

Estudio *in vitro* de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*

MARTINS, R. M.

Departamento de Ciências Biomédicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade do Caxias do Sul. Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130. Bairro Petrópolis, Caxias do Sul, RS. Cep: 95070-560. Brasil.

RESUMEN: En este artículo se describe los testes experimentales *in vitro* de la acción acaricida del aceite esencial extraído de la gramínea *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Citronela de Java), frente a teleoginas y larvas de la garrapata de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), bien como sobre la puesta y eclosión de sus huevos. Los resultados indicaron que el tratamiento con el referido aceite presenta una DL50 en la concentración de 6,1% frente a teleoginas y de 4,1% frente a las larvas. No hubo puesta cuando las teleoginas fueron tratadas con este aceite en la concentración de 10% y tan poco hubo eclosión de los huevos de estas teleoginas cuando tratadas en la concentración de 7,14%. Fueron también hechos testes comparativos entre acaricidas comerciales y el aceite de Citronela de Java. Los resultados de los tratamientos fueron semejantes, siendo que el tratamiento con la Citronela de Java inhibió totalmente la puesta de las teleoginas cuando utilizado en la concentración de 20%. Los tres principales compuestos presentes en el aceite testado, a saber, Citronelal, Geraniol y Citronelol, fueron también estudiados separadamente cuanto a su acción acaricida y inhibitoria de la eclosión de los huevos. Los resultados indicaron que el Citronelal y el Geraniol tienen una acción acaricida significativamente más fuerte do que el Citronelol, indicando haber una acción compartida entre ellos.

Palabras-chave: Acción *in vitro*; aceite essencial; Citronela de Java; *Cymbopogon winterianus* Jowitt; garrapatas; *Boophilus microplus*.

RESUMO: Estudo *in vitro* da ação acaricida do óleo essencial da gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) no carrapato *Boophilus microplus*. Este artigo descreve os testes experimentais “*in vitro*” da ação acaricida do óleo essencial extraído da gramínea *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Citronela de Java), frente a teleóginas e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), bem como frente a postura e a eclosão de seus ovos. Os resultados indicaram que o tratamento com o referido óleo, apresentou uma DL50 na concentração de 6,1% frente as teleoginas e de 4,1% frente as larvas. Não houve postura quando as teleoginas foram tratadas com este óleo na concentração de 10% e tão pouco houve eclosão dos ovos desta teleoginas quando tratadas na concentração de 7,14%. Foram também feitos testes comparativos entre carrapaticidas comerciais e o óleo de Citronela de Java. Os resultados dos tratamentos foram semelhantes e o tratamento com a Citronela de Java inibiu totalmente a postura das teleoginas quando utilizado na concentração de 20%. Os três principais compostos presentes no óleo testado, a saber, Citronelal, Geraniol e Citronelol, foram também estudados separadamente quanto a sua ação acaricida e inibitória da eclosão dos ovos. Os resultados indicaram que o Citronelal e o Geraniol tiveram uma ação acaricida significativamente mais forte que o Citronelol, indicando haver uma ação compartilhada entre eles.

Palavras-chave: Ação *in vitro*; óleos essenciais; Citronela de Java; *Cymbopogon winterianus* Jowitt; carrapatos; *Boophilus microplus*.

ABSTRACT: *In vitro* study of the acaricidal activity of the essential oil from the Citronella of Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) to the tick *Boophilus microplus*.

This work describes experimental tests “*in vivo*” of the acaricidal activity of the essential oil extract from the grass *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Citronela de Java) against engorge adult females and larvae from the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), and against the hatching and the breaking through of the eggs. The results indicated that treatment with this oil shows a DL50 in the concentration of 6.1% against the engorged female and 4.1% against the larvae. There was no hatch when the engorged female was treated with this oil in the concentration of

10% and the eggs from this female did not break through when it was treated with such oil in the concentration of 7.14%. There were also performed comparative tests among commercial acaricides and the Citronella of Java oil. The results of the Citronella oil were similar to the commercial products. The hatch was totally inhibited when the oil was used in the concentration of 20%. The three main compounds present in the studied oil, known as Citronellal, Geraniol and Citronellol were also studied separately about the acaricidal activity and eggs break through inhibition. The results showed that the Citronellal and the Geraniol have a significant stronger action than the Citronellol, indicating a compartmentalized acaricidal action among them.

Key words: "In vitro" acaricidal activity; essential oil; Citronella of Java grass; *Cymbopogon winterianus* Jowitt; ticks; *Boophilus microplus*.

INTRODUCCIÓN

La infestación de bovinos por *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) y las enfermedades transmitidas por este ácaro (babesiosis y anaplasmosis), causan perjuicios a la economía agropecuaria, no solamente por la disminución de la producción de carne, leche y la eventual muerte del animal, sino también por la depreciación de su cuero (González, 1995). A estas pérdidas se suman los gastos con los tratamientos químicos que, además de no resolver definitivamente el problema, pueden favorecer la aparición de cepas resistentes y contaminar el medio ambiente (Roulston et al., 1968). Las pérdidas causadas por *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) fueron estimadas en más de 100 millones de dólares por año en Australia (Cobon & Willadsen, 1990) y de 1 billón de dólares en América Central y Sudamérica (Horn, 1987). En Brasil se estima que actualmente las pérdidas con el parasitismo de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) alcancen 2 millones de dólares al año. (Grisi et al., 2002).

Por otro lado, Clark & Sánchez (1982) publicaron resultados que muestran la intoxicación de los animales sometidos a consecutivos baños de acaricidas químicos y que sumados al "estrés" físico del tratamiento, predisponen los bovinos a otras enfermedades.

El control de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) basándose exclusivamente en la utilización de sustancias químicas ha sido cuestionado recientemente (Labarthe, 1994). Esta afirmación es compartida por algunos investigadores que defienden el control biológico por hongos (Bittencourt et al., 1989; 1997) y bacterias (Brum et al. 1991a; 1991b). Además, actualmente ha sido enfatizada la utilización de inmunizaciones (Kemp et al., 1986), baños estratégicos (Martins, 1995), creación de razas resistentes (Penna, 1990), uso de formas híbridas estériles (Losburn & Knipling, 1982)

y cultivo de pastos repelentes (Sutherst & Wilson, 1986). Esta es apenas una parte de una larga lista de citaciones en la literatura.

La gramínea *Cymbopogon winterianus* Jowitt, conocida como Citronela de Java, ha sido descrita en la literatura como portadora de cualidad controladora de hongos (Sarbhoy et al., 1978; Dikshit & Husain, 1984), nematodos (Sangwain et al., 1985), y principalmente de insectos coleópteros y lepidópteros (Srivastava et al., 1988; Singh & Chaudhary, 1988; Singh et al., 1989; Roychoudhury et al., 1989; Marimuthu et al., 1997). Más recientemente (Alves-Branco et al., 2000), cita que la "mosca del cuerno" (*Haematobia irritans* Linnaeus), fue controlada por el uso de extractos de la Citronela de Java. En cambio, no encontramos citas sobre el uso de *Cymbopogon winterianus* Jowitt en el control del *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Esta es una gramínea oriunda de Sri Lanka (antiguo Ceilán) y descrita originalmente por Jowitt en 1908. Fue obtenida a partir de la selección de una variedad inferior en producción de aceite (*Cymbopogon nardus* Rendle), según se cita en Virmani et al. (1979).

Los testes "in vitro" que evalúan la capacidad acaricida de sustancias químicas para el control de la garrapata, de a mucho aparecen bien relatados en la literatura. Los más utilizados son: Prueba de paquete larval (PPL) descrita inicialmente por Stone & Haydock (1962) en la cual larvas de garrapatas son colocadas en paquetes de papel filtro impregnadas con acaricidas; Prueba de inmersión de larvas (PIL) descrita inicialmente por Shaw (1966) en la cual la larva es introducida en una solución o suspensión de acaricida, método que generalmente aumentaba el poder de acción del acaricida; Prueba de inmersión de hembras adultas (PIA) descrita inicialmente por Whitnall & Bradford (1947) y complementada por Drummond et al. (1973). Por lo tanto, un adecuado control de enfermedades no es posible sin un buen sistema de control de los compuestos utilizados

como acarícidas, así como el control de las cepas resistentes a estos compuestos (Aguirre et al., 1983). Frente a estos problemas la FAO esta trabajando en programas de busca de normas que deben todavía ser evaluadas (FAO, 1999).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar “*in vitro*” la acción del aceite esencial de la gramínea *Cymbopogon winterianus* Jowitt y sus principales compuestos, utilizándose teleoginas, larvas y huevos de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), con vistas a su futuro uso como acarícida.

MATERIAL Y MÉTODO

El aceite esencial de Citronela de Java utilizado en los experimentos fue producido en los laboratorios de la División de Aceites Esenciales del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Caxias do Sul, RS (Brasil). Las principales características del aceite Citronela de Java en cuanto a sus compuestos principales fueron: Citronelal (41,15%); Geraniol (17,90%) y Citronelol (17, 28%). La densidad relativa es de 0,881, el índice de refracción de 1,470 y el desvío polarimétrico de cero.

Las teleoginas y larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) utilizados en esta investigación procedían de bovinos estabulados e infestados artificialmente con larvas de la cepa CPVDF (Centro de Pesquisas Veterinaria Desidério Finamor – FEPAGRO, RS – Brasil).

Después de la cosecha diaria por tres días, las teleoginas fueron transportadas al laboratorio y lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2,5% para prevenir contaminaciones bacterianas y fúngicas, siendo escogidos individuos adultos, aparentemente saludables y del mismo tamaño.

Las teleoginas fueron colocadas individualmente en tubos de ensayo con 12 cm de largo y 1,5 cm de diámetro, tapadas con algodón hidrófilo y divididas en lotes de 24 tubos (cantidad patrón de teleoginas usadas en todos los experimentos). Los tubos fueron inmovilizados por períodos alternativos de 12 horas con y sin refrigeración para inhibir la puesta hasta el momento de ser empleados en los experimentos.

Fueron realizados seis experimentos “*in vitro*”. El primero fue realizado de forma exploratoria para inicialmente observar el comportamiento biológico del ácaro frente al aceite esencial de Citronela de Java. El segundo, tercero, cuarto y quinto experimentos fueron hechos con un número más grande de ácaros y más diluciones del aceite esencial de Citronela de Java para determinar la dilución más alta que mata al 50% de las teleoginas y larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), y cual dilución inhibe 50% la postura y la eclosión de los huevos. El sexto experimento “*in vitro*”, fue realizado para comparar el aceite de Citronela de Java con otros

acarícidas comerciales, utilizándose el protocolo recomendado por la FAO (1999) para testar la resistencia de teleoginas frente a acarícidas químicos comerciales. El diluyente utilizado en todas las diluciones del aceite de Citronela de Java, bien como placebo en los controles, fue el aceite de girasol comercial. Los experimentos están descritos a seguir.

Experimento I:

Fueron preparadas diluciones del aceite de Citronela de Java para obtener concentraciones de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% y 3.12% del producto. Un volumen de 50ml de cada concentración fue colocado con una pipeta en la cara dorsal de 24 teleoginas y estas puestas individualmente en tubos de ensayo y estufa a 27°C con 80% de humedad relativa de aire (condiciones de tratamiento utilizadas en todos los experimentos). Igual número de teleoginas sirvió de control recibiendo placebo en igual volumen. Las teleoginas testes y control fueron observadas diariamente por un período de 7 días con relación a la mortalidad.

Experimento II:

Con pipetas de 50 ml fueron depositadas 6 diluciones del aceite de Citronela de Java de distintas concentraciones (10%; 8,33%; 7,14%; 6,25%; 5,55%; 5%) en la cara dorsal de 24 teleoginas y colocadas individualmente en tubos de ensayo y puestas en estufa a 27°C y 80% de humedad relativa del aire. Igual número de teleoginas sirvió de control, recibiendo placebo en igual volumen. Las teleoginas fueron observadas en días alternados con relación a la mortalidad durante un período de 14 días.

Experimento III:

Un tercer experimento fue realizado igualmente al experimento II, pero con un tiempo más largo de observación (36 días), con el objetivo de observar, además de la mortalidad, la acción del referido aceite sobre la puesta y la eclosión de los huevos del *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).

Experimento IV:

Para determinar la mortalidad de las larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) cuando eran tratadas con aceite de Citronela de Java, fueron puestas individualmente teleoginas saludables en tubos de ensayo y colocadas en una incubadora a 27°C con 80% de humedad relativa del aire. Después de la puesta y completarse la eclosión de los huevos y transformación en larvas, las teleoginas fueron retiradas y en las larvas fueron tratadas con 50ml del aceite de Citronela de Java en 12 distintas diluciones (7,14%; 6,25%; 5,55%; 5%; 4,54%; 4,16%; 3,84%; 3,57%; 3,33%; 3,12%; 2,94%; 2,77%), de tal forma que cada concentración fue probada en 24 tubos. Sus

respectivos controles fueron hechos con igual tratamiento utilizando placebo. La observación de la mortalidad de las larvas fue hecha utilizando una lupa y realizada en días alternados por un período de 14 días.

Experimento V:

Se realizaron varias diluciones de los 3 más importantes compuestos principales del aceite de Citronela de Java. El Citronelal (-3,7-dimethyl-6-octenal) fue preparado en las proporciones de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% y 3,12%. Estas diluciones fueron aplicadas en la cara dorsal de 24 teleoginas en un volumen de 20,57mL por ácaro, colocados individualmente en tubos de ensayo. En igual número de teleoginas que sirvieron de control, fue aplicado el placebo.

Con los otros dos compuestos principales, Geraniol (trans-3,7-dimethyl-2,6-octadien-1-ol) y Citronelol (3,7-dimethyl-6-octen-1-ol) también fueron preparadas concentraciones semejantes, pero utilizándose volúmenes distintos de aplicación en las teleoginas, o sea, 8,95mL y 8,64mL respectivamente. La variación de los volúmenes de aplicación está en correspondencia con los porcentajes de su aparición en el aceite integral de Citronela de Java utilizado. En los controles fue aplicado el placebo con igual volumen utilizado en las diluciones testes. La lectura de los tubos fue hecha en días alternados, observando la mortalidad de las teleoginas y la eclosión de sus huevos, durante un período de 14 días.

Experimento VI:

Fue testada la acción de inhibición de puesta en teleoginas tratadas con Citronela de Java en las concentraciones de 10 y 20%, comparativamente con otros 10 acarícidas comerciales diluidos en agua. Como control fueron utilizados placebos de aceite de girasol y agua en igual número de teleoginas. Los productos comerciales fueron: Bovinal, Cypermil/Sup, Assuntol, Butox, Barrage, Ec-Tox, Ciperpurina, No Kalt, Amipur e Amitraz 7S.

Por lo tanto, fueron utilizadas 10 teleoginas de peso y tamaño semejantes para cada producto, las cuales fueron sumergidas durante 5 minutos en los acarícidas probados en su dilución de uso recomendada por el laboratorio comercial. Después de este período las teleoginas fueron secadas en papel filtro, fijadas con cinta adhesiva en placas de Petry y depositadas en una estufa con temperatura de 27°C y 80% de humedad relativa del aire. A los 7 días fueron hechas las observaciones de las teleoginas que hicieron puesta. Igual procedimiento fue hecho con las teleoginas control con diluyente aceite de girasol y agua.

RESULTADO

Los resultados de los experimentos se muestran en las tablas expuestas a seguir:

ANÁLISIS ESTADÍSTICA

Fue utilizado el programa SPSS para los cálculos estadísticos. Los resultados se muestran a seguir:

Cuanto a la mortalidad de las teleoginas después del tratamiento con distintas concentraciones del aceite de Citronela de Java (Tablas 2 y 3), encontramos una reta de regresión entre la mortalidad y la concentración del aceite, de tal forma que la ecuación quedo: concentración (%) = $3,21 + 0,058$ mortalidad (%). El valor de la Dosis Letal 50% (DL 50) basada en la regresión fue de 6.1 % de la concentración. El coeficiente de regresión $r = 0,91$, el % de la variancia explicada $r^2 = 0,83$ y un valor de $P = 0,011$. La figura de la reta de regresión si muestra en la Figura 1.

Los resultados de la acción del aceite de Citronela de Java en la inhibición de la puesta y eclosión de los huevos de teleoginas tratadas con este producto (Tabla 4) mostraran que el Efecto de Concentración 100% (EC 100) en la puesta fue obtenida en la concentración de 10% y en la eclosión en la concentración de 7,14%.

Los estudios estadísticos de la acción del aceite de Citronela de Java contra las larvas de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), también resulto una reta de regresión entre la

TABLA 1. Porcentaje de teleoginas muertas, después del tratamiento con concentraciones dobles de aceite Citronela de Java y sus respectivos controles.

Concentraciones	%de Mortalidad
50 %	100 %
25 %	100 %
12,5 %	100 %
6,25 %	25 %
3,12	4,16 %
Controle 0 %	4,16 %

TABLA 2. Porcentaje de teleoginas muertas, después del tratamiento con concentraciones más próximas del aceite Citronela de Java y sus respectivos controles.

Concentraciones	% de Mortalidad
10 %	100 %
8,33 %	79,16 %
7,14 %	75 %
6,25 %	41,66 %
5,55 %	33,33 %
5 %	20,83 %
Controle 0 %	12,5 %

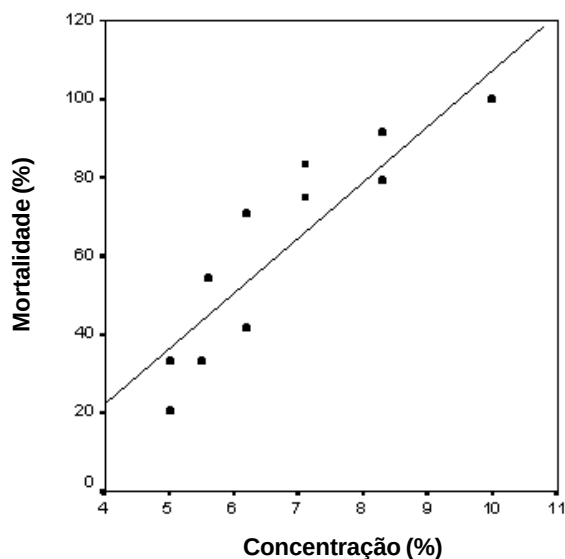


FIGURA 1. Reta de regressão entre porcentaje de mortalidad de teleoginas y porcentaje de concentración del aceite de Citronela de Java utilizado como tratamiento acaricida.

TABLA 3. Porcentaje de teleoginas muertas, después del tratamiento con diferentes concentraciones del aceite Citronela de Java y sus respectivos controles.

Concentraciones	% de Mortalidad
10 %	100 %
8,33 %	91,66 %
7,14 %	83,33 %
6,25 %	70,83 %
5,55 %	54,16 %
5 %	33,33 %
Controle 0 %	8,33 %

mortalidad de larvas y la concentración del aceite (Tabla 5), de tal forma que la ecuación quedo: concentración (%) = $2,414 + 0,034$ mortalidad (%). El valor de la DL 50 obtenida fue de 4,11% de la concentración, basado en la regresión El coeficiente de regresión $r = 0,92$, el % de la variancia explicada $r^2 = 0,84$ y un valor de $P = 0,01$.

Cuanto al estudio del uso de los principales compuestos del aceite de la Citronela de Java en respecto a la mortalidad (Tabla 6) y eclosión de los huevos de teleoginas tratadas con estos productos (Tabla 7), obtuvimos los siguientes resultados. Para el Citronelal el coeficiente de regresión $r = 0,94$, la variancia explicada $r^2 = 0,88$ y el valor de $P = 0,02$. La ecuación quedo: % de concentración = $41,98 - 0,42$. El EC 50 obtenido fue de 21,05 %. Para el Geraniol, el coeficiente de regresión $r = 0,87$, la variancia explicada $r^2 = 0,76$ y el valor de $P = 0,054$. La ecuación quedo: % de concentración = $36,33 - 0,37$. El EC 50 fue de 17,8 %. Para el Citronelol el

TABLA 4. Porcentaje de teleoginas en puesta y eclosión, después del tratamiento con diferentes concentraciones del aceite de Citronela de Java y sus controles.

Concentraciones	%de puesta	%de clusión
10 %	0 %	0 %
8,33 %	8,33 %	0 %
7,14 %	12,5 %	0 %
6,25 %	25 %	8,33 %
5,55 %	29,16 %	16,66 %
5 %	41,66 %	25 %
Controle 0 %	4,16 %	100 %

TABLA 5. Porcentaje de tubos con larvas, después del tratamiento con diferentes concentraciones del aceite de Citronela de Java y sus respectivos controles.

Concentraciones	% de mortalidad de larvas
7,14 %	100 %
6,25 %	100 %
5,55 %	100 %
5 %	83,33 %
4,54 %	75 %
4,16 %	62,5 %
3,84 %	62,5 %
3,57 %	50 %
3,33 %	20,83 %
3,12 %	12,5 %
2,94 %	12,5 %
2,77 %	0 %
Controles 0 %	0 %

coeficiente de regresión $r = 0,99$, la variancia explicada $r^2 = 0,97$ y el valor de $P = 0,002$. La ecuación quedo: % de concentración = $154,9 - 1,52$. El EC 50 obtenido fue de 78,9%.

Fueron también realizados los cálculos de diferencias significativas entre los % de mortalidad de teleoginas tratadas con los compuestos estudiados y la eclosión de sus huevos (Tablas 6 y 7), utilizando el teste de Man-Whitney, utilizado porque las variables no tienen distribución normal, lo que as exclui de la aplicacion de la ANOVA y del teste "post hoc" de Tukey. No fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre los compuestos Citronelal y Geraniol, pero encontrada diferencia significativa (dif. Sig en á = 0,05) entre Citronelal y Citronelol, bién como entre Geraniol y Citronelol.

TABLA 6. Porcentaje de teleoginas muertas después del tratamiento con diferentes concentraciones de los compuestos Citroneal, Geraniol y Citronelol, derivados del aceite de Citronela de Java y sus controles.

Compuestos	Citronelal	Geraniol	Citronelol
Concentraciones	% de mortalidad	%de mortalidad	% de mortalidad
50 %	100 %	100 %	25 %
25 %	87,5 %	100 %	12,5 %
12,5 %	33,33 %	50 %	8,33 %
6,25 %	16,66 %	20,83 %	4,16 %
3,12	8,33 %	4,16 %	4,16 %
Controles 0 %	12,5 %	4,16 %	4,16 %

TABLA 7. Porcentaje de tubos con huevos de teleoginas con eclosión, después del tratamiento con diferentes concentraciones de los compuestos Citroneal, Geraniol y Citronelol, derivados del aceite de Citronela de Java y sus controles.

Compuestos	Citronelal	Geraniol	Citronelol
Concentraciones	% de eclos.	% de eclos.ón	% de eclos.
50 %	0 %	0 %	70,83 %
25 %	16,66 %	0 %	83,33 %
12,5 %	75 %	54,16 %	91,66 %
6,25 %	83,33 %	75 %	100 %
3,12	95,83 %	100 %	100 %
Controles 0 %	87,5 %	95,83 %	95,83 %

DISCUSIÓN

Inicialmente fue realizado un experimento preliminar con el objetivo de conocer el potencial la Citronela de Java como acariciada frente a la teleogina del ácaro *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), donde obtuvimos resultados satisfactorios (Tabla 1).

Otros dos experimentos fueron realizados para determinar con más exactitud la concentración del aceite de Citronela de Java que mata 50% las teleoginas tratadas (DL50), siendo en esta vez testadas en concentraciones más próximas (Tablas 2 y 3). Los resultados demostraron que la DL50 fue la de 6,1%, presentando una reta de regresión bien distribuida (Figura 1) con un $P = 0,01$ altamente significativo.

Los resultados de la acción del aceite de Citronela de Java en la puesta y eclosión de los huevos de teleoginas tratadas con este producto (Tabla 4), no posibilitaran el cálculo del Efecto de Concentración 50% (EC 50), una vez que las concentraciones utilizadas no llegaron alcanzar un porcentaje de 50% de puesta y eclosión. Sin embargo, fue posible observar que el EC 100 en la puesta fue en la concentración de 10% y en la eclosión en la concentración de 7,14%. Cuanto a la acción del aceite de Citronela de Java sobre las larvas (Tabla 5), podemos observar que la DL50 fue de 4,11%, % con un $P = 0,01$, altamente significativo.

El estudio del uso de los principales compuestos del aceite de Citronela de Java en respecto a la mortalidad de las teleoginas tratadas con esto producto (Tabla 6) y de la eclosión de sus huevos (Tabla 7), demostraran que el Citronelal (EC50 de 21,05%) y el Geraniol (EC50 de 17,8%) tuvieron

un efecto semejante y eficaz en la mortalidad de las teleoginas y como inhibidor de la eclosión de sus huevos, en relación al Citronelol (EC50 de 78,9%). Este último compuesto tuvo el menor efecto como acariciada y inhibidor de la eclosión de los huevos y tampoco alcanzo el EC 50 en las concentraciones utilizadas. Lo que parece ocurrir es que existe una acción sinérgica compartida entre los compuestos del aceite de Citronela de Java, que se suman para producir efectos de acariciada, larvicida y inhibidor de la puesta y eclosión de los huevos de las teleoginas tratadas.

TABLA 8. Porcentaje de teleoginas en puesta, después de tratadas con varios productos químicos comerciales, en comparación con el tratamiento con diferentes concentraciones del aceite de Citronela de Java y sus respectivos controles de aceite y agua. Período de observación de 7 días.

Compuestos	% de Puesta
Bovinal	0 %
Cypermil/Sup	0 %
Assuntol	0 %
Butox	3 %
Barrage	4 %
Ec-Tox	5 %
Ciperpurina	2 %
No Kalt	0 %
Amipur	0 %
Amitraz 7S	0 %
Citronela 10%	4%
Citronela 20%	0 %
Control aceite	90 %
Control agua	100 %

El aceite de Citronela de Java diluido en la concentración de 20% y testado comparativamente con otros productos comerciales (Tabla 8), parece ser la concentración que con seguridad puede ser utilizada “*in vivo*” como acaricida. Por otro lado, si consideramos la propiedad de repelencia de este aceite esencial, el producto quizás pueda ser utilizado en una concentración más baja.

La industria farmacéutica internacional continuamente ha investigado nuevos compuestos para el control químico de la garrapata. El coste de desarrollo de un nuevo producto está entre 100 y 230 millones de dólares y el proceso puede tardar más de 10 años hasta que alcance el mercado (De Alva, 1995). Sin embargo, los testes de comprobación hasta ahora empleados, no fueron diseñados para testar productos volátiles o repelentes.

Los resultados de validación del aceite de Citronela de Java en esta investigación fueron bastante animadores y rigurosos una vez que cada procedimiento experimental fue realizado con 24 repeticiones por concentración, además de sus controles (Hinkle et al., 1988).

Finalmente, para que la Citronela de Java pueda ser definitivamente utilizada como tratamiento alternativo, hay un largo camino de investigación a recorrer. Hay que testar el producto bajo condiciones de campo, confirmar su propiedad de repelencia, determinar con seguridad su dosis de uso, conocer su mecanismo de acción, testar su toxicidad al organismo bovino, estudiar su influencia en la preñez y su permanencia en la carne y en la leche. Algunos de estos aspectos están siendo investigados por el autor y serán en breve enviados para publicación.

CONCLUSION

Con base en los experimentos “*in vitro*” del presente trabajo, se concluye que:

El aceite esencial la Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en distintas concentraciones, matan teleoginas y larvas, así como inhiben la puesta y eclosión de huevos de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887).

AGRADECIMIENTO

Al Dr. João Ricardo S. Martins del Centro de Pesquisas Veterinarias Desidério Finamor (FEPAGRO, RS/Brasil) por suministrar las cepas de garrapatas. A la Dra. Luciana Serafini del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Caxias do Sul (RS/Brasil) por suministrar el aceite de Citronela de Java y al Dr. Alois Schafer del mismo Instituto por los cálculos estadísticos. Al Prof. Dr. Juan Antonio Régil Cueto de la Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de León (España) por la orientación en el trabajo.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGUIRRE, E.J.; NERI, O.S.; ABURTO, A.S. Determinación de concentraciones discriminantes como un medio diagnóstico de susceptibilidad en garrapatas *Boophilus microplus*. In: REUNIÓN ANUAL DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, 4., 1983, México. **Proceedings...** México: Universidade Nacional Autônoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1983. 47p.
- ALVES-BRANCO, F.P.J. et al. Atividade de repelência do extrato de *Citronela* nas infestações por *Haematobia irritans* em bovinos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 11., 2000, Salvador. **Anais...** Salvador, 2000, p.123.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MÁSSARD, C.L.; LIMA, A.F. Uso do Fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, no Controle do Carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, supl.3, p.146. 1989.
- BITTENCOURT, V.R.E.P. et al. Avaliação da eficácia “*in vitro*” de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals) Vuil. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira Parasitologia**, v.6, p.49-52, 1997.
- BRUM, J.G.W.; FACCINI, J.L.H.; AMARAL, M.M. Infecção em teleoginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Histopatologia e testes *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.31-7, 1991a.
- BRUM, J.G.W.; TEIXEIRA, M.O.; SILVA, E.G. Infecção em teleoginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): I. etiologia e sazonalidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, p.25-30, 1991b.
- CANESTRINI, G. Intorno ad alcuni Acari ed Opilioni dell'America. **Atti della Società Veneto-Trentina di Scienze Naturali**, v.11, n.1, p.104. 1887.
- CLARK, L.G.; SANCHEZ, S.J. Association of pesticide toxicosis with some health factors during the tick eradication program in Puerto Rico. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VETERINARY EPIDEMIOLOGY AND ECONOMICS, 3., 1982, Arlington. **Proceedings...** Edwardsville: Veterinary Medicine Publishing Co., 1982. p.620-3.
- COBON, G.S.; WILLADSEN, P.W. Vaccines to prevent cattle tick infestations. In: WOODROW, G.C.; LEVINE, M.M. (Eds.). **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1990. p.901-17.
- DE ALVA, R. Creating new products for animal health. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 3., 1995, Acapulco. **Proceedings...** Acapulco, 1995. p.86-7.
- DIKSHIT, A.; HUSAIN, A. Antifungal action of some essential oils against animal pathogens. **Fitoterapia**, v.55, n.3, p.171-6. 1984.
- DRUMMOND, R.O. et al. *B. annulatus* and *B. decoloratus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.66, p.130-3, 1973.
- FAO Industry Sub-group 2 Report, on Adult Immersion Test (AIT) for Acaricide Resistance in *Boophilus* ticks. Report presented to FAO/Industry – EMBRAPA meeting (Juiz de Fora, MG, Brasil, 20-23 september 1999). 1999.
- GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Ética, 1995. 80p.

- GRISI, L. et al. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A HORA VETERINÁRIA**, v.125, p.8-10, 2002.
- HINKLE, D.E.; WIERSMA, W.; JURIS, S.G. **Applied Statistics for the Behavioral Sciences**. 2 ed. Boston: Houghton Mifflin Company, 1988. 682p.
- HORN, S. Ectoparasites of animals and their impact on the economy of South America. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 23., 1987, Montreal. **Proceedings...** Montreal, 1987. p.127
- JOWITT, E. Original description of *Cymbopogon winterianus*. **Annals of the Royal Botanic Gardens of Peradeniya (Colombo)**, v.4, p.188-9, 1908.
- KEMP, D.H. et al. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: feeding and survival of the parasite on vaccinated cattle. **International Journal of Parasitology**, v.16, n.2 p.115-20, 1986.
- LABARTHE, N.V. Biological control of tick populations: review reflections. **Cadernos de Saúde Pública**, v.10, n.1 p.47-52, 1994.
- LOSURN, R.L.; Knipling, E.F. The potential use of sterile hybrid *Boophilus* ticks (Acari: Ixodidae) as a supplemental eradication technique. **Journal of Medical Entomology**, v.19, n.6, p.637-44, 1982.
- MARIMUTHU, S.; GURUSUBRAMANIAN G.; KRISHNA, S.S. Effect of exposure of eggs to vapours from essential oils on egg mortality, development and adult emergence in *Earias vittella* (F) (Lepidoptera: noctuidae). **Biological Agriculture & Horticulture**, v.14, n.4, p.303-7, 1997.
- MARTINS, J.R.S. **O controle correto do carrapato**. Porto Alegre: FEPAGRO, 1995. p.5-10 (Circular técnica, 5).
- PENNA, V.M. *Boophilus microplus*: A resistência genética do hospedeiro como forma de controle. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da Universidade de Minas Gerais**, v.4, p.3-65, 1990.
- ROYCHOUDHRY, R.; JAIN, R.K.; RAYCHAUDHURI, S.P. Effect of neem oil and citronella oil on the development of white fly (*Bemisia tabaci*) and virus transmission. Recent advances in medicinal, aromatic and spice crops. In: INTERNATIONAL CONFERENCE HELD, 1989, New Delhi. **Proceedings...** New Delhi, 1989. p.159-61.
- ROULSTON, W.J. et al. Chemical control of an organophosphorus and carbamate resistant strain of *Boophilus microplus* from Queensland. **Bulletin of Entomological Research**, v.58, p.379-92, 1968.
- RUSSELL, R.M.; ROBERTSON, J.L.; SAVIN, N.E. POLO: a new computer program for probit analysis. **Bulletin of Entomological Society of America**, v.23, p.209-13, 1977.
- SANGWAIN, N.K. et al. Nematicidal activity of essential oils of *Cymbopogon* grasses. **Nematológica**, v.31, n.1, p.93-9, 1985.
- SARBHOY, A.K. et al. Efficacy of some essential oils and their constituents on few ubiquitous molds. **Zentralblatt für Bakteriologie Naturwiss**, v.133, n.7-8, p.723-5, 1978.
- SHAW, R.D. Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. **Bulletin of Entomological Research**, v.56, p.389-405, 1966.
- SINGH, R.; CHAUDARY, J.P. Effect of plant species on post-embryonic development and survival of armyworm (*Mythimna separata*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.58, n.11, p.873-5, 1988.
- SINGH, D.; SIDDIQUI, M.S.; SHARMA, S. Reproduction retardant and fumigant properties in essential oils against rice weevil (Coleoptera: Curculionidae) in stored wheat. **Journal of Economic Entomology**, v.82, n.3, p.727-33. 1989.
- SRIVASTAVA, S.; GUPTA, K.C.; AGRAWALL, A. Effect of plant product on *Calosobruchus chinensis* L. infection on redgram. **Seed-Research**, v.16, n.1, p.98-101, 1988.
- STONE, B.F.; HAYDOCK, P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, v.53, p.563-78, 1962.
- SUTHERST, R.W.; WILSON, L.J. Tropical legumes and their ability to immobilize and kill cattle ticks. In: JUNIPER, B.; SOUTHWOOD, R. **Insects and the plant surface**. London: Edward Arnold, 1986. p.185-94.
- VIRMANI, O.P.; SINGH, K.K.; SINGH, H.J. **Java Citronella and its cultivation in India**. New Deeli: Central Institute of Medical and Aromatic Plant, 1979, p.13. (Farm Bulletin, 1).
- WHITNALL, A.B.; BRADFORD, B. An arsenic resistant tick and its control with gammexane dips. **Bulletin of Entomological Research**, v.38, p.353-72, 1947.