



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

FORMULACIÓN BIOINSECTICIDA A PARTIR DEL ACEITE ESENCIAL DE
AMBROSIA ARBORESCENS MILL (ALTAMISA) DE APLICACIÓN CANINA

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

AUTOR:

FELIPE SEBASTIÁN MENDOZA ALVARADO

CI: 010339475-5

DIRECTORA:

Prof. Doctora MARÍA ELENA CAZAR RAMÍREZ

CI: 060224380-0

CUENCA – ECUADOR

2016



Resumen

La presente investigación se planteó reemplazar el uso de insecticidas sintéticos, formulando un champú bioinsecticida de aplicación canina mediante la acción biocida del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* Mill (Altamisa).

La planta se recolectó en las laderas del río Tomebamba, cercanas al Campus Balzay de la Universidad de Cuenca Parroquia San Joaquín. La recolección se realizó durante los meses de Enero a Marzo del 2016. El desarrollo y formulación del producto se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

La obtención del aceite esencial de *A. arborescens* se realizó mediante hidrodestilación por el método Clevenger, con un rendimiento del 0,14%. La actividad biocida se estableció en un ensayo "in vitro" ante el nematodo *Panagrellus redivivus*, determinándose la dosis letal (DL₅₀) de 250 uL/mL. Debido a la moderada DL₅₀ y bajo rendimiento, se planteó como estrategia, determinar el DL₅₀ del extracto orgánico de *A. arborescens*, el cual se obtuvo mediante una extracción con metanol, consiguiendo un rendimiento del 2 % y DL₅₀ de 31,25 uL/mL. De acuerdo a estos resultados se procedió a realizar pruebas en pulgas de perros (*Ctenocephalides canis*) con el extracto de *A. arborescens*, estableciendo una efectividad del 100 % a la concentración de 46,875 mg/mL en el periodo de tiempo más corto, siendo esta la dosis aplicada para la formulación del champú. El extracto metanólico de *A. arborescens* presentó elevada actividad biocida, comparado con el aceite esencial. Esta sustancia activa es promisoría en la formulación de bioinsecticidas para mascotas.

Palabras Claves: Ambrosia Arborescens, Altamisa, Bioinsecticidas, Insecticidas Sintéticos, Aceite Esencial, Hidrodestilación, Extracción Solvente Volátil, Formulación Bioinsecticida, Metabolitos Secundarios, Champú Canino, Dosis Letal DL₅₀, Pruebas In vitro, Pruebas In vivo.

**Abstract.**

The aim of the present work was to replace the use of synthetic insecticides in the formulation of a bio-insecticide dog shampoo. For this purpose we studied the essential oil of *Ambrosia arborescens* Mill. (Altamisa).

The plant material was collected at the shore of Tomebamba River, in the surroundings of Balzay Campus, Universidad de Cuenca, San Joaquin Parrish. The development of the product was performed at the Biotechnology Laboratory of the Chemical Sciences Faculty, Universidad de Cuenca.

The essential oil was extracted by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus. The yield obtained was 0.14%. LD₅₀ was tested by means of an "in vitro" test against the nematode *Panagrellus redivivus*. The essential oil displayed a LD₅₀ of 250 µL/mL). Due to the modest results regarding extraction yield and LD₅₀ we obtained an organic extract from aerial parts of *A. arborescens*. The extraction with methanol produced significantly better results (yield of 2%, LD₅₀ 31,25 µL/mL. Furthermore, the extract was tested in dog fleas (*Ctenocephalides canis*). In this test the extract displayed 100% effectivity at a concentration of 46,875 mg/mL at the shortest action time. The methanolic extract of *A. arborescens* displayed the highest biocide activity, compared with the essential oil. This active substance is promising for bioinsecticide formulations for pets.

Palabras Claves

Ambrosia Arborescens, Altamisa, Bioinsecticidas, Insecticidas Sintéticos, Aceite Esencial, Hidrodestilación, Extracción Solvente Volátil, Formulación Bioinsecticidad, Metabolitos Secundarios, Champú Canino, Dosis Letal DL50, Pruebas In vitro, Pruebas In vivo.

**CONTENIDO**

Capítulo I	11
1.1 Introducción	11
1.2 Objetivo General	12
1.3 Objetivos específicos	12
Capitulo II	13
Revisión Bibliográfica	13
2.1 Insecticidas	13
2.2 Bioinsecticidas	16
2.3 Generalidades sobre el Metabolismo Vegetal	19
2.3.2 Metabolismo Secundario	20
2.4 <i>Ambrosia Arborescens</i> Mill	22
2.4.3 Composición Química del Aceite esencial y extracto de <i>A. arborescens</i>	24
2.5 Ectoparásitos en perros	26
2.5.2 Las Pulgas	27
2.6 Champú Canino	30
2.6.2 Componentes del Champú	30
2.6.5 Normativas Vigentes para Champú Canino	36
Capitulo III	37
Metodología Experimental	37
3.1 Identificación Botánica de <i>A. arborescens</i>	37
3.2 Recolección de material vegetal	37
3.3 Tratamiento Previo del material vegetal	38
3.4 Obtención del aceite Esencial de <i>A. arborescens</i>	40
3.4.1 Hidrodestilación Método Clevenger	40
3.5 Acción biocida del Aceite esencial de <i>A. arborescens</i> expresada como DL ₅₀	42
3.5.1 Ensayo de actividad Nematicida	42
3.6 Estrategia para la Formulación Bioinsecticida Canina	45
3.7 Obtención del extracto de <i>A. Arborescens</i>	45
3.7.1 Extracción con solvente volátiles	45
3.8 Ensayos cromatográficos en el extracto metanólico de <i>A. arborescens</i>	47
3.9 Acción biocida del extracto de <i>A. arborescens</i> expresada como DL ₅₀	48
3.10 Acción biocida del extracto de <i>A. arborescens ante ctenocephalides canis</i>	49
3.11 Formulación del Champú Bioinsecticida Canino de <i>A. Arborescens</i>	51
3.12 Prueba in Vivo acción bioinsecticida del Champo Canino	53



Capitulo IV	56
Resultados	56
4.1 Obtención y rendimiento del Aceite Esencial de <i>A. arborescens</i>	56
4.2 Acción biocida del Aceite esencial de <i>A. arborescens</i> , expresada como DL ₅₀	57
4.3 Obtención y rendimiento del Extracto de <i>A arborescens</i>	57
4.4 Resultados ensayos cromatográficos en el extracto metanólico de <i>A. arborescens</i>	58
4.5 Acción biocida del extracto de <i>A. arborescens</i> , expresada como DL ₅₀	58
4.6 Acción biocida del extracto de <i>A. arborescens</i> ente <i>ctenocephalides canis</i>	¡Error!
	Marcador no definido.
4.7 Efectividad del Champú Bioinsecticida Canino de extracto de <i>A. arborescens</i>	59
Capitulo V:	61
Discusión	61
Conclusiones	64
Bibliografía	66



Índice de Tablas

Tabla Nº 1 Ejemplos de Insecticidas, nombre y año de introducción.	14
Tabla Nº 2 Clasificación de los Insecticidas Sintéticos.....	15
Tabla Nº 3 Ejemplos de Plantas con características bioinsecticida	17
Tabla Nº 4 Clasificación de los Terpenos.....	21
Tabla Nº 5 Componentes del Aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	25
Tabla Nº 6 Componentes del Champú Bioinsecticida Canino	34
Tabla Nº 7 Concentraciones del extracto de <i>A. arborescens</i> utilizadas in prueba in vitro.....	50
Tabla Nº 8 Formula del Champú canino Bioinsecticida a partir del extracto de <i>A. arborescens</i> ..	52
Tabla Nº 9 Condiciones y volumen obtenido de aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	56
Tabla Nº 10 Rendimiento en la obtención de aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	56
Tabla Nº 11 Resultados del ensayo DL 50 del Aceite esencial de <i>A. arborescens</i>	57
Tabla Nº 12 Condiciones y cantidad obtenida de extracto de <i>A. arborescens</i>	57
Tabla Nº 13 Rendimiento en la obtención de extracto de <i>A. arborescens</i>	57
Tabla Nº 14 Resultados del ensayo DL 50 del extracto de <i>A. arborescens</i>	58
Tabla Nº 15 Resultados de la Prueba in vitro del extracto de <i>A. arborescens</i>	59

Índice de Figuras

Fig. Nº 1 Componentes del Extracto de <i>A. arborescens</i>	26
Fig. Nº 2 Ciclo de vida de la Pulga.....	28
Fig. Nº 3 Estructura de butil hidroxi tolueno y butil hidroxi anisol	32
Fig. Nº 4 <i>Ambrosia arborescens</i> . Hojas y Flores.....	37
Fig. Nº 5 Selección – <i>A. arborescens</i>	39
Fig. Nº 6 Triturado – <i>A. arborescens</i>	39
Fig. Nº 7 Hidrodestilador / Cleverger.....	41
Fig. Nº 8 Ensayo de actividad Nematicida	45
Fig. Nº 9 Obtención de Extracto de <i>A. arborescens</i>	47
Fig. Nº 10 Prueba in vitro de extracto del <i>A. arborescens</i>	51
Fig. Nº 11 Elaboración Champú canino Bioinsecticida de <i>A. arborecens</i>	53
Fig. Nº 12 Prueba in Vivo acción bioinsecticida del Champo Canino	55
Fig. Nº 13 Resultados ensayos cromatográficos en el extracto metanólico de <i>A. Arborescens</i> ...58	
Fig. Nº 14 Efectividad del Champú canino Bioinsecticida de <i>A. arborecens</i>	60



Felipe Sebastián Mendoza Alvarado, autor de la tesis "FORMULACIÓN BIOINSECTICIDA A PARTIR DEL ACEITE ESENCIAL DE *AMBROSIA ARBORESCENS* MILL (ALTAMISA) DE APLICACIÓN CANINA", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Químico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor

Cuenca, 22 de junio de 2016

Felipe Sebastián Mendoza Alvarado

C.I: 0103394755

Felipe Sebastián Mendoza Alvarado



Felipe Sebastián Mendoza Alvarado, autor de la tesis "FORMULACIÓN BIOINSECTICIDA A PARTIR DEL ACEITE ESENCIAL DE *AMBROSIA ARBORESCENS* MILL (ALTAMISA) DE APLICACIÓN CANINA", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 22 de junio de 2016

Felipe Sebastián Mendoza Alvarado

Felipe Sebastián Mendoza Alvarado



DEDICATORIA

La presente investigación está dedicada a mi hija Amelia Sofía, luz de mi vida, a mi familia y de manera especial a mi madre por su apoyo incondicional y sacrificio diario.



AGRADECIMIENTOS

A mi familia, maestros y amigos por el apoyo permanente, durante mi carrera Universitaria.

A la Ing. Nataly Álvarez y al Ing. Juan José Vázquez por su valiosa amistad, colaboración y apoyo.

De manera especial a la Dra. María Elena Cazar por su entrega y dedicación durante el desarrollo de la presente investigación.

A todos muchas gracias por su apoyo.



CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Las pulgas son ectoparásitos, que afectan directa e indirectamente a los animales y al hombre, siendo el mayor vector de enfermedades en los perros y transmisores al hombre de enfermedades tales como: peste bubónica (*Yersinia pestis*), tifus (*Rickettsia thypi*), dipilidiosis (*Dipylidium caninum*), etc. (Andrango & Morales, 2013). Actualmente se hace uso de varios tipos de insecticidas sintéticos que controlan y/o eliminan a estos ectoparásitos.

El uso abusivo de los insecticidas sintéticos tales como organofosforados, carbamatos, traen diversas consecuencias negativas en el medio ambiente, contaminándolo y afectando directamente al hombre. (Devine, 2008)

Las mascotas y el hombre al estar en contacto prolongadamente con los insecticidas sintéticos se exponen a adquirir efectos negativos permanentes. La Organización Mundial de la Salud estima que aproximadamente 20 000 personas mueren anualmente como resultado de la exposición a insecticidas, sin embargo, estos compuestos químicos también protegen la agricultura y la salud pública. (OMS, 2009)

El impacto negativo causado por el uso abusivo de insecticidas sintéticos obliga a buscar nuevas alternativas de manejo de insectos plaga. Se considera a las plantas, una amplia línea de investigación de nuevos compuestos de acción bioinsecticida de gran potencial, los cuales tienen menor impacto ambiental (Cortez, 2011).

Los bioinsecticidas son productos de origen natural, que sirven para el control de insectos, son menos agresivos contra el medio ambiente y no son tóxicos para animales, plantas o ser humano (Devine, 2008).



Ambrosia arborescens Mill (Altamisa) es una planta autóctona dispersa en nuestra zona, a la cual se le atribuye propiedades medicinales, antibacterianas e insecticidas (Vera, 2008). Mediante la aplicación de la acción bioinsecticida del aceite esencial de *A. arborescens*, se pretende eliminar estos ectoparásitos y sustituir el uso de insecticidas sintéticos, planteando una eficiente alternativa.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Formular un champú bioinsecticida a partir del aceite esencial de *Ambrosia Arborescens* Mill “Altamisa” de aplicación canina.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer aceite esencial de la planta *A. arborescens* para el uso en la formulación bioinsecticida y determinar su rendimiento.
- Determinar la dosificación correcta del aceite esencial, la cual tenga una tolerabilidad local sobre la piel canina.
- Formular una combinación apropiadas de agentes tensoactivos del champú y aceite esencial de *A. arborescens*, con el fin de lograr alta efectividad en la limpieza y efecto bioinsecticida.
- Determinar efecto residual de la formulación en los perros.



CAPITULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 INSECTICIDAS

Un insecticida es una clase de plaguicida de origen sintético o natural; es un producto fitosanitario empleado para controlar o eliminar insectos, generalmente por la inhibición de enzimas. Esta palabra proviene del latín y significa matar insectos (Cortez, 2011).

Los insecticidas se utilizan en agricultura, ganadería, construcción, veterinaria, medicina, control de plagas o para eliminar todo organismo que afecte la salud humana y animal (Devine, 2008).

2.1.1 Desarrollo de Insecticidas Sintéticos

Desde épocas tempranas y desarrollo del hombre, se tuvo la necesidad de combatir las plagas que afectaban sus cultivos y productos. Los primeros compuestos naturales de acción insecticida fueron sustancias provenientes de productos naturales tales como los piretroides, rotenoides y nicotinoides (Cortez, 2011).

Al comienzo de la Primera Guerra Mundial (1914), se utilizaban compuestos arsenicales, aceites de petróleo, nicotina, piretro, rotenona, azufre, gas de cianuro y criolita como insecticidas (Mondragón, 2002). La Segunda Guerra Mundial (1939) abrió la era de los productos químicos con la introducción de productos sintéticos tales como insecticidas orgánicos. El primero de éstos fue el Dicloro difenil tricloroetano (DDT), su acción insecticida fue descubierta por el químico suizo Paul Müller en 1939. Su comercialización en los EE.UU. fue autorizada en 1945, expandiéndose rápidamente al resto del mundo e iniciándose la búsqueda de múltiples compuestos análogos. En el año 1998 la Agencia de Protección Ambiental

de los EE.UU. tenía registrados 20.000 productos comerciales plaguicidas (Ramirez & Lacasaña, 2011).

Tipos de Insecticidas	Ejemplos	Año
Piretrinas	Piretrum	1850s
Roteno	Derris	1850s
Nicotina	Nicotina	1930s
Organoclorados	DDT	1943
Ciclodieno Organoclorados	Clordano	1945
Organofosforados	Malation	1950
Piretroides	Alletrin, Cipermetrina	1952
Carbamatos	Carbaryl	1956
Especies de bacillus	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1961
Avermectin	Abacmetin	1985
Neonicotinoides	Imidacloprid,	1991
Inhibidores del desarrollo	Fenoxicard	1993
Fenilpirazoles	Fipronil	1993
Indoxacarb	Indoxacarb	2000

Tabla N° 1 Ejemplos de Insecticidas, nombre y año de introducción.

Fuente: (IRAC, 2016)

2.1.2 Clasificación de Insecticidas Sintéticos

Los insecticidas de síntesis se clasifican según varios criterios (Tabla N° 2).

Clasificación	Tipo	Ejemplos
Principio químico activo	Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
	Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión
	Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
	Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
	Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permetrín
	Derivados biperidilos	Cloromequat, diquat, paraquat
	Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, piclram, silvex
	Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
	Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn,
	Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, dowco, plictrán
	Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo Rotenona,
Compuestos de origen botánico	Nicotina, aceite de canola	

Clasificación	Tipo	Ejemplos
Persistencia al medio ambiente	No persistentes: De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
	Moderadamente persistentes: De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
	Persistentes: De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
	Permanentes: Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico
Modo de acción	Ingestión: a través de las plantas que han incorporado a su sistema vascular el producto	
	Contacto: por acción del insecticida directamente sobre el organismo blanco	
	Ingestión y Contacto: es la acción sinérgica de los dos anteriores.	
	Sistémico: Ingresa al organismo del insecto, actuando de diversas maneras en alguno de sus metabolismos	

Tabla Nº 2 Clasificación de los Insecticidas Sintéticos

Fuentes: (Ramirez & Lacasaña, 2011) (IRAC, 2016).

2.1.3 Características Ideales de los Insecticidas

- **Gran especificidad:** El producto solo ataca a la plaga objeto de eliminación, dejando indemnes al resto de seres vivos y al medio ambiente.
- **Baja toxicidad en humanos y resto de fauna:** Este es un factor determinante, al ser de baja toxicidad disminuye el impacto al ecosistema.
- **Baja dosis letal:** El insecticida es efectivo con poca cantidad.
- **Bajo coste:** El producto tiene que ser de bajo costo.
- **De característica latente:** El insecticida permanece en el lugar durante un período de tiempo suficiente para interactuar y matar a la población constituyente de plaga a combatir.



- **No persistente ni acumulable.** Debe degradarse sin producir subproductos tóxicos, es decir no ser persistente ni acumularse en los tejidos de los animales, tras haber actuado (DeCarvalho, 2013).

2.1.4 Impacto del uso de los Insecticidas Sintéticos

Los Insecticidas sintéticos han tenido un papel importante en el incremento de la producción agrícola en el control de plagas en los animales (Maggi, 2004). Sin embargo el uso continuo e indiscriminado de estos productos, han causado enfermedades y muertes por envenenamiento a corto y largo plazo, afectado al medio ambiente acumulándose por bioconcentración en los distintos eslabones de la cadena alimenticia, en el suelo y en el agua (Bourguet, 2000). Son responsables de la aparición de poblaciones de insectos cada vez más resistentes a estos productos, lo que ocasiona que se requiera mayor cantidad del insecticida para obtener el efecto deseado (Cortez, 2011), además estos los insecticidas sintéticos al ser poco específicos destruyen los parásitos, predadores naturales y polinizadores, entre otros tantos integrantes del ecosistema, que han visto alterado su ciclo de vida a causa de estos productos (Maggi, 2004).

Desde finales del siglo XX hasta la actualidad, debido a los problemas de toxicidad de los insecticidas sintéticos se investiga y desarrolla productos menos tóxicos y más específicos, como son los “Bioinsecticidas” (DeCarvalho, 2013).

2.2 Bioinsecticidas

Debido a la necesidad de hallar una nueva alternativa para el control de insectos plagas y sustituir así los insecticidas sintéticos aparecen los bioinsecticidas (Maggi, 2004). El término bioinsecticida se utiliza para los productos utilizados en la eliminación o control de insectos, cuyo origen puede ser microbiano (hongos,

bacteria, virus) o bioquímico (origen vegetal) (Saenz, 2012). Se diferencian de los insecticidas sintéticos en su origen natural, son menos agresivos contra el medio ambiente, no suelen ser tóxicos para organismos superiores y plantas (Devine, 2008).

2.2.1 Desarrollo de Bioinsecticidas a partir del metabolismo vegetal

En Europa y en América hay diferentes reportes de plantas de las cuales se notifica efectos contra ectoparásitos del ganado, perros y gatos. Siendo estos remedios “tradicionales” o “caseros”, la mayoría de estos no han sido analizados por métodos científicos para el desarrollo de plaguicidas, los cuales deben estar enfocados en la eficacia y seguridad para el humano y animales (Junquera, 2015).

Las características bioinsecticidas o antibacterianas se deben a los diferentes metabolitos producidos por las plantas. A continuación se citan ejemplos de plantas con actividad bioinsecticida.

Planta Especie	Nombre Común
<i>Acorus calamus</i>	Cálamo aromático
<i>Actaea spicata</i>	Cimífuga
<i>Ambrosia arborescens</i> Mill	Altamisa, Marco
<i>Amorpha fruticosa</i>	Falso índigo del desierto
<i>Citrus maxima</i>	Pomelo, Pamplémusa
<i>Juglans nigra</i>	Nogal negro
<i>Menta piperita</i>	Piperita, monte yuyo, toronjil de menta
<i>Origanum minutiflorum</i>	Orégano salvaje
<i>Ricinus communis</i>	Ricino
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo

Tabla Nº 3 Ejemplos de Plantas con características bioinsecticida

Fuente: (Borgaud, 2001).



2.2.2 Mecanismo de acción de los Bioinsecticidas

Los mecanismos de acción de los bioinsecticidas son los siguientes:

2.2.2.1 Reguladores de Crecimiento.

Son aquellas sustancias que alteran la función de las hormonas que regulan la metamorfosis dando una como resultado una metamorfosis precoz, produciendo insectos con malformaciones, estériles o muertos (Silva, 2007).

2.2.2.2 Inhibidores de la Alimentación

Son aquellas sustancias que luego de una pequeña prueba, el insecto deja de alimentarse y muere por inanición. Muchos de las sustancias que muestran esta actividad pertenecen al grupo de los terpenos, aislados principalmente de plantas de origen de África y la India (Maggi, 2004).

2.2.2.3 Repelentes

Se da en el caso de sustancias que tienen mal olor o efectos irritantes como el ají (*Capsicum annunum*), Ajo (*Allium sativum*), Hinojo (*Foniculum vulgare*), Ruda (*Ruta graveolens*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (Maggi, 2004).

2.2.2.4 Veneno de contacto

Mata al insecto plaga por acción directa al entrar en contacto con el mismo (Fernandez, 2009).

2.2.2.5 Confusores.

Producen una señal inequívoca para el insecto de poder encontrar su fuente de alimento, de modo que el insecto tiene fuentes de estímulo y no es capaz de reconocer la planta que nos interesa proteger (Espinoza, 2008).



2.2.3 Ventajas y desventajas en el uso de Bioinsecticidas

2.2.3.1 Ventajas

- Los bioinsecticidas, son seguros y no afectan a personas, animales, plantas ni insectos benéficos como los polinizadores.
- No generan resistencia. Los insectos difícilmente pueden desarrollar resistencias, a los bioinsecticidas.
- Son de gran especificidad. Algunos bioinsecticidas son muy específicos, y solo atacan a una sola especie de insecto.
- Son biodegradables, por lo cual no contaminan el medio ambiente, su impacto ambiental es muy bajo.
- Actúan sobre el insecto a muy baja concentración (Fernandez, 2009).

2.2.3.2 Desventajas

- Compiten con los insecticidas sintéticos cuyos resultados son más evidentes y rápidos, pero los bioinsecticidas colaboran con la sustentabilidad de los recursos del ecosistema.
- Algunos actúan inhibiendo el desarrollo normal de los insectos, lo que los hace tener una acción más lenta.
- Se degradan por los rayos UV por lo que su efecto residual es bajo.
- No hay registros oficiales que regulen su uso (Fernandez, 2009).

2.3 GENERALIDADES SOBRE EL METABOLISMO VEGETAL

Las plantas son seres vivos autótrofos, que biosintetizan una gran cantidad de sustancias químicas complejas a partir de otras más simples o viceversa, se considera a las plantas como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Las plantas además del metabolismo primario presente en todos los



seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa (Garcia & Perez, 2009).

Los metabolitos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario, pero sí tienen una implicación ecológica como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias (Borgaud, 2001).

2.3.1 Metabolismo Primario

En el metabolismo primario se sintetizan compuestos esenciales: aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos. Los metabolitos primarios son de presencia universal en todas las especies vegetales, desempeñan funciones en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes y transporte de solutos (Garcia & Perez, 2009).

2.3.2 Metabolismo Secundario

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía, a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas las cuales se denominan metabolitos secundarios. (Garcia & Perez, 2009). No todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. (Silva, 2007), se sintetizan en pequeñas cantidades a menudo su producción está restringida a un género o especie de plantas (Garcia & Perez, 2009). Se agrupan en los siguientes grupos:

2.3.2.1 Terpenoides: Son una amplia y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno, hidrocarburo de 5 átomos de carbono. Más de 40.000 diferentes terpenoides han sido aislados de plantas (Roberts, 2007). Se usan comercialmente como aromas, en alimentación, cosmética, por sus propiedades anticarcinogénicas y antimicrobianas (Garcia & Perez, 2009).

Se clasifican según el número de unidades de isopreno presentes, según Tabla N° 4.

Isopreno (5 C)	Nombre	Total de Carbonos
2	Monoterpenos	10
3	Sesquiterpenos	15
4	Diterpenos	20
6	Triterpenos	30
8	Tetraterpenos	40
> 20	Politerpenos	> 100

Tabla N° 4 Clasificación de los Terpenos

Fuente: (Roberts, 2007)

2.3.2.2 Compuestos fenólicos (fenilpropanoides) y sus derivados: Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, denominados compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides (Garcia & Perez, 2009). Cumplen diversas funciones como defensa de las plantas contra herbívoros, patógenos o plantas competidoras, soporte mecánico, atracción de polinizadores, dispersantes de frutos (Llerena, 2011). Los fenilpropanoides se clasifican principalmente en Ligninas, Lignanós, Suberinas, Flavonoides, Coumarinas, Furanocoumarinas Estilbenos.

2.3.2.3 Compuestos nitrogenados y alcaloides:

- **Alcaloide:** Los alcaloides son una extensa familia de aproximadamente 15.000 metabolitos secundarios, se sintetizan a partir de aminoácidos, como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina (Sepúlveda, 2004). Tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. A dosis altas casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto



valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos (García & Pérez, 2009).

- **Glicósidos:** Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés (Llerena, 2011).
 - **Saponinas:** Son estructuras formadas por una parte glusídica y una parte no glusídica (aglicón) y su nombre se debe a sus propiedades jabonosas (Martínez, 2003).
 - **Glicósidos cardiacos:** Son semejantes a las saponinas, poseen propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona (García & Pérez, 2009).
 - **Glicósidos cianogénicos:** Son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN) (Llerena, 2011).

2.4 *AMBROSIA ARBORESCENS* MILL

Ambrosia arborescens Mill, perteneciente al género *Ambrosia*, es conocida en la Sierra Sur Ecuatoriana como “Altamisa” o “Marco”. Las especies de *Ambrosia* pertenecen a la familia de las *Asteraceae*, son plantas aromáticas, poseen propiedades medicinales difundidas entre los pobladores de nuestra región (Vera, 2008).

2.4.1 Descripción Botánica *Ambrosia arborescens*



Grupo botánico: Dicotiledoneae

Familia: Asteraceae

Género: *Ambrosia*

Especie: *Arborescens* Mill

Nombre Común: Altamisa o Marco

Arbusto verde sufrútices o hierbas de 0,5 – 3 metros; toda la planta con glándulas, aromática. Muy abundante, a veces considerado como una mala hierba. Se localiza en terrenos baldíos, acequias, zonas de vegetación tupida y a lo largo de los caminos de la sierra ecuatoriana.

Poseen hojas alternas, pinnatidisectas, flores masculinas y femeninas en cabezuelas separadas a menudo en la misma planta.

Cabezuelas masculinas en espigas o racimos terminales; involucreo cupuliforme, brácteas lateralmente connatas; receptáculo con páleas.

Flores masculinas modificadas, cáliz o vilano ausente, corola hialina, campanulada, 5-lobulada; estambres 5 alternado con los lóbulos de la corola; pistilodio reducido. Cabezuelas femeninas en grupos axilares en las hojas y sosteniendo los racimos masculinos; brácteas unidas y formando un receptáculo en forma de vaso; ápices de las brácteas espiniscentes, brácteas arregladas en varias formas o dispersas en el involucreo durante la fructificación; páleas ausentes; una a pocas flores.

Flores femeninas reducidas, perianto ausente, androceo ausente; ovario maduro obovado, estilo corto, estigma lobulado, superficies estigmáticas papilosas, exertas a través de los ápices espinosos del involucreo. Aquenios prismáticos, con pelos uniseriados, formando complejos con el involucreo (Vera, 2008).

2.4.2 Usos Tradicionales de *Ambrosia arborescens*

Es tradicionalmente aprovechada por sus usos medicinales ante: enfriamientos, reumatismo, desordenes menstruales, menorrea, migraña, parásitos, dolor de la cabeza, úlceras, fiebre, hemorroides, salpullido y pata tratar cuadros nosológicos propios del mundo andino (hechizos, espanto, mal aire) Además posee propiedades antisépticas, antiparasitarias, insecticidas, fungicidas (Navarrete & De la Torre, 2008).

2.4.3 Composición Química del Aceite esencial y extracto de *A. arborescens*

En el año 2009 se realizó una evaluación agroindustrial del aceite esencial de Altamisa en el Centro Experimental CEUNP, de la Universidad Nacional de Colombia. Para esto se realizó la extracción mediante arrastre de vapor y se determinó la composición química del aceite por cromatografía de gases, (tabla N° 5) (Saldarriaga, Sanchez, & Bonilla, 2010).

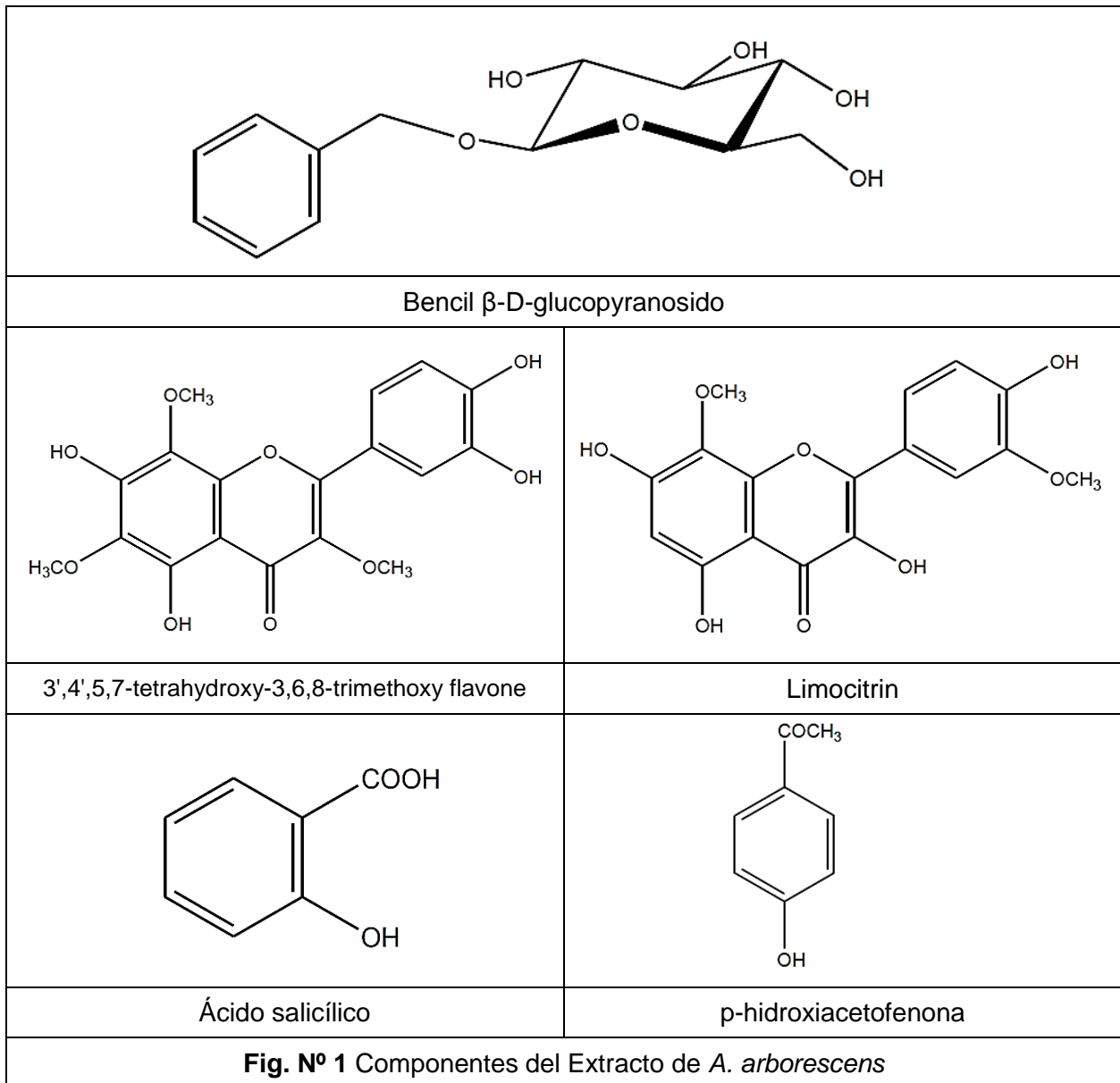
Compuesto	Cantidad relativa %
β -Himachaleno	53,98
<i>trans</i> - β -Guaieno	14,60
γ -Bisaboleno	5,22
Fitol	4,28
α -Bisabolol + N.I.	3,34
Crisantenona	2,89
N.I.	2,37
Metil eugenol	1,71
N.I.	1,54
Sesquiterpenoide	1,05
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1,04
β -Farneseno	1,03
endo- Borneol	0,85
Elemicina + Germacreno B*	0,82
β -Sesquifelandreno	0,67

Compuesto	Cantidad relativa %
Sesquiterpeno C ₂₀ H ₃₂ *	0,67
α-Farneseno	0,62
Sesquiterpenoide C ₁₅ H ₂₆ O (Cubenol*)	0,61
Alcanfor	0,57
Pulegona	0,44
N.I.	0,44
Sesquiterpenoide C ₁₅ H ₂₄ O	0,40
Sesquiterpenoide C ₁₅ H ₂₄ O	0,33
α-Gurjuneno	0,32
Sesquiterpenoide C ₁₅ H ₂₄ O	0,23

* Identificado tentativamente N.I.: No identificado

Tabla Nº 5 Componentes del Aceite esencial de *A. arborescens*

En la Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí (Pichincha - Ecuador), se realizó un estudio químico y biológico en base a cuatro extractos de la planta objeto del presente estudio, obtenidos con solventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo, cloroformo – metanol y metanol. Este estudio fitoquímico condujo al aislamiento y completa caracterización de 5 sesquiterpeno lactonas y 5 compuestos fenólicos: bencil β-D-glucopiranosido (C₁₃H₁₈O₆), 3',4',5,7-tetrahydroxy-3,6,8-trimethoxy flavona (C₁₈H₁₆O₉), limocitrina (C₁₇H₁₄O₈), ácido salicílico (C₇H₆O₃), p-hidroxiacetofenona (C₈H₈O₂), entre los cuales dos pertenecen al grupo de los flavonoides (3',4',5,7-tetrahidroxi-3,6,8-trimetoxi flavona, limocitrina). (Vera, 2008)



2.5 ECTOPARÁSITOS EN PERROS

2.5.1 Introducción

Los ectoparásitos son parásitos que se hospedan en la piel de un animal, se alimentan de descamaciones cutáneas (queratina de la piel) y de su sangre.

Provocan daños directamente por pérdida de sangre e irritación cutánea. Los parásitos externos o ectoparásitos abarcan un amplio abanico de artrópodos parásitos, que son:



- Ácaros: (garrapatas y ácaros)
- Insectos: (pulgas, piojos picadores y chupadores, mosquitos, moscas y flebótomos (ESCCAP, 2010).

2.5.2 Las Pulgas

Las pulgas son vectores de enfermedades sistémicas graves para los animales, pueden tener un marcado efecto en perros provocando infestaciones continuas, dermatitis alérgica y parasitosis como la Dipylidiosis. En las personas, las mordeduras de estos parásitos suele causar reacciones alérgicas a la saliva de la pulga e irritaciones de la piel (Bayer, 2014).

La infestación masiva de estos insectos con frecuencia se debe a los siguientes factores:

- Los recintos provistos de calefacción y alfombras, proporcionan condiciones ideales para el desarrollo de las pulgas.
- Presencia de un gran número de animales domésticos.
- Falta de medidas de desinfección al observar síntomas de infestación en animales domésticos.
- Carencia de medidas de desinfección de ambientes asociadas a la desparasitación de animales.

Las pulgas viven aproximadamente 50 días. Ciertos factores pueden aumentar o reducir su longevidad, como son la temperatura, humedad en el ambiente, el aseo corporal de las mascotas, uso de collares. Las pulgas adultas no abandonan voluntariamente a su hospedante, se quedan en él hasta morir, fuera del animal mueren a los pocos días (Pinedo, 2012).

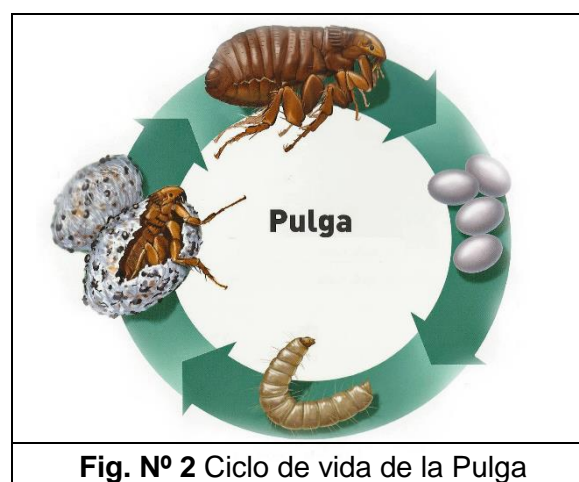
2.5.2.1 Morfología de las Pulgas

Las pulgas constituyen el ectoparásito más frecuente del perro. Son insectos achatados lateralmente, con un tamaño de 3,5 mm como máximo, pueden dar saltos de hasta 30 cm. de altura, por ello, se traspasan con facilidad de un animal a otro. Se alimentan de la sangre de los animales sobre los que viven. De las más de 2000 especies de pulgas que existen en el mundo, para el perro sólo son importantes la pulga del gato (*Ctenocephalides felis*) y la pulga del perro (*Ctenocephalides canis*) (Pinedo, 2012).

Las pulgas con su aparato bucal incisivo-chupador, pueden absorber un volumen de sangre entre 10 y 20 veces superior al volumen de su propio estómago. La mayor parte se evacua de inmediato y se encuentra en forma de diminutos cilindros rojo-parduzcos en la piel y en la cama del perro (ESCCAP, 2010).

La copulación de las pulgas tiene lugar sobre el animal huésped. Uno o dos días después del primer acto de succión, las hembras empiezan a producir huevos blancos. En condiciones favorables, las hembras pueden poner más de 100 huevos diarios (Bayer, 2014).

2.5.2.2 Ciclo de vida de las Pulgas



(ESCCAP, 2010)



Los huevos de la pulga se depositan al azar en el entorno donde el animal huésped habite. En función de las condiciones ambientales, las larvas blancas, eclosionan al cabo de 1 a 10 días, evitan la luz y se arrastran hasta las grietas, fisuras, textiles y fibras de alfombras, se alimentan de la sangre evacuada por las pulgas adultas, siendo fundamental esta para su desarrollo. De un período entre 5 y 14 días mudan dos veces, transformándose en crisálidas, que son la tercera larva de color parduzco y 5 mm de longitud, dentro de un capullo tejido por ellas mismas.

El desarrollo dentro del capullo dura entre 5 y 19 días; periodo en el que la pulga se encuentra muy bien protegida dentro del capullo. La pulga adulta, totalmente desarrollada, permanece dentro del capullo y no eclosiona hasta que no recibe un estímulo exterior como el peso del animal hospedante cuando se acuesta sobre su cama o cuando una persona pisa una alfombra infestada con estos parásitos. Sin estos estímulos, la pulga adulta puede resistir hasta 5 meses en el capullo (Bayer, 2014) (ESCCAP, 2010).

2.5.2.3 Diagnóstico de la infestación de pulgas

Una plaga de pulgas en perros no se detecta rápidamente ya que estos insectos son diminutos y su anatomía les permite moverse con facilidad por la piel de la mascota, sobre todo si el perro tiene pelaje largo. Las mascotas están infestadas de pulgas cuando se rascan repetidamente, muerden, están inquietos y presentan alteraciones cutáneas en la inserción de la cola o región abdominal (ESCCAP, 2010). Empleando un peine especial para pulgas se suelen descubrir a menudo las pulgas o sus excrementos en forma de pequeños grumos pardo-rojizos. Al depositar los residuos colectados sobre un papel filtro humedecido forma una mancha pardo-rojiza de hemoglobina alrededor de la partícula de excremento (Pinedo, 2012).



2.6 CHAMPÚ CANINO

2.6.1 Etimología de la palabra Champú

La palabra champú es un anglicismo de la palabra shampoo, que data de 1762, se documenta por primera vez en español a principios del siglo XX. La palabra shampoo procede a su vez del hindi champo, que es un imperativo y viene a significar 'masajea, aprieta'.

2.6.2 Componentes del Champú

Las formulaciones de los champús tradicionales se componen de agentes tensoactivos (limpiadores, espumantes y acondicionadores), así como espesantes, suavizantes, conservantes, perfume, aditivos colorantes o agentes medicinales.

2.6.2.1 Tensoactivos

Los tensoactivos son moléculas dotadas de afinidad dual, tanto para el agua como para el aceite. Se componen de dos partes:

- Hidrofílica "cabeza" , esta molécula se enlaza con el agua
- Lipofílica "cola" envuelve los compuestos oleosos (inclusive los desechos)

Los tensoactivos modifican las propiedades de la superficie de contacto, disminución de la tensión en dicha superficie y estabilización de la misma. Brindan diferentes propiedades al champú como: propiedades espumantes, acondicionantes, estabilidad y tolerabilidad local.

2.6.2.1.1 Tensioactivos Anionicos

Están cargados negativamente en soluciones acuosas debido a la presencia de sales de ácidos grasos (jabones) y grupos sulfato, sulfonato, carboxilato o fosfato. Estos compuestos poseen propiedades limpiadoras suaves, espumantes



favorables y son bien tolerados por la piel. Suelen utilizarse en combinación con tensoactivos no iónicos y anfóteros para mejorar su tolerancia local.

2.6.2.1.2 Tensioactivos Catiónicos

Los tensoactivos catiónicos están cargados positivamente en soluciones acuosas, entre ellos se encuentran las sales de amonio cuaternario, las sales de alquilamina, las sales de alquilpiridinio y los aminóxidos.

Sus propiedades limpiadoras y espumantes son débiles, poseen la capacidad de mejorar su textura y volumen del pelo, son utilizados como acondicionadores.

2.6.2.1.3 Tensioactivos no iónicos

Son tensoactivos suaves, resistentes a las variaciones en el pH y compatibles con tensoactivos aniónicos y catiónicos. Destacan los ésteres de glicol, ésteres de ácidos grasos, las alcanolamidas, los derivados polietoxilados. Se utilizan frecuentemente en combinación con tensoactivos aniónicos y catiónicos para mejorar la tolerancia local del champú.

2.6.2.1.4 Tensioactivos Anfóteros

Son moléculas muy específicas que se comportan como tensoactivos aniónicos o catiónicos en función del pH de la fase acuosa. Son aniónicos en presencia de $\text{pH} > 7$ y catiónicos en presencia de $\text{pH} < 7$ (Carlottl, 2006).

2.6.2.2 Espesantes

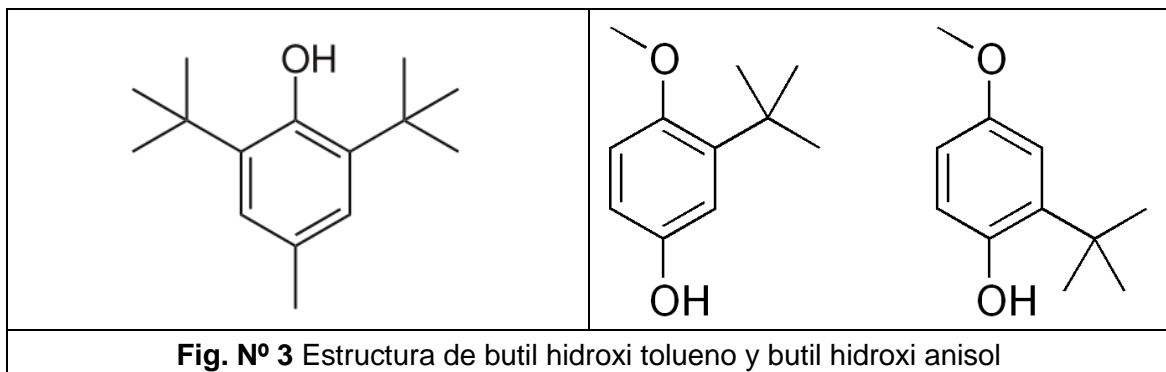
Es muy importante la viscosidad alta, esto para que tenga mayor estabilidad el producto Manejo. El producto deberá tener una viscosidad entre 400 y 4000 m Pas. Entre los Espesantes más usados tenemos los derivados de Celulosa (goma natural).

2.6.2.3 Suavizantes Humectantes

El excesivo desengrasado que producen se compensa incorporando en la formulación sustancias emolientes y humectantes las cuales son estabilizadoras de la espuma como las amidas grasas como el dietanolamida de ácidos grasos de coco o del ácido láurico.

2.6.2.4 Conservadores

- **Antioxidantes:** Sirven para preservar varios componentes, no deben ser tóxicos, ni tener color, olor, sabor y deben ser neutros. Ej. tocoferoles y derivados, BHT y BHA.



(Chavez, 2013)

- **Antimicrobianos:** Las fórmulas cosméticas pueden ser medio de cultivo. Existen límites de tolerancia en cuanto a concentración microbiana y se exige ausencia de patógenos, como el ésteres del ácido p-hidroxibenzóico.

2.6.2.5 Perfume

Enmascara el olor del resto de componentes de la formulación brindando el suyo propio. Hay que tener en cuenta que puede afectar el pH, estabilidad del producto desde el punto de vista fisicoquímico o microbiológico.



2.6.2.6 Colorantes

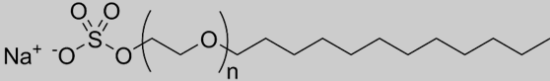
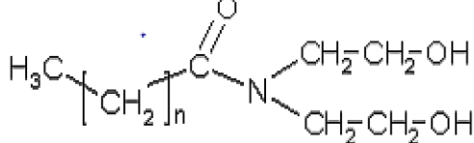
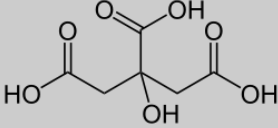
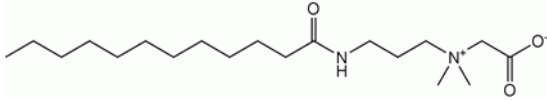
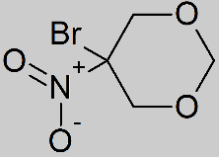
Debe estar en armonía con el perfume. Ambos pueden significar el éxito o fracaso de una formulación. Es lo primero que percibe el usuario. Se deben emplear colorantes autorizados para este fin.

2.6.2.7 Agente Medicinales

Es la Sustancia activa que define la actividad para la cual está formulado el champú, tales como propiedades insecticidas o antibacterianas.

Tabla N° 6 Componentes del Champú Bioinsecticida Canino

Fuente: (QuimiNet, 2013).

Componentes	Características	Formula Estructural
Lauril éter sulfato sódico "Texapon"	Es un tensioactivo aniónico, brinda la espumabilidad y permite mantener en emulsión al champú, es de alta compatibilidad con la piel, capacidad humectante y emulsionante. De ligero olor y color que permite ser perfumado y coloreado,	
Dietanolamida de ácido graso de coco "Comperlan"	Es un tensioactivo no iónico que se utiliza como espesante en preparaciones de tensioactivos, aumentan la viscosidad.	
Ácido Cítrico	Es un ácido orgánico natural débil. Es un polvo blanco de propiedades antioxidantes, conservantes y saborizantes y se utiliza como amortiguador del pH.	
Cocamidopropil Betaina	Es un detergente anfotero que además de poseer propiedades espumantes y limpiadoras es bien tolerado por la piel. Reduce la irritación causada por otros componentes de la fórmula. Es compatible con otros tensioactivos.	
Bronidox	Es un líquido casi transparente apto para la preservación de preparaciones de tensioactivos para cosmética que son posteriormente eliminados en el agua del aclarado	

2.6.3 Generalidades del Champú canino

El champú canino limpia el pelaje y la piel de la mascota, elimina el mal olor, separando el sebo acumulado del pelaje del perro, residuos dejados por la polución y partículas de piel muerta, dejando la piel suave y el pelaje flexible, brillante y fácil de manejar. Al no dar una higiene adecuada a los perros se acumulan de suciedad llegando a causar problemas de salud en las mascotas.

El champú canino presenta propiedades diferentes que el champú para humanos, ya que la piel canina es más sensible que la humana, debido a diferencias anatómicas y fisiológicas entre las que destacan el espesor de estrato córneo (más fino) y el pH de la piel. La piel del perro tiene un pH cercano a 7.5 (alcalino), en la piel humana este valor llega a 5.5 (ácido). La densidad de los folículos pilosos en los perros es más alta, factor que pueden facilitar la penetración cutánea de principios activos.

Debido a las características especiales de la piel del perro es necesario un champú específico, formulado con combinaciones apropiadas de agentes tensoactivos, de manera que el producto adopte propiedades limpiadoras favorables, de tolerabilidad local perfecta sobre la piel canina (Carlotti, 2006)

2.6.4 Mecanismo de Acción del Champú Canino

El pelaje sano tiene una superficie hidrofóbica a la que se adhieren los lípidos, pero que repele el agua. La grasa no es arrastrada por el agua, por lo que no se puede lavar el pelaje sólo con agua. Cuando se aplica champú al pelaje húmedo, es absorbido en la superficie entre el pelaje y el sebo. Los tensoactivos reducen la tensión de superficie y favorecen la separación del sebo del pelaje. La materia grasa (apolar) se emulsiona con el champú y el agua, y es arrastrada junto con la suciedad en el aclarado o enjuague. (López, 2012)



2.6.5 Normativas Vigentes para Champú Canino

El Champú Bioinsecticida Canino se rige a las disposiciones de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro “AGROCALIDAD” y en particular a la resolución 0072 que “*Normaliza el control sobre la comercialización de los Productos Veterinarios*” la misma que se respalda por la Ley de Sanidad Animal (Constitución de la Republica) y en concordancia con la decisión 483 de la Comunidad Andina de Naciones “CAN”. De acuerdo a esta legislación, la formulación a investigar, entra en la categoría de productos veterinarios “Champú medicado”. (AGROCALIDAD, 2016)

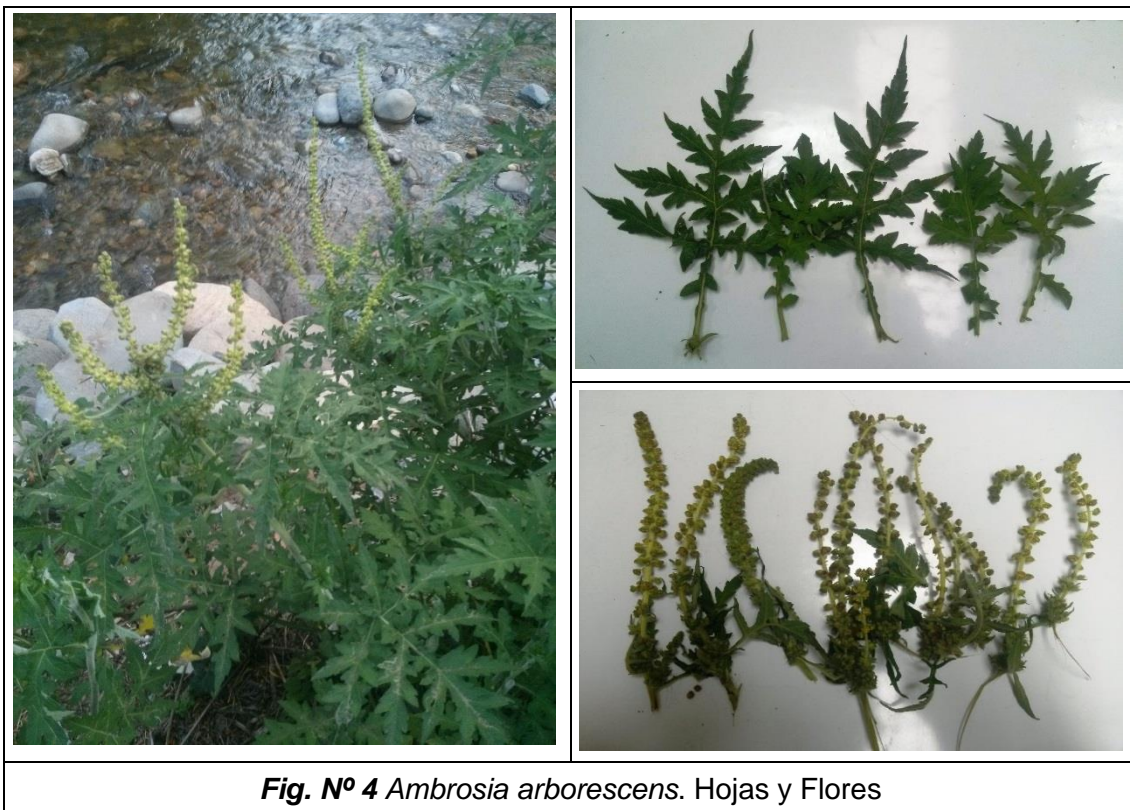
CAPITULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE *A. ARBORESCENS*

La identificación botánica de la planta en estudio se llevó a cabo en el Herbario Azuay perteneciente a la Universidad del Azuay.

Para ello se tomó un voucher de la planta y fue contrastado por sus claves botánicas, siendo identificada como *Ambrosia arborescens* Mill.



Fuente: El autor

3.2 RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

A. arborescens se desarrolla en toda época del año, es una planta la cual no exige cuidados y es de fácil recolección. La recolección de la planta en estudio se realizó en los meses de Enero a Marzo de 2016, en la jornada vespertina de 15h00 -16h00, en las laderas del rio Tomebamba, cercanas al Campus Balzay de la Universidad de Cuenca Parroquia San Joaquín



En la recolección se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- El corte o poda del material vegetal se recomienda realizar cuando la planta no se encuentre húmeda por lluvias.
- Recolectar las partes aéreas de las plantas: hojas, tallos finos y flores.
- No se deben recolectar plantas marchitas o con síntomas visibles de enfermedad, o contaminadas por polvo o residuos de otras especies.
- El corte o poda de la altamisa se debe realizar con cuidado con el fin de no comprometer el desarrollo de la planta.
- Se debe evitar mantener el material vegetal almacenado por más de 24 horas, es recomendable extender sobre hojas de papel absorbente para evitar la contaminación por hongos o a su vez mantener en refrigeración hasta proceder al tratamiento de la planta.

3.2.1 Materiales para la recolección

En la recolección se necesitó los siguientes materiales.

- Tijeras para podar
- Bolsas Plásticas
- Guantes Anti corte
- Etiquetas para identificación

3.3 TRATAMIENTO PREVIO DEL MATERIAL VEGETAL

3.3.1 Selección del material vegetal

Se deben procurar eliminar las partes vegetales marchitas o con signos visibles de enfermedad, ya que podrían contaminar el aceite esencial de la planta con compuestos resultantes del decaimiento o de la defensa química de la planta.

Además, se debe aislar y limpiar cualquier material, agente extraño o residuos de otras plantas.



Fig. Nº 5 Selección – *A. arborescens*

Fuente: El autor

3.3.2 Triturado

Es necesario un proceso de reducción del tamaño del material vegetal, con el fin de ampliar la superficie de contacto del material vegetal y de esta manera maximizar el rendimiento en la obtención del aceite esencial de la *A. Arborescens*. El triturado del material vegetal se realizó en una trituradora marca Holstein de 1400 -1800 rpm.



Fig. Nº 6 Triturado – *A. arborescens*

Fuente: El autor.



3.4 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *A. arborescens*

3.4.1 HIDRODESTILACIÓN MÉTODO CLEVINGER

La hidrodestilación es un proceso conocido y difundido mundialmente que se utiliza para obtener el aceite esencial de una planta aromática. La muestra vegetal preparada es colocada en balón de destilación, en el cual el material vegetal entra en contacto íntimo con el agua que al calentarse, mediante manto calefactor, genera una corriente de vapor saturado y la esencia así es arrastrada (Gonzales, 2004). Los vapores se conducen por tubos comunicantes de vidrio pasando luego a un sistema de condensación, el cual utiliza agua como refrigerante. El vapor se condensa y el aceite esencial se recolecta en una trampa “Clevenger”, la cual facilita la separación de la mezcla de agua y aceite por diferencia de densidad. (Torres, 2011)

3.4.1.1 Materiales y Equipos

- Probeta de 250 ml.
- Tubos eppendorf
- Balón de destilación (capacidad tres litros)
- Hidrodestilador con trampa Clevenger
- Manto calefactor
- Balanza técnica

3.4.1.2 Procedimiento

- El material vegetal previamente preparado, es cargada en el balón del hidrodestilador.
- A continuación se procede a agregar agua destilada hasta que cubra a todo el material vegetal, por recomendaciones del fabricante, llenar el balón hasta

la mitad de su capacidad aproximadamente. El llenar completamente el balón puede producir ebullición turbulenta, la cual produce proyecciones al interior del equipo de destilación por arrastre de vapor.

- Llenar con agua destilada los vasos comunicantes del hidrodestilador, a una altura igual.
- Empezar el proceso de extracción del aceite esencial por un periodo de tiempo controlado.
- Es importante evitar que la fase líquida llegue a ebullición, ya que éste llega a los tubos comunicantes, contaminando el agua de extracción.
- Registrar las siguientes variables: peso del material vegetal, volumen de agua y tiempo de extracción, con el fin de determinar en qué condiciones se da el máximo rendimiento.
- El aceite esencial obtenido se recibe en tubos eppendorf, los cuales son identificados con la fecha, peso del material vegetal, volumen de agua y tiempo empleado en la hidrodestilación.



Fig. Nº 7 Hidrodestilador / Cleverger

Fuente: El autor.



3.5 Acción biocida del Aceite esencial de *A. arborescens* expresada como DL₅₀

La dosis letal (DL₅₀) es la cuantificación del grado de toxicidad de una sustancia, que provoca la muerte del 50% de un grupo de animales de prueba. La DL₅₀ es una forma de medir el envenenamiento potencial a corto plazo (toxicidad aguda) de una sustancia.

La DL₅₀ debe ser el resultado de una serie de repeticiones, como mínimo tres, con el fin de evaluar la variabilidad de los resultados y evitar errores sistemáticos y casuales. (Chandler *et al.*, 2011)

3.5.1 Ensayo de actividad Nematicida

La identificación de sustancias bioactivas inicia por ensayos “in vitro”, en los cuales el objetivo es evaluar el potencial del material de prueba ante un organismo modelo. Los ensayos que utilizan organismos modelo como bacterias, hongos filamentosos, levaduras o nematodos, son rápidos, de fácil desarrollo y dan información relevante para establecer una dosis activa para el escalamiento de la bioactividad en ensayos “in vivo” (Wallace *et al.*, 2011)

Los nematodos del suelo son pequeños invertebrados, considerados uno de los grupos de animales más abundantes y diversos en el planeta. Están presentes en cualquier lugar donde exista carbono orgánico. La palabra nematodo deriva del griego “nema” que significa “forma de un hilo”, ya que poseen un cuerpo alargado y cilíndrico. (Cares, 2015)

En la presente investigación se desarrolló el ensayo de actividad biocida usando como organismos modelo nematodos de vida libre, de la especie “*Panagrellus redivirus*”, para la determinación del efecto letal del aceite esencial y extracto metanólico de de *A. arborescens*.



La especie de nematodo "*Panagrellus*" es fácil de cultivar, mantener y no representa una amenaza para la salud humana por lo que puede ser utilizado en ensayos "in vitro" en laboratorios de bioseguridad I y II. (Graf, 2014)

3.5.1.1 Materiales y Equipos

- Ejemplares de lombriz *Panagrellus redivivus*
- Placa de 96 pocillos con fondo en U
- Micropipeta con puntas
- Avena
- Levadura de panadería
- Espátula pequeña
- Solución de CuSO_4 (160 mg/ml)
- Metanol 60 %
- Agua destilada
- Estéreo microscopio
- Cámara de flujo laminar
- Probeta de 100 ml
- Aceite esencial de *A. arborescens*

3.5.1.2 Preparación de cultivo de Nematodos

- En un recipiente que posea tapa mezclar una taza de agua en ebullición (aproximadamente 200 ml) con aproximadamente diez gramos de avena. Dejar enfriar completamente.
- Añadir al recipiente aproximadamente un gramo de levadura y una cuchara del cultivo de lombriz, cubrir el recipiente con la tapa e identificar con la fecha.



- Los nematodos pueden vivir y multiplicarse en este medio durante aproximadamente una a dos semanas. Tras este proceso debe repetirse el proceso anterior usando avena, levadura fresca y una cucharada del cultivo anteriormente preparado. Para que la cantidad de lombrices sea suficiente para el ensayo, se debe permitir que crezcan y se multipliquen durante 7 -10 días (Graf, 2014)

3.5.1.3 Proceso de ensayo DL₅₀ del aceite esencial de *A. arborescens*

- El aceite esencial de *A. arborescens* no requiere de una preparación previa al ensayo DL₅₀.
- En la primera fila de placa de pocillos, para control negativo colocar 5 µl de metanol al 60 % en los primeros seis pocillos y para control positivo 5 µl de CuSO₄ en los siguientes seis pocillos.
- Luego, colocar en las siguientes tres filas 500 ul de agua destilada, en todos los pocillos.
- Realizar el ensayo de DL 50 por triplicado de la siguiente forma:
 - ✓ Agregar 500 ul del aceite esencial de *A. arborescens* en el primer pocillo de cada fila, homogenizar con el agua anteriormente agregada con la ayuda de una micropipeta,
 - ✓ Realizar una disolución serial con la micropipeta, tomando una alícuota de 500 ul y repitiendo el proceso hasta el último pocillo de cada fila.
- Agregar 100 µl de una suspensión homogénea de nematodos, en cada pocillo de la placa. Para esto colocar en la probeta, 20 ml de agua destilada

y aproximadamente 10 ml de los Nematodos, agitar con una espátula, con el fin de dispersar las lombrices y formar una suspensión homogénea.

- Incubar la placa de pocillos a temperatura ambiente por el periodo de 4 horas.
- Con la ayuda del estéreo microscopio determinar la acción biocida del aceite esencial de *A. arborescens*, de la siguiente manera:
 - ✓ Control positivo: mortalidad total de nematodos.
 - ✓ Control negativo: mortalidad parcial o nula de nematodos.

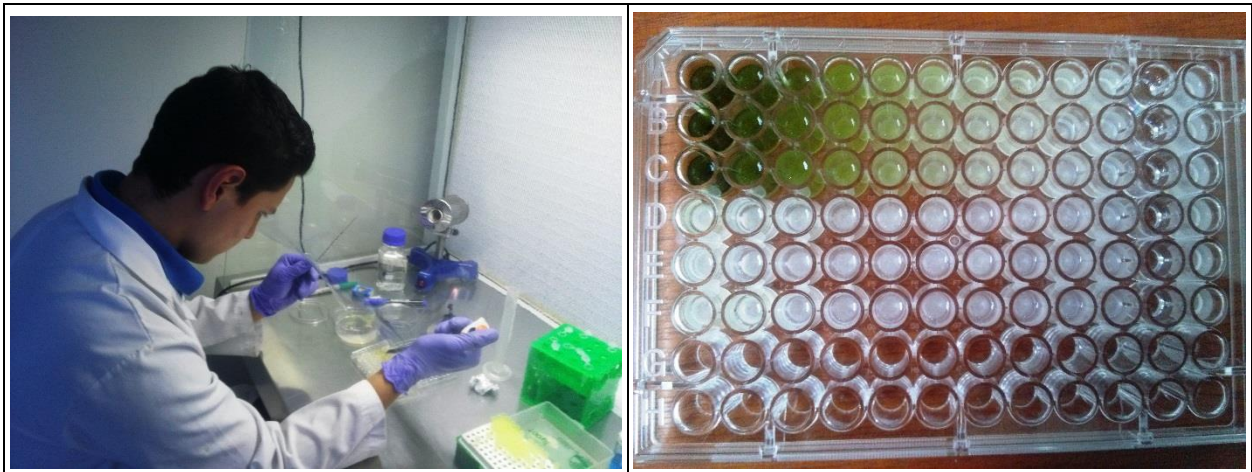


Fig. Nº 8 Ensayo de actividad Nematicida

Fuente: El autor.

3.6 ESTRATEGIA PARA LA FORMULACIÓN BIOINSECTICIDA CANINA

Dado los resultados de DL_{50} y rendimiento en la obtención del aceite esencial de *A. arborescens* (ver resultados en el Capítulo IV), se planteó como estrategia, determinar el DL_{50} del extracto orgánico de *A. arborescens*, para ello se procedió a la obtención del extracto de *A. arborescens*.

3.7 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE *A. ARBORESCENS*

3.7.1 EXTRACCIÓN CON SOLVENTE VOLÁTILES

En la extracción con solventes volátiles, el material vegetal es triturado y macerado con solventes volátiles como alcohol o cloroformo, seguido de la



eliminación del solvente por destilación a presión reducida, mediante rotavapor. (Gonzales, 2004).

La base del funcionamiento del rotavapor es la evaporación y la condensación de los solventes volátiles a presión reducida, esta condición disminuye el punto de ebullición del solvente volátil, el cual se condensa y se recoge en un balón colector. El extracto obtenido puede ser recuperado y pesado del balón de destilación (Leiva, 2015).

3.7.1.1 Materiales y Equipos

- Metanol Grado Analítico
- Balanza técnica
- Rotavapor
- Elenmeyer de 500 ml, Pipeta 250 ml

3.7.1.2 Procedimiento de extracción metanólica

- Pesar 100 gr del material vegetal previamente tratado.
- Adicionar el solvente metanol absoluto hasta cubrir completamente el material vegetal, agitar y tapar.
- Dejar reposar por un período de 48 horas. Agitar esporádicamente el contenido. Luego del reposo, filtrar el producto.
- El extracto fue separado del solvente mediante destilación a presión reducida con la ayuda del rotavapor, a una temperatura de 40 ° C, con el fin de no causar degradación térmica de los componentes del extracto.
- Pesar, envasar y almacenar el extracto obtenido.



Fig. Nº 9 Obtención de Extracto de *A. arborescens*

Fuente: El autor.

3.8 Ensayos cromatográficos en el extracto metanólico de *A. arborescens*.

La cromatografía en capa fina (CCF) es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria está en forma de una capa fina o superficie plana. El experimento básico consiste en impregnar la mezcla a analizar como una mancha o banda en el extremo de la capa. La separación se lleva a cabo en una cámara cerrada, colocando el extremo impregnado en contacto con la fase móvil, la cual avanza a través de la capa por fuerzas capilares. La separación de la mezcla resulta por las diferentes tasas de migración de los componentes de la mezcla en la dirección de la fase móvil. Después del desarrollo y evaporación de la fase móvil, los componentes pueden ser visualizados y revelados por reacciones químicas sencillas (Poole, 2003).

Para identificar presencia de terpenos en el extracto metanólico de *Ambrosia arborescens*, se desarrollaron placas de Sílica Gel 60 F254 (Merck). Se impregnó una gota del extracto resuspendido en metanol. La fase móvil fue una mezcla de éter de petróleo: acetato de etilo 7:3, de polaridad media, que permite una buena



separación de extractos. Posteriormente se realizó un revelado en cámara de iodo, donde los terpenos reaccionan generando manchas parduzcas (Cazes, 2004).

3.9 Acción biocida del extracto de *A. arborescens* expresada como DL₅₀

3.9.1 Preparación previa al ensayo DL₅₀ del extracto de *A. arborescens*.

El extracto al ser de consistencia viscosa requiere de una preparación previa al ensayo DL₅₀, para ello se procedió a formar una solución del extracto de altamisa de la siguiente manera:

- Pesar 500 mg del extracto y colocar en un tubo eppendorf con la ayuda de una espátula pequeña.
- Agregar 1 mL de metanol
- Homogenizar la mezcla.

Se obtiene una solución de extracto de “Altamisa” de 500 mg / mL

3.9.2 Proceso de ensayo DL₅₀ del extracto de *A. arborescens*

- Para los controles positivos y negativos proceder igual al proceso de DL₅₀ para el aceite esencial de *A. arborescens*.
- Luego, colocar en las siguientes tres filas 500 µL de agua destilada, en todos los pocillos.
- Se realizó el ensayo de DL 50 por triplicado de la siguiente forma:
 - ✓ Agregar 500 µL de la solución previamente preparada del extracto metanólico de *A. arborescens*.
 - ✓ Realizar una disolución seriada con la micropipeta, tomando una alícuota de 500 µL, repitiendo hasta el último pocillo de cada fila.
- Agregar 100 µL de una suspensión homogénea de nematodos, en cada pocillo de la placa, de la misma forma que se realizó en ensayo DL₅₀ para el aceite esencial de *A. arborescens*.



- Incubar la placa de pocillos a temperatura ambiente por el periodo de 4 horas.
- Con la ayuda del estéreo microscopio determinar la acción biocida del extracto de *A. arborescens*, de la misma forma que se procedió con el aceite esencial de *A. arborescens*.

3.10 Acción biocida del extracto de *A. arborescens* ante *Ctenocephalides canis*

De acuerdo a los datos favorables de acción biocida y rendimiento del extracto de *A. arborescens*, se realizaron pruebas con el parásito objetivo. Estas se realizan fuera del organismo vivo (perro) y directamente sobre el parásito objetivo (pulga de perro *Ctenocephalides canis*), en un ambiente controlado (recipiente cerrado).

El objetivo de esta prueba fue confrontar la efectividad observada en un organismo de prueba con los parásitos en los cuales se desea probar la efectividad biocida. Considerando que la pulga es un organismo más complejo y resistente que el nematodo *P. millaceum*, se probó la dosis letal 50, y dos concentraciones adicionales, considerando que en las nuevas condiciones del ensayo se enfrenta a un parásito más resistente. Esta estrategia se sigue en ensayos similares orientados al desarrollo de productos agrícolas, donde las condiciones ambientales disminuyen la actividad observada en pruebas de laboratorio (Chandler *et al.*, 2011). Para el límite superior se incrementó en un 50% de la DL₅₀ y para el límite inferior se disminuyó la dosis en en mismo porcentaje.

3.10.1 Materiales y Equipos

- Recipientes estériles con tapa
- Papel filtro
- Extracto de *A. arborescens*



- Micropipeta con puntas, Eppendorf
- Pulgas de perros (*Ctenocephalides canis*)
- Balanza analítica

3.10.2 Concentraciones del extracto de *A. arborescens*

De acuerdo al valor de DL_{50} determinados para el extracto de *A. arborescens*, se estableció las concentraciones a las cuales se realizaron los ensayos in vitro, según lo descrito en 3.10. Las concentraciones del ensayo se describen a continuación:

	Concentraciones (mg/mL)	Cantidades (gr)
A	31,25	0,03125
B	46,875	0,046875
C	15,625	0,015625

Tabla Nº 7 Concentraciones del extracto de *A. arborescens* utilizadas en prueba in vitro

Fuente: El autor.

- Pesar en balanza analítica las cantidades de extracto, según la tabla Nº 7 para preparar las concentraciones A B C del extracto de la Altamisa y colocar en tubos eppendorfs
- Agregar 1 mL metanol en cada tubo eppendorf
- Homogenizar la disolución antes del ensayo.

3.10.3 Proceso prueba in Vitro del extracto de *A. Arborescens*

- Colocar un papel filtro impregnado con 500 μ L de cada concentración del extracto de *A. arborescens* en la base de cada recipiente.
- Colocar 10 pulgas de perro (*Ctenocephalides canis*) en cada recipiente.
- Observar la acción bioinsecticida del extracto *A. arborescens*.
- Determinar que concentración de extracto *A. arborescens* fue la más efectiva en un periodo de tiempo.



Fig. Nº 10 Prueba in vitro de extracto del *A. arborescens*

Fuente: El autor.

3.11 Formulación del Champú Bioinsecticida Canino de *A. Arborescens*

La actividad biológica de los insecticidas botánicos se puede mejorar si se le adiciona adherentes o tensoactivos, estos evitan que las soluciones insecticidas se escurran de los animales o plantas aplicadas y favorecen la penetración de los principios activos (Carlotti, 2006).

Al desarrollar la formulación del Champú canino de acción Bioinsecticida a partir del extracto de *A. arborescens* se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Analizar la información completa sobre los componentes del Champú y características de la alteración cutánea.
- Seleccionar los componentes y determinar sus proporciones.
- Establecer el tiempo de contacto requerido.
- Ajustar el pH de acuerdo a la formulación.
- Verificar las cualidades estéticas de uso.

3.11.1 Formulación del Champú Canino Bioinsecticida

Se determinó una apropiada combinación de los componentes del Champú y extracto de *A. arborescens*, obteniendo la siguiente formula:

	Componente	%	Unidad / Criterio
A	Texapon	28%	gr
B	Cocamidopropilbetaina	6%	gr
C	Comperlan	2%	gr
D	Conservante	1%	gr
E	Ácido Cítrico		Hasta pH 6,5 - 7
F	Agua destilada		cps
G	Aroma y color		cps
H	Extracto de <i>A. arborescens</i>	4,69 %	gr

Tabla Nº 8 Formula del Champú canino Bioinsecticida a partir del extracto de *A. arborescens*
Fuente: El autor.

3.11.2 Materiales y Equipos

- Probetas de 25, 50 y 100 ml
- Vasos de precipitación 100, 250, 500 y 1000 ml
- Erlenmeyer 500 y 1000 ml
- Envase para champú
- Balanza Analítica
- pH metro

3.11.3 Proceso de Elaboración de Champú canino

- Pesar los componentes de acuerdo al volumen a producir.
- Mezclar los agentes tensoactivos con agitación continua y moderada
- Agregar el conservante, aroma y agitar hasta lograr una emulsión homogénea.
- Medir el pH del champú, para esto diluir el champú en una proporción de 1:5, el pH debe llegar aproximadamente a 7, en caso contrario neutralizar la alcalinidad con ácido cítrico hasta pH requerido.

- Proceder a envasar y etiquetar el champú con la fecha y hora de elaboración.



Fig. Nº 11 Elaboración Champú canino Bioinsecticida de *A. arborecens*

Fuente: El autor.

3.12 Prueba in Vivo acción bioinsecticida del Champú Canino

Para realizar las pruebas de la efectividad del champú bioinsecticida canino se necesitan perros infestados de pulgas, los cuales fueron sometidos a una evaluación inicial.

3.12.1 Evaluación Inicial de los perros

Con el fin de evaluar la efectividad y efecto residual del champú de *A. arborecens* en los perros, estos fueron sometidos a una evaluación inicial por parte del médico veterinario de la clínica “Amigos Fieles”, debiendo cumplir las siguientes condiciones previas, la mascota:

- Debe estar infestada de pulgas, con el objetivo de evidenciar el efecto bioinsecticida del champú del extracto de *A. arborecens*.
- No deben presentar ninguna alteración cutánea, como una dermatitis, con el fin de determinar si el champú causa alguna irritación cutánea en la mascota
- No deben haber sido sometidas a ningún tratamiento anti pulgas, por ejemplo: talco, pipetas, baños anti pulgas.



3.12.2 Proceso prueba in Vivo acción bioinsecticida del Champo Canino

Los perros previamente calificados para la prueba in vivo, fueron sometidos a un baño con el champú formulado, el cual se llevó acabo de la siguiente manera:

- La mascota fue humedecida con abundante agua
- Se procedió a aplicar el champú bioinsecticida de *A. arborescens* en suficiente cantidad.
- Se procedió a masajear y formar espuma.
- Se dejó actuar al champú bioinsecticida por 10 minutos,
- Luego, se continuo con el aclaro con abundante agua.
- Finalmente la mascota fue secada con la ayuda de una tolla y una secadora eléctrica.

3.12.3 Control de la efectividad del champú bioinsecticida canino de *A. arborescens*.

Las mascotas fueron sometidas a los siguientes controles y seguimientos, para determinar la efectividad del champú bioinsecticida:

- Post baño.
- Semanal.
- Quincenal

Durante los seguimientos las mascotas fueron vigiladas y protegidas de cualquier fuente que altere los resultados de las pruebas, tales como: contaminación cruzada con animales posiblemente infectados, limpieza del entorno del animal.



Fuente: El autor.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Obtención y rendimiento del Aceite Esencial de *A. arborescens*

El proceso de hidrodestilación de la “Altamisa” se realizó en las siguientes condiciones y se obtuvieron los siguientes volúmenes de aceite esencial:

Peso del material vegetal (g)	Volumen de agua (ml)	Tiempo del ensayo (min)	Volumen de obtenido de aceite esencial (ml)
100	1100	90	0,15
		120	0,15
150	1050	120	0,20
		150	0,20
200	1000	90	0,25
		120	0,30
		150	0,30
250	950	90	0,30
		120	0,35
		150	0,35
300	900	90	0,30
		120	0,35
		150	0,35

Tabla N° 9 Condiciones y volumen obtenido de aceite esencial de *A. arborescens*

Fuente: El autor.

De acuerdo a los resultados obtenidos en Tabla N° 9, se determinó el mayor rendimiento en las siguientes condiciones:

Peso del material vegetal (g)	Volumen de agua (ml)	Tiempo del ensayo (min)	Volumen de obtenido de aceite esencial (ml)	Rendimiento (%)
250	950	120	0,35	0.14

Tabla N° 10 Rendimiento en la obtención de aceite esencial de *A. arborescens*

Fuente: El autor.

4.2 Acción biocida del Aceite esencial de *A. arborescens*, expresada como DL₅₀

La dosis letal que produce la muerte de los nematodos en contacto con el aceite esencial de Altamisa es de 250 ul/ml (25 % v/v)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Conc. (%)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,781	0,390	0,195	0,097	0,488	0,244
A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla N° 11 Resultados del ensayo DL 50 del Aceite esencial de *A. arborescens*

Fuente: El autor.

4.3 Obtención y rendimiento del Extracto de *A arborescens*

La obtención del extracto de “Altamisa” se realizó en las siguientes condiciones:

Peso del material vegetal (g)	Volumen de alcohol (ml)	Tiempo del macerado (h)	Peso del extracto obtenido (gr)
200	400	96	4

Tabla N° 12 Condiciones y cantidad obtenida de extracto de *A. arborescens*

Fuente: El autor.

Se obtuvo el siguiente rendimiento en la obtención del extracto de la *A. arborescens*.

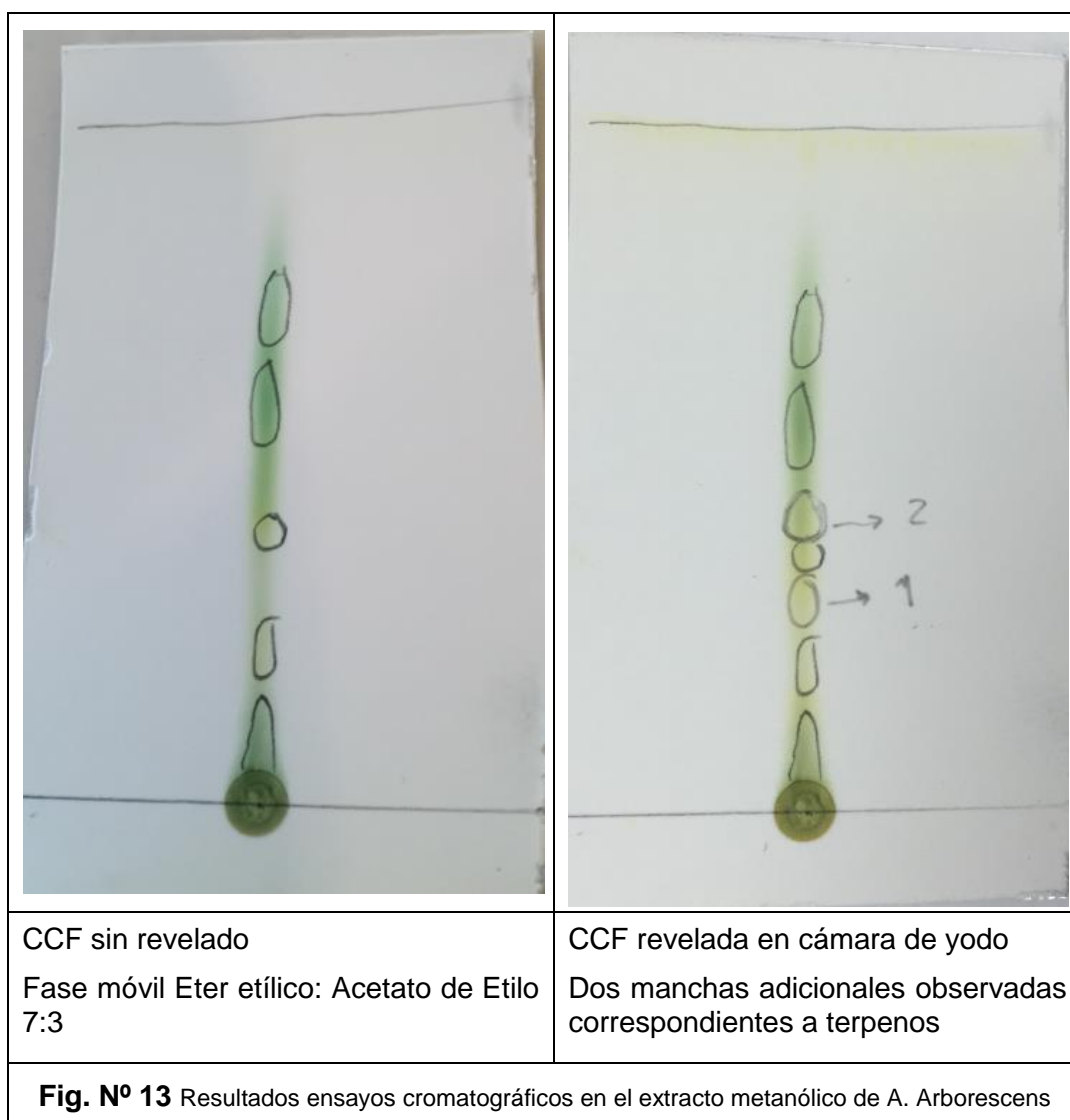
Peso del material vegetal (g)	Rendimiento (%)
100	2

Tabla N° 13 Rendimiento en la obtención de extracto de *A. arborescens*

Fuente: El autor.

4.4 Resultados ensayos cromatográficos en el extracto metanólico de *A.*

arborescens



4.5 Acción biocida del extracto de *A. arborescens*, expresada como DL₅₀

La dosis que produce la muerte de los nematodos en contacto con el extracto de *A. arborescens* es de 31,25 mg/ml (3,125 % v/v).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Conc. (mg/ml)	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,9	1,95	0,97	0,48	0,24	0,12
A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
B	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla N° 14 Resultados del ensayo DL 50 del extracto de *A. arborescens*

Fuente: El autor.

4.6 Acción Biocida del extracto de *A. arborescens* ante *ctenocephalides canis*

A continuación se presentan los resultados del ensayo de efectividad del extracto de *A. arborescens* ante la pulga de perro *Ctenocephalides canis*.

	Concentraciones (mg/ml)	Nº pulgas	Nº pulgas muertas	Tiempo Efectividad	Efectividad (%)
A	31,25	10	10	11'40"	100
B	46,875	10	10	8'10"	100
C	15,625	10	10	14'30"	100

Tabla Nº 15 Resultados de la Prueba in vitro del extracto de *A. arborescens*

Fuente: El autor.

De acuerdo a los resultados expuestos en la tabla Nº 15. Se determina que la concentración efectiva para la elaboración del Champú es a la concentración de 46,875 mg/mL equivalente al 4,687 %, ya que en esta presenta una efectividad del 100 %, en el periodo de tiempo más corto.

4.7 Efectividad del Champú Bioinsecticida Canino de extracto de *A. arborescens*

En el control y seguimiento de las mascotas se determinó los siguientes resultados:

- Se comprobó una alta efectividad en la eliminación de las pulgas.
- En el aclarado, el champú se removió fácilmente, notándose que las pulgas se eliminaban y desprendían de la mascota,
- En el post baño se evidencio un perro limpio, saludable y con un pelaje brillante.
- En los seguimientos se evidencio que la dermis de la mascota no presento ningún tipo de alteración, ni irritación, demostrado una alta tolerabilidad cutánea ante el champú Bioinsecticida canino.



Fuente: El autor.



CAPITULO V:

DISCUSIÓN

Las plantas se han utilizado a lo largo de la historia por sus propiedades medicinales. Este uso se ha centrado a menudo en la salud humana, pero las plantas también han sido, y siguen siendo, aplicados en la práctica en la salud animal y veterinaria. Durante siglos, las plantas medicinales se han utilizado para combatir la parasitosis y en muchas partes del mundo todavía se utilice para este fin. A pesar de que, hasta hace poco, la mayoría de las pruebas sobre la actividad antiparasitaria de plantas medicinales era anecdótica y carecía de validez científica, en la actualidad existe un creciente número de estudios experimentales controladas que tienen como objetivo verificar y cuantificar tales actividades biocida de las plantas frente a los ectoparásitos, especialmente pulgas, garrapatas y piojos, estos son parásitos importantes debido a su actividad se alimentan de sangre voraz y son vectores de agentes de enfermedades en el hombre y el ganado. (Kamaraj, Rahuman, & Zahir, 2010)

El término “bioinsecticida” incluye aspectos del manejo de plagas como:

- Organismos microbiano (viral, bacteriano y fungal).
- Nemátodos entomopatógenos
- Pesticidas derivados de plantas
- Metabolitos secundarios vegetales
- Feromonas de insectos aplicadas para perturbar los procesos reproductivos
- Genes usados para transformar cultivos y expresar resistencia a insectos, hongos o virus (Copping & Menn, 2000).



La investigación sobre la eficacia de extractos vegetales y aceites esenciales en el control de parásitos constituye una estrategia para desarrollar biocidas o productos medicinales para un amplio rango de ectoparásitos que atacan al ser humano o a animales domésticos. El desarrollo de productos listos para usar depende del establecimiento de la dosis efectiva, que prueba su actividad biocida y de testar que no se producen daños en el usuario. Otro aspecto a considerar es que, según la evidencia publicada, los ectoparásitos desarrollan resistencia de forma más fácil ante un compuesto químico que ante productos naturales, que son la mezcla de muchos metabolitos vegetales bioactivos. (Semmler & Ghaffar, 2009)

En medicina etnoveterinaria se utilizan diversos extractos vegetales para tratar parasitosis de animales. Por ejemplo, el tabaco se utiliza para tratar la piel del ganado afectado por parásitos externos. Las hojas, flores y el aceite de *Chenopodium ambrosioides*, planta originaria de América Central y distribuida alrededor del mundo, se utiliza como antihelmíntico desde 1900 (Athanasiadou & Col, 2007).

Se realizó un estudio de la actividad antiparasitaria para determinar la eficacia de los extractos de hexanol, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol en las plantas: *Aegle marmelos* (membrillo de bengala), *Correa ex Roxb*, *Andrographis lineata wallich ex Ness*, *Cocculus hirsutus*, *eclipta prostrata* y *Tagetes erecta L.* las cuales se probó su acción biocida en garrapatas de ganado, larvas de oveja. Todos los extractos de las plantas presentaron un efecto tóxico moderado después de las 24 horas de exposición, sin embargo el extracto con mayor actividad fue *A. lineata* con acetato de etilo y *A. marmelos* con metanol; presentaron una dosis letal DL_{50} de 395.27 y 358,45 ppm. Este es el primer informe sobre la actividad parasitaria veterinaria de extractos de plantas del sur de la India (Elango & Rauman, 2010).



Las investigaciones documentadas en 2004 en Columbia Británica (BC), Canadá, informa sobre las plantas medicinales utilizadas para las pulgas en perros y gatos. Las pulgas y moscas son tratados con *Artemisia vulgaris* L. (*Asteraceae*), Citrus limon del x (L.), *Juniperus communis* L. var. *Depressa* Pursh. (*Cupressaceae*), *Lavandula officinalis* L. (*Labiatae*), *Melissa officinalis* L. (*Lamiaceae*), y *Thuja plicata* Donn ex D. Don (*Cupressaceae*). Todas las plantas que se utilizaron presentan actividad bioinsecticida. (Lans, Turner, & Khan, 2008)

El presente estudio determino la actividad bioinsecticidad del extracto metanólico y aceite esencial obtenido por Hidrodestilacion método Clevenger de *Ambrosia Artemisoides*, determinando su acción biocida expresada en DL₅₀ de 31,25 mg/ml y 250 uL/mL respectivamente, ante el nematodo *Panagrellus redivirus*, reportando mayor acción biocida en el extracto de *A. arborecens*, con el cual se formuló un champo bioinsecticida efectivo ante la pulga de perro *Ctenocephalides canis*, demostrando el potencial recurso del metabolismo secundario vegetal de esta planta proveniente de la Serranía Ecuatoriana.

Ecuador al ser un país con una amplia variedad de flora, dispone de un amplio campo de estudio, es importante aprovechar las propiedades particulares de las plantas, desarrollando alternativas sustentables que sustituyan el uso de compuestos sintéticos y disminuyendo el impacto negativo al medio ambiente.



CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo experimental nos permite exponer las siguientes conclusiones:

- Se obtuvo aceite esencial de *Ambrosia arborescens*, estableciéndose las condiciones óptimas de obtención en el Hidrodestilador tipo Clevenger disponible en el Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, obteniendo un rendimiento del 0,14 %.
- Para determinar la tolerabilidad local del aceite esencial de *A. arborescens* en la piel canina se determinó la acción biocida expresada como dosis letal (DL_{50}) siendo de 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (25 % v/v)
- El aceite esencial de *A. arborescens* fue obtenido con bajos rendimientos y se obtuvo una DL_{50} moderada. Estas características no permiten escalar los resultados para la formulación bioinsecticida canina. Por consiguiente se planteó como estrategia, la obtención del extracto orgánico de *A. arborescens* y su evaluación como agente biocida.
- En la obtención del extracto orgánico de *A. arborescens* se obtuvo un rendimiento 2 % y un DL_{50} de 31,25 mg/mL (3,12 % v/v), siendo estos resultados promisorios para el desarrollo de una formulación bioinsecticida canina.
- Se determinaron la presencia de terpenos, grupo de compuestos de metabolitos secundarios en el extracto metanólico de *A. arborescens*, mediante ensayos cromatográficos en capa fina.
- Luego de pruebas in vitro y ensayos ante el parásito objetivo, se estableció una dosis activa de extracto metanólico de 4,6875 mg/mL (4,687 % v/v), para la dosificación en la formula bioinsecticida canina. Esta concentración presenta



una efectividad del 100 % en las pruebas in vitro realizadas en las pulgas de perros (*Ctenocephalides canis*) en el periodo de tiempo más corto.

- Se determinó una apropiada combinación de los componentes del Champú y extracto de *A. arborescens* según la fórmula de la tabla N° 8.
- En las pruebas realizadas in vivo en los perros se comprobó una alta efectividad del champú bioinsecticida canino, notándose que las pulgas se eliminaban y desprendían de la mascota en el baño, obteniendo un perro limpio, saludable y con un pelaje brillante.
- Se realizó un seguimiento por una semana a las mascotas expuestas al champú bioinsecticida canino observando un efecto residual nulo, y demostrado una alta tolerabilidad cutánea en la dermis de las mascotas.
- Los resultados obtenidos en el presente estudio permitieron desarrollar una formulación para un producto veterinario basado en un extracto natural, demostrando el potencial de las plantas de nuestra región como fuente de principios bioactivos.



BIBLIOGRAFÍA

- Andrango, M., & Morales, G. (2013). *Identificación de las especies de pulgas y endoparásitos gastrointestinales asociados en caninos*. Quito.
- Athanasiadou, & Col. (2007). Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Springer*.
- Bayer, L. (2014). *Mascotas Foyal*. Obtenido de http://www.foyel.com/paginas/2009/05/506/las_pulgas_ctenocephalides_felis_y_canis/
- Borgaud, G. (2001). Production of plant secondary metabolites a historical perspective.
- Carlottl, D. N. (2006). El arte de los champús en dermatología canina. *A.V.E.P.A.*, 8.
- CASAFE. (2014). Insecticidas y Acaricidas. *Camara de sanidad agropecuaria y fertilizantes*, 5.
- Cazes, 2004. Encyclopedia of Chromatography. Marcel Dekker. ISBN 0-8247-2153-5
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J., & Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 366(1573), 1987-1998.
- Cordero, L. (1984). *Estudios Botánicos*.
- Cortez, H. (2011). "Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales. *Universidad Veracruzana*, 83.
- DeCarvalho, J. P. (08 de Mayo de 2013). *Insecticidas*. Obtenido de Toxipedia: <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/insecticidas>
- Devine, G. (2008). Uso de Insecticidas Contexto y Consecuencias Ecológicas. *Scielo*, 27.
- Elango, & Rauman. (2010). Evaluation of medicinal plant extracts against ticks and fluke. *Springer: Parasitology Research*, 513-519.
- ESCCAP. (2010). *Ectoparásitos Control de insectos y garrapatas que parasitan a perros y gatos*. Madrid - España .
- Espinoza. (2008). Evaluación de la Actividad Insecticida del extracto de Canela. *Tesis Doctor Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Cimborazo*.
- Fernandez, P. (2009). *SlideShare*. Obtenido de <http://es.slideshare.net/cephasx/bioinsecticidas>
- Garcia, & Perez. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.*, 27.
- Gonzales, A. A. (2004). Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanolicos. *Universidad Nacional de Colombia*.
- Graf, B. (2014). Manual Screens to Nature. *Rutgers University*.



- Healthcare. (2002). *Healthcare Series*. Obtenido de <http://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-glucosidos-cardiotonicos-accion-usos-13028926>
- Herbario Azuay. (2008). Clasificación Botánica Ambrosia Arborescens Mill (Altamisa).
- IRAC. (2016). *Resistance Action Committee insecticida gestión de resistencia para la agricultura sostenible y la mejora de la Salud Pública DE SESIÓN Término de búsqueda*. Obtenido de <http://www.irac-online.org/modes-of-action/>
- Junquera, P. (01 de 07 de 2015). *Parasitipedia. net*. Obtenido de PLANTAS MEDICINALES GARRAPATICIDAS, PULGUICIDAS, INSECTICIDAS, MOSQUICIDAS, PIOJICIDAS, SARNICIDAS y REPELENTES para el GANADO, PERROS Y GATOS: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=382&Itemid=460
- Kamaraj, Rahuman, & Zahir. (2010). Evaluation of medicinal plant extracts against blood-sucking parasites. *Springer*, 1403-1412.
- Lans, C., Turner, N., & Khan, T. (2008). Medicinal plant treatments for fleas and ear problems of cats and dogs in British Columbia, Canada. *Springer : Parasitology Research*.
- Leiva, A. (2015). Principio de funcionamiento del rotavapor. *Scrib*.
- León. (1969). *Investigación del Contenido de Principios Activos del Marco*. Riobamba.
- Llerena, A. (2011). Metabolitos Secundarios. *Tercer Congreso de Agroecología*, 32.
- Maggi, M. E. (2004). Insecticidas Naturales . *Laboratorio de Química Fina y Productos Naturales Agencia Cordoba Ciencia-Unidad CEPROCOR*.
- Martinez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmaceutica, Medellín. Obtenido de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>
- MERCK & CO., I. (2012). *El Manual Merck de Veterinaria* (Sexta ed.). Barcelona: Oceano.
- Mondragón, J. (2002). Obtenido de http://www.csr.servicios.es/LABORATORIO/DESCARGAS/LOS_INSECTICIDAS_LECTURA_AVANZADA.pdf
- Navarrete , H., & De la Torre, L. (2008). Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador.
- OMS. (2009). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. Obtenido de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44271/1/9789241547963_eng.pdf
- Pinedo, C. (2012). Pulgas y perros. *Eroski Consumer*, 21.
- Poole. C. (2003). *The Essence of Chromatography*. Elsevier. ISBN 0 444 50199 1



- QuimiNet. (10 de Enero de 2013). *QuimiNet.com*. Obtenido de <http://www.quiminet.com/articulos/conozca-los-usos-y-aplicaciones-del-lauril-eter-sulfato-de-sodio-3403327.htm>
- Ramirez, & Lacasaña. (2011). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición. *Trabajo realizado durante el programa de doctorado en Ciencias de la Salud y de la vida*, 67-65.
- Roberts, S. (2007). Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Natural Chemical biology*, 48.
- Saenz, A. (2012). Bioinsecticidas vs. insecticidas químicos. *Ciencia Cierta*. Obtenido de <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC30/5.html>
- Saldarriaga, Sanchez, & Bonilla. (2010). Evaluación agroindustrial de los aceites esenciales de *Artemisia dracunculoides* L, *Franseria artemisioides* Willd.,. *Acta Agronomica 59, Centro Experimental CEUNP*.
- Semmeler, & Ghaffar. (2009). Nature helps: from research to products against blood-sucking arthropods. *Springer: Parasitology Research*.
- Sepúlveda, G. (2004). The participation of secondary metabolites in plants. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA*, 10.
- Silva, G. (2007). Pesticidas orgánicos; Una vieja-nueva Alternativa en el control de plagas. *Manejo Integral de Plagas*.
- Torres, L. T. (2011). Hidrodestilación del Aceite esencial de *Lippia Alba*. *Universidad Industrial de Santander*, 67.
- Valle, C. (2008). Metabolitos Secundarios de las Plantas. *Psicostasia*.
- Velasco, R. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos. *Scielo*, 14.
- Vera, M. (2008). ESTUDIO FITOQUÍMICO DE UNA PLANTA DE LA FLORA DEL ECUADOR: *Ambrosia arborescens*. *ESUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO*. Obtenido de <http://www.espe.edu.ec>
- Vidal, M. V., & Arévalo, P. (2001). *Estudio Fitoquímico de la Franseria Artemisoides Determinación del DL 50*. Cuenca.
- Wallace, I. M., Urbanus, M. L., Luciani, G. M., Burns, A. R., Han, M. K., Wang, H., ... & Roemer, T. (2011). Compound prioritization methods increase rates of chemical probe discovery in model organisms. *Chemistry & biology*, 18(10), 1273-1283
- White. (1982). *Hierbas del Ecuador*. Quito: Libri Mundi.