

2016

Evaluación in vitro e in vivo de la eficacia insecticida y/o repelente de extractos de sauco *Sambucus nigra* sobre moscas del género *Haematobia irritans* en bovinos en una finca de lechería especializada

Jazmín Andrea Martínez Rosas
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria



Part of the [Veterinary Medicine Commons](#)

Citación recomendada

Martínez Rosas, J. A. (2016). Evaluación in vitro e in vivo de la eficacia insecticida y/o repelente de extractos de sauco *Sambucus nigra* sobre moscas del género *Haematobia irritans* en bovinos en una finca de lechería especializada. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/171

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medicina Veterinaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Programa de Medicina Veterinaria

Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la eficacia insecticida y/o repelente de extractos de Sauco (*Sambucus nigra*) sobre moscas del género *Haematobia irritans* en bovinos en una finca de lechería especializada

Jazmín Andrea Martínez Rosas

Código 14091029

BOGOTÁ, D.C

2016

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria

Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la eficacia insecticida y/o repelente de extractos de Sauco (*Sambucus nigra*) sobre moscas del género *Haematobia irritans* en bovinos en una finca de lechería especializada

Jazmín Andrea Martínez Rosas

Código 14091029

DIRECTOR

José Luis Rodríguez Bautista MV. MSc.

Investigador CORPOICA

BOGOTÁ, D.C

2016

{ }

APROBACIÓN

DIRECTOR: JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ BAUTISTA _____

JURADO: GERMÁN ALONSO PRADA SANMIGUEL _____

JURADO: NORBERTO ANDREY CHÁVEZ ENCISO _____

DIRECTIVOS

RECTOR

Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo

VICERRECTOR ACADÉMICO

Hno. Carlos Enrique Carvajal

VICERRECTOR DE PROMOCIÓN Y

Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero

DESARROLLO HUMANO

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

Dr. Eduardo Ángel Reyes

VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y

Dr. Luis Fernando Ramírez

TRANSFERENCIA

DECANO DE LA FACULTAD DE

Dra. Claudia Aixa Mutis Barreto

CIENCIAS AGROPECUARIAS

SECRETARIO ACADÉMICO FACULTAD

Dr. Alejandro Tobón González

DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DIRECTOR PROGRAMA MEDICINA

Dr. Fernando Nassar Montoya

VETERINARIA

ASISTENTE ACADÉMICA PROGRAMA

Dra. Clara Stefany Romero

MEDICINA VETERINARIA



AGRADECIMIENTOS

Cuando hay sueños que queremos lograr en nuestra vida por más obstáculos y dificultades que se nos presenten, la voluntad y el deseo por cumplirlos son más grandes que la resignación; es por eso que después de un arduo trabajo, quiero agradecer a Dios por darme las fuerzas necesarias para poder culminar mi trabajo, a mi familia por estar siempre a mi lado y apoyarme, especialmente a mi mamá quien siempre tuvo una palabra de ánimo para darme, por mostrarme el camino cuando me sentí perdida; a mi director José Luis Rodríguez, quien tuvo la suficiente paciencia para guiarme, enseñarme y corregirme cuando fue necesario; a Corpoica Tibaitatá por brindarme los espacios y elementos necesarios para el desarrollo de mi investigación, a las personas de estadística Yajaira y Ronnal quienes me asesoraron y guiaron en el proceso, a las personas que no nombró individualmente pero me brindaron palabras de ánimo y su apoyo, operarios, asistentes de investigación, investigadores. Por último, a esas personas que no hicieron parte de este proceso, pero me brindaron su apoyo incondicional, amigos, compañeros, a todos muchísimas gracias.

Tabla de contenido

1. RESUMEN	12
2. ABSTRACT.....	14
3. INTRODUCCIÓN	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
5. OBJETIVOS	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
6. HIPÓTESIS	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
Localización	21
Material vegetal.....	21
Moscas	21
Animales	22
Extractos vegetales puros.....	23
Extractos glicerinados (EG)	24
Extractos hidroglicolicos (EHG).....	24
Evaluación in vitro del efecto insecticida de extractos vegetales de Sauco (<i>Sambucus nigra</i>) sobre moscas <i>H. irritans</i>	25

Preparación de formulaciones para montaje de pruebas de mortalidad	25
Pruebas de mortalidad.....	26
Evaluación <i>in vitro</i> del efecto repelente de extractos vegetales de Sauco sobre moscas <i>H. irritans</i>	27
Pruebas de repelencia.....	27
Evaluación in vivo del efecto repelente del EHG en hojas de Sauco (<i>Sambucus nigra</i>).....	29
Preparación de formulaciones y aplicación de extractos vegetales en animales	30
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
9. MARCO TEÓRICO	33
Limitantes de salud en los sistemas ganaderos	33
Importancia de las infestaciones por dípteros hematófagos en los sistemas ganaderos.....	33
Importancia Económica	34
<i>Haematobia irritans</i>	35
Taxonomía.....	35
Morfología.....	35
Ciclo de Vida.....	36
Patogénesis	37
Métodos de control.....	37

Control químico.....	38
Control no químico	39
Control Integrado Parasitario - CIP.....	40
SAUCO (<i>Sambucus nigra</i>)	44
Origen	44
Principios activos del sauco	45
Aplicaciones tradicionales	45
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
Resultados de ensayos de repelencia <i>in vitro</i> de Extractos puros de glicerina y propilenglicol.....	49
Resultados de ensayos <i>in vitro</i> de diluciones del extracto de hojas y flores con propilenglicol.....	54
Resultados de ensayos <i>in vivo</i> de las diluciones del extracto de hojas y flores con propilenglicol.....	56
11. IMPACTO E INDICADORES	61
12. CONCLUSIONES	62
13. RECOMENDACIONES	63
14. REFERENCIAS	64
15. ANEXOS	67

Tabla de figuras

Figura 1 Árboles de sauco del Centro de Investigación de Tibaitatá usados en los ensayos de mortalidad y de repelencia.....	21
Figura 2 Captura de moscas en el hato naturalmente infestado	22
Figura 3 Grupo de Novillas seleccionadas para los ensayos de campo	22
Figura 4 Material vegetal recolectado para secar y posterior elaboración de extractos vegetales	23
Figura 5 Preparación de EG para ensayos <i>in vitro</i>	24
Figura 6 Extractos hidroglicólicos y de glicerina	24
Figura 7 Preparación de papeletas para ensayos de mortalidad.....	25
Figura 8 Montaje de papeleta para prueba de mortalidad	26
Figura 9 Exposición de moscas <i>H. irritans</i> en cajas de Petri para ensayos <i>in vitro</i> de mortalidad	26
Figura 10 Aparato elaborado para ensayos de repelencia	28
Figura 11 Aplicación de los extractos para montaje de los ensayos de repelencia	28
Figura 12 Delimitación del área de tratamiento del extracto en los animales usados en el ensayo de repelencia <i>in vivo</i>	31
Figura 13 <i>Haematobia Irritans</i> (Fitzpatrick, 2014).....	35
Figura 14 Ciclo de vida de <i>H. irritans</i> . Figura modificada (Navarro, 2009)	37
Figura 15 Flores y follaje de Sauco (<i>Sambucus Nigra</i>).....	44
Figura 16 Porcentaje promedio de repelencia de las moscas <i>H. irritans</i> en ensayos <i>in vitro</i> con EG tras cuatro horas de observación	50
Figura 17 Porcentaje promedio de repelencia contra <i>H. irritans</i> en ensayos <i>in vitro</i> con extracto hidroglicólico (EHG) de hojas y flores de <i>S. nigra</i> tras 4 horas de observación	50

Figura 18 *Porcentaje promedio de los ensayos de los Extractos puros de propilenglicol (PPG) y glicerina (G) tras cuatro horas de observación.....53*

Figura 19 *Porcentaje promedio de repelencia in vitro del EHG en las distintas diluciones durante las 4 horas de observación56*

Figura 20 *Repelencia promedio de los ensayos in vivo de las diluciones del EHG durante las 5 horas de observación59*

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Identificación de animales grupo experimental 1</i> _____	29
Tabla 2 <i>Identificación de animales grupo experimental 2</i> _____	30
Tabla 3 <i>Valores de pérdidas de ganancias anuales en leche por el efecto de dípteros en sistemas ganaderos.</i> _____	34
Tabla 4 <i>Modelo de efectos fijos para los datos de los ensayos in vitro de los extractos puros de EG y EHG de hojas y flores</i> _____	51
Tabla 5 <i>Mínimos cuadrados medios, interacción entre solvente, material y tiempo estableciendo la media y su error estandar</i> _____	52
Tabla 6 <i>Modelo de efectos fijos para los datos obtenidos en los ensayos de diluciones de los extractos EHG de hojas y flores</i> _____	54
Tabla 7 <i>Mínimos cuadrados medios interacción de las diluciones y los diferentes tiempos</i> ____	55
Tabla 8 <i>Modelo de efectos fijos para los datos obtenidos en los ensayos in vivo de las diluciones del extracto EHG de hojas y flores</i> _____	58
Tabla 9 <i>Mínimos cuadrados medios los dos factores como individuales y la interacción de los dos tiempo-tratamiento</i> _____	58

RESUMEN

El control tradicional de las infestaciones por *H. irritans* en la ganadería bovina es una limitante mayor que genera efectos adversos desde el punto de vista económico, ambiental, en la salud animal y la salud pública. En este sentido es necesario diseñar diferentes estrategias que disminuyan los efectos negativos generados por los insecticidas y así conseguir un control más sostenible de esta especie de en los bovinos. El objetivo de este trabajo de investigación, fue obtener diferentes tipos de extractos de Sauco (*Sambucus nigra*) y evaluar su efecto repelente *in vitro* e *in vivo* sobre una población de moscas de los cuernos (*Haematobia irritans*). Los bioensayos se desarrollaron en el Centro de Investigación TIBAITATÁ de CORPOICA, en el municipio de Mosquera. Se evaluaron extractos glicerinados e hidroglicólicos (dilución en propilenglicol - PG) de hojas y flores de Sauco. Cuatro diluciones preparadas a partir de un extracto puro tanto de flores como hojas fueron usados en ensayos de repelencia *in vitro* (10, 30, 60 y 90% y extracto puro) y tres diluciones fueron usados en ensayos de repelencia en ensayos *in vivo* (10, 50 y 90%). Los ensayos de repelencia *in vitro* se hicieron en un instrumento similar al diseñado por (Klauck et al., 2015) con cuatro observaciones en un periodo de 4 horas. Se realizaron ensayos por triplicado. Se demostró que los extractos de hojas y flores elaborados con propilenglicol tuvieron mejor efecto que los elaborados con glicerina. El porcentaje de repelencia obtenido en cualquiera de los tiempos de observación al usar glicerina como solvente no fue superior al 80%, mientras que si se lograron porcentajes de repelencia de hasta el 100% al usar propilenglicol. Dado que no hubo diferencias significativas entre el efecto de repelencia generado por el extracto de hojas y flores, ni entre las diluciones, los ensayos *in vivo* fueron realizados con hojas y flores mezcladas en las mismas proporciones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tiempos y concentraciones de los extractos en

los ensayos in vivo, pero sí mostrando un mejor efecto de los extractos con mayor concentración. Aunque, el uso de preparados vegetales de Sauco puede constituirse en una herramienta promisorio para el manejo de las infestaciones por *H. irritans* en bovinos, es necesario indagar en la evaluación de este efecto de compuestos en un grado de mayor purificación y poderlo incorporar en esquemas de control integrado de moscas.

Palabras clave: Control no químico, Control integrado de moscas, extractos vegetales, moscas hematófagas

ABSTRACT

The traditional control of horn flies is considered a major constrain in livestock production by generating adverse economic, environmental effects and negative impact on animal and public health. Due to this it is necessary to design alternate strategies in order to reduce the negative impact caused by insecticides. The main aim of this study was to assess the repellent effect of different type of plant extracts of *Sambucus nigra* on a horn fly (*H. irritant*) population. The *in vivo* and *in vitro* assays were performed in the Research Centre Tibaitatá of Corpoica, in the municipality of Mosquera. Glycerine and propylenglycol (PG) based extracts of flowers and leaves of *S. nigrans* were prepared in different dilutions or concentrations. Four different dilutions of an extract stock were assessed for *in vitro* repellent evaluations (10, 30, 60, 90%, and a stock) and on the other hand three dilutions (10, 50 y 90%) of the stock were used for the *in vivo* assays. The *in vitro* assays were developed in a repellent apparatus similar to the one used by Klauck et al. (2015), by recording four observations during a four-hour period. Assays by triplicate were done. It was shown that flowers and leaves extracts with PG produced better repellent effect than those made with glycerine. The repellent percentage obtained with glycerine was always lower than 80%, while the effect obtained with PG extracts were sometimes as high as 100%. Since there was no difference on the repellent effect between the flowers and leaves extracts, an equally proportionate extract made with flowers and leaves were used for the *in vivo* assays. There was no statistic significant difference between the time of exposures and the concentrations of the plant extracts in the *in vivo* assays. However, it was clearly shown that there was a higher repellent effect with extracts of high concentration. Besides the application of *S. nigrans* extract can be considered promissory for the control of *H. irritans* in cattle, it is

necessary to evaluate more purified extracts of this plant in order to consider to incorporate it as a sustainable tool for the control of this plague in livestock.

Key words: Non chemical control, Integrated control of flies, plant extracts, haematophagous flies.

INTRODUCCIÓN

Las moscas hematófagas son uno de los principales ectoparásitos que causan pérdidas económicas en la ganadería en todo el mundo, la presencia de ellas se constituye en una limitante mayor de la salud y la producción ganadera debido a que causan reducción en la ganancia de peso de los animales, baja en la producción de leche y baja en la eficiencia de la conversión alimenticia(Oyarzun, Quiroz, & Birkett, 2008).

Una de las principales especies de moscas hematófagas con amplia distribución en las ganaderías del mundo es *Haematobia irritans*, conocida también como mosca de los cuernos o mosca de la paleta. Se ha registrado que infestaciones severas de esta especie puede causar pérdidas cercanas a 1 billón de dólares en Estados Unidos. Estudios similares realizados en el Brasil, Argentina y Chile han determinado pérdidas anuales cercanas al millón de dólares (Oyarzun et al., 2008).

La principal estrategia tradicional del control de las poblaciones de *H. irritans* en la ganadería ha estado centrada al uso indiscriminado y poco técnico de insecticidas, los cuales conducen a efectos secundarios directos e indirectos en el desempeño y competitividad de los sistemas ganaderos. Así, el uso irracional de insecticidas pueden conducir a la presencia de residuos en leche y carne, así como contaminación ambiental, a la rápida aparición de resistencia a estos compuestos en las poblaciones de moscas, lo cual hace que este tipo de abordaje actualmente no sea eficaz como estrategia sostenible de control de esta especie de plaga (FAO, 2003), (Oyarzún et al., 2008).

Teniendo en cuenta las demandas de los consumidores actuales y las necesidades de competitividad de los sistemas ganaderos en la actualidad, exigen que se diseñen esquemas y estrategias de control alternas que disminuyan el impacto negativo en el medio ambiente, que no

generen residuos nocivos en los alimentos y que no afecten la salud animal ni la salud pública(Cruz, Rodríguez, & Ortiz, 2011), (Graeper, 2013).

Es así como el hecho de que en algunas plantas se han identificado principios activos que poseen efecto insecticida o repelente para algunos ectoparásitos que afectan los cultivos y la ganadería en todo el mundo, el uso de extractos vegetales aunque no es una estrategia innovadora, saber escoger la planta adecuada, el método de preparación del extracto y la forma de aplicación en los animales nos permite considerar como una estrategia que cumple con la disminución de estos efectos negativos (J. J. Zhu et al., 2012), (Santos, Varón, & Salamanca, 2009).

El presente trabajo busca evaluar el efecto *in vitro* de un extracto de hojas y de flores de sauco (*Sambucus nigra*) en moscas de la especie *Haematobia irritans*, y de forma comparativa determinar el efecto *in vivo* del mismo sobre los niveles de infestación por esta mosca en bovinos de leche ubicados en una finca de lechería especializada.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso indiscriminado de insecticidas para el control de moscas hematófagas que afectan a los bovinos ha generado efectos negativos en aspectos económicos expresado como las pérdidas por disminución en la producción, costos para el control de las moscas y tratamiento de enfermedades que puedan causar daños, ambientales por contaminación de praderas y fuentes hídricas; biológicos por inducir resistencia a compuestos, en las poblaciones de moscas, así como el agotamiento de principios activos eficaces para su control y en salud pública por generar presencia de residuos químicos en leche, carne y debido también al riesgo que corren las personas que manipulan estos insecticidas. En la práctica pecuaria, se hace necesario diseñar diferentes estrategias que disminuyan los efectos negativos generados por los insecticidas y así conseguir un control más sostenible de las moscas que afectan a los bovinos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Obtener extractos de Sauco (*Sambucus nigra*) y evaluar el efecto *in vitro* e *in vivo* sobre la población de moscas de los cuernos (*Haematobia irritans*) en bovinos adultos en una finca de lechería especializada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar de forma comparativa el efecto *in vitro* de cuatro tipos de extractos vegetales de *Sambucus nigra* elaborados a partir de hojas o flores con dos diferentes solventes (glicerina y propilenglicol) sobre la supervivencia de poblaciones de mosca *H. Irritans* en grupos de animales naturalmente infestados.

Identificar el efecto de la formulación de un extracto con mayor capacidad insecticida y/o repelente en bovinos adultos infestados naturalmente con *H. irritans* mantenidos en una finca de lechería especializada.

HIPÓTESIS

Un extracto vegetal obtenido a partir de material seco de follaje u hojas de árbol de Sauco (*Sambucus nigra*) es capaz de causar efecto insecticida y/o repelente en moscas de la especie *Haematobia irritans* en condiciones *in vitro* y en bovinos naturalmente infestados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

Colombia, Cundinamarca, Mosquera, CORPOICA Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Centro de Investigación TIBAITATÁ

Material vegetal

El material vegetal, previa clasificación taxonómica, se obtuvo de árboles del Centro de Investigación Tibaitatá de CORPOICA (Figura 1), a partir del follaje de árboles con más de 4 años de edad, se recolectaron hojas verdes y flores que estén en buen estado, se cosecho el material vegetal en las horas de la mañana. El material fue cosechado en época regular de lluvias.



Figura 1 Árboles de sauco del Centro de Investigación de Tibaitatá usados en los ensayos de mortalidad y de repelencia

Moscas

Árboles de sauco del Centro de Investigación de Tibaitatá usados en los ensayos de mortalidad y de repelencia

Para los ensayos *in vitro* se hizo captura de moscas *H. irritans* de animales infestados naturalmente y que no habían sido bañados en por lo menos dos meses con ninguna solución insecticida. Se usó una red entomológica, la cual por jameo sobre los animales se obtuvo una cantidad adecuada de moscas para los ensayos, (Figura 2) las moscas capturadas se usaron el mismo día en los bioensayos (Cruz et al., 2011)

Las observaciones de los ensayos *in vivo*, se hicieron en animales naturalmente infestados.



Figura 2 Captura de moscas en el hato naturalmente infestado

Animales

Para los ensayos *in vivo* se escogieron 8 hembras bovinas con edad promedio de dos (2) años (Figura 3).



Figura 3 Grupo de Novillas seleccionadas para los ensayos de campo

Extractos vegetales puros

Los extractos realizados para los ensayos se elaboraron de manera casera o artesanal, evitando así procesos de elaboración complejos, o que llegaran a requerir instalaciones o equipos especiales. La formulación base o inicial de los extractos vegetales elaborados fue denominado como “Extracto puro” y fueron la base para las distintas diluciones realizadas a lo largo de los ensayos *in vitro* o *in vivo*.

El material vegetal recolectado se lavó con solución de jabón neutro al 0.01% y agua corriente, se dejó secar el exceso de agua de las hojas y flores sobre una lámina de gasa. Este material fue almacenado en bolsas de papel y puesto a secar durante 8 días en un ambiente seco y a la oscuridad. Pasado este tiempo se elaboraron los distintos tipos de extractos (ver figura 1).



Figura 4 Material vegetal recolectado para secar y posterior elaboración de extractos vegetales

Extractos glicerinados (EG)

Treinta (30) gramos de material vegetal seco fue agregado a un frasco de vidrio (Figura 5) junto con 90 ml de glicerina, se almacenó protegido de la luz y fue conservado a temperatura ambiente durante 8 días. La fase sólida se retiró al cabo de este periodo y la parte líquida se filtró y se usó en los bioensayos.



Figura 5 Preparación de EG para ensayos *in vitro*

Extractos hidroglicolicos (EHG)

Los extractos hidroglicólicos se elaboraron de la misma forma que los EHG, pero en esta oportunidad se usaron 90 ml de propilenglicol (Figura 6).



Figura 6 Extractos hidroglicólicos y de glicerina

Evaluación *in vitro* del efecto insecticida de extractos vegetales de Sauco (*Sambucus nigra*) sobre moscas *H. irritans*.

Las pruebas de mortalidad *in vitro* se realizaron mediante adaptación del método descrito por Sheppard (FAO, 2004) para la evaluación de resistencia a compuestos insecticidas en moscas. Mediante el uso de cuatro (4) diluciones preparadas de acuerdo a la formulación descrita anteriormente para los diferentes extractos y con la inclusión de un control cuya base fue el solvente usado en la formulación de los diferentes extractos (propilenglicol y glicerina). Todos los ensayos fueron realizados con su respectiva réplica. Papeletas Whatman® con un área de 63,6 cm² fueron previamente impregnadas con volúmenes iguales (1 mL) de cada una de las diluciones de cada extracto. Estas papeletas se dejaron secar al aire libre a temperatura ambiente y se conservaron durante toda la noche en una envoltura de papel aluminio (Figura 7).

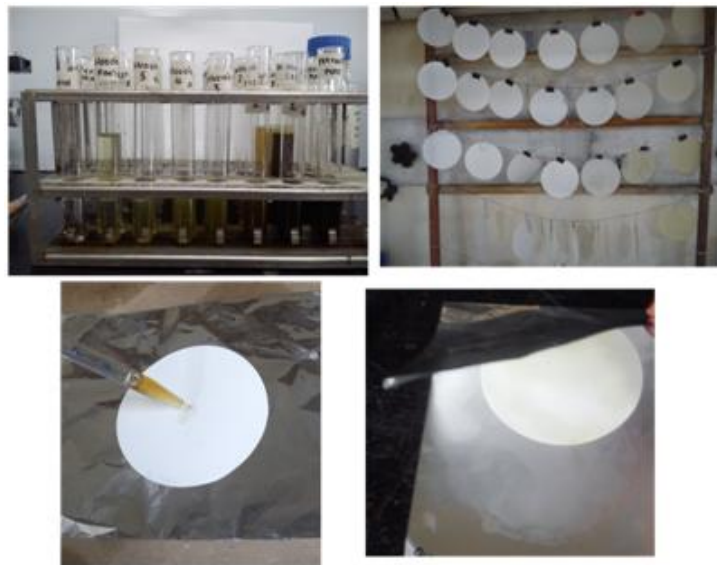


Figura 7 Preparación de papeletas para ensayos de mortalidad

Preparación de formulaciones para montaje de pruebas de mortalidad

De los extractos obtenidos se realizaron cuatro diluciones seriadas en relación 1:1 agua: solvente y el extracto puro también se evaluó, obteniendo así 5 distintos tipos de

soluciones. Como se mencionó anteriormente el solvente usado para los extractos fue usado como control. Las papeletas fueron colocadas de manera individual en cajas de Petri, que presentaban perforaciones diseñadas para la manipulación entomológica de las moscas de los ensayos (Figura 8). De esta manera se contó con un total de 6 formulaciones por cada bioensayo.

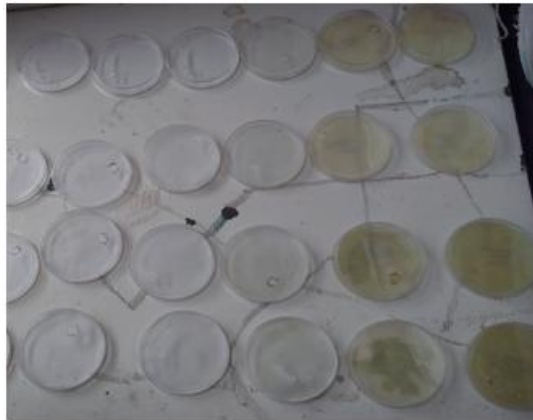


Figura 8 Montaje de papeleta para prueba de mortalidad

Pruebas de mortalidad

De las moscas capturadas, grupos cercanos a 25 individuos se distribuyeron en las distintas cajas de Petri (Figura 9). Se realizaron registros de mortalidad. Se hicieron cinco repeticiones por extracto. Cada 15 minutos por un periodo de dos horas fueron contadas y registradas en un formato diseñado ver anexo 1.

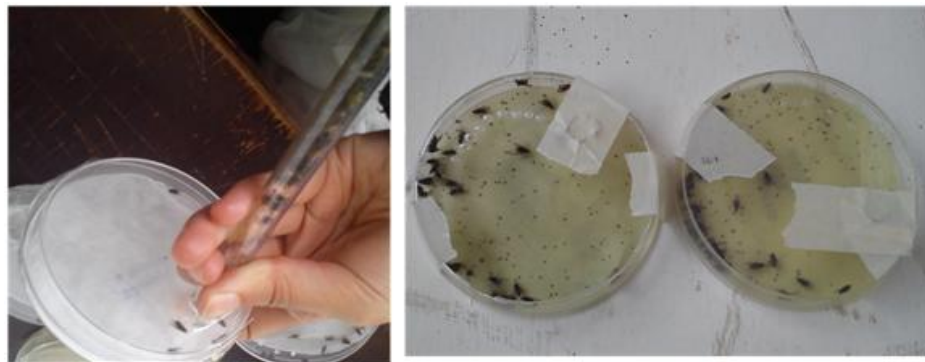


Figura 9 Exposición de moscas *H. irritans* en cajas de Petri para ensayos *in vitro* de mortalidad

Evaluación *in vitro* del efecto repelente de extractos vegetales de Sauco sobre moscas *H. irritans*

Para los ensayos de repelencia se usaron los mismos extractos y las mismas formulaciones de los bioensayos de mortalidad

Pruebas de repelencia

Para la realización de los bioensayos de repelencia *in vitro* se realizó una adaptación del método descrito por (Klauck et al., 2015). Se elaboró un aparato de cuatro compartimentos (A, B, C, y D) comunicados entre sí mediante estructuras tubulares que permitían el libre acceso de las moscas entre los compartimentos (Figura 10). Al inicio de cada ensayo, en dos compartimentos fueron colocadas láminas de gasa de 10 cm X 7 cm impregnadas con cada solución de extracto a evaluar (A y B) y en los dos compartimentos restantes (C y D) las láminas se impregnaron tan solo con el solvente respectivo (agua, glicerina o propilenglicol) como se muestra en la figura 11.

Una vez preparado el aparato de evaluación de repelencia, los resultados del ensayo fueron registrados en un formato que se elaboró (Ver anexo 2), las moscas se ubicaron en el compartimento 1 y se empezaron a distribuir en los distintos compartimentos. Este tiempo fue el momento cero. El número de moscas presente en cada compartimento fue registrado en los tiempos 30, 60, 120, 180 y 240 minutos.

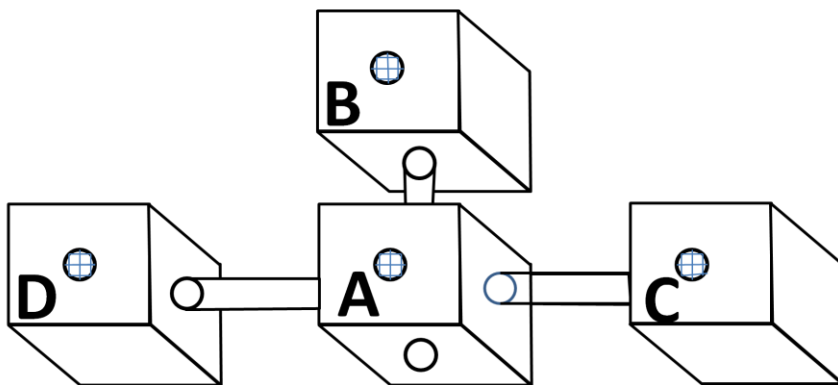


Figura 10 Aparato elaborado para ensayos de repelencia

Previo a los ensayos con los extractos se realizaron pruebas piloto con el aparato de repelencia, con una dilución 1:10 de un repelente comercial. Así mismo se realizaron pruebas con dos de los solventes en los cuatro compartimentos (glicerina y propilenglicol). Posteriormente se realizaron ensayos de cada extracto puro por triplicado.

Con los ensayos anteriores se eligió usar los EHG y realizar diluciones de los mismos al 10, 30, 60 y 90% para los ensayos.

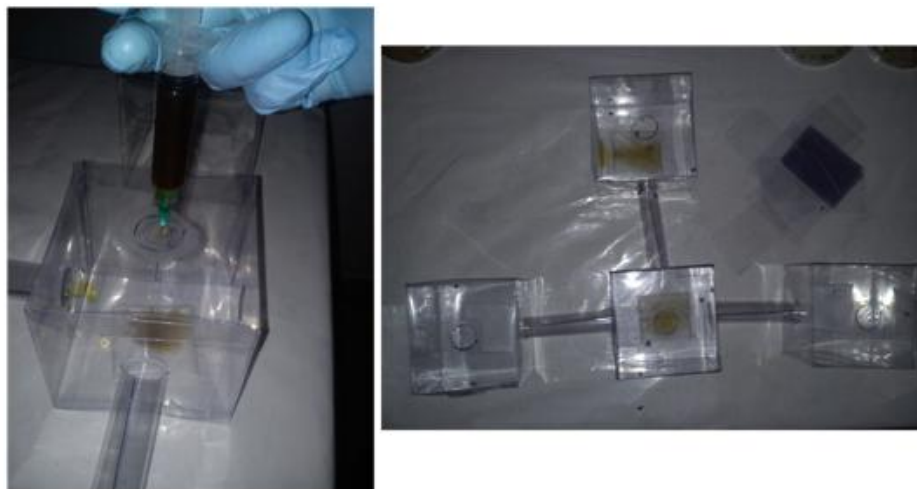


Figura 11 Aplicación de los extractos para montaje de los ensayos de repelencia

Evaluación in vivo del efecto repelente del EHG en hojas de Sauco (*Sambucus nigra*)

Con los resultados obtenidos en los ensayos in vitro, se escogió el tipo de extracto que generó el mayor efecto repelente o insecticida. Para este efecto se usó una combinación de extracto de flores y de hojas en diluciones al 10, 50 y 90% a partir de extractos crudos. El procedimiento de la elaboración del extracto fue similar al realizado en las pruebas *in vitro*, con la diferencia que se preparó en un volumen necesario para realizar las aplicaciones en los animales.

Los 8 animales escogidos, se dividieron en dos grupos, como se puede observar en la tabla 1 y 2 cada animal fue identificado con un lazo de un color diferente alrededor del cuello para facilitar la diferenciación en la distancia y de esa manera reducir el sesgo generado por la aproximación a los animales durante la observación. También se recopiló el número de las chapetas por si algún animal perdía el lazo de identificación. Cada animal recibió un tratamiento distinto, se hicieron 4 repeticiones del ensayo, a la vez se replicó el ensayo, para un total de 8 animales para los ensayos, ninguna de las vacas repitió el tratamiento y tampoco se mezclaron los dos grupos, la distribución entre ensayos fue como se ilustra en las tablas 1 y 2.

Tabla 1

Identificación de animales grupo experimental 1 usados en el ensayo de repelencia in vivo

Identificación del animal experimental	Concentraciones de los extractos			Control
	10%	50%	90%	
Color cinta	Verde	Amarillo	Azul	Menta
Número	1436	1430	1422	1448
Color cinta	Menta	Verde	Amarillo	Azul
Número	1448	1436	1430	1422
Color cinta	Azul	Menta	Verde	Amarillo
Número	1422	1448	1436	1430
Color cinta	Amarillo	Azul	Menta	Verde
Número	1430	1422	1448	1436

Tabla 2*Identificación de animales grupo experimental 2 usados en el ensayo de repelencia in vivo*

Identificación del animal experimental	Concentraciones de los extractos			Control
	10%	50%	90%	
Color cinta	Morado	Gris	Vinotinto	Lima
Número	1454	1426	1446	1442
Color cinta	Lima	Morado	Gris	Vinotinto
Número	1442	1454	1426	1446
Color cinta	Vinotinto	Lima	Morado	Gris
Número	1446	1442	1454	1426
Color cinta	Gris	Vinotinto	Lima	Morado
Número	1426	1446	1442	1454

Preparación de formulaciones y aplicación de extractos vegetales en animales

Previo a cada ensayo se realizó conteo del número de moscas sobre cada animal, luego cada animal se sujetó y se le aplicó un volumen de 400 ml de solución del extracto en un costado y en una zona delimitada del tórax y el cuello del animal (Figura 12). Por el costado opuesto del animal se aplicó un volumen igual del solvente en la misma proporción del extracto diluido. Una vez aplicado el extracto y el solvente en cada animal, estos se soltaron en un potrero para posterior observación y registro de cargas de infestación cada hora. De esta forma se registró el número de moscas posadas sobre el animal en el tiempo durante 5 horas post-tratamiento (Junwei J. Zhu, Brewer, Boxler, Friesen, & Taylor, 2015).



Figura 12 Delimitación del área de tratamiento del extracto en los animales usados en el ensayo de repelencia in vivo

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para los ensayos in vitro de mortalidad se planteó realizar un análisis para determinar concentración letal 50 (CL50%) y concentración letal 99,9% (CL99%), mediante regresión Probit.

Para el caso de las evaluaciones de repelencia, se realizó análisis de varianza, con el fin de comparar las medias entre tratamientos y tiempos, empleando modelos mixtos debido a que no hubo independencia entre las observaciones (esto dado que se mide sobre la misma unidad experimental varias veces y hay un efecto del tiempo). Para mejorar la homogeneidad de varianza, se empleó una corrección sobre la matriz varianza covarianza llamada antedependencia de primer orden.

Al existir diferencias estadísticamente significativas para la interacción tiempo concentración, se hizo una prueba de comparación múltiple de Tukey para determinar grupos homogéneos. Con el uso de análisis de varianza ANOVA con arreglo, mediante análisis de modelos mixtos usando los valores de porcentaje de repelencia expresada en el número de individuos repelidos; se usó el software estadístico SAS 9.3.

En el caso de los ensayos in vivo para evaluar el efecto de las distintas concentraciones se diseñó un cuadrado latino replicado con arreglo de medidas repetidas en el tiempo.

Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se evaluaron por la pruebas de Shapiro-Wilk y Gráfico, respectivamente. En los casos en donde se presentaron diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia del 5 %, se realizó Mínimos Cuadrados Medios con corrección para comparaciones múltiples: Bonferroni.

MARCO TEÓRICO

Limitantes de salud en los sistemas ganaderos

Los dípteros de mayor importancia en los sistemas ganaderos del país son la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*), la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*), la mosca doméstica (*Musca domestica*) y en algunas regiones algunas especies de tábanos cobran bastante importancia en diferentes épocas del año. Estos ectoparásitos causan reducción en la producción de leche, disminución en la eficiencia de la conversión alimenticia, molestias para la población animal y humana e impacto negativo en salud pública cuando, principalmente poblaciones elevadas de *M. doméstica*, se encuentran asociadas a la cosecha y manipulación de la leche, carne y otros alimentos. En épocas cálidas las tres primeras especies de moscas generan una mayor molestia al incrementar sus poblaciones y propagar enfermedades entre animales o humanos como conjuntivitis, gusanos en los ojos *Thelazia* y mastitis, entre otras. Además el ataque defensivo del animal se traduce en menor ingesta de alimento, pérdida de sangre, dolor e irritación, daños en la piel, de forma paralela el incremento en las poblaciones de *M. doméstica* genera aumento en el recuento de células somáticas en la leche, lo que ocasiona leche de baja calidad higiénica (Graeper, 2013), (Loftin & Corder, 2012).

Se han hecho algunas estimaciones de acuerdo a la pérdida de la producción y a transmisión de enfermedades, se ha demostrado que la infestación por mosca del establo reduce la producción en un 15 - 30%, y para la mosca de los cuernos pueden reducir la producción de leche en un 10 a 20 por ciento (Loftin & Corder, 2012).

Importancia de las infestaciones por dípteros hematófagos en los sistemas ganaderos

Aunque es difícil evaluar el impacto que genera cualquier tipo de parásito en la ganadería, existen varias épocas en el año en el que aumenta la población de ectoparásitos por

condiciones climatológicas óptimas para su desarrollo, lo que conlleva a disminuir la producción y por lo tanto la rentabilidad de la finca. En este sentido se estiman pérdidas de un 5% o más en los valores de producción al año. En el caso de animales jóvenes el estrés puede afectar el aumento de peso lo cual se traduciría en una baja en la productividad durante toda su vida. Algunos autores han mencionado que las pérdidas son cuantiosas por la disminución en la producción láctea y en el efecto negativo sobre la población animal. Datos de estimaciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos demuestran que las pérdidas anuales causadas por todas las plagas de artrópodos que afectan el ganado de leche llegan a las 17.000 libras de leche por animal por año equivalentes a \$28 por 100 kg de peso (Graeper, 2013) , como se observa en la tabla 3.

Tabla 3

Valores de pérdidas de ganancias anuales en leche por el efecto de dípteros en sistemas ganaderos.

Pérdida en %	Pérdida por vaca	Pérdida anual/100 vacas*
5%	\$238	\$23.800
10%	\$476	\$47.600
20%	\$952	\$95.200

**Tomado de Graeper, 2013*

Importancia Económica

La mosca de los cuernos es considerada una de las plagas económicamente más devastadora para la ganadería por causar pérdidas económicas representadas en miles de millones de dólares, en conjunto con los costos incrementados por el uso de insecticidas para el control de las infestaciones.

Debido al comportamiento alimentario de la mosca y a la enorme cantidad de moscas presentes en los animales, el ganado gasta mucha energía en defenderse de las

picaduras. Esto se traduce en tasas respiratorias y cardiacas elevadas, reducción del tiempo de pastoreo, disminución de la eficiencia de la alimentación y la reducción de la producción de leche en vacas, lo que puede resultar en una disminución de peso al destete. La alimentación de la mosca también puede dañar los cueros del ganado, lo que resulta en piel de calidad más pobre (Townsend, 2011).

Haematobia irritans

Taxonomía

Haematobia irritans pertenece al Phylum artrópoda, a la clase Insecta, al orden Díptera al Suborden Cyclorapha (moscas). La clasificación taxónomica culmina en Familia Muscidae género: *Haematobia* y Especie: *irritans*



Figura 13 *Haematobia Irritans* (Fitzpatrick, 2014)

Morfología

La mosca de los cuernos es aproximadamente la mitad del tamaño de una mosca doméstica o mosca de los establos. Tanto machos como hembras tienen piezas bucales que

utilizan para penetrar en la piel de los animales para obtener sangre. Esta especie de mosca normalmente se ubica en los hombros, la espalda y en los costados de los animales, también se mueven a la parte inferior del vientre durante las horas calurosas o lluviosas.

A diferencia de otras moscas, la *H. irritans* permanece en los animales casi todo el tiempo, apartándose de este solo para poner sus huevos (Graeper, 2013).

Ciclo de Vida

El estiércol vacuno es el hábitat indispensable para el desarrollo de las larvas; en el caso de los adultos estos se alimentan de sangre del ganado. Los huevos eclosionan entre uno a dos días después de puestos. Las formas evolutivas L1, L2 y L3 son cilíndricas de color blanco amarillento y miden 7 mm de largo. La L3 termina encapsulándose en un pupario de pared resistente y de tonalidad oscura. La pupa evoluciona casi exclusivamente dentro de la materia fecal o en el suelo, debajo de su superficie, para dar nacimiento al adulto en un proceso de maduración que demanda 5 a 6 días (Figura 14) La pupación requiere normalmente de seis a ocho días para que la maduración sea completa. El tiempo requerido para completar el ciclo de vida de una *H. irritans* es entre 10 y 20 días, dependiendo de la temperatura (Mancebo, Monzón, & Bulman, 2001).

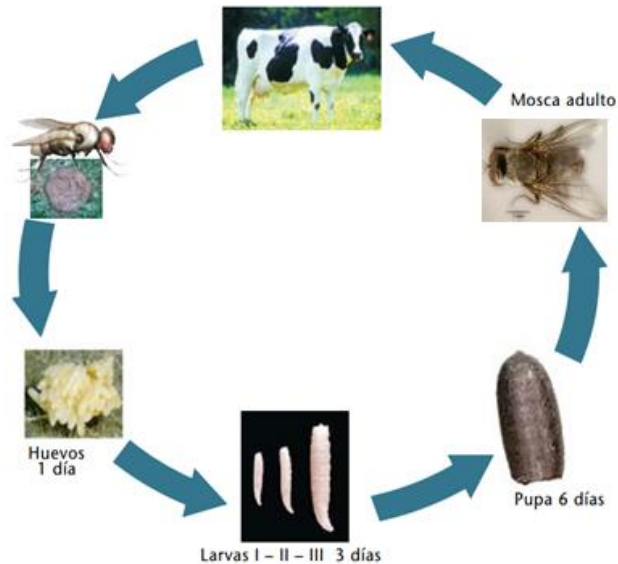


Figura 14 Ciclo de vida de *H. irritans*. Figura modificada (Navarro, 2009)

A pesar de que las moscas de los cuernos típicamente diapausan o hibernan como pupas durante el invierno en la mayoría de las zonas subtropicales y templadas, las poblaciones de *H. irritans* son una molestia durante todo el año para el ganado (Fitzpatrick, 2014).

Patogénesis

Algunos estudios han demostrado que vacas infestadas con 500 moscas se pierden en promedio 7 ml de sangre al día con un número de picaduras entre 20 – 40 veces al día; las heridas generadas por las picaduras llegan a ocasionar infecciones secundarias, enfermedades o parásitos (*Stephanofilaria stilesi*) que causan dermatitis, o ser vector de *Staphylococcus* spp. causante de mastitis (Fitzpatrick, 2014).

Métodos de control

El control de *H. irritans* se encuentra muy ligado al uso de insecticidas, debido a esta situación se ha generado el problema de resistencia a estas sustancias y por ende a la

disminución en el número de principios activos disponibles para el control de moscas (Barros, Guglielmo, & Martins, 2002).

Control químico

Los insecticidas más usados en especial son los elaborados a base de organofosforados y piretroides sintéticos (Barros et al., 2002).

Los **Organofosforados (OF)** son ésteres o amidas de ácidos fosfóricos. Desde el punto de vista químico se clasifican en fosfatos, pirofosfatos, tiofosfatos y ditiofosfatos, entre otros (Navarro, Lara, & Bórquez, 2009). Su mecanismo de acción es interferir con la función normal de los nervios debido a la inactivación de la enzima acetil colinesterasa, los cuales catalizan la hidrolisis del neurotransmisor acetilcolina. Dentro del grupo de insecticidas OF usados para el control de moscas *H. irritans* se encuentran el diazinón, diclorvos, cumafós y Fentión (Oyarzun et al., 2008).(Nari, 2003)

Piretroides sintéticos Los piretroides se sintetizan a partir de compuestos que se encuentran en las flores conocidas como el crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Se reconoce su capacidad antiparasitaria dada principalmente por su alta especificidad por los insectos y baja toxicidad para los mamíferos. Entre ellos se encuentra la aletrina, permetrina, cipermetrina, deltametrina y fenotrina, entre otros (Navarro et al., 2009). Su mecanismo de acción se basa en la interrupción de la transmisión normal de impulsos nerviosos, específicamente por la interferencia de los canales de sodio. Los piretroides más usados para el control de moscas son cipermetrina, alpha-cipermetrina, cialotrina y permetrina (Oyarzun et al., 2008).

Control no químico

Debido a la creciente resistencia se han implementado alternativas para el control de la mosca de los cuernos, pero que comercialmente aún no tiene una distribución masiva (Barros et al., 2002).

Control mecánico: Una de las prácticas comunes de control mecánico es la dispersión de las bostas para eliminar el sustrato sobre el cual se desarrollan las larvas. Una de las recomendaciones más eficientes es la dispersión de las bostas una vez por semana para evitar la eclosión de los huevos (Navarro et al., 2009).

Trampas: El uso de trampas adhesivas cerca de los lotes de pastoreo de los animales ha demostrado ser una herramienta eficaz para el control de poblaciones de este artrópodo, pero a su vez puede atrapar otros tipos de insectos en los que se pueden incluir algunos benéficos, afectando de esta manera la entomofauna no patógena y/o benéfica.

Control biológico: Como alternativas para el control no química de estas moscas se encuentra el uso de parasitoides como las micro avispas depredadoras del género *Spalangia*, competidores del sustrato como escarabajos coprófagos y el uso de extractos o aceites esenciales de origen vegetales (Navarro et al., 2009).

Parasitoides: Son parásitos que afectan diferentes estadios de la mosca pudiendo infestar pupas y desarrollándose dentro de las misma y a su vez alimentándose de los restos de la pupa tras el emerger de las larvas para alimentarse de ellas, un ejemplo de estos parasitoides son las microavispa (Navarro et al., 2009), (Ripani & Maciel, 2010).

Depredadores: Uno de los principales depredadores de moscas adultas de *H. irritans* son los adultos de la avispa del género *Spalangia* (Ripani & Maciel, 2010) (Navarro R., *et al* 2009).

Competidores del sustrato: Numerosas especies de familias de dípteros y coleópteros estercoleros (*Scarabaeidae* y *Aphodiidae*) compiten con la mosca por la fuente alimentaria de las larvas, debido a que los escarabajos habitualmente entierran la materia fecal en la tierra en forma de bolas para poner sus huevos (Navarro R., *et al* 2009).

Control Integrado Parasitario - CIP

El control integrado de parásitos combina de una forma adecuada varias herramientas de control para prevenir o reducir la aparición de poblaciones existentes y su implementación va en consonancia con el manejo de poblaciones resistentes a los insecticidas o en la reducción de la aparición de las mismas. Como requisito para la implementación de un plan de CIP se considera que es necesaria una mayor planeación, mano de obra, cambio en la mentalidad por lo que es un método poco usado (Nari, 2003).

Extractos vegetales

Dentro las aplicaciones del uso de las plantas en la medicina humana y veterinaria se ha encontrado que el uso de extractos de origen vegetal, de forma cruda, semiprocesada o sustancias con diferente grado de purificación se ha convertido en los últimos años en un alternativa sostenible para el manejo de diferentes enfermedades y de plagas que afectan animales y al humano (Viegi, Pieroni, Guarrera, & Vangelisti, 2003). En este sentido el uso de extractos vegetales es considerado una práctica alternativa promisoría, en el manejo de agentes parasitarios en varias especies animales como en los bovinos, equinos, ovinos, porcinos, caninos

y conejos principalmente; se reporta que, por su efectividad, en mayor proporción las hojas, raíces y frutos son las partes más utilizadas de las planta (Akerreta, Calvo, & Cavero, 2010). La forma más común para su uso ha sido la elaboración de decocciones o de soluciones en las que las plantas han sido sumergidas por algún tiempo determinado para extraer sus componentes. Otras formulaciones son los ungüentos, pomadas, tinturas, entre otros. Los extractos que más se elaboran son los usados para el tratamiento de enfermedades del sistema digestivo seguido por las afecciones de la piel (Akerreta et al., 2010), (Viegi et al., 2003).

Algunos autores consideran que los extractos vegetales han sido usados para la protección de cultivos, se considera que los extractos vegetales tienen actividad insectistática (inhibe el desarrollo normal del insecto) y no insecticida (Ortuño, 2011).

Un extracto vegetal está compuesto por múltiples principios, al no tener estabilidad en la cantidad de estos compuestos es considerado como un factor positivo ya que habrá una probabilidad muy baja que un extracto se parezca al otro, por lo cual la resistencia va a ser baja, aunque en el extracto se encuentren los mismos compuestos no siempre se encontraran en la misma cantidad y disponibilidad bioactiva (Ortuño, 2011).

Etnoveterinaria o extractos vegetales para el control de insectos

“Las sustancias de origen vegetal han proporcionado una fuente continua de medicamentos desde los tiempos más antiguos, el desarrollo de estudios etnobotánicos es importante para revelar la cultura pasada y presente de las plantas en el mundo” (Bulut & Tuzlaci, 2013).

En el ámbito mundial, muchas especies de insectos son vectores de patógenos que causan enfermedades en humanos y animales. De forma paralela, el cambio climático ha tenido

influencia en la expansión de vectores de ciertas enfermedades infecciosas propias de una región o país. A causa del control químico de insectos plaga, algunas poblaciones han desarrollado resistencia a sustancias químicas pesticidas de diferentes grupos como organoclorados, organofosforados y piretroides, razón por la cual se han buscado estrategias de control de base ecológica como la etnobotánica para contrarrestar los efectos que han generado los insecticidas (Gonzalez, Garcia-Barriuso, Gordaliza, & Amich, 2011).

Los extractos foliares, radicales, de hojas y de frutos de algunas plantas se constituyen en herramientas sostenibles y alternativas para el control no químico de moscas en los sistemas pecuarios. De forma ideal, las plantas seleccionadas para el control de artrópodos en los sistemas productivos deberían ser plantas de fácil adaptación al sistema de producción, de rápida producción foliar, de recuperación y resistencia a las condiciones adversas medioambientales. Partiendo del principio de la etnoveterinaria, fundamentado en estudios y a su vez aplicación sistemática de los conocimientos populares de las plantas en el control de enfermedades animales, y más específicamente los estudios etnoveterinarios que han contribuido a la investigación de los extractos vegetales activos en el tratamiento de patologías de los animales es posible considerar la evaluación de componentes vegetales involucrados en el paisaje agroecológico de los sistemas de producción animal (Maxia, Lancioni, Mura, & Mongiano, 2005), (Sargin, Akcicek, & Selvi, 2013).

Para que un extracto sea útil como repelente o insecticida la planta debe tener la capacidad de adaptarse fácilmente a las condiciones ambientales que la rodean, baja exigencia de nutrientes y alta capacidad de recuperación tras la poda. En este sentido dentro de los sistemas de lechería especializada en el trópico alto colombiano se han identificado múltiples especies arbóreas promisorias usadas en los sistemas pecuarios que podrían ser usadas para tal fin.

Algunas características que se deben tener en cuenta para escoger la planta adecuada y considerar su uso como insecticida y/o repelente son: estar ampliamente distribuido y en grandes cantidades en la naturaleza, ser perenne, usar partes de la planta renovables como hojas, flores y frutos, no ser destruida cada vez que se necesite recolectar material, requerir poco espacio, manejo, agua y fertilización, tener usos complementarios (medicinales), no tener un alto valor económico, ser efectiva a bajas dosis (Camacho, 2012), (Ortuño, 2011).

El uso de los extractos vegetales trae consigo algunas ventajas que lo convierten en una buena opción comparándolo con un insecticida de origen sintético; entre las ventajas tenemos que son amistosos con el medio ambiente, muchas de estas plantas poseen actividad medicinal, su rápida degradación favorece la disminución de residuos riesgosos en los alimentos, su toxicidad es menor que la de un insecticida o repelente comercial, varios actúan rápidamente inhibiendo la alimentación del insecto, desarrollan resistencia más lentamente que los insecticidas sintéticos (Ortuño, 2011)(Camacho, 2011).

Las desventajas de los extractos es que no todos son insecticidas sino que muchos son insectistáticos lo que los hace tener una acción más lenta, se degradan rápidamente por los rayos UV por lo que su efecto residual es bajo, no todos los insecticidas vegetales son menos tóxicos que los sintéticos, los límites máximos de residuos no están establecidos (Camacho, 2011), (Ortuño, 2011).

Es así como en muchos sistemas ganaderos del trópico alto colombiano, la presencia dominante de algunas especies que cumplen con buena parte de los requisitos en el caso de *Sambucus nigra* (sauco) cumple con las características para ser usado en este estudio ya que es una opción interesante para su aprovechamiento como agente que contribuya al control de dípteros plaga en estos sistemas de producción.

SAUCO (*Sambucus nigra*)

Pertenece al reino: Plantae, subreino: Tracheobionta, división: Magnoliophyta, clase: Magnoliopsida, subclase: Asteridae, orden: Dipsacales, familia: Adoxaceae, género: *Sambucus* y especie: *nigra*,



Figura 15 Flores y follaje de Sauco (Sambucus Nigra)

Origen

Arbusto originario de Europa y cultivado como ornamental en las tierras templadas y frías, con el tronco muy ramificado, café claro y rugoso, follaje denso de color verde claro con hojas opuestas y hojas compuestas de folíolos aserrados, y racimos densos y redondeados de numerosas flores blancas, y frutos esféricos, carnosos y negros en la madurez (Bernal, Galeano, Rodríguez, H, & M, 2012).

Es una de las plantas más usadas con fines medicinales casi todas sus partes se han usado (corteza, raíz, hojas, flores, frutos), ha tenido usos terapéuticos, profilácticos,

paliativos, la toxicidad es muy baja hasta en dosis altas, los frutos verdes contienen un alcaloide venenoso y un glucósido cianogénico que causa diarrea, vómito, náuseas; pero los frutos maduros y flores son comestibles (Valles, Bonet, & Agelet, 2004).

Principios activos del sauco

Los principales componentes de las flores son los aceites esenciales, glucósidos sudoríficos, los flavonoides (quercetina, rutina, hiperoside y antocianicas), mucilago y taninos, ácidos orgánicos, sales proteicas, en las hojas se ha detectado N-glicosido que descompone el ácido prúsico, plastocianina. Altas cantidades de amidas de ácido N-Fenilpropenol L-Amino (Ulbricht et al., 2014), (Ortuño, 2011) otros compuestos son Cianidina 3- glucosido, cianidina 3 sambubiosido así como 4 metabolitos peonidina 3 glucosido, peonidina 3 sambubiosido, peonidina monoglucuronido y monoglucuronido (Ulbricht et al., 2014).

Aplicaciones tradicionales

El sauco es una planta extendida por todo el mundo, también en la península Ibérica, siendo uno de los remedios fitoterapéuticos mejor considerados. En ciertos lugares de este mismo país se utiliza incluso como aderezo culinario. En la mayoría de los países la planta es considerada beneficiosa para todo tipo de dolencias (Akerreta et al., 2010), (Bulut & Tuzlaci, 2013), (Maxia et al., 2005).

En Colombia se han usado extractos etanólicos de sauco para evaluar efecto insecticida e ixodicida (Ramírez, Cruz, & Rodríguez, 2009), la forma de elaboración y los análisis hechos a los extractos permitieron obtener buenos resultados en el caso de *N. tabacum* encontrando una alta tasa de mortalidad tanto para garrapatas pequeñas como una adulta, y generando efecto en todas las diluciones que se realizaron, caso contrario a los otros extractos *B.*

arbórea llegó a mortalidades del 60% pero no encontrando efecto en las mayores diluciones del extracto, *S. nigra* solo tuvo efecto en garrapatas pequeñas y solo usado como extracto puro en las diluciones no tuvo efecto ixodida al igual que el resto de plantas usadas (Rodríguez, Rodríguez, & Cruz, 2010), en el caso del tabaco se atribuye su efecto a la presencia de alcaloides como la nicotina, pasa algo similar en otros estudios aunque en el caso de extractos etanólicos y usando como unidad experimental la mosca *H irritans* los resultados del sauco son relevantes obteniéndose mortalidad en porcentajes altos, lo mismo que eficacia en las diluciones realizadas. (Cruz et al., 2011).

La hoja se usa como antiséptico para combatir el ántrax en animales o como purgante; las flores se usan como antiacetónémico, antiinflamatorio, el mayor uso es como anticatarral, antiséptico faríngeo (Sargin et al., 2013); la raíz se usa como laxante (Valles et al., 2004) (Akerreta et al., 2010) (Bulut & Tuzlaci, 2013).

La infusión de flores y/o frutos se utiliza como diaforético, indicado en los resfriados y estados febriles. Aplicada en gargarismos, la infusión parece aliviar el dolor o quemazón de la garganta inflamada, las anginas, la estomatitis, el catarro nasal y la sinusitis. La corteza del arbusto se aplica como catártico, emético y diurético. La infusión de corteza se aplica también contra la epilepsia, como estimulador circulatorio, diaforético y expectorante. En aplicación local, se utiliza como antiinflamatorio (Valles et al., 2004).

En medicina popular humana se usa como calmante en los procesos de quemaduras (contiene triterpenos y ácido ursólico), en el caso del sistema respiratorio los compuestos del sauco ácido ursólico, alfa amirin, polifenoles y flavonoides son parte de los compuestos que benefician el tratamiento de enfermedades respiratorias (Viegi et al., 2003).

Los flavonoides, esteroides y algunos alcaloides encontrados en la planta generan efecto insecticida en moscas (Cruz, 2011). En algunas zonas de Europa, el saúco se utiliza para distintas afecciones cutáneas como las quemaduras o escaldaduras, la erisipela, las tiñas, la erupción provocada por las ortigas, ciertas inflamaciones locales, distintas manifestaciones reumáticas, cortes, verrugas, granos o forúnculos. El uso de flores como repelente de insectos (Ulbricht 2014) Se han registrado también otros usos menos extendidos, como tratamiento para las picaduras de insectos, de la hidropesía, de la ictericia, de enfermedades del riñón, del dolor dentario, de las almorranas e incluso como cosmético (Valles et al., 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas han proporcionado una fuente continua de remedios a través de la historia, las hojas de las plantas al ser las más expuestas al daño ambiental y a predadores se han convertido en las más ampliamente usadas al sintetizar estos compuestos de defensa (Akerreta et al., 2010).

Debido a que el método de elaboración del extracto no había sido probado antes en *H. irritans*, los resultados no son comparables con métodos de extracción que permiten concentraciones altas de los compuestos deseados o que se conocen generan un efecto insecticida y/o repelente, pero el método artesanal escogido sí permite demostrar que plantas como el sauco ampliamente distribuido y muy usado en cercas vivas o como parte de arreglos silvopastoriles, genera efecto repelente en porcentajes cercanos al 100%.

En los ensayos in vitro de mortalidad se encontró que ninguno de los extractos realizados y sus respectivas diluciones tuvo efecto insecticida, por lo que no fue posible realizar análisis estadístico.

Los ensayos de mortalidad no mostraron efecto insecticida, a pesar de que la técnica del filtro tratado es una de las más usadas para evaluar el efecto de los insecticidas sintéticos, ya que obliga al insecto a tener un contacto directo con el insecticida y sus vapores (FAO, 2004), es por eso que es el método más indicado para evaluar los extractos vegetales, además permite una mejor observación y evaluación de los insectos tratados,

- Se ha reportado que el extracto etanólico genera mortalidad del 100% en altas concentraciones en parte se asocia estos resultados a que algunos de sus compuestos como es el caso de los flavonoides que se pueden obtener con este método de extracción

(Ramírez et al., 2009); en el estudio realizado por Castillo y Col. 2012 usando el extracto etanólico de chile habanero (*Capsicum chinense*) sobre mosca blanca (*Bemisia tabaci*), evidenció mortalidades por encima de 50%, Agnolin 2009 encontró efecto insecticida del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) sobre *H. irritans* con mortalidades del 58,6% al realizar análisis al extracto se encontró terpenoides que se cree interfieren con funciones fisiológicas del organismo del insecto; por lo que se puede pensar que en la forma de extracción no se obtuvo compuestos flavonoides y asumir que este método, no permitió obtener resultados favorables en cuanto a la actividad insecticida obtenida por los autores antes mencionados.

Resultados de ensayos de repelencia *in vitro* de Extractos puros de glicerina y propilenglicol

No hay muchas técnicas para la evaluación de repelencia, el uso de botellas plásticas es una de las técnicas recientemente usadas y que mostraron ser un método viable de evaluación, según lo reportado por Klauck y colaboradores (2014), al realizar un ensayo de prueba se vio que el manejo de botellas plásticas es difícil y el método de aspersion genera que las moscas caigan al mojarse sus alas, generando datos poco confiables por lo que no fue el método indicado para la evaluación de la repelencia; otro método descrito por Klauck y colaboradores (2015) fue el uso de un equipo diseñado con cuatro compartimentos que se comunican y que permite de forma más precisa evaluar el efecto repelente ya que es más evidente la dispersión de las moscas a lugares no tratados con la sustancia a evaluar .

En los ensayos *in vitro* del extracto puro de glicerina (Figura 16) se encontró que a medida que transcurría el tiempo mejoraba la repelencia, encontrándose el efecto repelente más

alto en el minuto 180 con un 79,12% de repelencia, y comparando entre material vegetal, las hojas fueron mejores que las flores en la mayoría de los tiempos de observación.

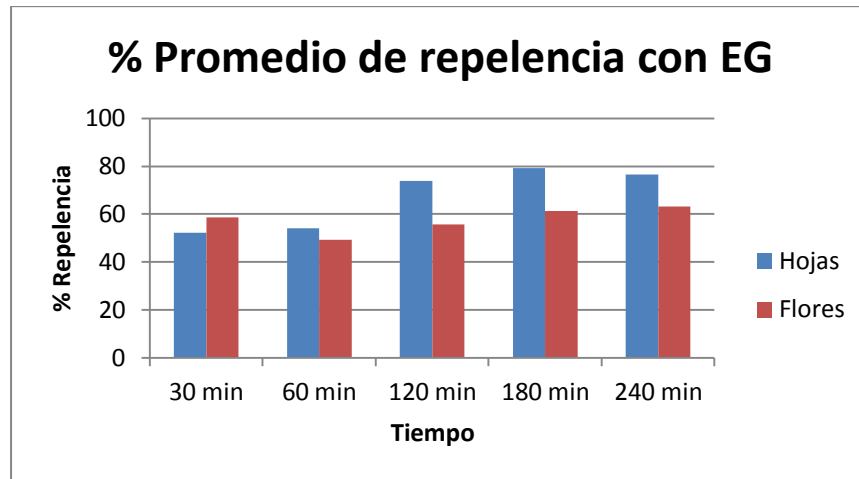


Figura 16 Porcentaje promedio de repelencia de las moscas *H. irritans* en ensayos in vitro con EG tras cuatro horas de observación

En el caso de los ensayos de propilenglicol el efecto de repelencia de los extractos de hojas y flores fue estadísticamente similar, teniendo un mejor porcentaje de repelencia en la mayoría de los tiempos el extracto de hojas debido a que en todas las observaciones el porcentaje de repelencia estuvo por encima del 80% (Figura 17).

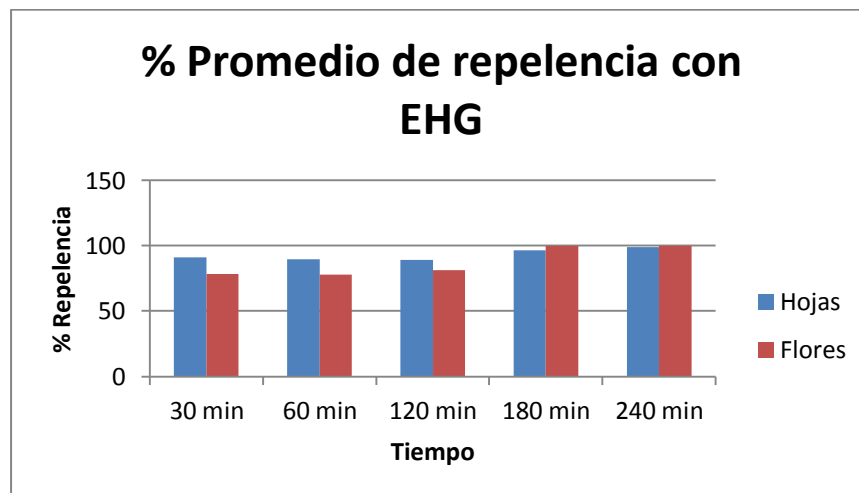


Figura 17 Porcentaje promedio de repelencia contra *H. irritans* en ensayos in vitro con extracto hidroglicólico (EHG) de hojas y flores de *S. nigrans* tras 4 horas de observación

En el caso de la tabla 4 se encuentran las estimaciones para todos los factores considerados: solvente, material vegetal, tiempo y sus distintas interacciones, como se puede observar en el caso de la interacción solvente-material-tiempo es significativa a un alfa de 0,005, aunque en el caso del solvente y el tiempo observándolos de manera individual, tienen diferencias estadísticamente significativas, pero en este caso no se mira como individual ya que una de las interacciones mostro diferencia estadísticamente significativas.

Tabla 4
Modelo de efectos fijos para los datos de los ensayos in vitro de los extractos puros de EG y EHG de hojas y flores

Efecto	F-Valor	Pr > F
Solvente	17,29	0,0032
Material vegetal	0,83	0,3885
Tiempo	12,62	<0,001
Solvente – material vegetal	0,21	0,6616
Solvente- tiempo	0,22	0,9255
Material vegetal- tiempo	0,18	0,9449
Solvente, Material, Tiempo	4,47	0,0056

La interacción de los solventes, material vegetal y tiempo que se muestra en la tabla 5 nos indica que en la mayoría de los tratamientos con extractos puros el porcentaje de repelencia estuvo por encima del 50% y los mejores resultados se encontraron en los EHG con la mayoría de los resultados por encima del 80% de repelencia.

Tabla 5

Mínimos cuadrados medios, interacción entre solvente, material y tiempo estableciendo la media y su error estandar

Solvente	Material	Tiempo	Media
Glicerina	Hojas	30	59
	Hojas	60	49
	Hojas	120	56
	Hojas	180	61
	Hojas	240	63
	Flores	30	52
	Flores	60	54
	Flores	120	74
	Flores	180	79
	Flores	240	77
Propilenglicol	Hojas	30	78
	Hojas	60	78
	Hojas	120	93
	Hojas	180	100
	Hojas	240	100
	Flores	30	91
	Flores	60	90
	Flores	120	89
	Flores	180	96
	Flores	240	99

Cuando se hace la comparación grafica entre los dos tipos de extractos EG y EHG, se hace más visible que quien tuvo mejor efecto fue el EHG, ya que ninguno de los tiempos del ensayo con el EG supero el 80%, y en ambos EHG siempre hubo un muy alto porcentaje de repelencia (Figura 18).

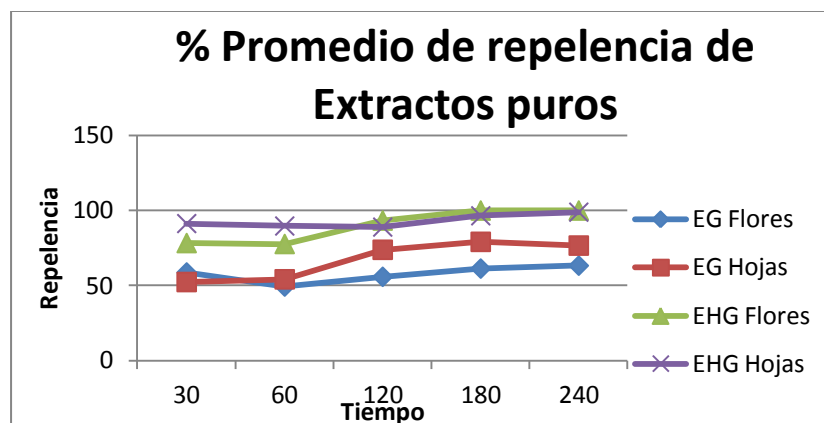


Figura 18 Porcentaje promedio de los ensayos de los Extractos puros de propilenglicol (PPG) y glicerina (G) tras cuatro horas de observación

Al obtener los resultados de los extractos puros, se escogió el solvente propilenglicol para realizar los ensayos del extracto diluido.

- Zhu y Col. 2012 En un estudio realizado sobre el efecto repelente del Aceite esencial de catnip (*Nepeta cataria*), Amyris (*Amyris balsamifera*). y sándalo (*Santalum album*) sobre moscas *S. calcitrans* encontró una repelencia in vitro a la alimentación del 98% *catnip*, 70% sándalo por debajo del 60% *Amirys sp.* Klauck y Col. 2015 en su estudio con aceites esenciales de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) y andiroba (*Carapa guianensis*) sobre *H. irritans*, en los que halló al minuto 30 repelencia 50% y a la segunda hora el 100% hasta terminar la observación con el extracto de té, en el caso de andiroba 50% al minuto 30 y en las dos últimas horas 100% repelencia; Castillo y Col 2012, con el extracto etanolico de chile habanero sobre mosca blanca encontró repelencias del 30-40% durante todo su ensayo; con los resultados obtenidos por los autores antes mencionados, se puede demostrar que el extracto de sauco generó porcentajes repelencias altos inclusive mejores que algunos autores y se mantuvo en el tiempo de observación en porcentajes altos.

Resultados de ensayos in vitro de diluciones del extracto de hojas y flores con propilenglicol

En el caso de los resultados de los ensayos de diluciones se puede observar en la tabla 6 que entre los tiempos se encontró diferencias estadísticamente significativas a un alfa de 0,05, además en el análisis se encontró que existe interacción entre la dilución- tiempo es decir que en algún momento alguna dilución y tiempo tuvieron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el resto.

Tabla 6

Modelo de efectos fijos para los datos obtenidos en los ensayos de diluciones de los extractos EHG de hojas y flores

Efecto	F-Valor	Pr > F
Material vegetal	0,5	0,4909
Dilución	0,51	0,6828
Tiempo	12,6	<0,001
Material vegetal- Dilución	0,1	0,9606
Material vegetal- tiempo	0,3	0,8745
Dilución - tiempo	2	0,0383
Material, Dilución, Tiempo	1,54	0,1347

Al encontrar que había una interacción entre las diluciones y los tiempos, se hace el análisis de todos los datos para encontrar el o los datos que generaron esta interacción y se puede observar que los datos de la dilución al 90% en los minutos 180 y 240 tuvieron los resultados más altos de 91,4 y 92% respectivamente

Tabla 7*Mínimos cuadrados medios, interacción de las diluciones y los diferentes tiempos*

Dilución	Tiempo	Estimado
10	30	58,5904
	60	59,8855
	120	68,7073
	180	84,0101
	240	88,886
30	30	52,5585
	60	73,1626
	120	73,8194
	180	81,8995
	240	81,9968
60	30	52,7698
	60	66,4021
	120	77,1024
	180	79,881
	240	82,6285
90	30	62,0389
	60	62,8731
	120	84,7154
	180	91,4931
	240	92,0139

Al observar los porcentajes promedio de repelencia (Figura 19) de los ensayos de los EHG en las distintas diluciones se puede observar que entre diluciones y extractos no existen diferencias estadísticamente significativas, entre tiempos si se puede observar que a medida que transcurre el tiempo el efecto repelente mejora y entre más concentrado el extracto más duraderos y más altos son los porcentajes de repelencia.

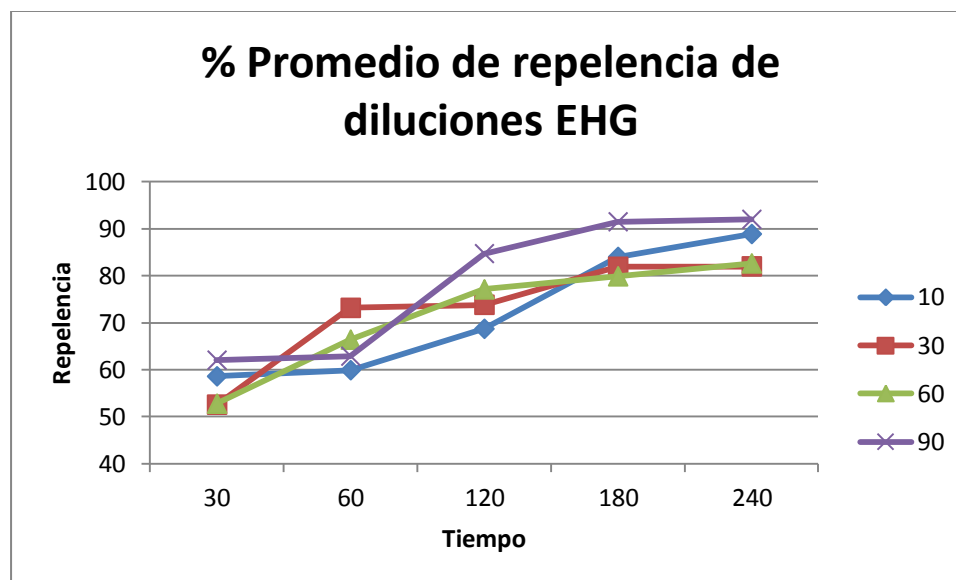


Figura 19 Porcentaje promedio de repelencia in vitro del EHG en las distintas diluciones durante las 4 horas de observación

En el estudio realizado por Zhu y Col. 2015 con aceite esencial de catnip y citronela contra *H. irritans* con diluciones 0,2, 2 y 20 mg encontró que en las 4 horas de observación no hubo diferencias significativas entre diluciones con porcentajes de repelencia que oscilaron entre 89-100% claramente algo consecuente con lo encontrado en este estudio ya que no hubo tampoco diferencias entre concentraciones y extractos; Ringelet y Col. 2014 al evaluar el aceite esencial de Lipia contra el falso gorgojo castaño el porcentaje de repelencia se mantuvo entre un 70-80%

Resultados de ensayos in vivo de las diluciones del extracto de hojas y flores con propilenglicol

En el caso de los ensayos de campo Zhu y colaboradores (2012) plantean el uso de una misma vaca como tratamiento y control, en este caso al evaluar el efecto de la mosca de los establos con sus hábitos de posarse y alimentarse en las extremidades del animal, Klauck y colaboradores (2014) establecieron un área de impregnación más pequeña y vacas tratadas versus vacas control; lo que permitió plantear una técnica con algunas características planteadas

por Zhu y Klauck y que hizo que se pudiera poner a la mosca en la misma situación del aparato de repelencia y decidir si posarse en el lado tratado o el no tratado

Con los ensayos se puede determinar que los tratamientos y el tiempo generaron diferencias significativas, por lo que al observar que la interacción tratamiento tiempo genera diferencias estadísticamente significativas a un alfa de 0,005 ya que el valor $Pr>F$ es menor que 0,005

Tabla 8

Modelo de efectos fijos para los datos obtenidos en los ensayos in vivo de las diluciones del extracto EHG de hojas y flores

EFEECTO	Valor F	Pr>F
Periodo	4.96	0.0104
Animal	3.77	0.0121
Tratamiento	31.49	<.0001
Tiempo	18.11	<.0001
Tratamiento*Tiempo	2.69	0.0013

Tabla 9 Mínimos cuadrados medios los dos factores como individuales y la interacción de los dos

Factor	Nivel	Media	Error estándar	
Tratamiento	0	22	0.1091	
	10	17	0.1083	
	50	10	0.1083	
	90	5	0.1148	
Valor P		<0.0001		
Tiempo	0	28	0.1046	
	60	11	0.1084	
	120	9	0.1123	
	180	9	0.1065	
	240	10	0.1065	
	300	11	0.1046	
Valor P		<0.0001		
Tratamiento* Tiempo	0	0	45	0.2093
	0	60	16	0.2236
	0	120	18	0.2093
	0	180	21	0.2093
	0	240	21	0.2093
	0	300	18	0.2093
	10	0	23	0.2093
	10	60	22	0.2093
	10	120	16	0.2093
	10	180	13	0.2093
	10	240	15	0.2093
	10	300	13	0.2093
	50	0	21	0.2093
	50	60	8	0.2093
	50	120	7	0.2093
	50	180	9	0.2093
	50	240	9	0.2093
	50	300	13	0.2093
	90	0	27	0.2093
	90	60	4	0.2238
	90	120	3	0.2651
	90	180	3	0.2240
	90	240	3	0.2240
	90	300	5	0.2093
	Valor P		<0.0001	

La tabla 9 muestra de manera individual el factor tratamiento y el factor tiempo, en este caso por si solos no muestra información relevante, pero al observar la interacción de los dos, se encuentra que los valores más altos y constantes de repelencia se encuentran en el tratamiento 90%.

En los resultados de los ensayos *in vivo* se puede observar que en el caso de los distintos tratamientos, todos generaron un efecto de repelencia, inclusive el control, pero se encontraron efectos constantes y bajos de repelencia en el tratamiento usando una concentración del 90%, los otros dos tratamientos y el control que se consideró como cero (0), variaron y no hubo un efecto constante de mantener valores bajos de moscas posadas sobre el animal.

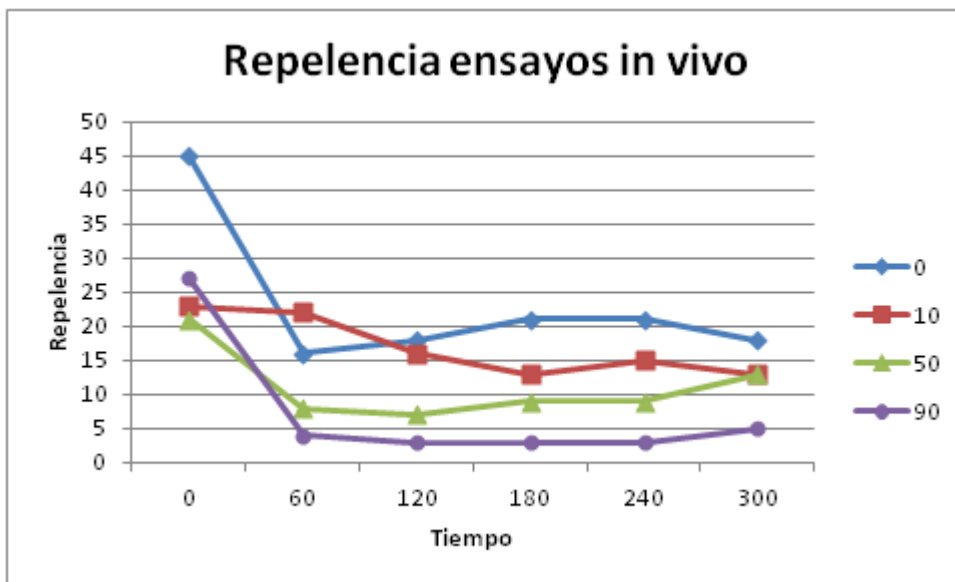


Figura 20 Repelencia promedio de los ensayos *in vivo* de las diluciones del EHG durante las 5 horas de observación

En el caso de los ensayos *in vivo* Zhu, y Col. 2012 con una formulación oleosa y acuosa de catnip evaluadas sobre *S. calcitrans* se realizo observaciones durante 8 horas, y el efecto del extracto oleoso duro hasta la hora 6, mientras que el acuoso su efecto fue hasta la hora 4, como sucedió en este caso la formulación era acuosa y su efecto se comenzó a perder en la

cuarta hora; por otro lado Klauck y Col. 2014 con aceite esencial de árbol de te y andiroba con observaciones a la 1, 3, 6, 9, 24, 48, y 72 horas, su efecto fue hasta la hora 2 luego aumento el número de moscas, no hubo diferencias entre extractos, también perdió muy rápidamente su efecto y Agnolin 2009 con aceite de citronela al 4% conteos 3,7,14 días sobre *H. irritans* tuvo un resultado que se considero no permitió evaluar el efecto repelente debido a que las vacas tuvieron un numero de moscas muy bajo que se mantuvo y fue similar después del tratamiento; esto pudo ser debido a que el extracto bajo las condiciones del medio ambiente se degrada muy rápido y su efecto se pierde.

IMPACTO E INDICADORES

El uso de productos naturales para el control de moscas en el ganado genera grandes beneficios no solo para el entorno si no para la comunidad en general:

- Disminución en el uso de productos químicos para el control
- Reducción de residuos químicos en carne y leche
- Disminuir la contaminación al medio ambiente
- Controlar la población de moscas en el ganado
- Minimizar el contacto de los empleados con productos que afecten su salud
- Brindar mejor bienestar al animal al tener controlada la población de moscas
- Disminución de la transmisión de microorganismos que generan enfermedad al ganado

CONCLUSIONES

Los extractos de sauco no generaron efecto insecticida, pero si un efecto repelente *in vitro* del 100% a los 240 minutos con extractos hidroglicólicos puros, mientras que *in vivo* el efecto fue de menos de 3 moscas hasta los 240 minutos de observación con extracto al 90% de hojas y flores en propilenglicol

Los extractos más concentrados generaron mayor efecto repelente, pero a su vez cualquier tratamiento fue capaz de generar y mantener este efecto en el tiempo, por lo que se puede asumir que el sauco es una herramienta útil como repelente contra *H. irritans*

Los extractos elaborados con el solvente glicerina generaron un porcentaje de repelencia inferior al 80%, obteniendo mejores resultados los extractos con propilenglicol con repelencias de hasta un 100% de efectividad *in vitro*

Los extractos usados en los ensayos *in vivo* generaron efecto repelente, pero las condiciones climáticas (lluvias y rayos UV) degradaron muy rápidamente el extracto generando que su efecto en el tiempo sea muy corto

RECOMENDACIONES

Para potencializar su efecto y mantenerlo por más tiempo se puede combinar el sauco con otra planta que se conozca tenga efecto repelente contra *H irritans*, también sería útil un solvente con mayor adherencia a la piel y pelo para que la lluvia no lo elimine rápidamente

Realizar un análisis fitoquímico de los extractos elaborados para determinar así la concentración y identificar los compuestos presentes en el extracto.

Puede ser de gran utilidad prolongar el tiempo de extracción para así lograr extractos más concentrados

Sería útil hacer ensayos con distintos tipos de solventes para determinar cual extrae mejor los compuestos del sauco

REFERENCIAS

- Akerreta, S., Calvo, M. I., & Cavero, R. Y. (2010). Ethnoveterinary knowledge in Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2), 369-378. doi:10.1016/j.jep.2010.05.023
- Agnolin, C., (2009). Óleo de citronela no controle de ectoparasitas de bovinos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
- Barros, A., Guglielmone, A., & Martins, J. (2002). **MOSCA DE LOS CUERNOS (Haematobia irritans): Control Sustentable y Resistencia a Los Insecticidas** 1-12. Retrieved from
- Bernal, R., Galeano, G., Rodríguez, A., H, S., & M, G. (2012). sauco. (*Sambucus nigra*). Retrieved from www.biovirtual.unal.edu.co/nombrescomunes/buscador/bnc_plants/lema/t:lema/q:sauco/q1:Sambucus nigra
- Bulut, G., & Tuzlaci, E. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu (Manisa-Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 149(3), 633-647. doi:10.1016/j.jep.2013.07.016
- Camacho, D. (2012). *Determinación de la Actividad Insecticida del Shampoo con Extracto de Sambucus nigra L: Franseria artemisiodes W. y Tagetes zipaquirensis H. en Ctenocephalides canis.* - See more at: <http://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/1617#sthash.8sTXLPDh.dpuf>. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/1617>
- Castillo, L., Jiménez, J., & Delgado, M., (2012). Actividad biológica in vitro del extracto de Capsicum chinense Jacq contra Bemisia tabaci Genn. Revista chapingo serie horticultura, vol. 18, núm. 3, pp. 345-356
- Cruz, A., Rodríguez, C., & Ortiz, C. (2011). Efecto insecticida in vitro del extracto etanólico de algunas plantas sobre la mosca adulta Haematobia irritans. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(3), 216-226.
- FAO. (2004). MODULE 3. FLIES: INSECTICIDE RESISTANCE: DIAGNOSIS, MANAGEMENT AND PREVENTION Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants (pp. 119-145).
- Fitzpatrick, D. (2014). Featured criatures Entomology and nematology. Retrieved from http://entnemdept.ufl.edu/creatures/livestock/flies/horn_fly.htm
- Gonzalez, J. A., Garcia-Barriuso, M., Gordaliza, M., & Amich, F. (2011). Traditional plant-based remedies to control insect vectors of disease in the Arribes del Duero (western Spain): An ethnobotanical study. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 595-601. doi:10.1016/j.jep.2011.10.003
- Graeper, E. (2013). *Integrated Pest Management (IPM) Guide for Organic Dairies* (pp. 38).

- Klauck, V., Pazinato, R., Radavelli, W. M., Volpato, A., Stefani, L. M., Santos, R. C. V., . . . Da Silva, A. S. (2015). In vitro repellent effect of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and andiroba (*Carapa guianensis*) oils on *Haematobia irritans* and *Chrysomya megacephala* flies. *Tropical Biomedicine*, 32(1), 160-166.
- Klauck, V., Pazinato, R., Stefani, L. M., Santos, R. C., Vaucher, R. A., Baldissera, M. D., . . . Da Silva, A. S. (2014). Insecticidal and repellent effects of tea tree and andiroba oils on flies associated with livestock. *Medical and Veterinary Entomology*, 28, 33-39. doi:10.1111/mve.12078
- Loftin, K., & Corder, R. (2012). Fly Control for Organic Dairies, 1-6. Retrieved from
- Mancebo, O., Monzón, C., & Bulman, G. (2001). HAEMATOBIA IRRITANS : UNA ACTUALIZACIÓN A DIEZ AÑOS DE SU INTRODUCCIÓN EN ARGENTINA 18(1), 34-46. Retrieved from http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/50-actualizacion_hematobia_irritans.pdf
- Maxia, A., Lancioni, C., Mura, L., & Mongiano, P. (2005). Plantas usadas en la práctica etnoveterinaria en el Nuorese (Cerdeña , Italia). *Revista de Fitoterapia*, 5(2), 155-161.
- Nari, A. (2003). *Resistencia a los antiparasitarios Estado actual con énfasis en America Latina* D. d. P. y. S. A. FAO (Ed.)
- Navarro, R., Lara, S., & Bórquez, F. (2009). Control Biológico de la Mosca de los Cuernos en Bovinos con Extracto de Neem 1- 35. Retrieved from
- Ortuño, M. (2011). *Determinación de la actividad biológica del extracto acuoso de Saúco sambucus nigra L. como repelente y/o insecticida en Lasius niger L.*, Escuela superior Politecnica de Chimborazo.
- Oyarzun, M. P., Quiroz, A., & Birkett, M. A. (2008). Insecticide resistance in the horn fly: alternative control strategies. *Medical and Veterinary Entomology*, 22(3), 188-202. doi:10.1111/j.1365-2915.2008.00733.x
- Ramírez, M., Cruz, A., & Rodríguez, C. (2009). Evaluación preliminar del efecto de los extractos etanólicos de cinco plantas medicinales sobre la mosca de los cuernos *Haematobia irritans* L. (diptera: muscidae). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 12(1), 69-78.
- Ripani, I., & Maciel, J. (2010). *Importancia económica y productiva de La Haematobia irritans en el ganadobovino, incidencia en reproducción y control sustentable*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA.
- Rodríguez, Á., Rodríguez, C., & Cruz, A. (2010). Efecto ixodicida de los extractos etanólicos de algunas plantas sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista MVZ Cordoba*, 15(3), 2175-2184.
- Santos, O., Varón, E., & Salamanca, J. (2009). Prueba de extractos vegetales para el control de *Dasiops* spp., en granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) en el Huila, Colombia. *Corpoica Ciencia Tecnología Agropecuaria*, 10(2), 141-151.

- Sargin, S. A., Akcicek, E., & Selvi, S. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alasehir (Manisa) in Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, *150*(3), 860-874. doi:10.1016/j.jep.2013.09.040
- Townsend, L. (2011). Horn Flies and Cattle. Retrieved from <https://entomology.ca.uky.edu/ef509>
- Ulbricht, C., Basch, E., Cheung, L., Goldberg, H., Hammerness, P., Isaac, R., . . . Wortley, J. (2014). An evidence-based systematic review of elderberry and elderflower (*Sambucus nigra*) by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of dietary supplements*, *11*(1), 80-120. doi:10.3109/19390211.2013.859852
- Valles, J., Bonet, M. A., & Agelet, A. (2004). Ethnobotany of *Sambucus nigra* L. in catalonia (Iberian peninsula): The integral exploitation of a natural resource in mountain regions. *Economic Botany*, *58*(3), 456-469. doi:10.1663/0013-0001(2004)058[0456:eosnli]2.0.co;2
- Viegi, L., Pieroni, A., Guarrera, P. M., & Vangelisti, R. (2003). A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *Journal of Ethnopharmacology*, *89*(2-3), 221-244. doi:10.1016/j.jep.2003.08.003
- Zhu, J. J., Berkebile, D. R., Dunlap, C. A., Zhang, A., Boxler, D., Tangtrakulwanich, K., . . . Brewer, G. (2012). Nepetalactones from essential oil of *Nepeta cataria* represent a stable fly feeding and oviposition repellent. *Medical and Veterinary Entomology*, *26*(2), 131-138. doi:10.1111/j.1365-2915.2011.00972.x
- Zhu, J. J., Brewer, G. J., Boxler, D. J., Friesen, K., & Taylor, D. B. (2015). Comparisons of antifeedancy and spatial repellency of three natural product repellents against horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Pest Management Science*, *71*(11), 1553-1560. doi:10.1002/ps.3960

ANEXOS

Extracto	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min	120 min	Total vivas	Total muertas
Stock										
Dilución stock 10%										
Dilución stock 30%										
Dilución stock 60%										
Dilución stock 90%										
Control										

Anexo 1 Formato para registros ensayos de mortalidad

	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
A					
B					
C					
D					
Total					

Anexo 2 Formato para registro de datos ensayos de repelencia in vitro

			Pre conteo		60'		120'		180'		240'		300'	
# Ensayo	Tratamiento	vacas	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2	L1	L2

Anexo 3 Formato para registro de los datos de los ensayos de campo