

Efecto letal y subletal de lactonas sobre la garrapata del ganado *Boophilus annulatus* Say

José Antonio Avila Reyes*
Norma Almaraz Abarca*
Jesús Herrera Corral*
Nestor Naranjo Jiménez*

Abstract

In this paper lethal and underlethal effects of five lactones on the cattle tick (*Boophilus annulatus* Say) and its oviposition features was evaluated. These lactones were obtained from a *Streptomyces* sp** culture broth. Lactone 3 caused a 30% percent death rate and a bigger decrease in hatching than a commercial drug with ivermectine. It is concluded that the lactone is effective due to its insecticidal potential use.

KEY WORDS: CATTLE TICK, LACTONE, *STREPTOMYCES*, HATCHING, OVIPOSITION.

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto letal y subletal de cinco lactonas obtenidas de un cultivo líquido de *Streptomyces* sp, sobre la garrapata del ganado (*Boophilus annulatus* Say) y la cantidad y calidad de su ovoposición. Los resultados se compararon con los producidos por un fármaco comercial a base de ivermectina. La lactona 3 provocó un porcentaje de mortalidad del 30, el más alto de las lactonas en experimentación y un descenso mayor en la eclosión de la puesta que el causado por el fármaco comercial usado, lo que le confiere un uso potencial como insecticida.

PALABRAS CLAVE: GARRAPATA, LACTONA, *STREPTOMYCES*, ECLOSION, OVIPOSICION.

Introducción

Las lactonas son moléculas aisladas a partir de tejidos vegetales y de cultivos de *Streptomyces* sp. Se ha informado que las lactonas obtenidas de plantas tienen efectos citotóxicos, analgésicos, amebicidas¹ y antimutagénicos².

A partir de cultivos de actinomicetos del género *Streptomyces* se han obtenido más de 500 lactonas, que funcionan como antibióticos³, antitumorales⁴, antihelmínticos, insecticidas, nematocidas, acaricidas^{5,6,7,8,9,10}, y en el tratamiento de la oncocercosis¹¹.

Las características compartidas por las lactonas aisladas a partir de especies del género *Streptomyces* permitió llamarlas con el nombre genérico de "macrólidos", cuya estructura tiene en común dos componentes: una aglicona y un azúcar¹².

El amplio espectro de acción de estas moléculas impactó

dos campos principalmente: el área de los antibióticos, en la cual se incluyen macrólidos como la eritromicina producida por *Streptomyces erythraeus* y el área de los insecticidas donde los macrólidos están representados por las avermectinas, moléculas que fueron aisladas a partir de cultivos de *Streptomyces avermitilis* en 1979^{7,13}.

Las avermectinas son lactonas macrocíclicas que actúan a nivel sináptico en el sistema nervioso de los organismos; al unirse a sitios específicos de alta afinidad en las membranas, provoca un incremento en la permeabilidad de los iones cloro^{9,11}, inhibiendo con esto último la despolarización de la membrana y evitando la transmisión del estímulo nervioso.

Estas moléculas cubren un papel importante en el esquema general de manejo integral de plagas, ya que cumplen con el doble requisito de ser efectivos agentes parasiticidas y causar un bajo impacto ambiental^{9,14,15}.

Otras referencias hablan de la capacidad de las avermectinas para actuar como agentes letales de larvas

Recibido el 13 de noviembre de 1998 y aceptado el 27 de agosto de 1999.

*Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN Unidad Durango), Departamento de Biotecnología, Sigma s/n, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, 34220, Durango, Durango, México.

y adultos de algunos insectos y como fármacos de efecto subletal, al reducir la voracidad de adultos y el número y la viabilidad de los huevecillos en algunos parásitos como la garrapata de la oreja^{5,8}.

En este estudio se describen los efectos letal y subletal de cinco lactonas aisladas a partir de cultivo líquido de *Streptomyces* sp, CSC 40, sobre hembras grávidas y la ovoposición y viabilidad de los huevecillos de la garrapata del ganado *Boophilus annulatus* Say, con aplicaciones a baja concentración, comparado con el mismo efecto de un producto comercial aplicado en las mismas condiciones.

Material y Métodos

Animales

Se usaron garrapatas (*Boophilus annulatus* Say), hembras, adultas, grávidas, de segunda generación en laboratorio.

Lactonas

Las cinco lactonas en estudio se obtuvieron del cultivo de la cepa de *Streptomyces* sp, CSC40, en medio líquido. Al término de la fase de crecimiento, se realizó la detección preliminar de lactonas¹. Los actinomicetos fueron separados del medio de cultivo por centrifugación a 13 000 g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C.

La pastilla fue separada y la parte líquida fue lavada repetidas veces con acetato de etilo. La fase orgánica fue concentrada a sequedad al vacío, el residuo se pesó y fue resuspendido en dos mililitros de acetato de etilo. Este concentrado se aplicó a una placa preparativa de sílica y se eluyó con hexano.

El marcaje y revelado de las fracciones resultantes se llevó a cabo por exposición de la placa a luz ultravioleta, posteriormente se asperjó la placa con ácido sulfúrico 0.5 N y se expuso a una temperatura de 100°C durante cinco minutos¹. Se obtuvieron los Rf de las bandas reveladas.

Cada compuesto identificado como lactona en el cromatograma fue recuperado y resuspendido en etanol para su caracterización espectrométrica. El fármaco de referencia fue un producto comercial hecho a base de ivermectina al 1%*.

Parámetros a evaluar

Se evaluó la tasa de mortalidad de hembras grávidas después de la aplicación del tratamiento y hasta el inicio de la ovoposición, este evento fue considerado como indicador de sobrevivencia. Posteriormente, se evaluó la cantidad y calidad de la puesta.

Tratamientos

Se diseñaron siete tratamientos que fueron denominados de la siguiente manera: Tratamiento A, lactona 1; tratamiento B, lactona 2; tratamiento C, lactona 3; tratamiento D, lactona 4; tratamiento E, lactona 5; tratamiento F, producto comercial*; tratamiento G, testigo (agua destilada). Se formaron lotes de 25 garrapatas por tratamiento y cada uno tuvo cuatro repeticiones. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar.

Los primeros cinco tratamientos (lactonas aisladas) se llevaron a cabo a una concentración de 0.075 % en agua; el sexto tratamiento se estableció con el producto comercial a una concentración de ivermectina al 1 %.

Procedimiento

Para facilitar el manejo y control de las garrapatas, éstas se fijaron por la parte ventral posterior a una cinta adhesiva. Esta acción no provoca una alteración fisiológica importante en las garrapatas, pues las hembras grávidas tienen la particularidad de inmovilizarse al empezar la ovoposición, al término de la cual mueren.

A cada animal se le suministró 50 µl del tratamiento respectivo por vía tópica en la parte dorsal del histerosoma. Posteriormente se mantuvieron a una temperatura promedio de 25°C y un fotoperiodo de 14 horas luz (indirecta) hasta que las garrapatas morían o las sobrevivientes terminaban la ovoposición. La tasa de mortalidad se registró porcentualmente, mientras que la ovoposición se evaluó pesando la masa total de huevecillos producida por cada individuo. Finalmente, se tomó la puesta total de diez garrapatas por tratamiento y de cada una se contaron y aislaron 100 huevecillos; es decir, 1000 huevecillos por tratamiento, que fueron incubados hasta eclosión y contadas las larvas emergentes.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados de los parámetros a medir (mortalidad, ovoposición y eclosión) se sometieron a un análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.01.

Resultados

La separación cromatográfica permitió identificar cinco lactonas cuyos Rf y absorción máxima se consignan en el Cuadro 1. El porcentaje de mortalidad, los pesos promedio de las oviposturas y el porcentaje de eclosiones por tratamiento se registran jerarquizados por prueba de Duncan y señalados con diferencias altamente significativas por análisis de varianza, en el Cuadro 2.

Discusión

Evidentemente, los datos de mortalidad muestran una

* Merck Sharp and Dohme.

Cuadro 1		
CARACTERIZACION CROMATOGRAFICA Y ESPECTROMETRICA DE LAS LACTONAS OBTENIDAS		
Lactona	R _f	A _{max} (nm)
1	0.044	241
2	0.533	232
3	0.616	238
4	0.738	243
5	0.883	230

Cuadro 2			
COMPILACION DE RESULTADOS DE MORTALIDAD, OVIPOSICION Y ECLOSION			
Tratamiento	Mortalidad (%)	Oviposición (g)	Eclosión (%)
A	0.0	0.06987 ^a	38.8 ^a
B	10.0	0.05204 ^{ab}	18.7 ^{ab}
C	30.0	0.04378 ^{bc}	5.8 ^b
D	0.0	0.07240 ^a	19.1 ^{ab}
E	0.0	0.06981 ^a	22.7 ^{ab}
F	85.0	0.02473 ^c	7.8 ^b
G	0.0	0.05203 ^{ab}	34.2 ^a
Significancia	***	***	***
Nivel = 0.01			

gran diferencia en favor del tratamiento F, lo que permite asegurar su eficiencia garrapaticida; además, las diferencias resultantes en los promedios de peso de la oviposición muestran que la acción inhibitoria del producto comercial (tratamiento F, ivermectina) es bastante efectiva al reducir en más del 50% el peso de huevecillos respecto del tratamiento testigo. De las lactonas en estudio sólo la lactona 3 (tratamiento C) provocó una disminución de la puesta de aproximadamente 20%, en comparación con el testigo. El análisis estadístico de los resultados de la oviposición muestra una diferencia altamente significativa entre los resultados del tratamiento F y los demás tratamientos, aunque la prueba de Duncan coloca a los tratamientos C (lactona 3) y F (ivermectina) en el mismo intervalo. La evaluación del parámetro eclosión mostró que el tratamiento C afectó de manera significativa la viabilidad de la puesta al permitir la eclosión de sólo 5.8% de los huevecillos, mientras que en el tratamiento F se registró 7.8%. Del resto de los tratamientos, sólo la lactona 1 (tratamiento A) no tuvo diferencia en cuanto al tratamiento testigo. Las lactonas 2, 4 y 5 (tratamientos B, D y E, respectivamente) tuvieron una acción inhibitoria de la eclosión mayor que la del testigo. Lo observado en este parámetro muestra que las lactonas de este estudio en comparación con el producto comercial

usado, no actúan en forma rápida, aniquilando a las garrapatas, sino que su efecto se empieza a hacer patente en la oviposición y se hace evidente al afectar la viabilidad de los huevecillos.

Por otra parte la inhibición de la viabilidad de la puesta con dosis pequeñas, permite pensar que los parasiticidas a base de lactonas podrían aplicarse a animales hospederos muy sensibles a ellos, como es el caso de los cerdos y algunas razas de perros^{10,11}.

Además, actualmente se busca hacer más efectivo el uso de parasiticidas y minimizar su impacto sobre el ambiente¹⁶. Tal vez la búsqueda de fármacos altamente letales ha dejado de lado la de otros fármacos que, aunque más lentos en cuanto a resultados, cumplen al final con el mismo objetivo. Probablemente el efecto subletal de algunos de los fármacos existentes, aplicados a bajas concentraciones y en combinación con otros biocidas que provoquen su potenciación, puede resultar en una práctica que signifique un gran ahorro económico, un adecuado control de parásitos de animales domésticos y un reducido impacto ambiental.

Finalmente, los resultados obtenidos son importantes porque permiten observar que la lactona 3 producida por la cepa nativa *Streptomyces* sp, CSC 40, aplicada a bajas concentraciones, tiene un efecto subletal muy similar al causado por el producto comercial, lo que hace de esta cepa una potencial fuente de metabolitos con capacidad garrapaticida.

Referencias

- Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. México (DF): Limusa, 1979.
- Kuroda M, Yoshida D, Kodama H. Bio-antimutagenic effects of sesquiterpene lactones from costus root oil. *Agric Biol Chem* 1987;51:585-587.
- Serrano JA, Sandoval AH. Manual de laboratorio para el estudio de los actinomicetales patógenos. Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes, 1992.
- Shibata M, Uyeda M, Kido Y, Fujimoto Y, Takano Y, Yoshioka Y. Production of acidic actinomycin congeners by a mutant strain of *Streptomyces antibioticus*, No. B-1625. *Agric Biol Chem* 1985;49:3377-3382.
- Meleney WP. Control of psoroptic scabies on calves with ivermectin. *Am J Vet Res* 1982;43:329-331.
- Wescott RB, LeaMaster BR. Efficacy of ivermectin against naturally acquired and experimentally induced nematode infections in sheep. *Am J Vet Res* 1982;43:531-533.
- Anke T. Further secondary products of biotechnological interest. In: Pape H, Rehm HJ, editors. *Biotechnology*. Vol. 4 Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1986;611-628.
- McCracken DI. The potential for avermectins to affect wildlife. *Vet Parasitol* 1993; 48:271-279.
- Forbes AB. A review of regional and temporal use of avermectins in cattle and horses worldwide. *Vet Parasitol* 1993;48:19-28.

10. Seaman JT, Thompson DR, Barrick RA. Treatment with ivermectin of sarcoptic mange in pigs. *Austr Vet J* 1993;70:307-308.
11. Poul JM, Abjean JP. Toxicité de l'ivermectine chez le rat nouveau-né. *Rec Méd Vét* 1993;169:47-52.
12. Omura S, Tanaka Y. Macrolide antibiotics. In: Pape H, Rehm HJ, editors. *Biotechnology*. Vol 4. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1986:359-391.
13. Singh MP, Peter JP, Nilda VJ, William MM, Michael G, Deborah AS. Mechanistic studies and biological activity of Bioxalomycin ? 2, a novel antibiotic produced by *Streptomyces viridodiastaticus* subsp. 1993;48:19-28. "litoralis" LL-31F508". *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1808-1812.
14. Sommer C, Steffansen B. Changes with time after treatment in the concentrations of ivermectin in fresh cow dung and in cow pats aged in the field. *Vet Parasitol* 1993;48:67-73.
15. Halley BA, Van den Heuvel WJA, Wislocki PG. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. *Vet Parasitol* 1993;48:109-125.
16. Waller PJ. Towards sustainable nematode parasite control of livestock. *Vet Parasitol* 1993;48:295-309.