

NOTA CORTA [SHORT NOTE]

***Tropical and
Subtropical
Agroecosystems***

**ACTIVIDAD IXODICIDA DE EXTRACTOS CRUDOS DE *Diospyros anisandra*
CONTRA LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae)**

**[IXODICIDE ACTIVITY OF *Diospyros anisandra* CRUDE EXTRACTS
AGAINST *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) LARVAE]**

**J.A. Rosado-Aguilar^{1*}, A.J. Aguilar-Caballero¹, R.I. Rodríguez-Vivas¹,
R. Borges-Argaez², Z. García-Vázquez³, M. Méndez-González²,
M. Cáceres-Farfán², A. Dorantes-Euán².**

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán,
Mérida, Yucatán, México. E-mail: jarosado@fvmz.uady.mx*

²Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

³Instituto Nacional de Investigación Forestal Agropecuaria,
Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria,
Jiutepec, Morelos, México.

*Corresponding author

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar extractos crudos de *Diospyros anisandra* disueltos en Tween, etanol y dimetilsulfóxido (DMSO) para el control de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Los extractos crudos de la planta completa y sus partes vegetales (hoja, corteza y raíz), fueron extraídos con metanol y evaluados mediante la prueba de inmersión larval. Larvas de *R. microplus* fueron expuestas a los extractos crudos de la planta completa disueltos en Tween-20 (2%), etanol (95%) y DMSO (2.5%). Los extractos crudos de la planta completa disueltos en Tween-20 (2%) y etanol (95%) presentaron las mayores mortalidades ($79.68 \pm 22.79\%$ y 69.42 ± 30.58 respectivamente, $p < 0.05$) de *R. microplus*. Los extractos crudos de hoja, raíz y corteza fueron disueltos en Tween-20 (2%). La hoja y la corteza produjeron la mayor actividad ixodícida (84.91% y 79.24% respectivamente). Se concluye que los extractos crudos de *D. anisandra* disueltos en Tween-20 (2%) y etanol (95%) presentaron las mayores mortalidades de larvas de *R. microplus*; sin embargo, se recomienda el uso del Tween-20 (2%) por ser menos tóxico para las larvas y el personal técnico que realiza los bioensayos. La hoja y corteza de *D. anisandra* disueltas en Tween-20 (2%) fueron las estructuras vegetales con mayor eficacia para el control de larvas de *R. microplus* en condiciones de laboratorio.

Palabras Clave: Ixodícida, extractos metanólicos, *Diospyros anisandra*, disolventes, prueba de inmersión larval, *Rhipicephalus microplus*

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate crude extracts of *Diospyros anisandra* diluted with Tween, ethanol and dimethylsulphoxide (DMSO) to control larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. The crude extracts of whole-plant and vegetable components (root, leaf and stem bark) were extracted with methanol and evaluated by the larval immersion test. Larvae of *R. microplus* were exposed to crude extracts of whole-plant dissolved in Tween-20 (2%), ethanol (95%) and DMSO (2.5%). The crude extracts of whole-plant dissolved in Tween-20 (2%), and ethanol (95%) showed higher mortality ($79.68 \pm 22.79\%$ and 69.42 ± 30.58 respectively, $p < 0.05$) of *R. microplus*. The crude extracts of leaf, root and stem bark were diluted in Tween-20 (2%). The leaf and stem bark produced the higher ixodicide activity (84.91% and 79.24% respectively). It is concluded that crude extracts of *D. anisandra* dissolved in Tween-20 (2%) and ethanol (95%) showed the higher mortalities of *R. microplus* larvae; however, we recommend the use of Tween-20 (2%) to be less toxic to larvae and technical staff which handles bioassays. The leaf and stem bark of *D. anisandra* dissolved in Tween-20 (2%) were the plant components with higher efficacy to control *R. microplus* larvae in laboratory conditions.

Key words: Ixodicide, methanolic extracts, *Diospyros anisandra*, solvents, immersion larval test, *Rhipicephalus microplus*.

INTRODUCCIÓN

En regiones tropicales y subtropicales del mundo las garrapatas son uno de los principales parásitos que causan pérdidas económicas en la ganadería bovina. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* causa en el bovino daños directos a través de laceraciones en la piel, reducción en los niveles de producción, alteraciones reproductivas y daños indirectos mediante la transmisión de agentes patógenos (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*). La estrategia para controlar esta plaga ha sido a través de ixodicidas químicos; sin embargo, su uso continuo e irracional está propiciando la generación de cepas de garrapatas resistentes (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006). Estos químicos también causan daños ecológicos (de Souza *et al.*, 2003). Debido a esto, se requiere de productos de origen natural que puedan minimizar estos efectos negativos en el animal y el ambiente. Existen evidencias de la actividad ixodicida de extractos de plantas a nivel mundial (Tedonkeng *et al.*, 2005; De Freitas *et al.*, 2007). En Yucatán, México existen una gran diversidad de plantas con metabolitos secundarios con probable actividad nematocida, bactericida, fungicida e ixodicida (Vera-Ku, 2004).

Diospyros anisandra S.F. Blake es un árbol de corta talla, endémico de la península de Yucatán, México. Esta planta es usada como leña, madera, para el tratamiento de desordenes cutáneos y su fruto es comestible (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003; Vera-Ku, 2004). Se le atribuyen propiedades antibióticas, antifúngicas, antimicobacterianas e ixodicidas (Vera-Ku, 2004; Borges-Argáez *et al.*, 2007; Rosado-Aguilar *et al.*, 2007).

La prueba de inmersión de larvas (PIL) se emplea como bioensayo para evaluar la eficacia de compuestos sintéticos y extractos de origen natural sobre garrapatas. La parte crítica de este bioensayo en la evaluación de extractos naturales, es el uso de disolventes que permitan la completa disolución de las muestras y que no sean tóxicos para el organismo a evaluar (De Souza *et al.*, 2003). Los compuestos más utilizados para disolver extractos crudos vegetales son el etanol, metanol y dimetilsulfóxido (DMSO); sin embargo, estos compuestos presentan cierta toxicidad en el organismo a evaluar. El detergente Tween es un compuesto inocuo que tiene la propiedad de disolver grasas (Acofarma, 2007; Panreac, 2007) y es utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria, por lo que podría ser utilizado como disolvente de extractos de plantas en bioensayos.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar extractos crudos de *D. anisandra* disueltos en Tween, etanol y DMSO para el control de larvas de *R. microplus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización geográfica

El trabajo se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (19°30' y 21°35' latitud norte y 87°30' y 90°24' longitud oeste) (INEGI, 1991). El Estado de Yucatán se caracteriza por presentar un clima de tipo Aw (cálido-subhúmedo) (García, 1981).

Material biológico

Plantas: Se colectaron plantas de *D. anisandra* en Yaxcabá, Yucatán, las cuales fueron identificadas en el herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán, depositándose en el mismo los ejemplares herborizados. Se realizaron extracciones crudas de la planta completa y sus partes vegetales por separado (raíz, corteza y hojas). El material vegetal fue secado en una estufa a 40°C durante 72 h y posteriormente fue molido usando un molino mecánico. El material molido se transfirió por separado a frascos de vidrio conteniendo metanol destilado a razón de 30 ml de metanol por 25 g de material vegetal. El material fue expuesto al metanol durante 72 h y posteriormente filtrado y concentrado en un rotavapor. Los extractos fueron transferidos a viales y conservados a 4°C hasta su uso (Borges-Argáez *et al.*, 2007).

Garrapatas: En un rancho con explotación de ganado bovino se colectaron garrapatas adultas repletas de *R. microplus* que fueron depositadas en tubos de ensayo tapados con algodón. Las garrapatas se transportaron al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (FMVZ-UADY) para su procesamiento.

Las garrapatas adultas repletas se depositaron en cajas de petri e incubaron en oscuridad a una temperatura de 27 ± 2 °C y humedad relativa de 85 a 86% para permitir la oviposición (Cen *et al.*, 1998). Los huevos obtenidos fueron depositados en viales de cristal tapados con algodón bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad al que estuvieron las garrapatas adultas repletas para permitir la eclosión de las larvas. Se utilizaron larvas de 7-14 días de edad para evaluar los extractos crudos metanólicos de *D. anisandra*.

Prueba de inmersión de larvas

Se utilizó la prueba de inmersión de larvas (Santamaría y Soberanes, 2001) para evaluar la actividad ixodicida de los extractos de *D. anisandra*. Para conocer el mejor compuesto para disolver los extractos crudos de *D. anisandra*, primero se probaron

los extractos de la planta completa, los cuales fueron disueltos en Tween-20 (2%), etanol (95%) y DMSO (2.5%).

Las larvas de *R. microplus* fueron expuestas por 30 segundos al extracto de la planta completa (10% de concentración) y transferidas a paquetes para ser incubadas a $27^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, con humedad relativa de 85 a 86% por 48 horas (Cen *et al.*, 1998). Para cada bioensayo se realizaron seis repeticiones incluyendo a los controles (solventes sin extractos). Al término del bioensayo, se realizó el conteo de larvas vivas y muertas (larvas sin movimiento).

Una vez obtenido el mejor disolvente del extracto de la planta completa de *D. anisandra*, los extractos obtenidos de la hoja, corteza y raíz se disolvieron en éste para probar su actividad ixodicida, utilizando la técnica de inmersión de larvas (Santamaría y Soberanes, 2001). La mortalidad corregida se calculó de acuerdo a la fórmula siguiente (Abbott, 1925):

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ MT} - \% \text{ MC}}{100 - \% \text{ MC}} \times 100$$

Donde:

MT= Mortalidad tratados

MC= Mortalidad controles

Análisis estadístico

Los resultados de las mortalidades corregidas de *R. microplus* expuestas a los extractos crudos de la planta completa de *D. anisandra* disueltos con Tween-20 al 2%, etanol (95%) y DMSO (2.5%) y las mortalidades corregidas de las tres partes de la planta, disueltas con Tween-20 (2%), fueron analizadas mediante la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Los extractos crudos de la planta completa de *D. anisandra* disueltos en Tween-20 (2%) y etanol (95%) presentaron las mayores mortalidades de larvas de *R. microplus* $79.68 \pm 22.79\%$ y 69.42 ± 30.58 ($p < 0.05$) respectivamente, en comparación con el DMSO (2.5%), el cual presentó una mortalidad larval del 52.12 ± 34.80 %. Sin embargo, al comparar la mortalidad producida al usar etanol (95%) y DMSO (2.5%) no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$). Debido a que el extracto completo de la planta disuelto en Tween-20 (2%) presentó la mayor mortalidad y que el Tween-20 es un solvente inocuo para el técnico que realiza el bioensayo, se decidió utilizar este disolvente para evaluar las partes vegetales de la planta. Los resultados de la mortalidad corregida de *R. microplus* al usar las distintas partes de la planta disueltas en Tween-20 (2%) se presentan

en el cuadro 1. Se observó que la hoja fue la parte de la planta que produjo la mayor actividad ixodicida (84.91%; $p < 0.05$) para el control de larvas de *R. microplus*, en tanto que la raíz mostró la menor actividad (43.14 %)

Cuadro 1. Mortalidad corregida de larvas de garrapatas *Rhipicephalus microplus* tratadas con extractos crudos metanólicos de las partes vegetales de *Diospyros anisandra* disueltos en Tween-20 (2%).

Parte de la planta	Larvas evaluadas*	Larvas muertas**	Mortalidad corregida
Control	542	6	No aplica
Raíz	480	210	43.14 %a
Hoja	444	353	84.91 %b
Corteza	516	439	79.24 %b

*Larvas evaluadas en las seis repeticiones.

**Larvas muertas en las seis repeticiones

Letras diferentes entre filas significa diferencia estadística $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

Los extractos crudos de la planta completa de *D. anisandra* disueltos en Tween-20 (2%) y etanol (95%) presentaron las mayores mortalidades de larvas de *R. microplus*. Sin embargo, las mortalidades producidas al usar etanol (95%) y DMSO (2.5%) no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Estos resultados permitieron demostrar que el Tween-20 es el compuesto que mejor disolvió los metabolitos de *D. anisandra*, lo que se reflejó en una mayor mortalidad de las larvas. Chungsamarnyart y Jansawan (1990) y De Souza *et al.* (2003) mencionan que los disolventes de extractos de plantas deben permitir la completa disolución de las muestras y ser inocuos para el organismo a evaluar. Asimismo, estos autores mencionan que el DMSO y etanol son más tóxicos que el Tween. El Tween es utilizado en la industria farmacéutica y alimenticia para elaborar supositorios, vitaminas y emulsificar aceites de hígado de pescado, vegetales y minerales (Acofarma, 2007; Panreac, 2007), lo que hace al Tween-20 menos tóxico para las larvas y el personal técnico que realiza los bioensayos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que la hoja y la corteza de *D. anisandra* fueron las estructuras de la planta que mayor eficacia presentaron contra larvas de *R. microplus* usando como disolvente Tween-20 (2%), esto concuerda con estudios realizados por Chungsamarnyart *et al.* (1988, 1991) quienes evaluaron 152 plantas con sus diferentes estructuras y observaron que la hoja presentó mayor eficacia contra larvas de *R. microplus* en comparación con las otras estructuras de las plantas. Esto

probablemente se deba a que la hoja es la parte que esta más expuesta a los ataques de las plagas de insectos y por lo tanto crea o secreta una mayor concentración de sustancias para su defensa que podrían ser insecticidas (Hernández *et al.*, 1987; Valladares *et al.*, 2003).

Se ha reportado que *D. anisandra* tiene propiedades antibióticas, antifúngicas y antimicobacterianas (Vera-Ku, 2004; Borges-Argáez *et al.*, 2007); sin embargo, se desconocía su actividad contra larvas de *R. microplus*. La elevada eficacia *D. anisandra* para el control de *R. microplus* obtenida en el presente estudio, pone de manifiesto el uso potencial de esta planta como biopesticida y una alternativa económica y ambientalmente sustentable. Sin embargo, es necesario evaluar su eficacia contra garrapatas adultas y bajo condiciones *in vivo*.

CONCLUSIONES

Los extractos crudos de *D. anisandra* disueltos en Tween-20 (2%) y etanol (95%) presentaron las mayores mortalidades de larvas de *R. microplus*; sin embargo, se recomienda el uso del Tween-20 (2%) por ser menos tóxico para las larvas y el personal técnico que realiza los bioensayos. La hoja y corteza de *D. anisandra* disueltos en Tween-20 (2%) fueron las estructuras vegetales con mayor eficacia para el control de larvas de *R. microplus* en condiciones de laboratorio. Es necesario continuar con la evaluación de extractos vegetales para el control de las garrapatas ya que podrían representar una alternativa económica y ambientalmente sustentable.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo proporcionado al M. en C. José Alberto Rosado Aguilar en su primer año de estudios de Doctorado en la Universidad Autónoma de Yucatán. Se agradece a la Fundación Produce Yucatán por el financiamiento del proyecto (31-2007-0552).

REFERENCIAS

Abott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economy Entomology*, 18: 265-267.

Acofarma. 2007. Fichas de información técnica Tween <http://www.acofarma.com/pdf/htm/tween.htm>

Arellano-Rodríguez, J.A., Flores-Guido, J.S., Tun-Garrido, J., Cruz-Balam, M.M. 2003. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la

península de Yucatán. *Etnoflora Yucatanense*, 20: 1-196.

Borges-Argáez, R., Canche-Chay, C.I., Peña-Rodríguez, L.M., Said-Fernández, S., Molina-Salinas, G.M. 2007. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia*, 78: 370-372.

Cen, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Domínguez, A.J.L., Wagner, G. 1998. Studies on the effect on infection by *Babesia sp* on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 78: 253-257.

Chungsamarnyart, N., Jansawan, W. 1990. Bioassay techniques of insecticidal plant-extracts on tropical cattle ticks (*Boophilus microplus*). *Thailand. Kasetsart Journal (Nature Science Supplement)*, 24: 24-27.

Chungsamarnyart, N., Jiwajinda, S., Jansawan, W., Kaewsuwan, U., Buranasilpin, P. 1988. Effective plant crude-extracts on the tick *B. microplus*. I. Larvicidal Action. *Thailand Kasetsart Journal (Nature Science Supplement)*, 22: 37-41.

Chungsamarnyart, N., Jiwajinda, S., Jansawan, W. 1991. Larvicidal effect of plant crude-extracts on the tropical cattle tick (*B. microplus*). *Thailand Kasetsart Journal (Nature Science. Supplement)*, 25: 80-89.

De Freitas, F.F., Souza, E.P.F. 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: *Caesalpinioideae*) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 147: 150-154

De Souza, C.A.C., Romário, C.L., Furlong, J., Teixeira, P.H., Mascarenhas, P.W. 2003. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciencia Rural*, 33: 109-114.

García, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México, México, D.F. Pp. 43-45.

Hernández, L.E., Parra, D.G., Marin, A.C. 1987. Acción repelente y acaricida del *Melinis minutiflora* sobre *Boophilus microplus*.

- Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas, 16: 17-21.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, INEGI. 1991. VII Censo Agropecuario. Yucatán, México.
- Panreac. 2007. Ficha de Datos de Seguridad del Tween 20. Según Directiva 2001/58/CE <http://www.panreac.com/new/esp/fds/ESP/X162312.htm>.
- Rosado-Aguilar, A., Aguilar-Caballero, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges, R., Mendez, M., Dorantes, A., Caceres, M., García-Vazquez, Z. 2007. Evaluation of three solvents as vehicle of crude methanolic plant extract in the larval immersion test using *Boophilus microplus* ticks. 21st International Conference WAAVP. Gent, Belgium. 19-23 August. Pp. 634.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Arevalo, F., Fragoso-Sánchez, H., Santamaría, V.M., Rosario-Cruz, R. 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136: 335-342.
- Santamaría, V.M., Soberanes, C.N. 2001. Memorias del Curso-Taller sobre diagnóstico de resistencia a ixodíidas en garrapatas *Boophilus microplus*. Del 26 al 28 de septiembre de 2001, Jiutepec, Morelos, México.
- Tedonkeng, P.E., Tendonkeng, F., Kana, J.R., Khan, P.V., Boukila, J.B. 2005. A study of the acaricidal properties of an essential oil extracted from the leaves of *Ageratum houstonianum*. Cameroon. *Veterinary Parasitology*, 128: 319-323.
- Valladares, G., Harbin, L., Defagó, M.T., Carpinella, C., Palacios, S. 2003. Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de *Melia azedarach* (meliaceae). *Revista Sociedad Entomológica Argentina*, 62: 53-61.
- Vera-Kú, B.M. 2004. Detección de actividad antimicrobacteriana en Evaluación de la actividad biológica en plantas medicinales nativas de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 100 p.

Submitted January 07, 2008 – Accepted April 04, 2008

Revised received June 03, 2008