

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO IXODICIDA *in vitro*
DE LOS EXTRACTOS DE SEMILLAS DE
Annona purpurea, *A. reticulata* y *A. muricata*,
APLICADOS EN LA GARRAPATA *Rhipicephalus
sanguineus*”**

ANA LUCÌA BARRIOS ARANDA

Médica Veterinaria

GUATEMALA, MAYO DE 2012

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO IXODICIDA *in vitro*
DE LOS EXTRACTOS DE SEMILLAS DE
Annona purpurea, *A. reticulata* y *A. muricata*,
APLICADOS EN LA GARRAPATA *Rhipicephalus sanguineus*”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

ANA LUCÌA BARRIOS ARANDA

Al conferírsele el título profesional de

Médica Veterinaria

En el grado de Licenciado

GUATEMALA MAYO DE 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
JUNTA DIRECTIVA

DECANO: M. V. Leonidas Ávila Palma
SECRETARIO: M. V. Marco Vinicio García Urbina
VOCAL I: Lic. Sergio Amílcar Dávila Hidalgo
VOCAL II: M. V. MSc. Dennis Sigfried Guerra Centeno
VOCAL III: M. V. Mario Antonio Motta González
VOCAL IV: MEP. Javier Enrique Baeza Chajón
VOCAL V: Br. Ana Lucía Molina Hernández

ASESORES

M. V. DORA ELENA CHANG CHANG DE JO
M. V. LUDWIG ESTUARDO FIGUEROA HERNÁNDEZ
M. V. JOAQUÍN FEDERICO VILLATORO PAZ
Lic. ARMANDO CÀCERES ESTRADA

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el Trabajo de Tesis titulado:

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO IXODICIDA *in vitro*
DE LOS EXTRACTOS DE SEMILLAS DE
Annona purpurea, *A. reticulata* y *A. muricata*,
APLICADOS EN LA GARRAPATA *Rhipicephalus sanguineus*”**

**Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

Como requisito previo a optar al título profesional de:

MÈDICA VETERINARIA

TESIS QUE DEDICO

A **MIS PADRES**: Por su apoyo incondicional y paciencia durante mi carrera.

A **MI HERMANO**: por influir positivamente en mis decisiones e inculcarme amor y respeto a la naturaleza.

A **TODOS LOS MIEMBROS DE MI FAMILIA**: Abuelos, tías, tíos y primos que me apoyaron en este largo trayecto; principalmente a los que ya no están presentes físicamente, pero sé que me acompañan.

A **MIS PADRINOS**: A Carlos Barrios mi papá, Dennis Marroquín, Juan Pablo Calderón y David Morán quienes, además de brindarme su amistad, han compartido conocimientos y experiencias, de manera desinteresada.

A **TODOS** los que me ayudaron moral y materialmente, durante el proceso de tesis: Alejandro Hun, José Arturo Lobo, mi tía Hilda Paz, Omar y Julio, mis Catedráticos y el personal de laboratorio.

A **TODOS LOS ANIMALES**, que de una u otra forma sufrieron o dieron su vida, para lograr mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS

A **MIS ASESORES**: por orientarme en el proceso de mi tesis y estar siempre en la disposición de ayudarme.

A **MIS AMIGAS DE INFANCIA**: Mariela y Lourdes por ser mis amigas incondicionales y que a pesar de tomar diferentes caminos, su apoyo siempre ha estado presente.

A **MARÍA**: por ser mi ayudante principal y estar a mi lado a lo largo de mi vida.

A **MIS AMIGOS DEL COLEGIO**: porque a pesar de tomar diferentes caminos siempre he tenido su apoyo incondicional.

A **MIS AMIGOS**: José Arturo, Numa y Astrid, que además de ofrecerme su valiosa amistad, fueron un gran apoyo durante mi carrera.

A **MI MÓDULO**: Integrado por María Eugenia, Víctor, Paola, la Ale, Gema, Chea, Carol y Laura porque además de su amistad he compartido conmigo momentos inolvidables.

A **LA DOCTORA** Blanco y a los Drs. María Díaz y Arturo Barahona por su hospitalidad y gran apoyo durante mi EPS en Honduras.

A **MIS MASCOTAS**: porque me han dejado y me dan lecciones de vida y son mi principal inspiración.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	HIPÓTESIS.....	2
III.	OBJETIVOS.....	3
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
	4.1 GARRAPATA CAFÉ DEL PERRO, GARRAPATA DE LAS PERRERAS.....	5
	4.1.1 Morfología.....	5
	4.1.2 Anatomía interna.....	5
	4.1.3 Ciclo de vida.....	6
	4.1.4 Síntomas de la infestación y efectos patológicos.....	7
	4.1.5 Diagnóstico.....	8
	4.1.6 Control.....	8
	4.1.7 Tratamiento.....	9
	4.2 DESCRIPCIÓN FAMILIA ANNONACEA.....	10
	4.3 DESCRIPCIÓN ESPECIES DE <i>ANNONA</i> A EVALUAR	
	4.3.1 Sincuyá (<i>Annona purpurea</i> Moc y Sessé).....	12
	4.3.2 Anona Colorada (<i>Annona reticulata</i> Linneo).....	13
	4.3.3 Guanaba (<i>Annona muricata</i> Linneo).....	14
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
VIII.	CONCLUSIONES.....	28
IX.	RECOMENDACIONES.....	29
X.	RESUMEN.....	30
	ABSTRACT.....	31
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.1	Resultado de garrapatas (<i>R. sanguineus</i>) muertas administrando extractos de <i>Annona</i> spp, según proporción a las 24 h.....	25
Tabla No.2	Resultado de garrapatas (<i>R. sanguineus</i>) muertas administrando extractos de <i>Annona</i> spp, según proporción a las 48 h.....	25
Tabla No.3	Resultado de garrapatas (<i>R. sanguineus</i>) muertas administrando extractos de <i>Annona</i> spp, según proporción a las 72 h.....	26

I. INTRODUCCIÓN

La garrapatosis en especies de compañía se presenta comúnmente en el campo y la ciudad, y se considera a las garrapatas como un riesgo para la salud animal y humana, causándoles lesiones epidérmicas, irritación, malestar, anemia y la transmisión de enfermedades como erliquiosis y babesiosis.

El tratamiento convencional consiste en el uso de diversos químicos, como por ejemplo: piretroides, organofosforados, amidinas, lactonas macrocíclicas, imidacloprid y fipronil. El uso irracional de estos fármacos ha generado resistencia variable de las garrapatas a estos productos; otras desventajas incluyen su potencial tóxico, costo elevado y disponibilidad limitada ya que no todas las personas están en condiciones de adquirirlos. Es necesaria la búsqueda de alternativas naturales eficaces con baja toxicidad, económicas, accesibles y amigables con el ambiente. La fitoterapia es una alternativa prometedora que podría extenderse en la medida en que se valide su uso clínico en pequeñas especies.

En el presente estudio evalué la actividad ixodida *in vitro* de los extractos de *Annona purpurea*, *A. reticulata* y *A. muricata* (en tres proporciones cada uno), aplicados en la garrapata de perro *Rhipicephalus sanguineus*. Utilicé tres especies del género *Annona* debido a que algunos autores reportan diferencias evolutivas en los niveles de acetogeninas, que son compuestos citotóxicos contra insectos, algunos reportados son los mosquitos y chinches por lo que en este estudio probé el efecto ixodida de cada extracto para determinar cuál es el más efectivo.

(Fang-Ronget *al.*, 1997; Chávez y Mata, 1999).

II. HIPÓTESIS

No existe diferencia del efecto ixodicida de los tres extractos de *Annona* sp., contra la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

3.1.1 Contribuir en el desarrollo de nuevas alternativas para el control de garrapatas en especies de compañía.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Determinar el efecto ixodicida *in vitro* de tres extractos naturales de semillas de anona (*A. purpurea*, *A. reticulata* y *A. muricata*) contra la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

3.2.2 Determinar qué proporción de los tres extractos es más efectiva contra la garrapata *R. sanguineus*.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 GARRAPATA CAFÉ DEL PERRO, GARRAPATA DE LAS PERRERAS

Las garrapatas son artrópodos que pertenecen a la clase Arácnida que comprende además, escorpiones, arañas y ácaros. Las garrapatas y los ácaros constituyen el Orden Acarina. Las garrapatas son los miembros más grandes del Orden Acarina y se alimentan exclusivamente de la sangre de los vertebrados, para lo cual poseen un aparato bucal adaptado para morder, picar y succionar. Se agrupan en el Suborden Ixodoidea, en el que se distinguen dos familias Ixodidae (o garrapatas duras) y Argasidae (o garrapatas blandas).

(Bowman, 2008; Cordero, 2002)

El termino garrapata se aplica tanto a las blandas (argásidos) como a las duras (ixódidos). Las especies que parasitan con mayor frecuencia a los carnívoros domésticos, son principalmente ixódidos o garrapatas duras.

(Cordero 2002)

Los ácaros en general (Acarina), morfológicamente presentan el cefalotórax y el abdomen fundidos en una sola región continua, desprovista de segmentación externa, de pequeño tamaño que oscila, según las especies, entre uno y 13 mm de longitud. El órgano bucal está adaptado para picar y chupar. Los adultos presentan cuatro pares de patas y las larvas tres, diferenciándose éstas según los estadios ninfales en ácaros (tres estadios ninfales) y en garrapatas (dos estadios ninfales).

(Bowman, 2008; Mehlhorn, 1993)

A la familia de las garrapatas duras se le reconocen numerosos géneros, siendo uno de ellos el *Rhipicephalus*. Este género comprende un gran número de especies dentro de las que destaca por su distribución cosmopolita el *Rhipicephalus sanguineus* o “garrapata café del perro”. Esta es una de las garrapatas con distribución más amplia prácticamente por todo el mundo.

Su actividad en zonas templadas es estacional, desde la primavera hasta el otoño. En invierno es menor la presencia de esta especie, pero en zonas tropicales y subtropicales, puede hallarse durante todo el año.

(Bowman, 2008; Cordero, 2002; Mehlhorn, 1993)

4.1.1 Morfología

Los palpos son cortos y anchos, dorsalmente la base del capítulo es usualmente hexagonal. Generalmente no posee ornamentación. Tiene ojos y festones. La coxa número uno es bífida. El surco anal se encuentra delante del ano. Los machos presentan un par de escudos adanales y generalmente, un par de escudos accesorios. Las placas estigmatales o espiráculos tienen forma de coma y son cortos o largos. Los machos miden 2.2–3.2 mm de largo, y la hembra mide de 2.4 mm cuando está ingurgitada, pero después de alimentarse pueden llegar a medir hasta 11.5 mm.

(Cordero, 2002; Mehlhorn, 1993)

4.1.2 Anatomía interna

- Aparato digestivo: ciegos gástricos que se extienden hasta las coxas con glándulas salivares desarrolladas.

- Aparato respiratorio: dendrotráqueas (con dos estigmas, una a cada lado del cuerpo) cutáneo (en larvas de garrapatas).
- Sistema nervioso: acúmulo ganglionar anterior formando un cerebro supraesofágico voluminoso.
- Sistema excretor: tubos de Malpighi, glándulas coxales.
- Sistema reproductor: gónadas en el abdomen orificio genital en posición ventral.

(Melhorn, 1993)

4.1.3 Ciclo de vida

La duración del ciclo evolutivo (al producirse en la naturaleza), depende de la temperatura, la humedad relativa del aire y del oportuno hallazgo del hospedador (no son específicas de hospedador). El ciclo evolutivo del *R. sanguineus* está compuesto por un estadio de huevos y tres estadios móviles: larvas, ninfas y adultos. Para completar dicho ciclo la garrapata requiere de tres huéspedes, es decir, cada uno de los estadios móviles debe alimentarse de un nuevo huésped para luego dejarse caer al suelo.

(Bowman, 2008; Cordero, 2002; Mehlhorn, 1993)

La hembra se alimenta del perro por seis a 21 días, tiempo durante el cual se lleva a cabo el apareamiento. Una vez que ha terminado de nutrirse, se deja caer al suelo para efectuar la puesta de huevos en grietas de paredes, alfombras y tablones para depositar aproximadamente 4,000 huevos, en un período de 14 días y luego sucumbe. Los machos mueren después de aparearse.

(Bowman, 2008; Cordero, 2002; Soulsby, 1987)

La eclosión de los huevos ocurre entre siete a 30 días post oviposición. Las larvas se adhieren a un huésped para alimentarse antes de pasar a un nuevo estadio de desarrollo. En el caso de no hallar huésped, tienen la capacidad de permanecer en un estado de latencia por un período que puede prolongarse de ocho meses hasta dos años sin alimentarse de sangre alguna.

(Flynn, 1973; Soulsby, 1987)

Las larvas se fijan a un perro, y permanecen en él por un espacio de tres a seis días. Se dejan caer y mudan a ninfas dentro de cinco a 23 días. Las larvas tienen tres pares de patas y al mudar para transformarse en ninfas adquieren el cuarto par, quedando con un aspecto muy semejante al de los adultos. La ninfa parasita a su huésped por cuatro a nueve días para luego bajarse de él y transformarse en adulto en un período que va de dos a cuatro semanas.

(Bowman, 2008; Cordero, 2002)

El parásito adulto en el perro se encuentra preferentemente en las orejas, cuello y espacio interdigital, mientras que las larvas y ninfas se ubican en zonas de pelo más largo, como lo es el dorso.

(Bowman, 2008)

4.1.4 Síntomas de la infestación y efectos patológicos

Produce intranquilidad, prurito, hiperqueratosis, inflamaciones cutáneas con ulceración (especialmente si se arranca el cuerpo de la garrapata), trastornos en el desarrollo; adelgazamiento y anemia en casos de fuerte infestación. La mordida de la garrapata *R. sanguineus* causa inflamación, hiperemia, edema, hemorragia y engrosamiento de la piel. Esta garrapata también transmite varios patógenos

incluyendo *Babesia canis* y *B. vogeli* causantes de babesiosis canina, *Hepatozoon canis* causa de hepatozoonosis canina, *Ehrlichia canis* causante de erliquiosis canina, *Salmonella enteritidis* causante de paratifoidea, *Dipetalonema reconditum* y *D. grassii*.

(Cordero, 2002; Mehlhorn, 1993)

4.1.5 Diagnóstico

Se basa en los signos anteriormente mencionados, la detección e identificación de las garrapatas (adultos, ninfas o larvas) desprendiéndolas de la piel, el parásito adulto en el perro se encuentra preferentemente en las orejas, cuello y espacio interdigital, mientras que las larvas y ninfas se ubican en zonas de pelo más largo, como lo es el dorso. Para confirmar el diagnóstico se puede hacer desprendiendo un espécimen y observándolo en el microscopio, identificando características propias del género *Rhipicephalus*. Los representantes de este género carecen de ornamentación, presentan ojos y festones; el hipostoma y los palpos son cortos y la parte dorsal de la base del capítulo es de forma hexagonal.

(Bowman, 2008; Mehlhorn, 1993)

4.1.6 Control

La enfermedad se previene desde la construcción de los recintos o jaulas, las cuales deben ser construidas con materiales como metal o concreto con la finalidad de evitar la presencia de grieta y presenten un fácil acceso para su limpieza y desinfección.

(Mehlhorn, 1993)

El control de *R. sanguineus* presenta unas características propias que derivan de su peculiar biología. Se trata de una garrapata muy bien adaptada al perro (monótrofa) y al ambiente doméstico en el que éste vive. Fuera de su hospedador, su ciclo biológico se desarrolla en el interior de perreras y viviendas humanas, escondida entre grietas y cámaras de aire de las paredes. Por ello, la planificación de las medidas de control debe tener en cuenta tanto al hospedador como al ambiente. La aplicación de acaricidas en ambientes infestados puede hacerse mediante fumigaciones con carbaril, permetrina, resmetrina, piretrinas y clorpirifós. En las perreras es importante que los tratamientos vayan acompañados de un adecuado mantenimiento de las instalaciones con el propósito que las garrapatas tengan acceso a lugares escondidos donde realizar sus mudas y estén al abrigo de los acaricidas. En jardines y zonas de recreo infestados se pueden emplear las piretrinas y el clorpirifós, pero siempre considerando un control adecuado de hábitat como medida complementaria.

(Cordero, 2002; Mehlhorn, 1993)

4.1.7 Tratamiento

Los tratamientos de perros y gatos pueden realizarse de tres formas: aplicaciones directas sobre el pelo o la piel (aerosoles, polvos, vertido puntual), mediante baños y colocación de collares. Los organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas y piretroides, formamidinas y fenilpirazoles, abarcan la práctica totalidad de los acaricidas en uso. Los fármacos más utilizados a nivel de clínicas veterinarias son los fenilpirazoles en donde se encuentra el fipronil.

(Bowman, 2008; Cordero, 2002)

El fipronil es una molécula extremadamente activa y es un potente alterador del sistema nervioso central de los insectos, vía canales de cloro regulados por el

gamma-ácido aminobutírico (GABA). A pesar que el canal GABA es importante en la neurotransmisión tanto en los animales vertebrados como en los invertebrados, y que el fipronil si se une al receptor GABA en los vertebrados, la unión es 'menos estrecha', lo que ofrece algún grado de selectividad. El fipronil es un insecticida de alta efectividad y amplio espectro, con un valor potencial para el control de numerosos cultivos, de la higiene pública y de plagas en ambientes de cuidado de mascotas y de atención veterinaria. Por lo general puede aplicarse en dosis bajas a muy bajas, a fin de lograr un control de plagas efectivo. La decisión de usar fipronil debe ser objeto de una cuidadosa consideración cuando existe la posibilidad de contaminación del medio ambiente acuático, ya que este producto químico es altamente tóxico para algunos peces e invertebrados acuáticos.

(Tringali, 2001)

4.2 DESCRIPCIÓN FAMILIA ANNONACEAE

La familia Anonácea, más conocida popularmente como la familia de la Guanábana, comprende cerca de 2,500 especies agrupadas en 130 géneros, constituidos por árboles, arbustos y lianas, distribuidas en las regiones tropicales de América, Asia y Madagascar. Desde 1982 se ha intensificado la investigación de sus especies por haberse descubierto un gran potencial de productos naturales con una amplia variedad de actividades biológicas.

(Nakasone, 1998; Bueso, 1998; Rupprecht, 1990)

Dentro de la familia Annonaceae hay géneros que se caracterizan por el interés económico de sus frutos. Tal es el caso de la *Annona squamosa*, *A. muricata*, *A. purpurea*, *A. cherimolia* y *A. reticulata*. Aproximadamente el 70% de los ácidos grasos de la guanábana son insaturados, ubicando los aceites que tiene dentro de un rango aceptable entre los aceites alimenticios convencionales, tan

estables como el aceite de algodón, maíz y soya. Sin embargo hay que advertir que, al extraer el aceite de semilla de *Annona muricata* con otros solventes, éste es extraído junto con sustancias químicamente bioactivas y citotóxicas que pueden actuar como inhibidores del crecimiento de larvas en insectos y microorganismos, y que se han reportado como tóxicas para algunos insectos en fase adulta.

(Rupprecht, 1990)

La familia Annonaceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química, en hojas, raíz, frutas y semillas. De esta familia se han caracterizado y reportado alcaloides, terpenoides, flavonoides, acetogeninas y aceites saponificables. La bioactividad de los metabolitos de plantas anonáceas está asociada a su efecto como insecticidas, actividad citotóxica, antitumoral, antibacterial, pesticida, antimalaria, anti-leishmania y propiedades antihelmínticas.

(Nakasone, 1998; Bueso, 1998; Rupprecht, 1990)

A nivel de fruto, esta familia es importante por la pulpa, que usualmente es utilizada como alimento y particularmente para la elaboración de productos industriales alimenticios tales como jugos, cremas y productos saborizantes. Las especies de la familia anonácea, contienen en la semilla triglicéridos basados en ácidos grasos saturados e insaturados. Los más característicos son: ácido linoléico, ácido oléico, ácido esteárico entre otros. Los aceites y otros extractos de la planta contienen trazas de acetogeninas de reconocida citotoxicidad, que le confieren importantes propiedades e interés a esta familia botánica.

(Nakasone, 1998; Rupprecht, 1990)

4.3 ESPECIES DE *ANNONA* A EVALUAR

4.3.1 Sincuyá (*Annona purpurea* Moc y Sessé)

4.3.1.1 Sinónimos:

Sencuyo, Sincuyo, Suncuyo, Cabeza de muerto, Soncoya, Chinchuya
(Standley, 1996; Salazar, 2001)

4.3.1.2 Descripción:

Crece frecuentemente en bosques húmedos o secos hasta 1200 msnm, principalmente en Alta Verapaz, Izabal, Chiquimula, Jutiapa, Santa Rosa, Retalhuleu y San Marcos. Se distribuye desde el sur de México hasta Venezuela, Trinidad y Tobago. Los árboles miden 10 m. Los frutos tienen un diámetro de 10 a 12 cm, cubierto por una cáscara rugosa con espinas duras piramidales. Las semillas son café oscuras de 3 cm de largo.

(Standley, 1996; Salazar, 2001)

4.3.1.3 Composición química y principios activos de las semillas:

Las semillas de la *A. purpurea* están compuestas por acetogeninas con actividad citotóxica: Monotetrahidrofuránicas: xilomatenina y annonacina A. Bistetrahidrofuránicas: annoglaucina, bullatacina, esquamocina (annonina I), motrilina (esquamocina C), purpurediolina, purpurenina y purpuracena. Presenta actividad antitumoral, anticancerígena e insecticida.

(Tringali, 2001; Chávez, 1999; Ross, 2003)

4.3.1.4 Estudios experimentales:

La annoglaucina y purpuracena, exhiben actividad citotóxica *in vitro* contra el carcinoma pulmonar, mamario, renal, pancreático, adenocarcinoma del colon y de la próstata humana. (Chávez y Mata 1998)

4.3.2 Anona colorada (*Annona reticulata* Linneo)

4.3.2.1 Sinónimos:

Anonilla, Anona roja

(Standley, 1996)

4.3.2.2 Descripción:

Crece en tierra de menos de 1200 msnm. Se localiza en El Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, El Progreso, Zacapa, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Quiché, Suchitepéquez, Retalhuleu, Huehuetenango y San Marcos. Se distribuye desde México hasta Panamá, y algunos países de Sudamérica. Puede llegar a medir hasta 12 m de altura, el fruto es globoso u ovoide de ocho a 12 cm de diámetro, es de color rojizo oscuro o café rojizo, cáscara suave.

(Standley, 1996)

4.3.2.3 Composición química y principios activos de las semillas:

Las semillas de la *A. reticulata* están compuestas por acetogeninas con actividad citotóxica, siendo estas las siguientes: Anoreticuina, anoreticuina-

9-uno, bullatacina, esquamocina, cis/trans-bullactacinona, cis/trans-murisolinona, cis/trans-isomurisolina, presenta una acetogenina gamma lactonacis/trans-isomurisolenina. Posee propiedades anticancerígenas y actividad insecticida.

(Fang-Rong, *et al.*, 1998; Ross, 2003)

4.3.2.4 Estudios experimentales:

Las moléculas de acetogeninas gamma lactonacis/trans-isomurisolenina, annoreticuina, annoreticuina-9-uno, bullatacina, esquamocina, cis/trans-bullactacinona, cis/trans - murisolinona, cis/trans-isomurisolina demuestran un potente efecto citotóxico contra el hepatoma celular humano (Hep. G2), contra carcinoma celular nasofaríngeo humano (KB), y contra tumor celular de colon humano (CCGM2).

(Fang-Rong, *et al.*, 1998)

4.3.3 Guanaba (*Annona muricata* Linneo)

4.3.3.1 Sinónimos:

Guanaba, Guanábana

4.3.3.2 Descripción:

Crece en regiones bajas de Baja Verapaz, Izabal y costa pacífica. Se distribuye desde México hasta Brasil. Es un árbol pequeño menor a ocho m de altura. Su fruto es ovoide de 15 a 20 cm de largo, verde, cubierto por espinas flexibles como tubérculos. Las semillas son negras de 1.5 cm de largo.

(Stanley, 1996)

4.3.3.3 Composición química y principios activos de las semillas:

Las semillas de la *A. reticulata* están compuestas por acetogeninas con actividad citotóxica; estas incluyen a las Monotetrahidrofuraninas: muricina H, muricina I, cis-annomontacina, cis-corossolona, annocatalina, annonacina, annonacinona, solamina, corossolona, annomontacina, murisolina, xylomaticina. Presenta actividad analgésica, antiamebiana, antibacteriana, antimalaria, antidepresiva, antifúngica, antiviral, antitumoral, antileishmania, antihepatotóxica, citotóxica, anticancerígena, larvicida e insecticida.

(Tringali, 2001; Ross, 2003)

4.3.2.4 Estudios experimentales:

Los extractos de *A. muricata* presentan actividad anti protozoaria y citotóxica contra *Trypanosomacruzi*, *Leishmaniaspp.*, y *Plasmodium falciparum*.

(Osorio, *et al.*, 2007)

La suspensión acuosa de semillas de *A. muricata* mostró 100% de actividad larvicida contra *Aedes aegypti* a 0.5 mg/mL.

(Bobadilla, *et al.*; 2005)

El extracto etanólico de semillas de *A. muricata* mostró repelencia, toxicidad y actividad ovicida contra *Rhodnius prolixus* y *R. pallelescens*.

(Parra-Henao, 2007)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ÁREA DE TRABAJO

- Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Clínicas Veterinarias Privadas del área Metropolitana de la ciudad capital.

5.2 RECURSOS HUMANOS

- Estudiante tesista
- Cuatro profesionales asesores
- Colaboradores: Asesor de Veterinarios sin fronteras y personal de los laboratorios en donde realicé la fase experimental.
- Personal de Clínicas Veterinarias del área Metropolitana.

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- Semillas de:
 - Sincuya (*A. purpurea*)
 - Anona colorada (*A. reticulata*)
 - Guanaba (*A. muricata*)

- Extractos etanólicos de las semillas de:
 - Sincuya (*A. purpurea*)
 - Anona colorada (*A. reticulata*)
 - Guanaba (*A. muricata*)

- Garrapata café del perro (*R. sanguineus*)

5.3 MATERIAL FARMACOLÓGICO

- Fipronil 0.25%

5.4 MATERIAL Y EQUIPO

- Agitador magnético
- Algodón
- Balanza semianalítica
- Balón de 1000 ml
- Cajas de Petri simples
- Cinta doble adhesiva
- Colador
- Cristalizador
- Erlenmeyers
- Guantes de Látex
- Medidor de humedad
- Papel filtro
- Papel toalla (Papel mayordomo)
- Percolador de vidrio o acero inoxidable

- Rotavapor (balón de evaporación, condensador, bomba de vacío, refrigerante y balón de colecta)
- Sistema de enfriamiento o circulación de agua
- Vaso de precipitar
- Vasos plásticos

5.5 DISOLVENTES

- Agua
- Acetato de etilo
- Agua desmineralizada
- Alcohol 10%

5.6 CENTROS DE REFERENCIA

- Biblioteca Central de la Universidad de San Carlos de Guatemala
- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- Biblioteca de la Facultad de Agronomía
- Internet

5.7 MÉTODOS

5.7.1 Obtención de semillas:

5.7.2 Obtención de extractos:

- Realicé los extractos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Recibí

previo a completar esta parte de la metodología la orientación y capacitación sobre los procedimientos respectivos.

Método de obtención de extractos

Pelé las semillas de *Annona* sp., para obtener la almendra, hasta tener 200 g de cada especie.

Luego las coloqué en el percolador y agregaré el Acetato de etilo (500 ml) hasta cubrirlas.

Dejé reposar por 24 h, recogí el líquido en un erlenmeyer, con la solución obtenida produce el extracto de las semillas de cada especie.

Para la preparación de los extractos, el líquido obtenido lo concentré en un rotavapor y repetí 5 veces la operación cada 24 h hasta agotar la droga con el disolvente recuperado.

Ya que obtuve el extracto, lo almacené en frascos de vidrio debidamente identificado y refrigerado.

(Gaitán, 2005)

5.7.3 Obtención de las concentraciones de los extractos de *Annona*:

Después de obtener el extracto, realicé una solución madre con una proporción (1:2) con el extracto de *Annona* sp., en alcohol isopropílico al 10% y realicé tres proporciones diferentes (1:50, 1:60, 1:75). Ya obtenidas las

concentraciones de los extractos de *Annona* procedí a realizar la técnica de inmersión de garrapatas adultas.

5.7.4 Obtención de garrapatas adultas:

Obtuve las garrapatas (*R. sanguineus*) adultas de perros pacientes de clínicas veterinarias privadas de la ciudad capital. Las colecté manualmente y las almacené en tubos de ensayo a una temperatura aproximada de 4°C.

Utilicé 5 garrapatas por cada concentración de los extractos de semillas de *Annona* sp., en total utilicé 145 garrapatas, 45 por cada extracto de *Annona* sp, 5 para el grupo control positivo y 5 para el grupo control negativo.

5.7.5 Validación de la técnica de inmersión de adultas:

Para validar la prueba utilicé Fipronil 0.25%, como control positivo y agua como control negativo.

5.7.6 Técnica de inmersión de adultas (Adult Immersion Test):

- Coloqué 20ml de las tres diferentes proporciones (1:50, 1:60, 1:75) de los extractos de las semillas *Annona* sp., en vasos de plástico colocando en el interior un agitador magnético.
- Evalué tres repeticiones por proporción.
- Coloqué 20ml de agua en un vaso que se usó como control negativo.

- Coloqué 20ml de Fipronil 0.25% líquido en otro vaso que lo usé como control positivo.
- Sumergí las garrapatas en cada una de las proporciones de cada extracto y fueron agitadas por 30 min.
- Retiré las garrapatas de las proporciones de cada extracto, las garrapatas fueron separadas con la ayuda de un colador y eliminé el exceso del producto con papel toalla.
- Las garrapatas fueron adheridas dorsalmente mediante una cinta adhesiva en una caja de petri. Las dejé incubar a 25 – 30 ° C y 80 – 90 % de humedad relativa por siete días. Revisé cada 24 h por siete días la actividad que mostraban las garrapatas y anoté en mi hoja control la cantidad de garrapatas vivas o muertas.

(FAO, 2002)

5.7.7 Método estadístico

El diseño del estudio es completamente aleatorio. Para determinar si existe diferencia entre el efecto ixodicida de los tres extractos y las tres proporciones de cada extracto de *Annona* sp., utilicé la prueba de Chi² (Sokal y Rohlf, 2000).

El orden de las comparaciones fue:

- 1ero, entre extractos
- 2do, entre proporciones de cada extracto
- 3ro, entre proporciones más efectivas de cada extracto

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilicé el acetato de etilo ya que según diversos estudios han demostrado que los extractos obtenidos a través de acetato de etilo, presentan mayor concentración de acetogeninas, lo que se correlaciona con su actividad citotóxica e insecticida.

(Fang-Ronget *al.*, 1997; Chávez y Mata, 1999)

Para establecer la confiabilidad de mi metodología, utilicé Fipronil 0.25% como control positivo dando como resultado el 100% de efectividad ixodicida a las 24h y como control negativo agua presentando un efecto ixodicida negativo.

Los tres extractos de *Annona* spp presentaron actividad ixodicida contra la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. No existió diferencia significativa ($P>0.05$) del efecto ixodicida entre los tres extractos de *Annona* spp, y en las diferentes proporciones utilizadas (1:50, 1:60 y 1:75).

En las tablas se detalla los resultados de cada una de las proporciones para cada uno de los extractos.

Los resultados a las 24 h post tratamiento fueron los siguientes:

Tabla No.1 Resultado de garrapatas (*R. sanguineus*) muertas administrando extractos de *Annona* spp, según proporción a las 24 h.

PROPORCIONES	<i>A. muricata</i>	<i>A. purpurea</i>	<i>A. reticulata</i>
1:50	15	14	13
1:60	15	13	11
1:75	15	11	9
Total muertas	45	38	33

A las 24 h post tratamiento, *A. muricata* presentó el 100% (45/45) de mortalidad de las garrapatas en las tres proporciones 1:50, 1:60 y 1:75. *A. purpurea* el efecto ixodicida fue de 93.3% (14/15) en la proporción 1:50, 86.7% (13/15) en la 1:60, y 73.3% (11/15) en la 1:75. *A. reticulata* obtuvo 86.7% (13/15) en la proporción 1:50, 73.3% (11/15) en la proporción 1:60 y 60% (9/15), siendo la menos efectiva de las tres.

Los resultados a las 48 h post tratamiento fueron:

Tabla No. 2 Resultado de garrapatas (*R. sanguineus*) muertas administrando extractos de *Annona* spp, según proporción a las 48 h.

PROPORCIONES	<i>A. purpurea</i>	<i>A. reticulata</i>
1:50	15	14
1:60	14	14
1:75	11	11
Total muertas	40	39

A las 48 h post tratamiento, *A. purpurea* presentó el 100% (15/15) de mortalidad de las garrapatas en la proporción 1:50, 93.3% (14/15) en la 1:60 y 73.3% (11/15) en 1:75, aumentando su mortalidad sólo en las dos primeras proporciones 1:50 y 1:60, la proporción 1:75, continuaba con el mismo porcentaje ixodicida. El extracto de *A. reticulata* 93.3% (14/15) en las primeras dos proporciones 1:50 y 1:60, 73.3% (11/15) en la proporción 1:75, aumentando su mortalidad en todas las proporciones.

Los resultados a las 72 h post tratamiento fueron:

Tabla No. 3 Resultado de garrapatas (*R. sanguineus*) muertas administrando extractos de *Annona* spp, según proporción a las 72 h.

PROPORCIONES	<i>A. purpurea</i>	<i>A. reticulata</i>
1:50	15	15
1:60	15	15
1:75	15	14
Total muertas	45	44

A las 72 h post tratamiento *A. purpurea* presentó el 100% (15/15) de mortalidad de las garrapatas en las tres proporciones 1:50, 1:60 y 1:75. *A. reticulata* el efecto ixodicida fue de 100% (15/15) en las proporciones 1:50 y 1:60, el único caso en que aún habían garrapatas vivas fue la proporción 1:75, con un 93.3% (14/15) de mortalidad.

Con este estudio se demostró que los tres extractos estudiados presentaron actividad ixodicida contra *Rhipicephalus sanguineus* a las 24, 48 y 72 h post tratamiento, siendo así el extracto de *A. muricata* el que demostró la mayor actividad ixodicida contra *R. sanguineus*. El extracto con mayor efectividad a las

24 h fue el de las semillas de *A. muricata*, obteniéndose efecto ixodicida al 100% en las proporciones 1:50, 1:60 y 1:75 y el extracto *A. purpurea* en proporciones 1:50, 1:60 y 1:75 fue efectivo 100% a las 72 h, lo que nos indica el aumento del efecto ixodicida conforme el tiempo transcurre.

Las moléculas responsables de la actividad ixodicida de los extractos de *A. muricata*, *A. reticulata* y *A. purpurea* son las acetogeninas, éstas son ácidos grasos presentes en sus semillas, con efectos citotóxicos contra algunos insectos estudiados.

(Fang-Rong *et al.*, 1997; Chávez y Mata, 1999).

VII. CONCLUSIONES

1. Los tres extractos presentaron actividad ixodicida contra *Rhipicephalus sanguineus* a las 24, 48 y 72 h post tratamiento.
2. El extracto de *A. muricata* presentó el 100% de efectividad contra *Rhipicephalus sanguineus* en las proporciones 1:50, 1:60 y 1:75 a las 24 h.
3. El extracto de *A. purpurea* presentó el 100% de efectividad contra *R. sanguineus* en las proporciones 1:50, 1:60 y 1:75 a las 72 h.
4. El extracto de *A. reticulata* presentó el 100% de efectividad contra *R. sanguineus* en las proporciones 1:50 y 1:60, 93.3% en la proporción 1:75 a las 72 h.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios *in vivo* de los extractos de *Annona* sp. para evaluar tanto el efecto ixodicida, como la toxicidad u otro efecto adverso en los huéspedes.
2. Realizar estudios sobre las propiedades ixodicidas de otras partes de la planta, así como de otras especies de *Annona* spp.
3. Realizar estudios tanto *in vitro* como *in vivo* de extractos de las semillas de *Annona* spp. como control de otras especies de ectoparásitos.
4. Realizar estudios *in vitro* de *A. muricata* para determinar la dosis adecuada y poder administrarlo *in vivo* en perros.
5. Evaluar toxicidad y efectos adversos del extracto de *A. muricata* en perros.

IX. RESUMEN

En el presente estudio evalué la actividad ixodícida *in vitro* de los extractos de *Annona purpurea*, *A. reticulata* y *A. muricata*, aplicados en la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* mediante el método de inmersión.

Obtuve las semillas y realicé los extractos en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Realicé una solución madre (1:2) con el extracto de *Annona* sp. en alcohol isopropílico al 10% y realicé tres proporciones diferentes (1:50, 1:60, 1:75) luego procedí a la técnica de inmersión de garrapatas adultas. Obtuve las garrapatas de perros pacientes de clínicas veterinarias privadas de la ciudad capital. Para validar la prueba utilicé Fipronil 0.25 %, como control positivo y agua como control negativo. Coloqué 20 ml de las tres diferentes proporciones de los extractos en vasos de plástico. Sumergí 5 garrapatas en cada proporción de cada extracto y fueron agitadas por 30 min. Las garrapatas fueron adheridas dorsalmente en una caja de petri. Las dejé incubar a 25–30 ° C y 80–90 % de humedad relativa y las revisé cada 24 h por siete días. No existió diferencia estadísticamente significativa del efecto ixodícida de los tres extractos de *Annona* sp. contra la garrapata *R. sanguineus*. El extracto con mayor efectividad fue el de las semillas de *A. muricata*, ya que tuvo efecto ixodícida al 100 % a las 24 h en las tres proporciones (1:50, 1:60 y 1:75). El extracto *A. purpurea* en proporciones 1:50, 1:60 y 1:75 fue efectivo 100 % a los 72 h. El extracto de *A. reticulata* presentó el 100 % de efectividad contra *R. sanguineus* en las proporciones 1:50 y 1:60, 93.3 % en la proporción 1:75 a las 72 h. Los tres extractos presentaron actividad ixodícida contra *Rhipicephalus sanguineus* a las 24, 48 y 72 h post tratamiento.

ABSTRACT

In this study I evaluated the *in vitro* ixodicide activity of the extracts from *Annona purpurea*, *A. reticulate* and *A. muricata* applied in the tick *Rhipicephalus sanguineus* by the immersion method. I collected the seeds and then obtained the extracts from them in the Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. A mother solution (1:2) of the *Annona sp.* extract and isopropyl alcohol 10 % was made to prepare 3 dilutions (1:50, 1:60, 1:75) and then proceed with the immersion method in adult ticks. I collected the ticks from patient dogs of different private veterinary clinics of the capital city. Fipronil 0.25 % and water were used as positive and negative controls respectively. I poured 20 ml of each dilution of the three kinds of extracts in plastic containers to submerge 5 ticks and shake them for 30 minutes. After that the ticks were placed dorsally inside a Petri dish. Then I let them in the incubator (25-30°C and 80-90 % RH) for 7 days and checked them every 24 hours. I found that there was no significant statistical difference between the ixodicid effect of the three extracts of *Annona sp.* against *R. sanguineus*. However the most effective was that of the *A. muricata* with a 100 % of mortality in a 24 hours period for each dilution. The *A. purpurea* extract was effective, also with a 100 % of mortality, but until 72 hours after its application. By contrast the *A. reticulata* extract had 100% of effectiveness only with the 1:50 and 1:60 dilutions and 93.3 % with the 1:75 dilution, all of them after 72 hours. The main conclusion of the study is that the three extracts presented ixodicide activity against *R. sanguineus* between 24, 48 and 72 hours post-treatment.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Acha, P; Boris S. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación científica de la Organización Panamericana de la Salud. Estados Unidos de Norteamérica. 2ed. 579-584.
2. Bobadilla, M, *et al*/2005. Evaluación larvicida suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus (guanabana) sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera Culicidae). 1727-9933.
3. Bowman, D. 2008. Georgis Parasitology for Veterinarians. 9ed. Estados Unidos de Norteamérica, Saunders Elsevier. 451 p.
4. Chávez, Daniel y Rachel Mata. 1999. Purpuracenin: a new cytotoxic adjacent bis-tetrahydrofuranannonaceousacetogenin from the seeds of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*. 823-828.
5. Coedero, M; Rojo, V. 2002. Parasitología Veterinaria. Ed. McGraw-hill interamericana. 968 p.
6. Fang-Rong, C, et al. 1998. Acetogenins From Seeds of *Annona reticulata*. *Phytochemistry*. XLVII (6): 1057-1061.
7. FAO (Food and Agricultural Organization, IT.) 2002. Sobre Diagnóstico de Resistencia al xodocidas en Garrapatas *Boophilus microplus*. Guatemala. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 32 p.
8. Gaafar, S; Howard, W; et al. 1985. World Animal Science. Parasites, Pests and Predators. Estados Unidos de Norteamérica, Saunders Elsevier. 650 p.
9. Gaitán, I. 2005. PEO. Extractos y Tinturas. Laboratorio de Bioensayos. Departamento de Citohistología, Facultad de Farmacia, USAC. 91 p.
10. Melhorn, H; Düwel, D. 1993. Manual de Parasitología Veterinaria. 2da ed. Ed. Grass-latros. 436 p.

11. Osorio, E; Arango, G; *et al.* 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. Saunders Elsevier. Journal of Ethnopharmacology 111:630-635.
12. Parra-Henao, G; García, C; *et al.* 2007. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius pallescens* (Hemíptera: Reduviidae). Bol Mal Salud Amb., v.47 n.1
13. Ross, I. 2003. Medicinal plant of the world. 2ed. 491 p.
14. Rupprecht, J. K., Hui, Y. M. and Mclaughlin, J. L. (1990). Annonaceous Acetogenins. En: Review Journal of Natural Products, 53 (2).237-278 p.
15. Salazar, R. 2001. Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina. Volumen II. Ed. Danida
16. Sokal, R; Rohlf, F. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 3ed. W.H. Freeman and Company. 706-719 p.
17. Soulsby, E. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ed. México, D.F. 934 p.
18. Standley, P; Steyermark, J.1946. Flora of Guatemala. Chicago Natural History Museum. XXIV (4): 272-279 p.
19. Tringali, C. 2001. Bioactive Compounds from Natural Sources. Ed. Taylor & France. 693 pp. HM Hamon, H. Gamboa and JEM Garcia, 1996, Fipronil: a major advance for the control of boll weevil in Columbia, In: GA Herzog, DA Hardee (chairs), RJ Ottens, CS Ireland and JV Nelms (eds.), Proceedings Beltwide Cotton Conferences US, vol. 2, Jan 9-12 1996, Nashville, TN, Cotton insect research and control conference, NCC, Memphis, TN. 990-994 p.
20. Nakasone, H. Y. and Paull, R. E. (1998). "Annonas". Tropical Fruits. London, UK: Edited CAB International.45-75 p.
21. Bueso, C. E (1980). Soursop, Tamarind and Cherimoya. Tropical and Subtropical Fruits- Composition, properties and uses. Connecticut. USA. 375-387 p.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
“EVALUACIÓN DEL EFECTO IXODICIDA *in vitro*
DE LOS EXTRACTOS DE SEMILLAS DE
Annona purpurea, A. reticulata y A. muricata,
APLICADOS EN LA GARRAPATA *Rhipicephalus sanguineus*”

f. _____
ANA LUCÍA BARRIOS ARANDA

f. _____
M. V. DORA ELENA CHANG
ASESORA PRICIPAL

f. _____
M. V. LUDWIG FIGUEROA
ASESOR

f. _____
M. V. FEDERICO VILLATORO
ASESOR

f. _____
LIC. ARMANDO CÀCERES
ASESOR

IMPRÍMASE:

f. _____
M. V. LEONIDAS ÀVILA PALMA
DECANO

