

Pruebas *in vitro* para medir la eficacia de soluciones de tamarindo (*Tamarindus indicus*) y ácido oxálico contra la garrapata común del ganado bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

***In vitro* tests to assess the effectiveness of tamarind (*Tamarindus indicus*) and oxalic acid solutions against cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.**

Víctor Álvarez C.¹

- 1 SENASA. Dirección de Medicamentos Veterinarios. Pruebas de Eficacia Biológica de los Acaricidas. Barreal de Heredia. E-mail: viacal@racsa.co.cr

Recibido: 26 de agosto de 2015. **Corregido:** 9 de octubre de 2015. **Aceptado:** 30 de octubre de 2015.

Resumen: Se realizó un ensayo *in vitro* para medir la efectividad acaricida del extracto crudo de tamarindo (*Tamarindus indicus*) en el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Asimismo, se puso a prueba un producto formulado con ácido oxálico (AO). Los parámetros que se midieron fueron el porcentaje de inhibición de la oviposición y el porcentaje de control. El ácido oxálico utilizado al doble de la dosis recomendada por el fabricante para control de varroasis presentó los mejores resultados en ambos parámetros, seguido de la pasta de tamarindo 1:3 y 1:4 obtenidas del fermento del extracto crudo. Aunque el fermento de extracto crudo de tamarindo y el ácido oxálico a la mitad de la dosis recomendada presentaron los resultados más bajos, en todos los casos fue superior al 60% de control, lo que demuestra un efecto detrimental sobre la población de garrapatas. Se hizo observaciones a través del estereoscopio de las garrapatas tratadas entre 1-3 horas después de los tratamientos y presentaron importantes lesiones. Estos resultados respaldan la hipótesis de que el ácido oxálico y variantes del fermento del extracto crudo de la fruta del tamarindo podrían tener potencial para el control de *R. microplus*, en especial en un programa de control integrado contra las garrapatas.

Palabras clave: *Rhipicephalus microplus*, *Tamarindus indicus*, ácido oxálico, control de garrapatas.

Abstract: An *in vitro* assay was performed to measure the acaricidal effectiveness of crude-extract of tamarind (*Tamarindus indicus*) to control the engorged female cattle tick (*Rhipicephalus microplus*). In addition, a product formulated with oxalic acid (OA) was tested. Parameters measured were percentage of oviposition inhibition and control rate. The best result was obtained with oxalic acid to twice the concentration recommended by the manufacturer for varroa control, followed by the tamarind pulp at 1:3 and 1:4 concentrations. Even though other concentrations of ferment of tamarind crude-extract and half dose of the oxalic acid recommended had lower values, all cases were above 60%, showing a detrimental effect on the tick population. Observations were made of treated ticks using a stereoscope 1-3 hours after the treatment and major injuries were detected. These results support the hypothesis that OA and the crude-extract of tamarind fruits could potentially help to control *R. microplus*, especially as part of an integral control program against ticks.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, *Tamarindus indicus*, oxalic acid, tick control.



INTRODUCCIÓN

La garrapata común del ganado, *Rhipicephalus microplus* (*Boophilus microplus*) (Acari: Ixodidae), ha sido reportada en la mayoría de las áreas ganaderas del país, por lo cual, su impacto sobre la producción bovina no deja de ser importante en los diferentes indicadores económicos y sanitarios de las explotaciones pecuarias (MAG 1980; Alvarez et al. 2003).

Desde los inicios del siglo XX y particularmente a partir de los años 50, se tiene reportes, en Costa Rica, del control de esta garrapata por medios químicos, para lo cual se ha utilizado todos los productos comerciales disponibles con la consecuente e inevitable aparición de resistencia a los principios químicos de los mismos (Alvarez & Herrero 1996; Alvarez et al. 1999; Álvarez & Hernández 2010).

Junto con el desarrollo de resistencia a los diferentes principios activos, lo cual vuelve por sí ineficiente cada una de esas moléculas, se ha puesto en evidencia el tema de los residuos, producto, principalmente, del uso indebido a que han sido sometidos los diferentes acaricidas y endectocidas. Esto pone, sin lugar a dudas, en riesgo, no solo la capacidad exportadora de un país, sino que, lo más importante, eleva el riesgo de afectar la salud pública de la población.

Ante esta disyuntiva, poco halagadora, surge la imperiosa necesidad de trabajar en la dirección de cambiar el paradigma del control químico, hasta ahora erigido como único y buscar otras opciones que, sin estigmatizar el uso de los químicos, permitan, de una forma holística, abordar la problemática del control de garrapatas. Se refiere, obviamente, a las posibilidades que puedan ser incorporadas dentro de un control integrado de plagas (CIP).

Una de estas sustancias, con potencial en el control de *R. microplus*, es el fruto del tamarindo (*Tamarindus indicus*), el cual, según Chungsamarnyart & Jansawan (2001), presenta actividad acaricida aguda a través de la acción, principalmente, del ácido oxálico. También, consideran de importancia el ácido tartárico, que junto al málico, succínico y cítrico están presentes en el *T. indicus*, los cuales podrían tener un efecto sinérgico.

Con el objetivo de conocer, en una primera etapa, *in vitro*, el potencial de la pulpa de tamarindo en el control de garrapatas *R. microplus*, se desarrolló este estudio. Para contar con indicadores cuantitativos, se utilizaron los parámetros biológicos de porcentaje de control y porcentaje de inhibición de la oviposición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Garrapatas. Se utilizó una cepa de *R. microplus*, susceptible a los diferentes principios activos presentes en el mercado nacional, proporcionada por el CENAPA, de México.

Tamarindo. Se utilizó tamarindo comercial, el cual contiene los frutos del tamarindo y miel de tapa.

Ácido oxálico (AO). Se usó el producto comercial formulado Oxa Var®: hecho a base de ácido oxálico al 97%, el cual es recomendado para el control de la varroasis a una concentración de 50g en 5 litros de agua.

Semovientes. Se usó, para las infestaciones artificiales con *R. microplus*, terneros menores de un año *Bos taurus* x *B. taurus*, con el fin de obtener suficientes teleoginas para las pruebas in vitro.

Metodología. Se realizaron dos pruebas in vitro con teleoginas de *R. microplus*, de la cepa susceptible, obtenidas de infestaciones artificiales realizadas en terneros *Bos taurus*. La primera prueba se realizó el 31/10/14; la segunda, el 12/11/14. Para el primer ensayo se probó el tamarindo disuelto en agua, en la relación 1:2, en la dosis de 196.8g de pulpa en 393.6 ml de agua, en tanto que el ácido oxálico se utilizó en una concentración de 100g en 5 litros de agua. El extracto crudo de tamarindo se puso a fermentar por espacio de 5 días, en refrigeración a 4°C y luego dos días, a temperatura ambiente. Posteriormente, al momento de realizar la prueba, se efectuó una filtración por medio de un doble colador.

Una vez que las teleoginas empezaron a caer naturalmente, se llevó a cabo la recolecta; se lavaron, se secaron y se pesaron las seleccionadas para el ensayo, para lo cual, se hizo una detallada escogencia a fin de evitar garrapatas dañadas, deformes o con grandes diferencias de peso.

Para este primer ensayo se escogió 330 garrapatas adultas repletas, las cuales, se subdividieron en grupos de 10, colocadas en placas de Petri. Se pesaron, con el cuidado de que las diferencias entre repeticiones no sobrepasaran los ± 20 mg. Se distribuyeron en dos grupos, un control y un tratado. Para el caso del tamarindo, se colocó, en el grupo control 10 placas de Petri (100 garrapatas); en el tratamiento, 13 placas (130 garrapatas). En cuanto a la prueba del AO, se empleó 100 garrapatas (50 control y 50 tratadas).

Las pruebas del tamarindo, y del AO, consistieron en sumergir las garrapatas, durante un minuto, en la solución respectiva. Los controles se sumergieron en agua. Luego, se colocaron en condiciones controladas de temperatura ($27.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad (90%).

Para el segundo ensayo, se utilizó dos diluciones del tamarindo en agua; a saber, 1:3 a una dosis de 210.1g de pulpa en 630.3ml de agua y 1:4 con una dosis de 206.5g de pulpa en 826ml de agua. Además, se hizo una prueba aplicando, directamente a la garrapata, tanto dorsal como ventralmente e incluyendo las patas, con un pincel n°4, el sedimento (pasta) del tamarindo de cada una de las concentraciones. En cuanto al AO, se usó, igualmente, dos concentraciones: la recomendada por el fabricante (50g en 5 L de agua) y, a la mitad de la recomendación (50%). En las pruebas con el tamarindo, se usó 600 teleoginas (300 en cada una de las concentraciones, divididas en 150 en el grupo control y 150 en el grupo tratado). Para la pasta, se empleó 90 teleoginas (30 en los controles y 60 en los tratamientos). En relación con el número de teleoginas usadas con el AO, se debe indicar que fue de 600 garrapatas, 300 en cada una de las concentraciones, con 150 en el control y 150 en el grupo tratado. Luego de 15 días, se separó los huevos, se pesaron y anotaron en una plantilla elaborada para tal propósito, a fin de obtener el porcentaje de inhibición de la oviposición (%IO), por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ I.O} = (\text{PQLt/PQLT} - \text{PHLt/PHLT}) \times 100$$

Donde:

PQLt = Peso de hembras de lote tratado.

PQLT = Peso de hembras de lote testigo.

PHLt = Peso de huevos de lote tratado.

PHLT = Peso de huevos de lote testigo.

Luego, fueron colocados en viales, en las condiciones descritas; tapados con algodón. Cuando las larvas emergieron se eliminaron por medio de calor, a 45°C por espacio de 3 días; se realizó el conteo de cascarones y huevos para establecer el porcentaje de eclosión (%E), y luego, obtener la reproducción estimada (RE); con ella el porcentaje de control (%C). El %E se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{C}{H + C} \times 100$$

Donde: C = cascarones

H = Huevos

Para determinar el porcentaje de control es necesario, primero, calcular la reproducción estimada mediante la fórmula:

$$RE = \frac{\text{Peso promedio de los huevos del grupo}}{\text{Peso promedio de las hembras del grupo}} \times \%E \times 20.000$$

Una vez calculado el RE de cada lote, tratados y testigo, se procedió a calcular el porcentaje de control (%C) por medio de la fórmula:

$$\%C = \frac{REC - RETr}{REC} \times 100$$

Donde:

REC: reproducción estimada del grupo control.

RETr: reproducción estimada del grupo tratado.

En el segundo ensayo las garrapatas fueron observadas al estereoscopio, en un lapso de 1-3 horas después de realizados los tratamientos.

Se midió, por medio de HPLC de masas, las concentraciones de ácido oxálico en el tamarindo 1:2 y la pureza del AO comercial empleando un equipo marca Shimatzu con desgasificador modelo DGU-20A5, bomba modelo LC-20AT, detector DAD modelo SPD-M20A y horno modelo CTA-20.

La prueba estadística utilizada fue la Z-test, para comparar dos proporciones (epi.tools.ausvet.com.au).

RESULTADOS

La observación al estereoscopio reveló las siguientes lesiones en las garrapatas tratadas con tamarindo y ácido oxálico (Fotos 1-3).

- Presencia de manchas negras (tipo inflamación hemorrágica) con delimitaciones claramente definidas pero de forma y tamaño irregular.
- Manchas blancas, como si fueran ampollas, principalmente, de forma circular, aunque se observa algunas (menos) de forma alargada.
- Algunas presentan manchas rojizas de sangre fresca.
- Se logró observar hemorragias externas.

Las lesiones causadas, por la acción del extracto crudo de tamarindo y el ácido oxálico, se observan tanto en la parte dorsal como ventral. Asimismo, alrededor de las patas y cerca de los orificios genital y anal (Figuras 1-3). En la figura 4, se observa garrapatas control poniendo huevos.

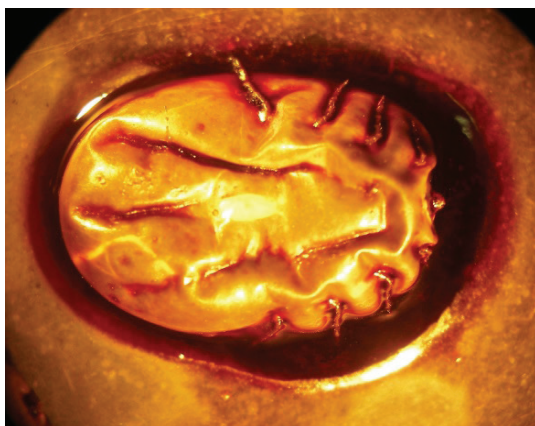


Figura 1. Teleogina de *R. microplus* tratada con tamarindo presentando hemorragia.

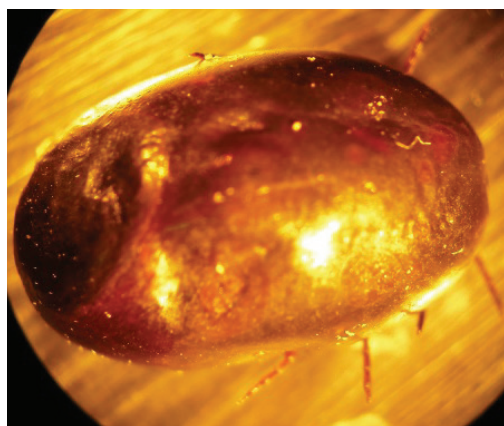


Figura 2. Teleogina de *R. microplus* tratada con AO muestra lesiones a nivel de cutícula.



Figura 3. Teleoginas de *R. microplus* tratadas con AO muestran lesiones a nivel de cutícula.



Figura 4. Teleoginas control de *R. microplus* (sin tratamiento).

Los indicadores medidos fueron el porcentaje de inhibición de la oviposición y el porcentaje de control, según se observa en los cuadros 1 y 2. El producto, que presentó los mejores resultados, fue el AO en la concentración de 100g/5L. Sin embargo, la pasta de tamarindo, en las concentraciones de 1:3 y 1:4 no tuvo diferencias significativas con el AO en ninguno de los dos parámetros medidos. Asimismo, el AO, en la dosis recomendada de 50g/5L, no mostró diferencias significativas con los anteriores en el porcentaje de control.

El análisis de HPLC permitió corroborar la concentración del 97% de AO (97g/100g) en la formulación comercial. En la preparación de pulpa de tamarindo 1:2 se logró establecer una

Cuadro 1. Porcentaje de Inhibición de la Oviposición. Comparación de tamarindo, ácido oxálico y pasta ($p < 0.05$).

Principio	Concentración	% IO	Diferencia*
Acido oxálico	100g/5L	100	a
Pasta	1:3	98,44	ab
Pasta	1:4	93,37	ab
Tamarindo	1:2	91,46	b
Acido oxálico	50g/5L	87,92	b
Tamarindo	1:3	69,84	c
Tamarindo	1:4	67,44	c
Acido oxálico	25g/5L	66,09	c

*Letras iguales no tienen diferencias estadísticas

Cuadro 2. Porcentaje de control (%C). Comparación de tamarindo, ácido oxálico y pasta ($p < 0.05$).

Principio	Concentración	% C	Diferencia*
Acido oxálico	100g/5L	100	a
Pasta	1:3	100	a
Pasta	1:4	99,23	a
Acido oxálico	50g/5L	94,09	a
Tamarindo	1:4	83,03	b
Tamarindo	1:3	82,78	b
Acido oxálico	25g/5L	82,62	b
Tamarindo	1:2	62,39	c

*Letras iguales no tienen diferencias estadísticas

concentración de ácido oxálico de 0.26 mg/ml. No se pudo cuantificar la concentración de AO en las otras muestras de tamarindo (1:3 y 1:4).

DISCUSIÓN

Son escasas las investigaciones previas sobre la acción acaricida de extractos crudos de la fruta del tamarindo y del ácido oxálico sobre garrapatas *R. microplus*. Únicamente Chungsamarnyart & Jansawan (2001) reportan un efecto importante sobre la mortalidad de garrapatas tratadas con extractos crudos de la fruta del tamarindo y con el AO.

Por otra parte el uso del AO, en el control de la varroasis producida por el ácaro *Varroa destructor*, está bien documentado, mostrando una elevada eficacia por diversas formas de aplicación, en el control de este importante parásito de las abejas (Marcandeli et al. 2003; Nanetti, 2007).

Al igual que Chungsamarnyart & Jansawan (2001), en este ensayo, se observó, pasados unos minutos, diversas lesiones en las garrapatas tratadas (fotos 1-3), algunas concordantes con las descritas por esos autores, por ejemplo, las lesiones hemorrágicas. Se supone, al igual que los autores citados, que ese tipo de lesiones pueden deberse a la acción de los diferentes ácidos presentes en el tamarindo y, por supuesto, al ácido oxálico; sin embargo, no fue posible determinarlo en este trabajo.

Los resultados obtenidos, tanto en el Porcentaje de Inhibición de la Oviposición (Cuadro 1), como en el Porcentaje de Control (Cuadro 2), muestran que el AO y la pasta de tamarindo tienen los mejores resultados; sin embargo, las diferentes concentraciones del fermento de extracto crudo de tamarindo, así como las concentraciones más débiles del AO surtieron efectos que no deben ser subestimados, máxime si la idea, hacia la que se orientan, es en el sentido de ser parte de un programa de control integrado de la garrapata, en el cual, aportes de esa cuantía suman y, en el conjunto, se integran otras medidas que puedan afectar las poblaciones de *R. microplus* en su fase no parasítica; o sea, en los potreros.

La concentración del AO formulado que se utilizó (97%) y la concentración del mismo de 0.26mg/ml que se detectó en la preparación de tamarindo 1:2 que se analizó mediante HPLC, sugiere que esta sustancia posee un importante efecto sobre las garrapatas y, en el caso del tamarindo, no se debe menospreciar el posible efecto sinérgico de otros ácidos presentes en la fruta (Chungsamarnyart & Jansawan 2001).

Está claro que es necesario, con estos resultados, realizar otras pruebas *in vivo* a fin de corroborar si el efecto observado se mantiene y, para ello, es imprescindible analizar las posibilidades reales de aplicación en condiciones de campo. Se desconoce el efecto del AO directamente sobre la epidermis de un bovino y si se acompaña de reacciones adversas. De igual forma, si luego de un intenso filtrado es factible obtener, de un fermento de tamarindo, un producto capaz de ser aplicado por medio de un equipo de fumigación. Este ensayo no pretende ser definitorio, sino que busca posibles opciones para ser incluidas dentro de un CIP; para ello, es necesario investigar mucho más, tener la mente abierta y no encasillarse en los moldes aprendidos y estereotipados del control químico.

Se debe tener presente que, opciones al uso de los productos químicos, para controlar *R. microplus*, permiten que la vida útil de estos se prolongue, e incluso, en el caso de las amidinas, se pueda esperar una reversión de esa resistencia, algo que ha sido descrito, lo cual garantiza una herramienta más en el abanico de opciones con que se cuenta para combatir la garrapata común del ganado (Cantú 2015).

AGRADECIMIENTOS

A Vladimir Hernández, por su apoyo laboratorial y sus apreciaciones. A Edwin Cruz, por su apoyo en el manejo interno del trabajo. A Roberto Bonilla, por el análisis estadístico y sus observaciones. A Víctor Álvarez V., por su apoyo en la determinación de la concentración del AO. A Luis Zamora, por la consecución del AO para las pruebas. A Jorge Osorio y Armando Nari, por sus opiniones críticas. A Tatiana Hernández, por su apoyo.

REFERENCIAS

- Alvarez, V. & Herrero, M. 1996. Bibliografía sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) y enfermedades transmitidas por esta en Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*. 19 (1-2): 1-10.
- Álvarez, V., Bonilla, R. & Chacón, I. 1999. Determinación de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) a organofosforados y piretroides en Costa Rica. *Rev. Cien. Vet.* 22:41-60.
- Alvarez, V., Bonilla, R. & Chacón, I. 2003. Frecuencia relativa de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en bovinos *Bos taurus* y *B. indicus* en ocho Zonas Ecológicas de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 51(2): 427-434.
- Álvarez, V. & Hernández, V. 2010. Diagnóstico de Resistencia a Organofosforados, Piretroides Sintéticos, Amidinas e Ivermectinas en la Garrapata *Rhipicephalus microplus* en fincas de leche de Costa Rica. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias* 9(2): 47-56.
- Cantú, A. & García, Z. 2013. Estrategias para el control integrado de la garrapata (*Boophilus* spp.) en la producción de bovinos de carne en pastoreo. Folleto técnico N° MX-0310402-43-03-14-09-36, ISBN 978-607-37-0180-8. INIFAP-CIRNE/P 158s. pp.1-38.
- Chungsamarnnyart N. & Jansawan W. 2001. Effect of *Tamarindus indicus* L. against the *Boophilus microplus*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 35: 34-39.
- Marcangeli, J., García, M., Cano, G., Distéfano, L., Martin, M., Quiroga, A., Raschia, F. & Vega, C. Eficacia del Oxavar® para el Control del Ácaro *Varroa destructor* (Varroidae) en Colmenas de *Apis mellifera* (Apidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* V.62 n.3-4. Mendoza ago./dic.2003. Versión on line ISSN 1851-7471.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 1980. Informe Final Proyecto Estudio de Factibilidad para el Control de la Garrapata. San José. Costa Rica. 118 pp.
- Nanetti, A. 2007. Uso de ácido oxálico y otros productos de origen natural para el control de varroa, pros y contras. *Agro Sur* 35(1): 48-50.