

Actividad repelente del aceite y de algunas fracciones cromatográficas del pasto *Melinis minutiflora* Gramínea frente a la *Stomoxys calcitrans*

Flor Angela Tobón*

Blanca Meneses y Danilo Parra Gil**

*Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.

**Departamento de Farmacia, Universidad Nacional.

Resumen

Se reportan los resultados experimentales de la actividad repelente del aceite y algunas fracciones cromatográficas del pasto *Melinis minutiflora* frente a la *Stomoxys calcitrans*, a las concentraciones de 10, 5, 2,5 y 1,25% para el aceite, y de 0,62 y 1,25% para las fracciones cromatográficas. Dicha actividad biológica se valoró mediante experimentos in vitro e in vivo, utilizando como patrón la N-N dietiltoluamida.

En el presente trabajo se analizan y se discuten los resultados de dicha investigación.

Palabras claves

Actividad repelente, *Melinis minutiflora*, *Stomoxys calcitrans*.

Introducción

La producción y la productividad del agro colombiano se encuentran afectadas por

una serie de epizootias y enfermedades que atacan a la población pecuaria del país; entre éstas las producidas por los dípteros hematófagos, como la *Stomoxys calcitrans*, los tábanos y los mosquitos, los cuales no sólo perjudican a los animales sino también al hombre ya que son transmisores mecánicos de gérmenes como el anaplasma, la *Tripanosoma vivax*, la *Salmonella spp.*, la *Scherinia coli*, el *Bacillus anthraxis*, el *Streptococcus spp.* y el *Staphylococcus spp.*^{4,14,15}

La *Stomoxys calcitrans*, díptero hematófago que se posa principalmente sobre el lomo, la parte inferior de los muslos, las piernas, las fosas nasales, los ojos y otras partes sensibles del cuerpo de los bovinos, causa infestaciones, malestar y desasosiego que los irrita. Las enfermedades parasitarias ocasionadas por ésta y otras moscas afectan los animales en morbilidad, mortalidad, peso corporal, producción de leche, fertilidad y natalidad. Además, les causan pérdidas en la eficiencia laboral, retardo en el crecimiento, predisposición para otras enfermedades y disminución del valor comercial; por otra parte, el suministro de medicamentos aumenta y se requiere un incremento de la mano de obra, más personal, veterinarios y obreros que cuiden los animales.^{1,3,4}

En Colombia, la *Stomoxys calcitrans*, los tábanos y los mosquitos constituyen, sin duda, un serio obstáculo al desarrollo

de la ganadería; lo que incide sobre el potencial pecuario existente y la creciente demanda de carne por parte de los mercados internos y externos de los últimos años.^{5,14,15}

Estas consideraciones muestran la importancia de la búsqueda de nuevas alternativas por medio de la investigación de sustancias, entre ellas las de origen natural, que ayuden a controlar los ectoparásitos que afectan al ganado y al hombre, que no sean tóxicas para el huésped y que produzcan un mínimo efecto contaminante sobre el medio ambiente.^{3,12,13}

Las observaciones de campo mostraron que los ganados alimentados en praderas con el pasto *Melinis minutiflora* presentan niveles muy bajos de infestación por garrapatas —a diferencia de los ganados de los potreros vecinos, alimentados con otro tipo de gramíneas, donde se ha presentado una infestación mayor—. De ahí surgió la inquietud por determinar si el *Melinis minutiflora* tiene una acción biológica sobre la *Stomoxys calcitrans* semejante a la observada sobre las garrapatas.

Las condiciones ecológicas y atmosféricas de Colombia determinan un hábitat propicio para el desarrollo de gran cantidad de parásitos; teniendo en cuenta además que el país, ubicado en la zona tropical, tiene definidos dos periodos climáticos: el verano y el invierno.

Estas condiciones ambientales favorecen, principalmente por la temperatura y la humedad, la proliferación de insectos, entre los cuales se encuentra la *Stomoxys calcitrans*, que produce anemias de distintos grados; lo cual puede ocasionar una disminución en el mercado de la carne, pues implica una baja en el peso del animal. Además, el ganado puede ser trasmisor mecánico de hemoparásitos y diseminador de enfermedades tales como la salmonellosis, la pasteurellosis, la mastitis bovina del verano, la fiebre aftosa, enfermedades aviares, mixomatosis del conejo, peste porcina, infecciones y alergias en la piel, nuches o dermatobiosis, gusaneras o miasis, e infecciones del aparato digestivo por parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia spp*, *Taenia solium*, *T. hydantigena*, *Dipilydium caninus*. En los equinos puede ser la causa de la anemia infecciosa equina.^{1,3,11}

La picadura de la *Stomoxys calcitrans* es muy dolorosa; ocasiona en los bovinos irritación, inquietud y dificultad para su alimentación y rumia normal, lo que los obliga a mover continuamente la cabeza y la cola y a deambular por el establo y los potreros; todo esto repercute sobre su estado nutricional y en la producción de leche (Véase figura 1).^{5,7,10}

Huckett en 1950 clasificó taxonómicamente la mosca *Stomoxys calcitrans*, así:

Phylum: Artrópoda

Clase: Insecta

Familia: Muscidae

Subfamilia: Stomoxydinae.

Género: *Stomoxys*
Geoffrey.

Especie: *Conop calcitrans*,
Linnaeus.

Numerosos nombres comunes se le han atribuido, entre ellos: mosca brava, mosca del pajar, mosca del perro, mosca de la playa, mosca del ganado, mosca de la máquina de cortar césped, siendo el más aceptado el de mosca del establo.

El control de las moscas está primordialmente orientado a la destrucción de criaderos y al saneamiento ambiental mediante el uso de insecticidas o la aplicación de sustancias repelentes. Otra forma de control sería la educación sanitaria, que comprendería la adecuada disposición de las basuras y de los alimentos.^{11,13,19,25}

El uso de orejeras hechas en PVC con piretroides de acción residual, el uso de feromonas sexuales y la aplicación de radiación gamma —la cual inhibe la fecundidad y la oviposición de las hembras, o produce machos estériles— son algunos de los métodos más modernos para dicho control de las moscas.

Diversos factores, como la necesidad de alimentos, la respiración, el calor y el sudor del huésped —personas, animales o plantas— atraen los ectoparásitos; pero si se evita que los insectos

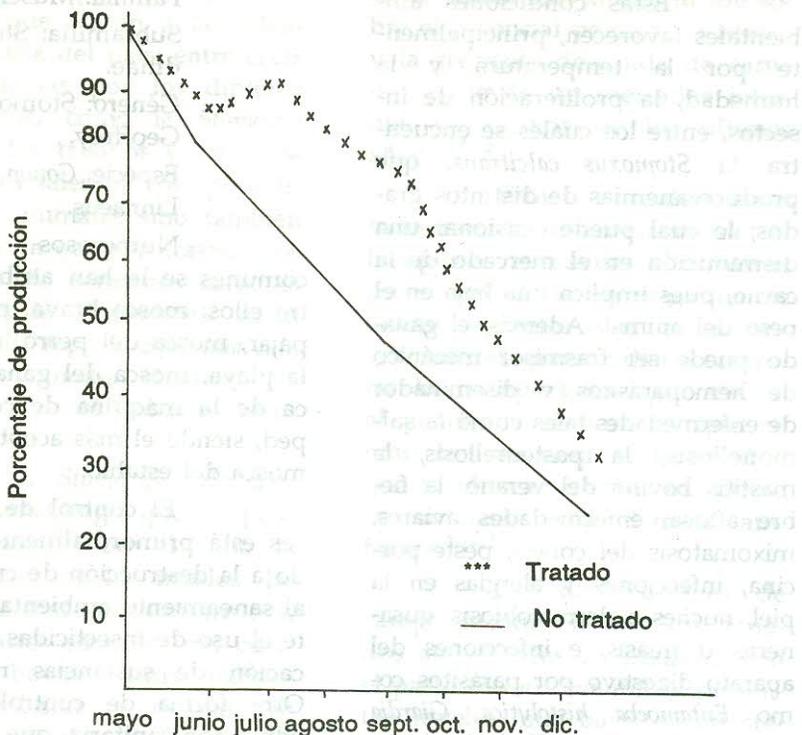


Figura 1 Efecto de la *Stomoxys calcitrans* sobre la producción de leche

Fuente: Tomado de Campbell, J. B. and McNeal, C. D. Universidad de Nebraska-Lincoln, julio de 1979.

se posen en la piel mediante una protección adecuada de la misma con sustancias repelentes, se reduce el peligro de transmisión de enfermedades y las reacciones molestas. Sin embargo, este tipo de control de ectoparásitos, basado en sustancias repelentes de origen químico, presenta desventajas como el desarrollo de resistencia, la alta toxicidad, la presencia de residuos y efectos indeseables; por lo cual es necesari

investigar sustancias repelentes de origen natural, que sean efectivas y seguras.²⁶

Con este fin se han adelantado investigaciones para el control de insectos por medio de sustancias repelentes presentes en la flora mundial. Entre ellas se encuentran los estudios sobre la actividad del *Melinis minutiflora* realizados por Nancy Castañeda en 1982; quien demostró que el extracto etéreo de dicho pasto al

20% es repelente a la larva y acaricida al ácaro adulto del *Boophilus microplus*.⁸ Augusto Ahumada corroboró, en 1984, estas conclusiones; y demostró que algunas fracciones cromatográficas del *Melinis minutiflora* al 2,5% poseen una acción repelente y larvicida sobre el *Boophilus microplus*.² Galindo y Riaño determinaron en el extracto total de este pasto una mezcla de ácidos grasos —oleico y linoleico—, terpenos, sesquiterpenos, esteroides, beta sistoterol, estigmaesterol y colesterol.¹⁶ Luego, en 1986, Carlos Sandino determinó ácidos grasos, esteroides y compuestos terpénicos aislados e identificados mediante cromatografía de capa fina y espectroscopia al IR.²³

El pasto *Melinis minutiflora* es una forrajera rústica, poco exigente, invasora y de rápido desarrollo. Entre los nombres comunes que se le han asignado están los de chopin y gordura.¹⁸ Este pasto se clasifica así:

- Orden: Glumiflorales
- Familia: Gramínea
- Género: *Melinis*
- Especie: *minutiflora Beauv.*

Parte experimental

Los experimentos llevados a cabo en el transcurso de esta investigación se realizaron en la sección de parasitología del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias, LIMV, dependencia

del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA; y en el departamento de farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, seccional Santafé de Bogotá.

Se empleó el diseño de bloques completos al azar,⁹ en el cual los bloques eliminan la variable tiempo en las pruebas in vitro —o la variable sitio de aplicación del tratamiento en los experimentos in vivo—, con los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1. Control: sangre fresca citrada de bovino.

Tratamiento 2. Disolvente: acetona.

Tratamiento 3. Aceite o fracción cromatográfica del *Melinis minutiflora*.

Tratamiento 4. Patrón; N-N dietiltoluidina.

Extracto del *Melinis minutiflora*

Se prepararon diluciones al 1,25, 2,5, 5 y 10%. Las fracciones cromatográficas *a*, *c*, *f* y *g* al 0,62 y 1,25% fueron utilizadas para valorar la acción repelente frente a la *Stomoxys calcitrans*.

Reproducción de la mosca *Stomoxys calcitrans*

Las moscas fueron recolectadas con una jama y luego llevadas a la caja de reproducción

para su oviposición.^{6,19} Se alimentaron mediante una banda de gasa impregnada con sangre fresca citratada de bovino.

Después de la eclosión de los huevos las larvas se desarrollaron en el medio de cultivo compuesto por estiércol fresco de equino enriquecido con leche en polvo y sangre de bovino a una temperatura de 18 a 30°C y una humedad relativa del 80%. Luego de obtenerse las pupas se retiraron del medio, se lavaron con agua tibia y se colocaron en cajas plásticas para la obtención de las moscas. Y una vez obtenidas las moscas se mantuvieron en el laboratorio con agua azucarada durante seis días, hasta su utilización en las pruebas biológicas.

Evaluación de la acción repelente

La evaluación consistió en contar el número de moscas que no ingirieron sangre; para lo cual se presionaba el abdomen de cada mosca sobre un papel secante blanco y se enumeraban aquellas que no dejaban huellas de sangre.

Experimentos in vitro.

Para estos experimentos se utilizaron dos pruebas:

1. Pruebas con gasa

Se empleó el método descrito por Starnes y Granett,²⁴ se depositaron cincuenta moscas anes-

tesiadadas dentro de cada una de las cajas de repelencia para cada uno de los tratamientos —patrón, disolvente, extracto o fracción cromatográfica y control—. Sobre la cara superior de la caja control se colocó, como cebo, una banda de gasa ligeramente impregnada con sangre fresca citratada de bovino; y en las otras tres cajas se colocaron primero sendas bandas de gasa con el cebo y luego con cada uno de los tratamientos que se iban a ensayar.

2. Pruebas con piel

Se empleó el método anterior, pero cambiando el sistema de las gasas impregnadas por trozos de piel fresca de bovino. En los experimentos in vitro se valoró la acción repelente durante ocho horas de exposición de las moscas a los diferentes tratamientos. Las pruebas se repitieron cinco veces.

Experimentos in vivo.

Fueron realizados en diferentes especies:

En bovinos se empleó el método descrito por Roberts y colaboradores: se rasuraron en forma de parche cuatro áreas del cuerpo de los bovinos;²² se aplicaron sobre éstas los distintos tratamientos —el patrón, el disolvente, el control y el aceite o las fracciones cromatográficas del *Melinis minutiflora* a las concentraciones mencionadas—; y luego se le colocó una caja plástica con veinte moscas a cada una. La acción repelente se valoró durante treinta minutos de exposición de

las moscas a los tratamientos. Las pruebas se repitieron cuatro veces. donde R_c es la repelencia corregida.

En ratones las pruebas se realizaron utilizando primero ratones de tres a cinco días de nacidos, sin pelo, y luego ratones de dieciocho a veinte días de nacidos, con pelo. Un grupo de veinte ratones se dividió en cuatro, con cinco ratones cada uno, y éstos se trataron por inmersión en cada una de las soluciones de los tratamientos. Luego se introdujeron dentro de una caja de prueba con veinticinco moscas. El comportamiento de las moscas frente a los ratones sometidos a dichos tratamientos fue observado durante seis horas. Las pruebas se repitieron cuatro veces.

En cobayos el ensayo se hizo con uno de aproximadamente ocho semanas de edad, el cual se introdujo dentro de una caja de repelencia con cincuenta moscas. Se observó durante seis horas si picaban o no al animal. La prueba fue repetida dos veces.

Corrección de los resultados

Esta se realizó de acuerdo al diseño experimental utilizado, con base en la siguiente fórmula estadística:

$$\% R_c = \frac{\text{Repelencia obtenida} - \text{Repelencia control}}{100 - \text{Repelencia control}} \times 100$$

Análisis estadístico

La respuesta en porcentaje de repelencia fue comprobada mediante la prueba de análisis de varianza. Para ello se consideró como variable dependiente el efecto de los tratamientos, y como variables comunes los datos de la concentración a diferentes niveles y el tiempo en que se hicieron las evaluaciones.⁹ Luego se hizo la prueba de Duncan para comparar las medidas y ver las diferencias entre ellas.

El análisis de regresión se realizó con el fin de relacionar los resultados de la respuesta en porcentaje de repelencia con el porcentaje de concentración del extracto total del pasto *Melinis minutiflora*.

Resultados y discusión

Para el análisis del aceite del pasto *Melinis minutiflora* y sus fracciones cromatográficas se pesaron 15 kg de la planta en estado fresco. El rendimiento del aceite libre de ceras, a partir del cual se obtuvieron las fracciones cromatográficas, fue del 0,9%.

En la tabla 1 se muestran los resultados de la reproducción controlada en laboratorio

Tabla 1 Reproducción controlada de la *Stomoxys calcitrans*

Días	Etapa	Promedio	Rango
	Huevo-larva	1,33	1-2
	Larva-pupa	7,44	5-10
	Pupa-moscas	6,11	3-11
	Huevo-moscas	14,88	9-23

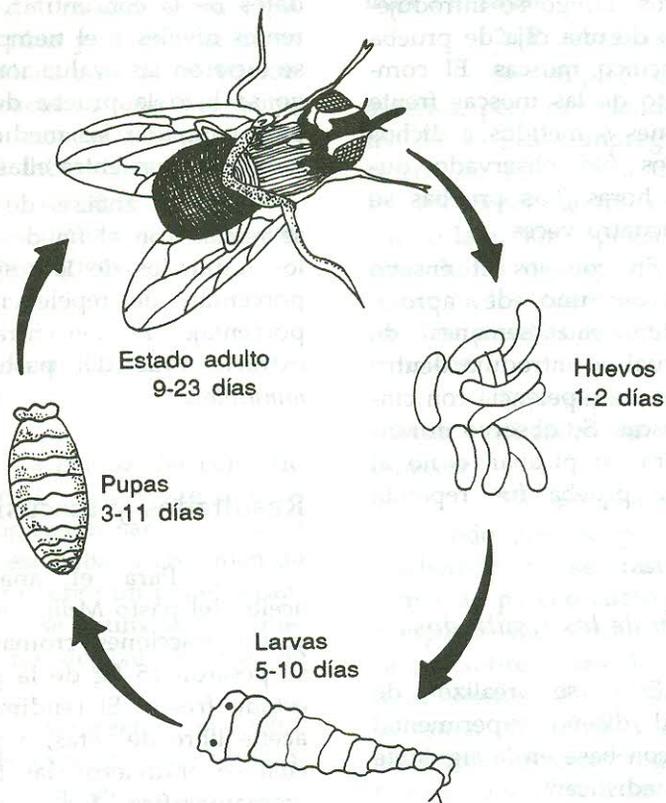


Figura 2 Ciclo de vida de la mosca *Stomoxys calcitrans*

de la *Stomoxys calcitrans* y en la figura 2 su ciclo de vida.

Los resultados de la reproducción controlada de la *Stomoxys calcitrans* se obtuvieron promediando nueve replicaciones; bajo condiciones de humedad relativa del 80% y temperatura aproximada entre 28 y 30°C.

A partir de la evaluación del efecto repelente del aceite y de las fracciones cromatográficas del *Melinis minutiflora* frente a la *Stomoxys calcitrans* se determinó que el comportamiento de las moscas frente al aceite es similar al que presentan cuando son sometidas a la N-N dietiltoluamida —patrón—, tanto en las pruebas in vitro como en las in vivo.

En la experimentación in vitro se obtuvieron los siguientes resultados:

1. Pruebas con gasa. Se presentó el mayor porcentaje de repelencia corregida, 92,95%, el cual fue similar al de la N-N dietiltoluamida, 93,33%.

El aceite a las concentraciones de 5; 2,5 y 1,25%, mostró una actividad repelente de 73,48; 63,09 y 58,16%; comparándola con la de la N-N dietiltoluamida —patrón—, que mostró una actividad repelente del 95,14; 91,51 y 89,88% respectivamente.

2. Pruebas con piel. Indicaron para las concentraciones del 10; 5; 2,5 y 1,25% un efecto repelente del aceite del 79,12; 78,01; 66,38 y 45,59% respectivamente; mientras que la N-N die-

tiltoluamida —patrón— mostró una repelencia del 95,90; 90,21, 89,00 y 87,51% con respecto a cada una de las concentraciones mencionadas.

Los resultados obtenidos en la experimentación in vivo fueron:

1. Pruebas con bovinos.

A las concentraciones de 10, 5; 2,5 y 1,25% la repelencia resultó ser de 85,91; 69,43; 64,59 y 51,79% respectivamente; en contraste con los resultados encontrados con la N-N dietiltoluamida, que mostró una repelencia del 95,63; 96,20, 97,76 y 96,83%. De las fracciones cromatográficas, la *a* fue la que presentó mayor actividad repelente, con valores entre el 66,08 y el 0,62%. También al 1,25% dicha fracción *a* fue la que tuvo un mayor efecto repelente, 89,79%; similar al de la N-N dietiltoluamida, del 95,39%.

2. Pruebas con cobayos y ratones. Estos ensayos no dieron resultado debido a que las moscas no picaron a estos animales durante seis horas de exposición. Este hecho se verificó porque al hacer presión en el abdomen de las moscas sobre un papel secante no se observaron huellas de sangre.

Después de varios ensayos y de modificar muchas técnicas se obtuvo en el laboratorio la cantidad suficiente de moscas adultas aptas para la investigación planeada (Véase figura 3).

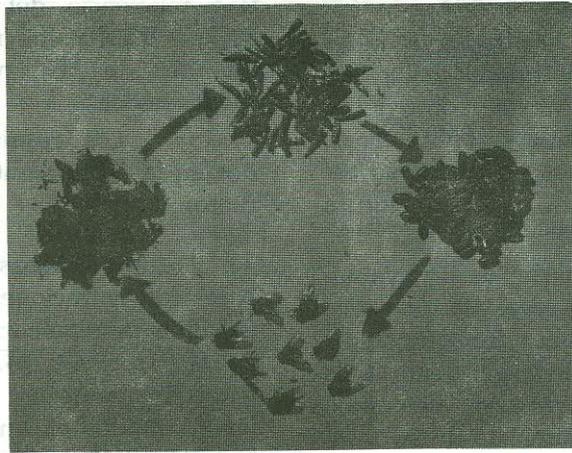


Figura 3 Moscas adultas obtenidas en el laboratorio

Según estudios realizados por Galindo y Riaño,¹⁶ y por Sandino,²³ la actividad repelente del aceite y la fracción *a* se podrían atribuir a compuestos como terpenos, sesquiterpenos, terpenoides y esteroides, presentes en el pasto *Melinis minutiflora*; sustancias éstas que, de acuerdo con Dagoz,¹² actúan como repelente de insectos.

En los experimentos in vitro e in vivo, el aceite del *Melinis minutiflora* mostró una actividad repelente frente a la *Stomoxys calcitrans* en relación directa con la concentración del mismo; estos resultados son comparables a los obtenidos sobre *Boophilus microplus* por Castañeda⁸ y Ahumada.²

Solamente la fracción *a* al 1,25% presentó actividad repelente comparativamente más potente que la obtenida por el aceite al 10%; lo que concuerda con los

resultados de Ahumada,² quien determinó una actividad acaricida sobre el *Boophilus microplus* con esta fracción.

El análisis de varianza, realizado para comparar los resultados de los experimentos sobre piel y gasa, mostró que las pruebas resultaron muy semejantes para los diferentes niveles de concentración de aceite utilizados.

La prueba Duncan,⁹ para comparar los efectos repelentes a diferentes concentraciones y tipos de materiales utilizados, gasa o piel, mostró una significancia estadística semejante en ambas pruebas para concentraciones al 5 y 2,5% del aceite. Entre las concentraciones al 10 y 1,25%, presentó una actividad repelente estadísticamente diferente en ambos ensayos (Véase figura 4).

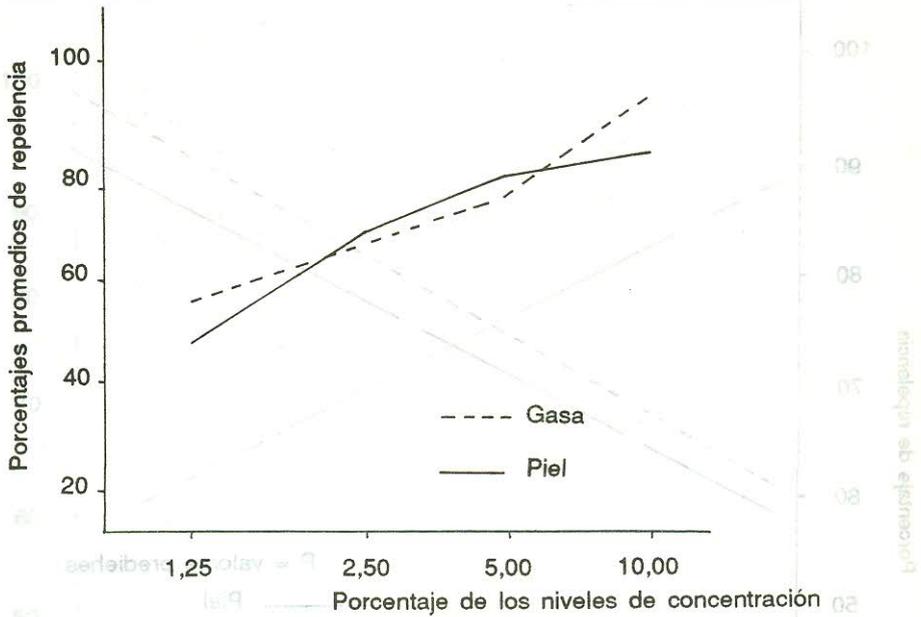


Figura 4 Comparación de la actividad repelente del aceite del *Melinis minutiflora* en los experimentos in vitro.

Los análisis de regresión para las pruebas in vitro e in vivo mostraron una distribución lineal ascendente en la cual la actividad repelente del aceite frente a la *Stomoxys calcitrans* va aumentando a medida que se aumenta la concentración del aceite; así, la mejor respuesta repelente es aquella que se presenta al 10%, con un porcentaje de repelencia del 92% (Véanse figuras 5 y 6).

Para la respuesta porcentaje de repelencia en función de las concentraciones de las fracciones cromatográficas, los análisis indicaron que la mejor respuesta repelente se obtuvo con

la fracción *a*, con un porcentaje de repelencia de 66,08 y 89,79%, a las concentraciones de 0,62 y 1,25% respectivamente. Esta es seguida por las fracciones *h*, *d* y *b*, en tanto que las fracciones *f*, *c* y *g* en orden descendente fueron menos activas.

Conclusiones

1. El método a base de estiércol de equino modificado es un excelente medio de reproducción de la *Stomoxys calcitrans* en el laboratorio.

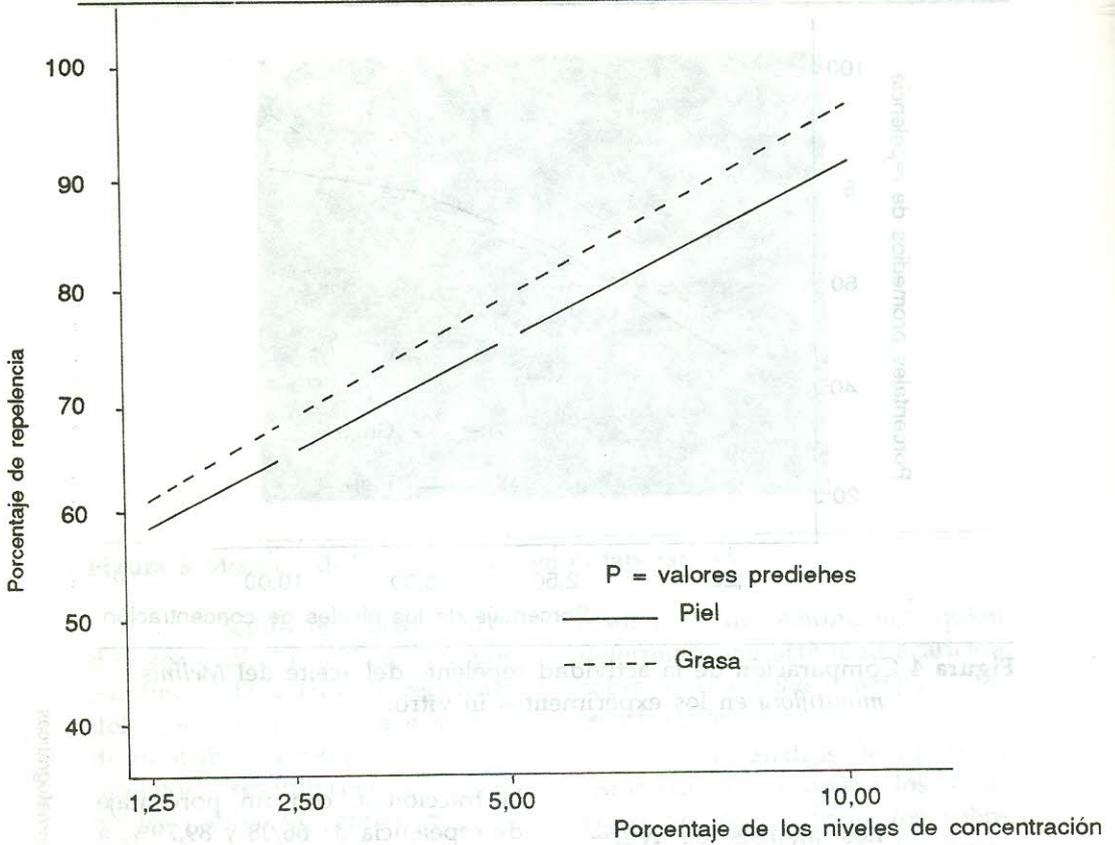


Figura 5 Ajuste de la ecuación de regresión a las curvas del porcentaje de repelencia del aceite del *Melinis minutiflora* in vivo.

2. Las pruebas in vitro e in vivo utilizando el aceite al 10% del pasto *Melinis minutiflora* mostraron un alto porcentaje de repelencia frente a la *Stomoxys calcitrans*.

3. La fracción a, de las fracciones cromatográficas ensayadas a las concentraciones de 0,62 y 1,25%, mostró una mayor y más potente actividad repelente; lo que indica que en ella deben

estar presentes los principios activos responsables del efecto evaluado.

4. Se demostró que no es conveniente utilizar ratones y cobayos como animales de experimentación en los ensayos de repelencia frente a la mosca *Stomoxys calcitrans*, pues ésta no se acerca a picarlos porque no apetece su sangre.

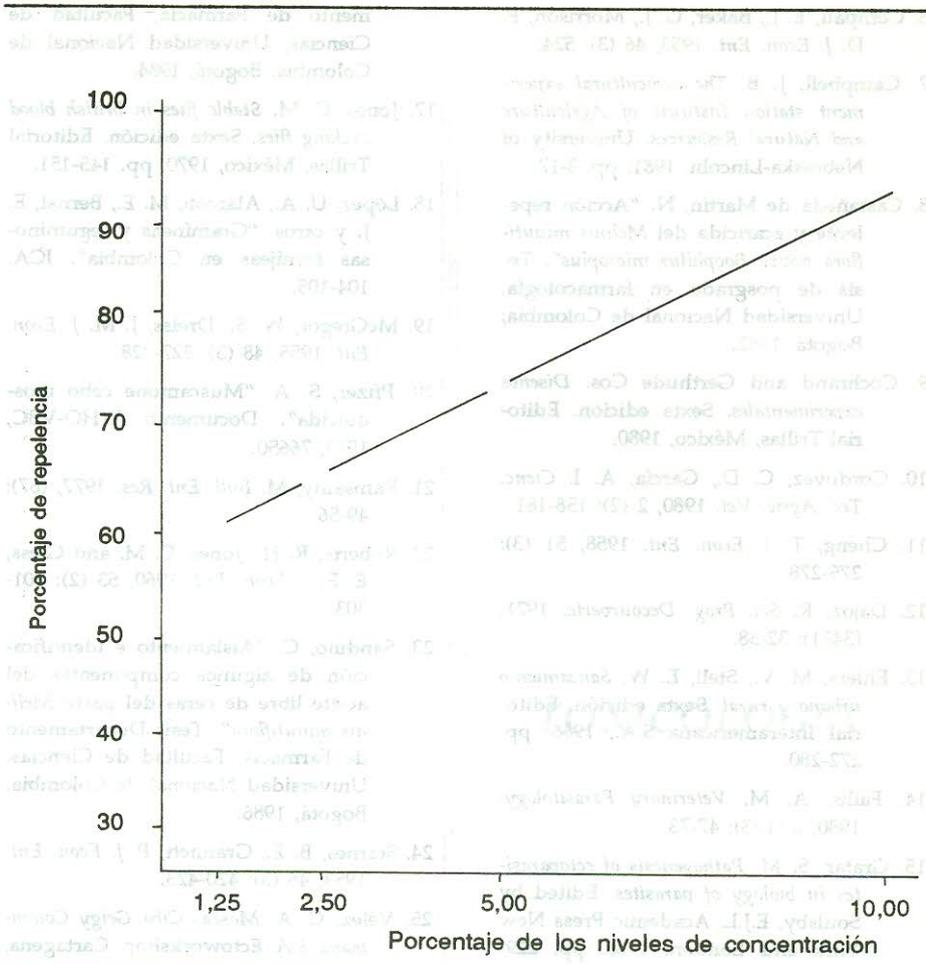


Figura 6 Ajuste de la ecuación de regresión a la curva de porcentaje de repelencia del aceite del *Melinis minutiflora* in vivo.

Referencias

1. Acha, P. N., Szyffrees, B. *Zoonosis y enfermedades trasmisibles al hombre y a los animales*. Publicaciones Científicas, OPS. N° 354. 1984.
2. Ahumada, A. "Actividad repelente y acaricida del aceite y algunas fracciones cromatográficas del *Melinis minutiflora* sobre el *Boophilus micro-*

- plus*". Tesis de posgrado de farmacología. Universidad Nacional de Colombia; Bogotá, 1984.
3. Barreto, P. *Ectoparásitos series C. E.* 1978 (13): 135-140.
4. Benavides, E. *Revista Acovez.* 1985, (31): 4-11.
5. Berry, I. L., Stage, D. A., Cambell, J. B. *Transsacones of the ASAE Am. Soc. Agri.* 1983, 26 (3): 873-877.

Actividad repelente del aceite y de algunas fracciones cromatográficas

6. Compau, E. J., Baker, G. J., Morrison, F. D. J. *Econ. Ent.* 1953, 46 (3): 524.
7. Campbell, J. B. *The agricultural experiment station Institute of Agriculture and Natural Resources.* University of Nebraska-Lincoln. 1981. pp. 3-17.
8. Castañeda de Martín, N. "Acción repelente y acaricida del *Melinis minutiflora* sobre *Boophilus microplus*". Tesis de posgrado en farmacología. Universidad Nacional de Colombia; Bogotá, 1982.
9. Cochrand and Gerthude Cos. *Diseños experimentales.* Sexta edición. Editorial Trillas; México, 1980.
10. Cordovez, C. D., García, A. I. *Cienc. Tec. Agric. Vet.* 1980, 2 (2): 158-161.
11. Cheng, T. J. *Econ. Ent.* 1958, 51 (3): 275-278.
12. Dajoz, R. *Sci. Prog. Decourverte.* 1971, (3431): 32-38.
13. Ehlers, M. V., Stell, E. W. *Saneamiento urbano y rural.* Sexta edición. Editorial Interamericana S.A., 1966. pp. 272-280.
14. Fallis, A. M. *Veterinary Parasitology.* 1980, 6 (1/3): 47-73.
15. Grafar, S. M. *Pathogenesis of ectoparasites in biology of parasites.* Edited by Soulsby, E.J.L. Academic Press New York and London. 1966. pp. 229-235.
16. Galindo, G., Riaño, I. "Aislamiento, purificación e identificación preliminar de algunos compuestos presentes en el extracto etéreo del pasto *Melinis minutiflora*". Tesis Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1984.
17. Jones, C. M. *Stable flies in british blood sucking flies.* Sexta edición. Editorial Trillas; México, 1970. pp. 145-151.
18. López, U. A., Alarcón, M. E., Bernal, E. J. y otros. "Gramíneas y leguminosas forrajeras en Colombia". ICA: 104-105.
19. McGregor, W. S., Dreiss, J. M. *J. Econ. Ent.* 1955, 48 (3): 327-328.
20. Pfizer, S. A. "Muscamone cebo mosquicida". Documento WHO-VBC, 1983, 76650.
21. Ramsamy, M. *Bull. Ent. Res.* 1977, (67): 49-56.
22. Roberts, R. H., Jones, C. M. and Gless, E. E. *J. Econ. Ent.* 1960, 53 (2): 301-303.
23. Sandino, C. "Aislamiento e identificación de algunos componentes del aceite libre de ceras del pasto *Melinis minutiflora*". Tesis Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1986.
24. Starnes, B. E., Grannett, P. *J. Econ. Ent.* 1953, 46 (3): 420-423.
25. Vélez, C. A. *Moscas Ciba Geigy Colombiana S.A. Ectoworkshop.* Cartagena, 1981. pp. 1-12.
26. Yeorman, G. H., Barry, C. *Vet. Rec.* 1968, 83 (5): 131-133.