus***

Concentraciones del aceite en %	Número Total Larvas*	Larvas no repelidas	No Larvas repelidas	Repelencia %
20	109	12	97	88.5
10	99	16	83	83.0
5	134	44	90	66.0
2.5	138	45	93	66.0
1.25	104	38	66	62.0
Control	115	110	5	3.9

* Promedio de 5 replicaciones

TABLA 3

**ACTIVIDAD REPELENTE DE LAS 6
FRACCIONES CROMATOGRÁFICAS FRENTE
A LAS LARVAS DE *Boophilus microplus***

Fracción	Concentración %	Repelencia
A	2.5	96.0
	1.25	95.0
	0.62	89.0
	0.31	89.0
	0.15	88.0
	0.075	82.0
0.0	0.037	61.0
	0.018	37.0
	2.5	79.0
B	1.25	76.0
	0.62	73.0
	0.31	57.0
	0.15	51.0
	0.075	24.0
C	2.5	77.0
	1.25	71.0
	0.62	69.0
	0.31	66.0
	0.15	52.0
	0.075	20.0
D	2.5	67.0
	1.25	66.0
	0.62	30.0
	0.31	30.0
E	0.15	30.0
	2.5	63.0
	1.25	28.0
F	2.5	30.5
	1.25	7.0

Actividad larvicida después de 24, 48 y 72 horas

La actividad del aceite se observó principalmente a la concentración del 20%, con la cual se obtuvo el 79% de mortalidad a las 24 horas, incrementándose al 92% a las 48 y al 96% a las 72 horas. A medida que disminuyó la concentración, disminuyó también la actividad larvicida (Tabla 4).

La acción larvicida se manifestó con las 6 fracciones cromatográficas. La mortalidad promedio demostró que la mayor actividad la produjo la fracción A con un 49% (Tabla 5). Con todas las fracciones se observó que la actividad decreció a medida que se diluyó la fracción.

TABLA 4

**ACTIVIDAD LARVICIDA DEL ACEITE
A LAS 24-48 Y 72 HORAS**

Concentraciones %	24 Horas Mortalidad %	48 Horas Mortalidad %	72 Horas Mortalidad %
20	79.0	92.0	96.0
10	23.0	91.0	95.0
5	17.0	44.0	44.0
2.5	13.0	22.0	22.0
1.25	7.0	10.0	10.0
0.1	2.5	5.0	5.0
Control	1.0	1.0	2.0

TABLA 5

**ACTIVIDAD LARVICIDA PROMEDIO
DE LAS 6 FRACCIONES
CROMATOGRÁFICAS
EN LA CONCENTRACION 2.5%**

Fracción	Total Larvas Promedio	Muertas Promedio	Vivas Promedio	Mortalidad Promedio
A	124	63	61	49.0
B	150	39	111	25.0
C	111	54	57	48.0
D	120	39	81	31.0
E	127	24	103	17.5
F	127	15	112	11.0

DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la presente investigación confirman la acción repelente y acaricida del aceite del pasto *Melinis minutiflora* (11) y demuestran la acción repelente manifestada por las seis fracciones

cromatográficas, indicando que esas acciones no se deben al efecto físico producido por los pelos glandulares de esta gramínea como se pensó inicialmente, sino a una(s) sustancia(s) química(s) presente(s) en ella.

Lo observado está de acuerdo con los datos consignados en las investigaciones de campo realizadas por el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA sobre cinco gramíneas, las cuales demostraron que el *Melinis minutiflora* a diferencia de los otros pastos examinados, era inhóspito para las larvas *Boophilus microplus* (10) y con lo demostrado por Hernández y Col (11) quien determinó la acción acaricida del aceite al 20% sobre las garrapatas *Boophilus microplus* y la actividad repelente frente a las larvas de la misma especie.

Calle y Col (14) determinaron que el aceite del *Melinis minutiflora* lo mismo que las fracciones cromatográficas B y C presentaban una composición rica en esteroides, los cuales según Bowden y Rathors (20) determinan resistencia al ataque de los insectos en las plantas que los contienen. De acuerdo con los resultados de estos estudios, aunque no puede destacarse la acción de los esteroides, debe pensarse en otras sustancias que poseen actividad repelente y acaricida, ya que la fracción A, que no muestra en su composición esteroides, fue la que presentó el porcentaje más alto de actividad repelente (96%).

La actividad del pasto *Melinis minutiflora* contra garrapatas del género *Boophilus microplus* es comparable a la acción de dos especies de *Stylosantes* nativas de Sur América, las cuales según Sutherst y colaboradores (12), cuando se mezclaban con gramíneas producían reducción de la población de garrapatas; sin embargo esta acción, de acuerdo a ensayos realizados, es ejercida por una sustancia volátil, la cual no ha

sido aislada ni caracterizada, no siendo el caso del pasto *Melinis minutiflora* donde la actividad continua después del proceso de extracción en el cual se podría desaparecer cualquier sustancia volátil. Este hecho confirma la presencia de sustancias en el pasto *Melinis minutiflora* de carácter no volátil y de composición desconocida que ejercen una acción no solamente repelente sino también acaricida sobre las larvas de *Boophilus microplus*.

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que el aceite del pasto *Melinis minutiflora* empleado el 20%, posee actividad acaricida del 100% sobre las garrapatas adultas *Boophilus microplus*.
2. Las seis fracciones cromatográficas, derivadas del aceite de este pasto, a las concentraciones ensayadas, no manifestaron actividad acaricida sobre las garrapatas adultas de la misma especie.
3. El aceite y las seis fracciones cromatográficas, a las concentraciones utilizadas, presentaron alto porcentaje repelente frente a las larvas de *Boophilus microplus*.
4. El aceite y las fracciones del *Melinis minutiflora* mostraron actividad larvicida.
5. Las fracciones A, B, C y D empleadas al 2.5% demostraron poseer acción repelente y larvicida más potente que la manifestada por el aceite a la misma concentración.
6. Se confirmó una vez más que las acciones acaricidas, larvicidas y repelentes son de naturaleza química.

BIBLIOGRAFIA

1. VALDEZ, A. Algunos Aspectos Económicos de la Industria Ganadera en América Latina. Seminario sobre el potencial para la Reproducción de Ganado de Carne en América Tropical. p. 193-211. 1974 Latina. Seminario sobre el potencial para la Reproducción de Ganado de Carne en América Tropical. p. 193-211. 1974.
2. MINISTERIO DE AGRICULTURA DE COLOMBIA. Programas Ganaderos. Oficina de divulgación. Copros Ltda. Bogotá, 1974.
3. VIZCAINO, G.O. Impacto Económico de los Hemoparásitos y sus vectores en ganado de leche. I Simposio Colombiano sobre Trastornos de la Reproducción en Ganado Lechero. Bogotá D.E. Colombia p. 37- 42. 1981.
4. SPRINGELL, P.H. The Cattle Tick in Relation to animal production in Australia. World Animal Review, Vol. 10 19-23 1974.
5. PEÑA, N.E. VILLAMIL L.C. PARRA F.D. LOBO, A.C. Las Enfermedades de los Animales en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario ICA Colombia. p. 41-44, 105-215, 1980.
6. EVANS, E.D. Puntos que surgen de los datos actuales acerca de la Distribución de Garrapatas en América Latina en "SEMINARIO SOBRE ECOTOPARASITOS", Colombia p. 47, 1975.

7. LUQUE, F.G. Conocimientos Actuales sobre la Distribución de las Especies de garrapatas en América Latina en "Seminario sobre ectoparásitos". Colombia p. 41-42, 1985.
8. LOPEZ, U.A.; ALARCON, M.E.; BERNAL, J.E.; BERMUDEZ, L.A.; BUSTAMANTE, E. Gramíneas y Leguminosas forrajeras en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Colombia p. 204-105, 1970.
9. BETANCOURT, E.A. Resistencia de Garrapatas a Insecticidas en "CONTROL DE GARRAPATAS". Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Compendio No. 39. p. 81-110, 1980.
10. AYCARDI, E. BENAVIDEZ, E. GARCIA, O. MATEUS, G.; HENAO F. Bioecología de la Garrapata, *Boophilus microplus* en novillos en cuatro pastos en los Llanos Orientales de Colombia. p. 37, 1982.
11. HERNANDEZ, L. PARRA, D. CASTAÑEDA N. Acción Repelente y Acaricida del *Melina minutiflora* sobre el *Boophilus microplus*.
12. SUTHERST, R.W.; JONES, R.J.; SCHNITZERLING, J.J. Tropical Legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and Kill Cattle Ticks. Nature. Vol. 295-3200-321, 1982.
13. RIAÑO, I. GALINDO, G. "Aislamiento, Purificación e identificación en el extracto etéreo del pasto *Melinis minutiflora*". Tesis Facultad de Ciencias - Universidad Nacional de Colombia Bogotá, 1984.
14. CALLE A.J. HERNANDEZ, E.L.; RIAÑO, I.; GALINDO, G. Aislamiento e identificación de algunos compuestos del aceite del pasto *Melinis minutiflora*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas; No. 15; 83-87, 1986.
15. SHA, R.D. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* and an assesmet of its resistance spectrum Bull ent. Res. Vol. 56: 389, 405, 1986.
16. Laboratory Technique for the determination of the repellent activity of Chemical against larval ticks. Técnica no Publicada de los laboratorios Wellcome.
17. STONE, B.F.; HAYDOCK, D.P. Method for Measuring the Acaricide Susceptibility of the Cattle Tick *Boophilus microplus*. Bull. ent. Res. Vol. 53: 567-578, 1962.
18. TATTERSFIELD, F.; MORRIS H.M. An Apparatus For testing the Toxic values of contact insecticides under controlled conditions Bull. ent. Res. Vol. 14 223, 1924.
19. ABBOT, W.S. A Method of computing the effectiveness of an insecticide, J. Econ. Ent. Vol. 18: 265-267, 1925.
20. BOWDEN, M.; RATHORE, A.K. S.C. Steroids from *Solanum Jasminoides* J. P. Of Natural Products. Vol. 42; 421-422. 1979.