

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
CenUR Litoral Norte**

**ESTUDIO *IN-VITRO* DEL EFECTO DE *Baccharis trimera* SOBRE *Haemonchus contortus*.**

**Tesista: Andrés PRELIASCO FIRPO**

TESIS DE GRADO presentada como  
uno de los requisitos para obtener el  
título de Doctor en Ciencias  
Veterinarias

Orientación: PRODUCCIÓN ANIMAL

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**SALTO  
URUGUAY  
2017**

**PÁGINA DE APROBACIÓN**

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

\_\_\_\_\_  
Nombre completo y Firma

Segundo miembro (Tutor):

\_\_\_\_\_  
Nombre completo y Firma

Tercer miembro:

\_\_\_\_\_  
Nombre completo y Firma

Fecha:

\_\_\_\_\_

Autor:

\_\_\_\_\_  
Nombre completo y Firma

## **AGRADECIMIENTOS**

- A mi familia y amigos por el apoyo incondicional brindado durante toda la carrera, por la confianza y cariño.
- A la MSc. Gabriela Ferragut, co-tutora de tesis, por su colaboración, apoyo brindado, entera disposición y amabilidad.
- Al Dr. José Herrmann, tutor de la tesis por su apoyo.
- A Juan Sedano, por su colaboración y buena disposición en la parte estadística.
- Al Laboratorio de Parasitología, Regional Norte, por permitirme utilizar sus instalaciones y materiales.
- Al Frigorífico Daymán Meat, en especial a Raúl Herrmann y el Dr. Juan Alsúa por su colaboración con el material parasitario.
- Al Frigorífico Somicar, en especial al Gerente Sebastián Sosa y el Dr. Nicolás Sosa, por su colaboración con el material parasitario.
- A Rocina funcionaria de Biblioteca de facultad de Veterinaria por su disposición y colaboración en la corrección de la bibliografía.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>2</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>6</b>
<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>2. SUMMARY</b> .....	<b>8</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>11</b>
4.1 Taxonomía .....	11
4.2 Morfología .....	11
4.3 Ciclo Biológico de <i>Haemonchus contortus</i> .....	12
4.4 Epidemiología .....	13
4.5 Patogenia .....	15
4.6 Sintomatología .....	15
4.7 Diagnóstico .....	16
4.8 Tratamiento y control de <i>Haemonchus contortus</i> .....	16
4.9 Descripción de <i>Baccharis trimera</i> (Carqueja).....	19
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
6.1 Objetivo General .....	20
6.2 Objetivos específicos .....	20
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
7.1 Material vegetal.....	21
7.1.1 Preparación de las diluciones del aceite esencial (AE) de <i>Baccharis trimera</i> .....	21
7.2 Obtención de material parasitario .....	22
7.3 Test de eclosión de huevos .....	24
7.4 Test de motilidad larvaria .....	26
7.5 Test de motilidad en estadio adulto.....	28
7.6 Análisis de datos .....	29
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
8.1 Efecto del AE de <i>Baccharis trimera</i> sobre la eclosión de huevos .....	30
8.2 Efecto del AE de <i>Baccharis trimera</i> sobre los estadios larvarios infectantes.....	33

8.3 Efecto del AE de <i>Baccharis trimera</i> sobre la motilidad en adultos .....	36
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
9.1 Efecto de <i>Baccharis trimera</i> sobre la inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> en ovinos.....	39
9.2 Efecto de <i>Baccharis trimera</i> sobre la motilidad de larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> en ovinos.....	40
9.3 Efecto de <i>Baccharis trimera</i> sobre la motilidad de adultos de <i>Haemonchus contortus</i> en ovinos.....	41
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>43</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>50</b>
12.1 Planilla de datos del test de eclosión de huevos.....	50
12.2 Planilla de datos y análisis de ANOVA para eclosión de huevo.....	51
12.3 Planilla de datos del test de motilidad larvaria .....	52
12.4 Planilla de datos obtenidos en estadio adulto .....	53
12.5 Planillas de datos a altas, medias y bajas concentraciones, sobre adultos de <i>Haemonchus contortus</i> en ovinos .....	54
12.6 Efecto de cada una de las diluciones del extracto de <i>Baccharis trimera</i> sobre estadio adulto de <i>Haemonchus contortus</i> .....	56

## **LISTA DE FIGURAS**

Página

<b>Figura 1.</b> Ciclo Biológico de <i>H. contortus</i> en ovinos. ....	12
<b>Figura 2.</b> Prevalencia de los géneros de Nematodos Gastrointestinales en ovinos del Uruguay.....	14
<b>Figura 3.</b> <i>Baccharis trimera</i> (Carqueja).....	21
<b>Figura 4.</b> Preparación de diluciones realizadas del Extracto de <i>Baccharis trimera</i> . ....	22
<b>Figura 5.</b> Obtención de material parasitario.....	23
<b>Figura 6.</b> Test de eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> . ....	25
<b>Figura 7.</b> Test de motilidad de larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i> ..	27
<b>Figura 8.</b> Efecto de <i>B. trimera</i> en el test de eclosión de huevos de <i>H. contortus</i> . ....	30
<b>Figura 9.</b> Efecto dosis- respuesta del extracto de <i>B. trimera</i> sobre la inhibición de la eclosión de huevos de <i>H. contortus</i> .....	31
<b>Figura 10.</b> Efecto de <i>B. trimera</i> en el test de motilidad de larvas infectantes de <i>H. contortus</i> . ....	33
<b>Figura 11.</b> Efecto dosis respuesta sobre larvas infectantes de <i>H. contortus</i> . .	34
<b>Figura 12.</b> Efecto del AE de <i>B. trimera</i> a concentraciones altas sobre adultos de <i>H. contortus</i> . ....	36
<b>Figura 13.</b> Efecto del AE de <i>B. trimera</i> a las concentraciones intermedias sobre <i>H. contortus</i> . ....	37
<b>Figura 14.</b> Efecto del AE de <i>B. trimera</i> a bajas concentraciones sobre <i>H. contortus</i> .....	37

## **LISTA DE TABLAS**

Página

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de los principales helmintos ovinos.....	11
<b>Tabla 2.</b> Porcentaje de participación relativa anual acumulada de cada una de las especies encontradas entre el otoño del 2007 y el otoño del 2009. ....	14
<b>Tabla 3.</b> Compuestos químicos más importantes o relevantes de <i>Baccharis trimera</i> con sus respectivas distribuciones porcentuales. ....	19
<b>Tabla 4.</b> Escala de Unidad Arbitraria (UA) asignada a motilidad de adultos....	28
<b>Tabla 5.</b> Análisis de varianza entre los diferentes tratamientos en relación a la inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> . ....	32
<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza entre los diferentes tratamientos con respecto a la motilidad de las larvas infestantes de <i>Haemonchus contortus</i> . ....	35

## **1. RESUMEN**

Los Nematodos Gastrointestinales (NGI) son los principales parásitos encontrados en los ovinos. Representan serios problemas a nivel mundial ya que afectan la productividad del hospedador causándole importantes reducciones en la tasa de crecimiento, en la fecundidad e incremento de mortalidad. El control de parásitos se realiza fundamentalmente utilizando antihelmínticos. Estos han desarrollado resistencia por lo que se ha visto la necesidad de encontrar alternativas terapéuticas. En nuestro país uno de los nematodos más prevalente es *Haemonchus contortus* por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antiparasitaria *in-vitro* del aceite esencial (AE) de *B. trimera* sobre estadio de vida libre y parasitaria de este nematodo. Se obtuvieron huevos, larvas infectantes (L3) y adultos de *H. contortus* a partir de abomasos obtenidos de frigoríficos. Se realizó el test de eclosión de huevo, motilidad larvaria y motilidad en adultos, enfrentando los diferentes estadios a diferentes concentraciones del AE (12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10%, 0,049%, 0,025%, 0,013%, 0,006%). Para el test de inhibición de la eclosión se utilizó como control positivo Ricobendazol, para el test de motilidad larvaria Levamisol y en el test de motilidad en adultos Moxidectin, como control negativo en los tres test PBS+DMSO al 1%. Los dos primeros ensayos se realizaron por triplicado incubando 72 horas en estufa a 26-28° C, mientras que para motilidad en adultos por duplicados a temperatura ambiente. Para el test de eclosión de huevo se observó efecto dosis-respuesta. La concentración del AE 12,5%, inhibió la eclosión de huevos en un 89,17% siendo moderadamente eficaz. Mientras que en el test de motilidad larvaria mantuvo las larvas infectantes móviles en un 29,28% siendo de baja eficacia en este caso. El extracto de *B. trimera* fue más efectivo en el test de eclosión de huevos con respecto al test de motilidad larvaria ya que el IC50 fue menor siendo de 0,3274% y 9,725% respectivamente. Para motilidad en adultos se observó que a las concentraciones 12,5%, 6,25% y 3,13% con tiempos de inhibición de motilidad inferior al control positivo, se considerarían altamente eficaz. *B. trimera* para el test de motilidad del adulto mostró ser altamente efectivo mostrando ausencia de motilidad a menor concentración 3,13% y menor tiempo. *B. trimera* presenta actividad antihelmíntica frente a *H. contortus* con efectividad alta frente a los adultos, moderada frente a los huevos y baja frente a los larvas.

## **2. SUMMARY**

Gastrointestinal Nematodes (GINs) are the main parasites found in sheep. They represent serious problems worldwide as they affect host productivity causing significant reductions in growth rate and fertility and they increase mortality. Parasite control is performed primarily using anthelmintics, but they have developed resistance, so there is a need to find therapeutic alternatives. In Uruguay, one of the most prevalent nematodes is *Haemonchus contortus*. Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in-vitro* antiparasitic activity of *B. trimera* essential oil (AE) on the free and parasitic life stage of this nematode. Eggs, infective larvae (L3) and adults of *H. contortus* were obtained from abomasa from slaughterhouses. The egg hatching, larval motility and adult motility tests were performed, facing different stages at different AE concentrations (12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%, 0.39%, 0.19%, 0.10%, 0.049%, 0.025%, 0.013%, and 0.006%). For the hatch inhibition test, Ricobendazole was used as a positive control, Levamisole for the larval motility test and Moxidectin in the adult motility test, as a negative control for all three tests PBS + 1% DMSO. The first two trials were performed in triplicate by incubating 72 hours in an oven at 26-28 ° C, while for motility in adults in duplicate at room temperature. A dose-response effect was observed for the egg hatch test. The concentration of AE 12.5% inhibited egg hatching by 89.17% being moderately effective, while in the larval motile test the infective larvae were kept mobile at 29.28%, with of low efficacy in this case. The *B. trimera* extract was more effective in the egg hatch test with respect to the larval motility test, since the IC50 was lower, being 0.3274% and 9.725%, respectively. For motility in adults it was observed that at concentrations 12.5%, 6.25% and 3.13% with lower motile inhibition times than the positive control would be considered highly effective. *B. trimera* for the adult motility test showed to be highly effective showing absence of motility at lower concentration 3.125% and less time. *B. trimera* presents anthelmintic activity against *H. contortus* with high effectiveness against adults, moderate against eggs and low against larvae.

### **3. INTRODUCCIÓN**

Los Nematodos Gastrointestinales (NGI) son los principales parásitos encontrados en los ovinos. Representan serios problemas a nivel mundial ya que afectan la productividad del hospedador causándole importantes reducciones en la tasa de crecimiento, en la fecundidad e incremento de mortalidad (Nari y Cardozo, 1987), ocasionando pérdidas económicas en los animales a pastoreo, jugando el clima, temperatura y humedad un papel importante para el control (Secretariado Uruguayo, 2013). Los NGI afectan la economía de los establecimientos ganaderos debido al aumento de mano de obra, uso de antihelmínticos y pérdidas productivas como la mortandad, peso vivo, producción de lana y sanidad, limitando así la producción (Castells y col., 2013). Estudios realizados tanto en Uruguay, como en Argentina han demostrado que las especies que más pérdidas ocasionan en los lanares son *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, los cuales se distribuyen por gran parte del territorio (Suárez y col., 2007). Las pérdidas han sido cuantificadas, en aquellos animales muy parasitados llegan a un 50% de mortalidad, hasta un 24% de pérdida de peso vivo y 30% en la reducción de la producción de lana (Berreta y col., 1998).

En nuestro país *H. contortus* es el de mayor prevalencia, siempre y cuando las condiciones sean las adecuadas en cuanto a temperatura y humedad (Bonino y col., 1987). Teniendo gran importancia debido a que los animales más susceptibles son aquellos que corresponden a categorías jóvenes y ovejas recién paridas (Fernández Abella, 1993). Después de los casos agudos y fatales de haemochosis los animales que sobreviven se estima que pierden entre 250 y 500 g de peso de vellón sucio y entre 3 y 5 kg de carne por animal (Suárez y col., 2007). *H. contortus* remueve cerca de 0,05 ml de sangre por día, por ingestión y extravasamiento, por lo tanto un ovino con 5000 parásitos adultos puede llegar a perder 250 ml de sangre por día llevándolo a un cuadro severo de anemia en poco tiempo (Manual Merck, 2007).

La erradicación de los NGI resulta prácticamente muy dificultosa, teniendo que acudir a alternativas más prácticas como el control de las parasitosis y así intentar lograr una homeostasis que resulte compatible con la producción (Suárez y col., 2007). Para hablar del control de los parásitos gastrointestinales existen distintas alternativas, no existiendo un único tratamiento, teniendo que valerse de varios aspectos como lo son la categoría, estado fisiológico, condición climática, condición corporal, carga/ ha, especie, entre otras (Fernández Abella, 1993).

Se ha logrado controlar las parasitosis en los ovinos mediante el uso de antihelmínticos, pero trayendo consigo diferentes problemas como lo es la resistencia antihelmíntica (RA) a diferentes drogas convirtiéndose en un problema para los establecimientos y los productores (Castells y col., 2013). Uno de los grandes desafíos es lograr una interacción entre el uso racional de las drogas y la carga parasitaria, las pérdidas que ocasionan en el uso

indiscriminado de antihelmínticos (ATH) durante muchos años lo que ha generado resistencia en los parásitos y otra consecuencia la presencia de residuos en los tejidos de los animales (Cordero del Campillo y col., 2001) lo que llevó a que los mercados extranjeros que son los principales demandantes del rubro sean cada vez más exigentes en cuanto a los niveles permitidos de residuos de ATH (Nari y Cardozo, 1987).

Hace ya algunos años se está intentando buscar alternativas de control para los NGI que apunten a disminuir el uso de ATH tradicionales, que lleven por lo tanto a disminuir la aparición de RA en los animales (Castells y col., 2013). Para esto se han probado diferentes alternativas como lo son: el manejo de pasturas seguras, selección de animales resistentes mediante genética, inmunitario por medio de vacunas, órganos vivos como artrópodos, hongos y microorganismos, uso de pasturas que contienen taninos condensados, suplementación proteica, etc. (Secretariado Uruguayo, 2013). En los últimos años los métodos más frecuentes de control de los NGI han sido las diferentes estrategias de dosificación y los manejos de pastoreo consistiendo en la alternación de especies bovinas y ovinas o categorías (adultas y jóvenes), pastoreo rotativo donde se subdividen potreros llevando a la disminución de la permanencia de los animales en dichos potreros aumentando los periodos de descanso (Nari y Cardozo, 1987). El uso de productos farmacológicos trae consigo muchas ventajas, ya que existen productos muy eficaces en el mercado, pero también trae desventajas ya que si se realiza incorrectamente puede generar RA (Castells y col., 2013).

A nivel mundial se han probado otras estrategias mediante el uso de extractos vegetales enfrentándolos a NGI de ovinos como lo es el extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* en los cuales se pudo observar el efecto ovicida inhibiendo la eclosión de los huevos de NGI (Perez-Perez y col., 2014). Por otra parte tenemos el uso de la familia de *Oreganum vulgare* (orégano molido) el cual demostró tener efecto antihelmíntico, dando resultados alentadores ya que disminuyó la carga parasitaria adulta por lo tanto la cantidad de huevos (Manquía y col., 2013).

A su vez en Brasil también existen ensayos *in vitro* utilizando *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* las cuales mostraron resultados alentadores sobre las fases exógenas de nematodos posiblemente por la interacción de las lecitinas y los taninos condensados contribuyendo a la inmovilización de una gran cantidad de larvas interfiriendo en la movilización de las larvas infectantes L3 (Puerto Abreu y col., 2014).

En este trabajo se planteó el estudio del efecto de *B. trimera*, ya que contamos con el antecedente del estudio realizado sobre NGI de Azanza y Solaro, (2016), quienes obtuvieron resultados alentadores sobre el efecto del AE de *B. trimera* sobre NGI. Por ello se planteó profundizar en este sentido y estudiar en particular el efecto sobre uno de los principales NGI por su prevalencia en nuestro país, *H. contortus*.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Taxonomía**

Los NGI pertenecen al reino animal, Phylum Nematelminthes y Clase Nematoda (Tabla 1), en el cual podemos distinguir principalmente tres familias: Trichostrongylidae, Strongylidae, Strongyloididae. En lo que respecta a *H. contortus* pertenece a la familia Trichostrongylidae con localización en el abomaso de los ovinos (Lapage, 1976).

**Tabla 1.** Taxonomía de los principales helmintos ovinos

PHYLLUM	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIE
Nematelminthes	Nematoda	Strongylida	Trichostrongylidae	<i>Haemonchus</i>	<i>H. contortus</i>
				<i>Trichostrongylus</i>	<i>T. colubriformis</i>
					<i>T. axei</i>
					<i>T. vitrinus</i>
				<i>Cooperia</i>	<i>C. curticei</i>
					<i>C. pectinata</i>
				<i>Nematodirus</i>	<i>N. fillicolis</i>
					<i>N. spathiger</i>
				<i>Ostertagia</i>	<i>O. circumcincta</i>
					<i>O. trifurcata</i>
					<i>O. venulosum</i>
					<i>O. columbianum</i>
					<i>S. papillosus</i>
	Rhabditida	Strongyloididae	<i>Strongyloides</i>		

Fuente: Modificado de Rosa y Ribicich, 2012

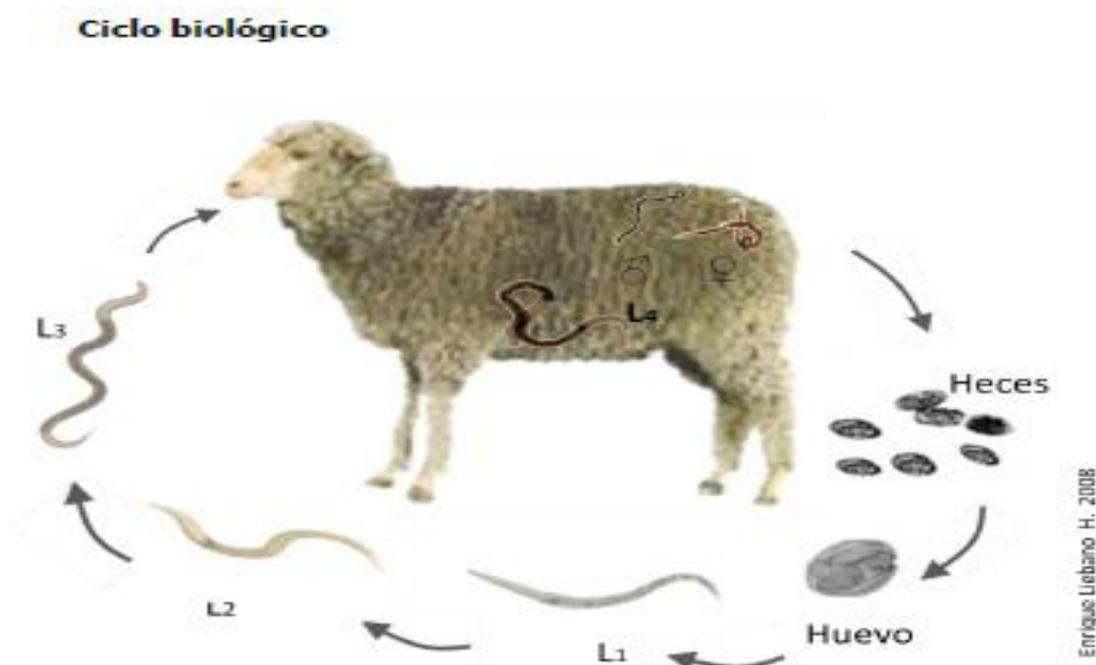
### **4.2 Morfología**

Los machos de *Haemonchus* miden de 10 a 22 mm y las hembras de 18 a 30 mm. Son parásitos hematófagos que en su estado larvario (larva 4 y 5) y adulto provocan lesiones hemorrágicas en el abomaso al dañar la mucosa por medio de una pequeña lanceta bucal. Estos parásitos extraen cantidades considerables de sangre (aproximadamente 0,05ml de sangre diario, por cada ejemplar adulto de éste parásito presente en el animal) lo que puede llevar a anemia si no es controlado (Fiel y Nari, 2013). *H. contortus* se lo puede localizar en abomaso, las hembras pueden ser visualizadas e identificadas por sus características morfológicas. Son de color rojo y blanco con un aspecto de “palo de barbero”, teniendo un potencial biótico de 5000 a 10000 huevos por día (Freyre y col., 1995). En cuanto a *T. colubriformis* se localiza en intestino delgado con una longitud promedio de 8 mm, alcanzando un potencial biótico de 100 a 200 huevos por día (Urribarren, 2015).

### 4.3 Ciclo Biológico de *Haemonchus contortus*

El ciclo biológico de *H. contortus* comienza con la eliminación de los huevos de los nematodos por medio de las heces de los hospedadores hacia la pastura (Figura 1). Pasan por estadios larvarios hasta llegar a la larva infectante (L3) condicionado por el clima (temperatura y humedad). Esta fase externa tiene una duración aproximada de 5 a 6 días (Quiroz y col., 2011). Luego se reconoce una fase interna la cual ocurre por la infección de los animales con las larvas L3, desarrollándose las larvas L4. Pasando a larvas L5 para luego diferenciarse en adultos machos y hembras cerrando nuevamente el ciclo con la ovoposición con un periodo prepatente de 20 días aproximados (Cordero del Campillo y col., 2001; Suárez y col., 2007; Jacobs y col., 2016).

Los estadios larvales hasta forma infectante ocurren fuera del hospedador (en el ambiente externo) (Fiel y Nari, 2013). La forma infectante ingresa al hospedador vía oral (única forma de infección en los ovinos). Esta libera la cutícula de la larva 2 y van a situarse al órgano anterior donde vivirá la forma adulta; pudiendo o no ingresar a mucosa donde van a mudar y luego regresar al lumen como L4 pasando a L5 y finalizando en adulto (Boch y Supperer, 1988; Suárez y col., 2007).



**Figura 1.** Ciclo Biológico de *H. contortus* en ovinos.

Fuente: Quiroz y col., 2011

En la fase fuera del hospedero, aparecen en las heces, los huevos de *H. contortus*, larva 1 (L1), larva 2 (L2), larva 3 (L3) forma infectante. Luego dentro del animal pasa a Larva 4 (L4) y (L5) hasta la forma adulta, diferenciándose en macho o hembra.

#### 4.4 Epidemiología

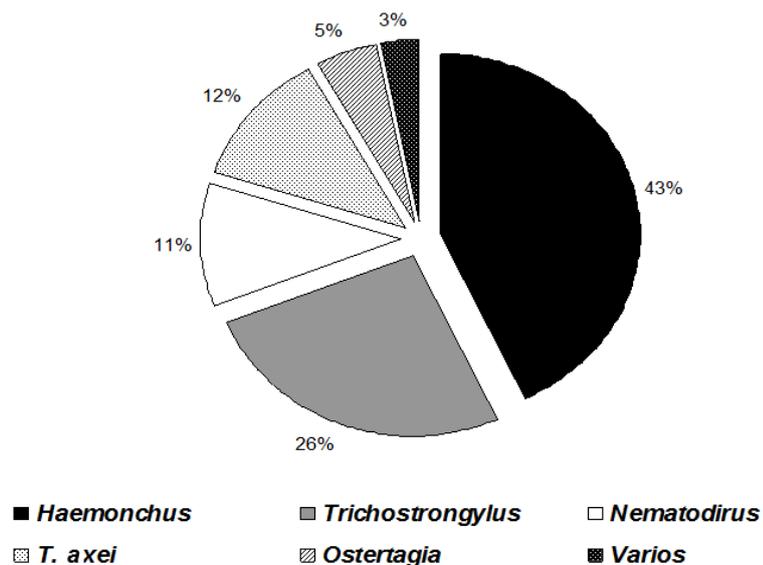
Al referirnos a la epidemiología cabe destacar que Uruguay es el único país de América que tiene clima templado no registrándose demasiadas variaciones de temperatura y humedad, por lo que los géneros parasitarios se distribuyen de forma homogénea por todo el país (Perrachon y col., 2001).

Los géneros de nematodos de los ovinos se los puede observar en diferentes épocas durante el año, lo que va a depender de la situación climática (Quiroz, 2002). *H. contortus* es de clima más cálido apareciendo principalmente en primavera y otoño, en el verano si las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas se puede producir la enfermedad en cambio en el invierno la enfermedad disminuye (Castells y col., 2013). Algunas larvas L4 tienen la capacidad de realizar hipobiosis si las condiciones no son adecuadas (Soulsby, 1987; Foreyt, 2001).

Las infecciones por *H. contortus* depende de la ingestión de larvas infectantes, del clima, tipo de pastura, dotación animal y el tipo de pastoreo (Mederos, 2002).

El alza de lactación es el aumento de eliminación de los huevos de los nematodos en las ovejas de cría cercana al parto y en la lactación temprana, lo que representa un factor importante debido a la posterior contaminación larvaria en la pastura para los corderos que nacen. En la oveja cercana a parir o recién parida ocurre un relajamiento de la resistencia inmunológica con producción de prolactina (que es inhibidor de la respuesta inmune), lo cual se puede acentuar entre las 6-8 semanas posparto (Fiel y Nari, 2013).

En la Figura 2 se observa la mayor proporción (43%) ocupada por *H. contortus*, seguida por *Trichostrongylus* con un (26%) y *Nematodirus* un (11%) (Castells, 2004).



**Figura 2.** Prevalencia de los géneros de Nematodos Gastrointestinales en ovinos del Uruguay.

Fuente: Castells, 2004.

Con la necesidad de tener datos actualizados Castells y col. (2013) realizaron un estudio por un período de 2 años distribuido estratégicamente en 6 lugares diferentes, abarcando el norte, sur, este y oeste del país por medio de 192 necropsias parasitarias (Tabla 2).

**Tabla 2.** Porcentaje de participación relativa anual acumulada de cada una de las especies encontradas entre el otoño del 2007 y el otoño del 2009.

	<i>H. contortus</i>	<i>T. axei</i>	<i>T. circumcincta</i>	<i>T. colubriformis</i>	<i>N. spathiger</i>	<i>Cooperia sp.</i>	<i>T. ovis</i>	<i>O. venulosum</i>
%	35,1	10,3	4,8	31,9	7,7	7,5	0,6	0,5

Fuente: Castells y col., 2013

Los resultados demuestran que *H. contortus* (35,1%) y *T. colubriformis* (31,9%) siguen siendo los NGI más prevalentes en el Uruguay con un 67% del total de NGI. En este sentido ambos estudios realizados en el 2004 y 2013 indican que se mantuvieron los porcentajes altos y que los más prevalentes en Uruguay son *H. contortus* y *T. colubriformis*.

## 4.5 Patogenia

Las infecciones por NGI son causantes de una serie de manifestaciones metabólicas que llevan a un síndrome parecido a la subnutrición. Disminuyendo la ingesta voluntaria de alimentación (Fiel y Nari, 2013). La hemoncosis está caracterizada por una anemia, que se la puede atribuir a la pérdida de sangre producida por los parásitos hematófagos dentro del abomaso. La pérdida de sangre puede llegar a ser significativa clínicamente, antes de que la infección sea detectable (Entrocasso y col., 2013).

En cuanto al mecanismo de alimentación requiere que se sujete a la mucosa y utilice su lanceta oral para cortar los capilares de la mucosa abomasal, ingiriendo la sangre que fluye por medio de los capilares cortados. Por otro lado segregan un anticoagulante en las lesiones, de modo que las mismas continúan sangrando aún después que *Haemonchus* haya abandonado el punto de alimentación (Nari y Cardozo, 1987; Cordero del Campillo y col., 2001).

## 4.6 Sintomatología

La sintomatología exhibida por *H. contortus* es muy variada dependiendo de la carga parasitaria y de la respuesta del hospedador donde se pueden generar en curso agudo o crónico (Angulo-Cubillán, 2005). Pudiéndose observar inapetencia, pérdida de peso, letargia, deshidratación, pelo hirsuto, mucosas pálidas, edema y aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria, disminución del hematocrito (anemia) (Nari y Cardozo, 1987). En fases terminales se pueden observar emaciación y muerte del animal afectado (Lapage, 1976).

Se pueden observar dos tipos de haemoncosis, aguda y crónica. La haemoncosis aguda ocurre generalmente cuando los ovinos desarrollan repentinamente una anemia. En ausencia de tratamiento y si los animales siguen pastoreando, empeorarán progresivamente. Cuando se realiza la detección de glóbulos, el hematocrito en un comienzo disminuye para luego estabilizarse, y luego disminuyendo aún más lo cual nos indica que el sistema eritropoyético está afectado, produciéndole la muerte del animal si no es tratado correctamente. En la necropsia se pueden encontrar de 2000 a 20000 *Haemonchus* contenidos en el abomaso, teniendo un color pardo debido a la presencia de sangre en su interior, también pudiéndose observar lesiones hemorrágicas en mucosa del abomaso (Nari y Cardozo, 1987).

Luego podemos encontrar haemoncosis crónicas las cuales se deben a infecciones con un pequeño número de *Haemonchus* sumado a una mala nutrición que persiste por largos periodos de tiempo. En estos casos de haemoncosis crónica los ovinos pierden diariamente una pequeña cantidad de sangre, sumado a esto existe una pérdida exacerbada de nutrientes debido a una deficiente dieta rica en proteínas. Perdiendo peso progresivamente debido a la movilización de proteínas de origen muscular para así proveer los aminoácidos para sintetizar proteínas de vital importancia como lo son las

proteínas del plasma la hemoglobina (Nari y Cardozo, 1987; Entrocasso y col., 2013).

#### **4.7 Diagnóstico**

En cuanto al diagnóstico la técnica McMaster es un método para diagnóstico que nos va a permitir reconocer de manera cuantitativa la cantidad de huevos que son eliminados por los parásitos por gramo de materia fecal, pero como limitante es que no vamos a poder diferenciar de manera exacta que especie o género de parásito está presente ya que la mayoría de los huevos de NGI son muy similares (Thienpot y col., 1986; Munguía, 2010). Por este motivo es necesario realizar otros análisis complementarios como la realización de cultivos fecales para así obtener larvas L1 las cuales podemos identificar por medio de sus características morfológicas (Fiel, 2005; Aguilar y col., 2011).

#### **4.8 Tratamiento y control de *Haemonchus contortus***

Antes de implementar un esquema de tratamiento es recomendable realizar análisis coprológico para estimar la carga parasitaria e identificar los géneros, para tomar la decisión de la utilización de ATH, para saber si realmente hay que tratar o no y que producto utilizar (Habela y col., 2002). Los antihelmínticos más utilizados son Imidazotiasoles como el levamizol y tetramizol que combaten la forma adulta y en menor medida la forma larvaria, los Benzimidazoles y las Lactonas Macroclínicas (Habela y col., 2002). La gama de productos son variados pero a pesar de esto se producen errores o fallas en los tratamientos como dosificaciones equivocadas, subdosificaciones, aparición de resistencia, reinfección, utilización de productos inapropiados, no conocer el potencial biótico del parásito, uso repetido del mismo fármaco y abuso de tratamientos (Fiel y Nari, 2013).

Hay diferentes métodos para el control, en cuanto a *H. contortus* tenemos control químico (antihelmíntico), de manejo mediante pasturas seguras, genético utilizando animales resistentes, inmunitario por medio de vacunas, control biológico como lo son artrópodos y microorganismos, hongos, taninos condensados, suplementación proteica (Secretariado Uruguayo, 2013). Los más frecuente son las diferentes estrategias de dosificación y los manejos de pastoreo consistiendo en la alternación de especies bovinas y ovinas o categorías (adultas y jóvenes) o rotativo donde se subdividen potreros llevando a la disminución de la permanencia de los animales en dichos potreros aumentando los periodos de descanso (Nari y Cardozo, 1987).

En Uruguay mediante sistemas de 28 días de permanencia y de 90 a 120 de descanso ha generado buenos resultados. Sin embargo cuando las condiciones climáticas son favorables para el *Haemonchus* los 28 días pueden ser suficiente para cerrar el ciclo dado que el periodo prepatente es de 20 días aproximados.

El pastoreo rotativo favorece el control de *Haemonchus* por el tiempo de permanencia y de descanso. Cuando los tiempos de permanencia en los potreros de los animales son cortos (menos de 7 días) la reinfección no se produce ya que cuando las larvas infectantes están disponibles los animales no estarán en ese potrero (Perrachon y col., 2001).

Las dosificaciones estratégicas están pensadas en diferentes momentos de una majada que va a ser: pre-encarnerada, pre-parto, señalada y destete (Secretariado Uruguayo, 2013). Las dosificaciones tácticas dependen del clima si es cálido o si es húmedo durante el año, la cantidad de lluvia, dándose principalmente en primavera/otoño o veranos (Perrachon y col., 2001). Las dosificaciones 2-3 semanas después de lluvias prolongadas; las categorías recomendadas a dosificar son lanares jóvenes (destetes, recrias) (Fiel y Nari, 2013).

En la actualidad el principal método de control de *Haemonchus* es mediante el uso de diversos antihelmínticos (ATH), por lo que el uso indiscriminado de ATH ha generado resistencia en muchos de los productos actualmente en el mercado (Márquez Lara, 2007), con diferentes mecanismos de acción, aunque las avermectinas, los bencimidazoles y los agonistas nicotínicos son los grupos de ATH más utilizados en los ovinos en Uruguay (Mbarria y col., 1998; Martin y Robertson, 2000). Lo cual resulta necesario buscar alternativas en busca de nuevas estrategias que complementen el control químico de *H. contortus*, haciendo énfasis en disminuir el uso de medicamentos.

Un concepto importante a destacar son las poblaciones de refugio, que son aquellas poblaciones que permanecen en vida libre (huevos y larvas de *Haemonchus*), las cuales no son afectadas directamente por medio del uso de productos químicos ATH. Es por este motivo que el tamaño de la población de refugio juega un rol fundamental ya que a menor población residual, mayor posibilidad de adquirir RA (Nari, 2001; Fiel y Steffan, 2012).

Existe un método práctico para evaluar clínicamente a los animales que presentan anemia, generalmente causada por *Haemonchus*, conocido como sistema FAMACHA®, permitiendo conocer indirectamente el estado de la parasitosis presente en los animales en base a dicho sistema, pudiendo optar por una toma de decisión si aplicar tratamiento ATH o no. Se basa en la visualización de la coloración de las mucosas oculares y se la compara con una escala de valores en cinco grados, pudiendo en dicho caso optar por aplicar un tratamiento a aquellos animales que lo requieran (Bath y col., 2001).

Uno de los fenómenos más importantes a destacar es la RA que está ampliamente distribuida en todos los países productores de ovinos. Se la puede definir como una modificación heredable que tienen los parásitos para poder sobrevivir a dosis de ATH terapéuticas recomendadas (Craig, 1993; Jackson, 1993). Los factores que favorecen son, manejo inadecuado de ATH, como un elevado uso de números de dosificaciones o la utilización repetida de una misma droga, como también la introducción de animales de predios que hayan reportado casos de RA (Perrachon y col., 2001). Banchero y Mederos, (2013) a partir de un estudio previo realizado por DILAVE “M. C. Rubino” en el año 1994,

se pudo determinar que la resistencia a los Benzimidazoles alcanzó un 80% en los predios estudiados, mientras que en un 70% de los establecimientos también presentaban resistencia a los Levamisoles y 1,5% a Ivermectina.

Algunos de los alimentos para animales (cultivos bioactivos) pueden ser particularmente beneficiosos. Por ejemplo, forrajes ricos en taninos como la alfalfa y trébol reducen el establecimiento de larvas infectantes de nematodos. También protegen a la proteína de la degradación microbiana en el rumen, lo que aumenta el suministro de proteína vegetal para el cuajar. Muchas otras plantas, por ejemplo, achicoria tienen actividad antiparasitaria, propiedades que en teoría podrían ser explotadas, ya sea como forrajes en un programa de pastoreo o como suplementos alimenticios, existiendo diferentes alternativas para el control de NGI mediante el uso de plantas (Goldberg y col., 2011; Jacobs y col., 2016).

En la actualidad se encuentran en estudio muchas plantas con propiedades antihelmínticas debido a sus principios activos. Constituyendo un método ecológico para el tratamiento de los parásitos pudiendo contribuir en la disminución del uso de sustancias químicas sintéticas (Arace Garcia y Barrabi Puerta, 2013).

Se han realizado diversos estudios en Latino América con la utilización de diversas plantas. Un ejemplo es el caso de *Gliricidia sepium* la cual mostró buenos resultados en base a los compuestos de dicha planta como lo son los Taninos y Saponinas que resultaron tener efecto ovicida frente a NGI (Pérez y col., 2014). Por otra parte el uso de la familia de *Oreganum vulgare* (orégano molido) demostró efecto antihelmíntico, dando resultados alentadores ya que disminuyó la carga parasitaria adulta por lo tanto la cantidad de huevos (Manquía y col., 2013).

A su vez en Brasil también se han realizado ensayos *in vitro* utilizando *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* las cuales mostraron resultados alentadores sobre las fases exógenas de nematodos posiblemente por la interacción de las lecitinas y los taninos condensados contribuyendo a la inmovilización de una gran cantidad de larvas interfiriendo en la movilización de las L3 (Puerto Abreu y col., 2014).

Con respecto a *Baccharis trimera* existen antecedentes en Brasil que demuestran tener propiedades antiparasitarias frente a *Rhipicephalus microplus* (Duarte y col., 2013) y *Schistosoma mansoni* (Garcia y col., 2014). En nuestro país esta planta es una especie nativa. Dentro de la flora nativa, la familia *Astraceae* es el grupo con mayor número de especies, muchas consideradas como malezas de la agricultura. El género *Baccharis* cuenta con al menos 50 especies en Uruguay incluyendo las conocidas Chircas y Carqueja.

#### 4.9 Descripción de *Baccharis trimera* (Carqueja)

Uruguay posee numerosas especies autóctonas, con antecedentes de uso medicinales y con propiedades biológicas. Entre ellas *B. trimera* comúnmente conocida como Carqueja, la cual presenta propiedades beneficiosas tales como; antiasmática, antibiótica, antiinflamatoria, antidiabética, emoliente, estimulante hepática, estomacal, etc. Es un arbusto de color verde, con abundantes tallos erectos, sin pelo, midiendo entre 50 a 70 cm de altura. Es una especie de ciclo estival, perenne y dioico por lo que podemos encontrar plantas masculinas y femeninas. Se caracteriza por ser muy ramosa con tallos con tres alas y hojas triangulares muy reducidas (Varela y col., 2016). Las flores crecen en capítulos pequeños, situándose en las porciones superiores de las ramificaciones. Los capítulos femeninos son cilíndricos mientras que los masculinos son hemisféricos. También presentan frutos muy pequeños de 5 a 6 mm de longitud que presentan una corona de pelos denominada Pappus de pelos. Florece desde febrero hasta abril, llegando algunos años hasta junio (Birriel y col., 2013; Fagro, 2016).

Es considerada una maleza que se distribuye por todo el territorio de la República Oriental del Uruguay, encontrándose también en países como Argentina, Brasil y Paraguay. Es una maleza que no es muy palatable para el ganado tanto bovino como ovino, sin embargo los brotes jóvenes pueden ser consumidos por los ovinos accidentalmente o en periodos de seca (Birriel y col., 2013; Fagro, 2016).

Comúnmente se la utiliza por medio de infusiones con fines terapéuticos tales como; litiasis hepática, cólicos biliares, trastornos digestivos, forúnculos, urticaria, abscesos (Birriel y col., 2013). También estimula las defensas del organismo, tiene actividad hipoglucemiante, diuréticas entre muchas otras propiedades beneficiosas. En lo que respecta a sus componentes químicos, podemos mencionar compuestos fenólicos flavonoides, mono y sesquiterpenos, tricótesenos, alcoholes, acetato de carquejilla y lactonas diterpenicas (Davies, 2004; Minteguiaga y col., 2015; Varela y col., 2016). En la Tabla 3 podemos observar los compuestos químicos del extracto de *Baccharis trimera* más importantes o relevantes con sus respectivas distribución porcentual.

**Tabla 3.** Compuestos químicos más importantes o relevantes de *Baccharis trimera* con sus respectivas distribuciones porcentuales.

Material Vegetal	Principales compuestos (%)					
<i>Baccharis trimera</i>	Acetato de Carquejilla (47,8)	B-pineno (9,1)	Palustrol (7,3)	B-felandreno (6,2)	(E)- $\beta$ -ocimeno (4,0)	Viridiflorol (3,9)

Fuente: Lombardo, 2015

## **5. HIPÓTESIS**

El extracto de *Baccharis trimera* presenta actividad antihelmíntica frente a *H. contortus*.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo General**

Estudiar el efecto *in-vitro* de *Baccharis trimera* (carqueja) sobre *Haemonchus contortus*.

### **6.2 Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto *in-vitro* sobre huevos de *Haemonchus contortus*.
- Evaluar el efecto *in-vitro* sobre larvas de *Haemonchus contortus*.
- Evaluar el efecto *in-vitro* sobre adultos de *Haemonchus contortus*.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Material vegetal**

El material utilizado en este estudio fue aceite esencial (AE) de la planta *Baccharis trimera*, perteneciente a la familia Astraceae, conocida comúnmente como (Carqueja) (Figura 3). El material utilizado fue aportado por la Prof. Pamela Lombardo del Depto. de Protección Vegetal de Facultad de Agronomía de la UdelaR. El AE fue preparado por hidrodestilación de hojas y flores colectadas en la Estación Experimental de Facultad de Agronomía de Salto (31° 23' S y 57° 43' O) por la Prof. Lombardo (Lombardo y col, 2016).

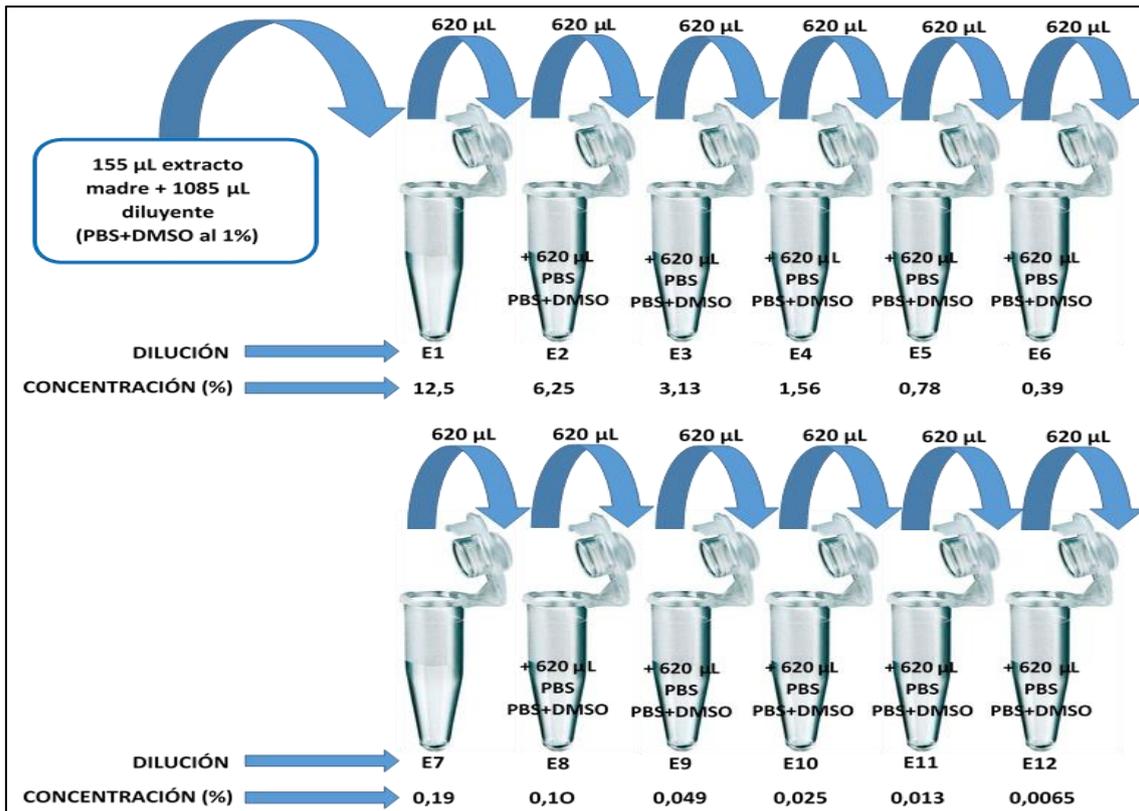


**Figura 3.** *Baccharis trimera* (Carqueja).

Fuente: Fagro, 2016.

#### **7.1.1 Preparación de las diluciones del aceite esencial (AE) de *Baccharis trimera***

A partir de la solución madre del AE se prepararon diferentes concentraciones del AE, la primer dilución del extracto fue preparado al 12,5% colocando en el primer tubo eppendorf 155  $\mu$ l del extracto madre en 1085  $\mu$ l de Buffer Fosfato Salino con un pH = 7 (PBS) conteniendo 1% de Dimetilsulfoxido (DMSO al 1%). Luego se colocó en los once tubos eppendorf 620  $\mu$ l del diluyente (PBS+DMSO al 1%). Se tomó 620  $\mu$ l del primer tubo para así agregarlo al segundo tubo eppendorf homogenizándolo, del segundo tubo también se tomaron 620  $\mu$ l para agregarlo al tercer tubo eppendorf y así sucesivamente hasta completar las 12 diluciones del extracto de *B. trimera* como se muestra en la (Figura 4).



**Figura 4.** Preparación de diluciones realizadas del Extracto de *Baccharis trimera*.

E1- primera dilución del AE  
 E2- segunda dilución del AE  
 E3- tercera dilución del AE  
 E4- cuarta dilución del AE  
 E5- quinta dilución del AE  
 E6- sexta dilución del AE

E7- séptima dilución del AE  
 E8- octava dilución del AE  
 E9- novena dilución del AE  
 E10- décima dilución del AE  
 E11- onceava dilución del AE  
 E12- doceava dilución del AE

## 7.2 Obtención de material parasitario

Se trabajó con 22 abomasos obtenidos de la playa de faena del Frigorífico Daymán Meat en el departamento de Salto, procesando cada uno de los abomasos inmediatamente en el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Veterinaria, CenUR, Litoral Norte. Se procedió a coleccionar todos los adultos de *H. contortus* mediante una pinza y colocándolos en un frasco conteniendo agua destilada como se muestra en la Figura 5.

Para la obtención de huevos de *H. contortus*, se procedió a realizar la selección de las hembras de *H. contortus* clasificándolas mediante características morfológicas visualizándolas en estereoscopio (Martinez Grueiro, 2002; Arace Garcia y col., 2014; Puerto Abreu y col., 2014), depositándolas en un frasco el cual contenía agua destilada, posteriormente se colocaron las hembras de *H. contortus* en un mortero, realizando el macerado de las mismas logrando romper

el útero y así liberar los huevos contenidos en dicho órgano. Se visualizó los huevos mediante lupa estereoscópica y se procedió a la limpieza del material dejando únicamente los huevos de *H. contortus* en agua destilada. En un volumen de 10 cm<sup>3</sup> de agua destilada conteniendo los huevos de *H. contortus* se realizó el conteo de los mismos. Para ello se hicieron 4 tomas de 100 µl cada una. Antes de realizar cada toma se homogeneizó bien para que el conteo sea representativo de la cantidad de huevos. Se realizaron el cálculo del promedio de huevos contados en las 4 muestras, y se estimó 16100 huevos en el volumen inicial de 10 cm<sup>3</sup>.

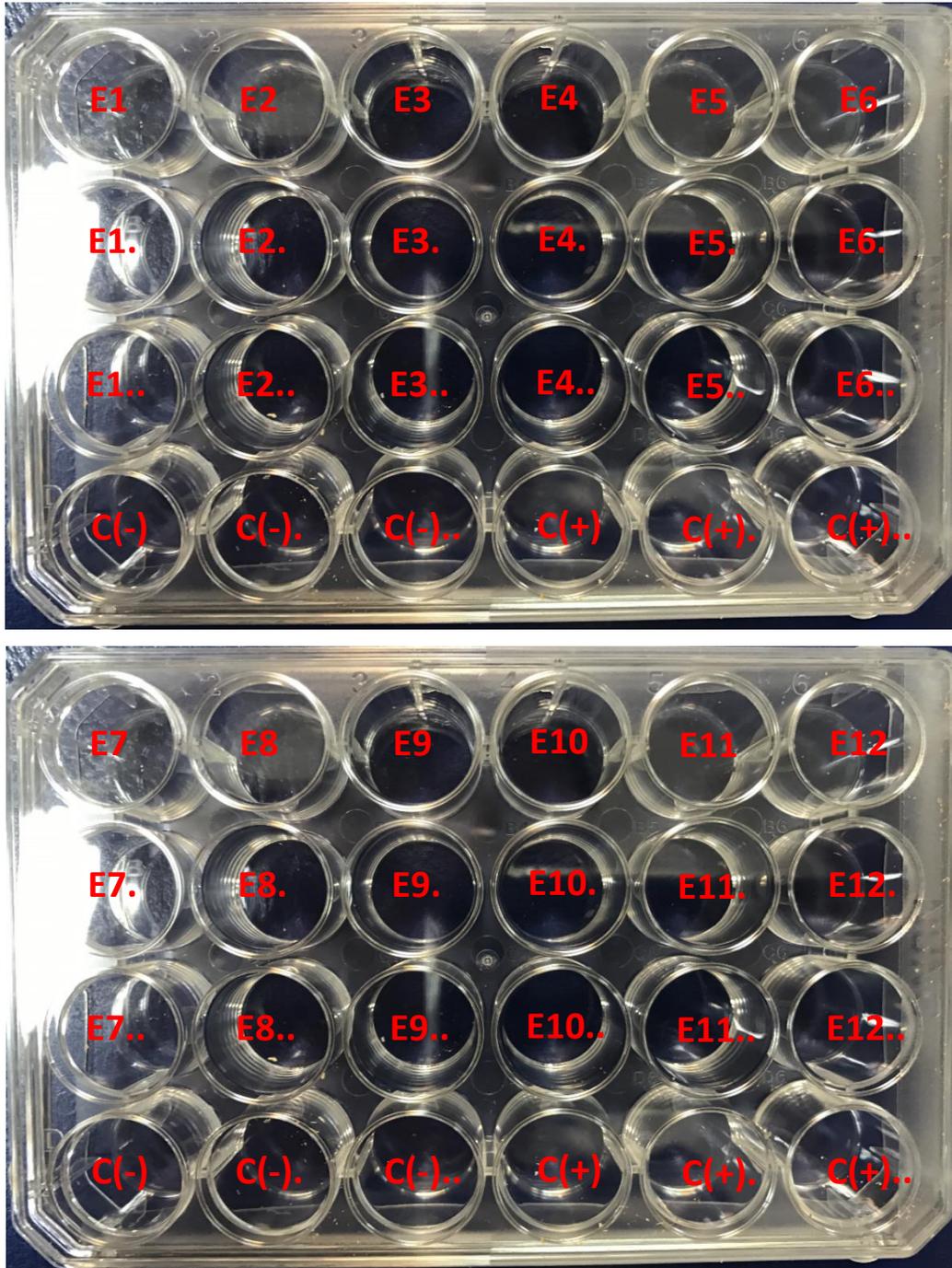
Para la obtención de las larvas infectantes L3 de *H. contortus*, se utilizaron los huevos obtenidos previamente, realizando un cultivo de larva mediante la técnica Robert O` Sullivan (Niec, 1968), dejándolo en estufa a 26-28°C durante un periodo de 7 días, controlando la humedad y temperatura diariamente, se lo sacaba de la estufa todos los días para airearlo y se dejaba temperatura ambiente durante dos horas. Para el conteo de las larvas infectantes L3 de *H. contortus* se partió de cuatro muestras de 100 µl tomadas mediante una micropipeta. Se promediaron las cuatro muestras y se estimó el total de larvas infectantes L3 de *H. contortus* que fue de 1600 larvas.



**Figura 5.** Obtención de material parasitario

### 7.3 Test de eclosión de huevos

Para la evaluación de la eclosión de los huevos de *Haemonchus* se utilizaron dos placas de cultivo celular de 24 pocillos (Nuncclon, Denmark). Se colocó en cada uno de los pocillos 200 µl de agua destilada conteniendo 100 huevos aproximadamente por pocillos de *H. contortus*. A 6 columnas de cada placa se le adicionaron 200 µl del extracto en 12 diluciones por triplicado (12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10%, 0,049%, 0,025%, 0,013%, 0,0061%). Como control positivo se agregó 200 µl de Ricobendazol a la dosis de 12,5 mg/ml, (Ferreya y col., 2002). Como control negativo PBS+DMSO al 1%, ambos por triplicado para cada placa. En la Figura 6 se muestra esquematizado los diferentes tratamientos utilizados y los controles en las placas.



**Figura 6.** Test de eclosión de huevos de *Haemonchus contortus*.

Esquema de las placas de cultivo celular mostrando los 12 tratamientos y los controles.

E1 primera dilución del AE  
 E2- segunda dilución del AE  
 E3- tercera dilución del AE  
 E4- cuarta dilución del AE  
 E5- quinta dilución del AE  
 E6- sexta dilución del AE

C (-) control negativo PBS+DMSO al 1%

E7- séptima dilución del AE

E8- octava dilución del AE

E9- novena dilución del AE

E10- décima dilución del AE

E11- onceava dilución del AE

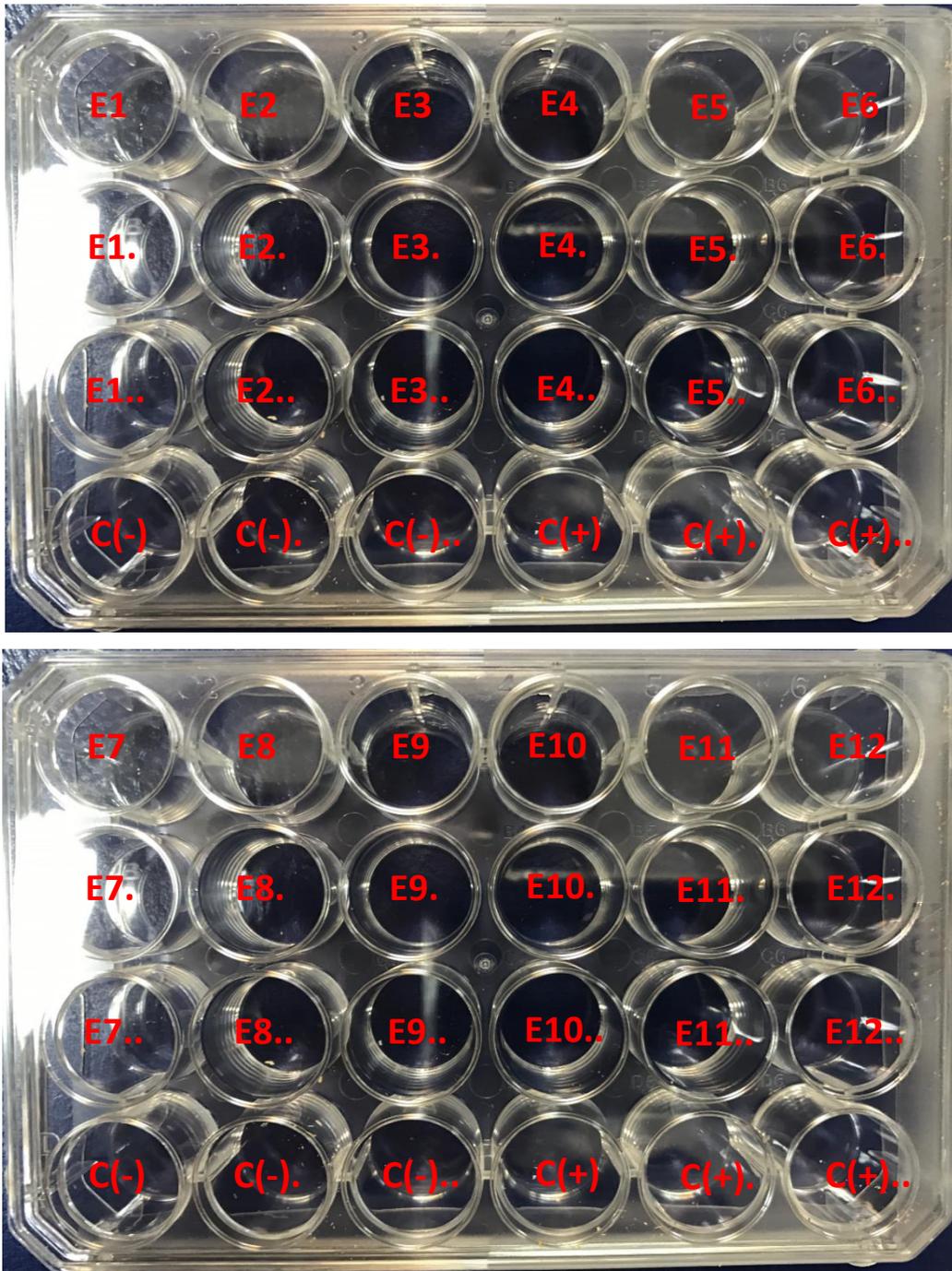
E12- doceava dilución del AE

C (+) control positivo Ricobendazol (CRIC)

Las placas fueron incubadas en estufa a una temperatura entre 26-28°C, en cámara húmeda, adicionándole un film antes de tapar cada placa. A las 72 horas se efectuó la lectura definitiva de manera aleatoria de los 48 pocillos cuantificando los huevos no eclosionados y las larvas presentes en cada uno de los pocillos mediante microscopio óptico a 4x y 10x (Martinez Grueiro, 2002; Arace Garcia y col., 2014; Puerto Abreu y col., 2014).

#### **7.4 Test de motilidad larvaria**

En placas de 24 pocillos cada una (Nunclon, Denmark) se colocaron aproximadamente 25 larvas infectantes (L3) móviles del cultivo puro de *Haemonchus* en cada pocillo, en 200 µl de agua destilada. Luego se procedió a la colocación de 200 µl del extracto en 12 diluciones diferentes (12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10%, 0,049%, 0,025%, 0,013%, 0,0061%) por triplicado. Como control negativo se adicionó 200 µl de PBS+DMSO al 1%. Como control positivo se adicionó la cantidad de 200 µl de Levamisol a la dosis de 2 mg/ml (Boggio, 2005), ambos controles por triplicado. En la Figura 7 se muestra esquematizado los diferentes tratamientos utilizados y los controles en las placas.



**Figura 7.** Test de motilidad de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Esquema de las placas de cultivo celular mostrando los 12 tratamientos y los controles.

E1- primera dilución del AE  
 E2- segunda dilución del AE  
 E3- tercera dilución del AE  
 E4- cuarta dilución del AE  
 E5- quinta dilución del AE  
 E6- sexta dilución del AE

C (-) control negativo PBS+DMSO al 1%

E7- séptima dilución del AE

E8- octava dilución del AE

E9- novena dilución del AE

E10- décima dilución del AE

E11- onceava dilución del AE

E12- doceava dilución del AE

C (+) control positivo Levamisol (CLEV)

Se tapan las placas y se incuban en estufa durante 72 horas a temperatura entre 26-28°C, en cámara húmeda, adicionándole un film antes de tapar cada placa. Se efectuó el conteo total a las 72 horas de manera aleatoria, determinando el número de larvas móviles y no móviles mediante la observación al microscopio óptico con aumentos de 4x y 10x (Arace Garcia y col., 2014).

### 7.5 Test de motilidad en estadio adulto

En una placa de 24 pocillos (Nunclon, Denmark) se colocaron 5 *Haemonchus* adultos móviles en cada pocillo en 200 µl de agua destilada. Se utilizaron 10 tratamientos con diferentes diluciones de AE (12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10%, 0,049%, 0,025%) por duplicado. Como control positivo se utilizó Moxidectina al 1% (Aguilar-Tipacamú y Rodríguez-Vivas, 2002) y como control negativo PBS+DMSO al 1%, ambos por duplicado. Se evaluó la movilidad de los adultos cada 5 minutos, por observación directa, durante 2 horas para finalizar a las 13 horas de iniciado el experimento. Se utilizó una escala de Unidad Arbitraria asignada para la motilidad de adultos, se muestra en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Escala de Unidad Arbitraria (UA) asignada a motilidad de adultos.

<b>Valoracion Subjetiva</b>	(UA)	
<b>Extremadamente Móvil</b>	(+ + + + +)	<b>5</b>
<b>Muy Movil</b>	(+ + + +)	<b>4</b>
<b>Movil</b>	(+ + +)	<b>3</b>
<b>Levemente Movil</b>	(+ +)	<b>2</b>
<b>Movilidad casi inaparente</b>	(+)	<b>1</b>
<b>Ausencia de Movilidad</b>	(o)	<b>0</b>

## 7.6 Análisis de datos

Para la evaluación de los resultados obtenidos entre las diferentes diluciones del extracto y los controles positivos y negativos, para el test de eclosión de huevo y motilidad larvaria, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Minitab y Excel. Se partió de los porcentajes promedios de las tres repeticiones efectuadas para cada uno de los tratamientos y ensayos.

Para calcular el IC<sub>50</sub>, es decir la dilución del extracto capaz de inhibir el 50% de eclosión de huevos, así como para inhibir el 50% de motilidad larvaria fueron graficados los datos obtenidos mediante Microsoft Excel, expresando las concentraciones a escala logarítmica. Se aplicó dicha escala debido a que cuando existe una relación dosis dependiente entre las concentraciones de una sustancia y un efecto, los datos suelen ajustarse a una curva sigmoidea, por lo que al representar los valores de las diferentes concentraciones o tratamientos en escala logarítmica esto nos permite el cálculo de la IC<sub>50</sub> en el tramo lineal de la curva. El valor de la IC<sub>50</sub> se pudo obtener por interpolación de la ecuación del gráfico de los dos ensayos realizados.

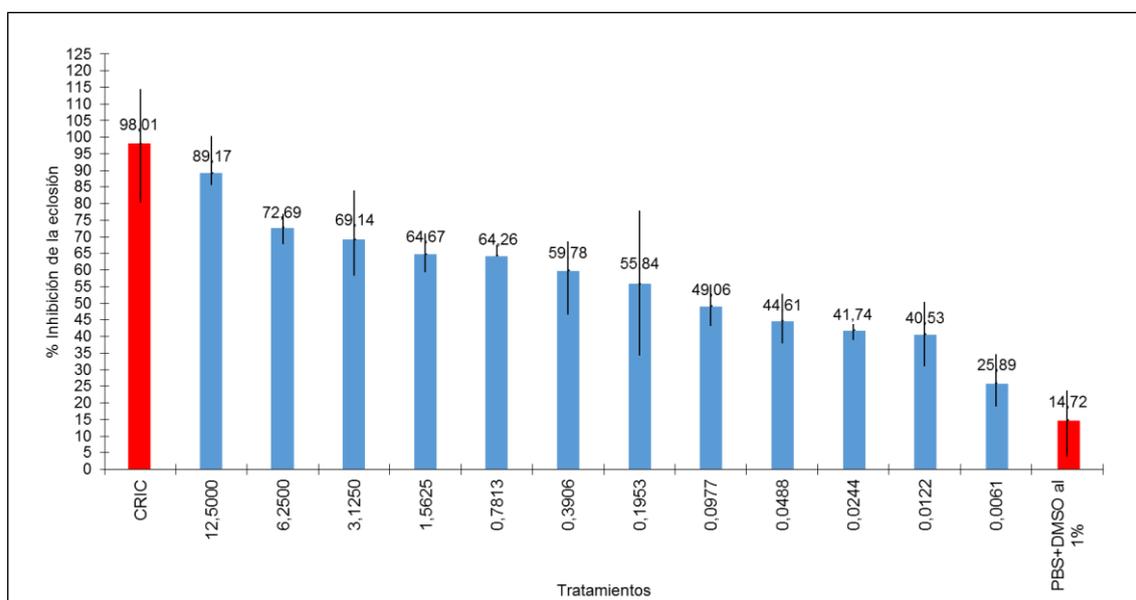
Para el test de motilidad de Adultos se utilizó una escala de Unidades Arbitrarias para poder procesar los resultados obtenidos mediante el programa Excel, y así graficar y evaluar el efecto independiente y en conjunto de cada tratamiento utilizado.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Efecto del AE de *Baccharis trimera* sobre la eclosión de huevos

Se estudió el efecto del AE de *B. trimera* sobre los huevos de *Haemonchus* obtenidos a partir de macerado de hembras previamente seleccionadas por características morfológicas.

A los efectos de evaluar el efecto de *B. trimera*, se realizó el conteo de los huevos que no eclosionaron en cada pocillo. Se calculó el promedio del porcentaje de la inhibición de la eclosión de los huevos de *H. contortus* a partir de las tres repeticiones efectuadas para cada uno de los tratamientos y para los controles positivos (Ricobendazol) y negativo (PBS+DMSO al 1%). En la Figura 8 se muestran los porcentajes de inhibición promedio con sus respectivos desvíos estándar.



**Figura 8.** Efecto de *B. trimera* en el test de eclosión de huevos de *H. contortus*.

Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus*, promedio del efecto del AE y sus desvíos estándar.

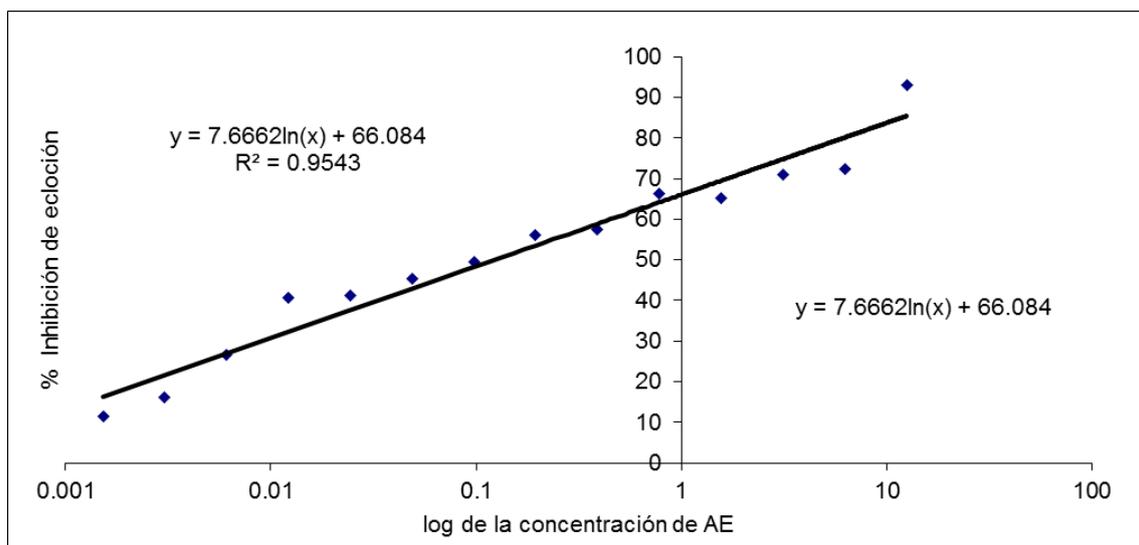
E1- primera dilución del AE (12,5%)  
E2- segunda dilución del AE (6,25%)  
E3- tercera dilución del AE (3,125%)  
E4- cuarta dilución del AE (1,56%)  
E5- quinta dilución del AE (0,78%)  
E6- sexta dilución del AE (0,39%)  
C (-) control negativo PBS+DMSO al 1%

E7- séptima dilución del AE (0,19%)  
E8- octava dilución del AE (0,10%)  
E9- novena dilución del AE (0,049%)  
E10- décima dilución del AE (0,025%)  
E11- onceava dilución del AE (0,013%)  
E12- doceava dilución del AE (0,0061%)  
C (+) control positivo Ricobendazol (CRIC)

Se puede observar un efecto dosis-respuesta a medida que disminuye la cantidad de AE que se enfrenta a los huevos, hay mayor eclosión de huevos.

Al comparar los tratamientos con los controles podemos destacar que para el tratamiento E1 (12,5%) se obtuvo una inhibición de la eclosión de huevos de 89,17%, mientras que en nuestro control positivo (Ricobendazol al 12,5 mg/ml) se obtuvo un promedio de 98,01% de inhibición de la eclosión de huevos. Para las siguientes concentraciones del AE va disminuyendo el efecto paulatinamente, observándose efecto en todas las diluciones ensayadas. Se muestra además el control negativo, que es el diluyente.

Se realizó el cálculo de la IC<sub>50</sub>. Para ello en la Figura 9 se muestra el gráfico de los porcentajes promedios de inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* para las distintas concentraciones del extracto a escala logarítmica. Se corrige el gráfico respecto al control negativo dado que en mi control negativo se registró inhibición del 14,72%.



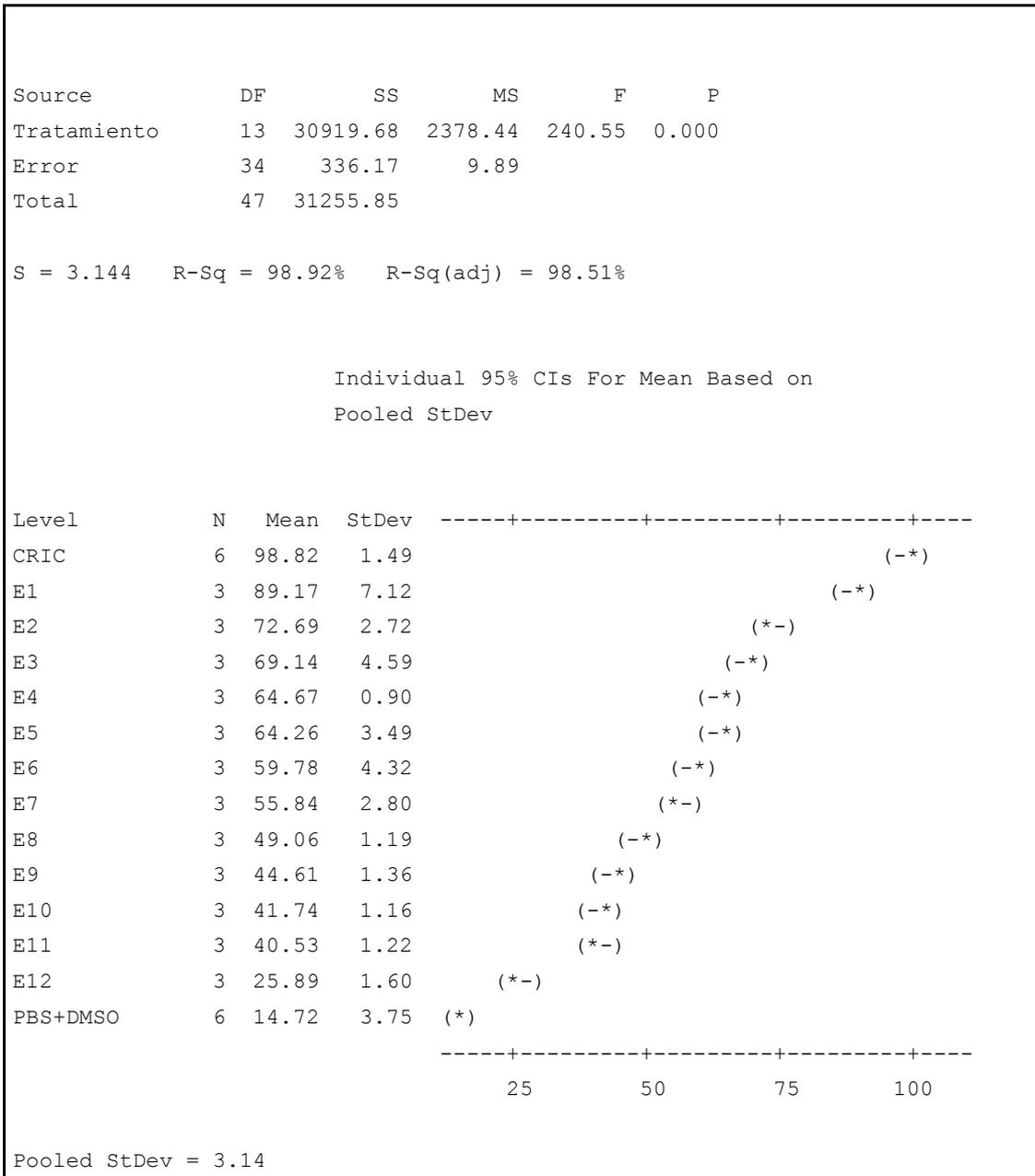
**Figura 9.** Efecto dosis- respuesta del extracto de *B. trimera* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus*.

Se obtuvo un valor de  $R^2 = 0,9542$  ( $r = 0,9731$ ) lo que indica que el nivel de correlación entre el porcentaje de inhibición de la eclosión y el logaritmo de la concentración es elevado, debido a que cuanto más cerca de uno se encuentre el valor de  $r$  mayor es el grado de correlación. A partir de la ecuación del gráfico se obtuvo el IC<sub>50</sub> = 0,3274, es decir el porcentaje del extracto que corresponde a la inhibición del 50% de eclosión de huevos de *H. contortus*.

Para los tratamientos E1 (12,5%) hasta E7 (0,1953) del AE, supera el 50% la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus*. En lo que respecta a los

tratamientos E8 (0,0977%) a E11 (0,0122%), encontramos que hay inhibición de la eclosión de huevos, si bien los mismos son inferior al 50% de inhibición, pero significativa respecto al control negativo. Para finalizar con el tratamiento E12 (0,0061%) se observa el menor efecto pero es significativamente diferente con respecto al control negativo PBS+DMSO al 1%. En la Tabla 5 se muestra el análisis estadístico de resultados.

**Tabla 5.** Análisis de varianza entre los diferentes tratamientos en relación a la inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus*.



## 8.2 Efecto del AE de *Baccharis trimera* sobre los estadios larvarios infectantes

Para evaluar el efecto de *B. trimera* sobre el estadio larvario infectante se realizó el estudio del efecto del AE sobre la motilidad por observación al microscopio óptico luego de 72 h de incubación a 26-28 °C. Se calculó el porcentaje promedio de larvas con movilidad de las tres repeticiones para cada tratamiento y para los controles positivo (Levamisol) y negativo (PBS+DMSO al 1%). Los mismos fueron graficados con sus correspondientes desvíos estándares como se muestran en la Figura 10.



**Figura 10.** Efecto de *B. trimera* en el test de motilidad de larvas infectantes de *H. contortus*.

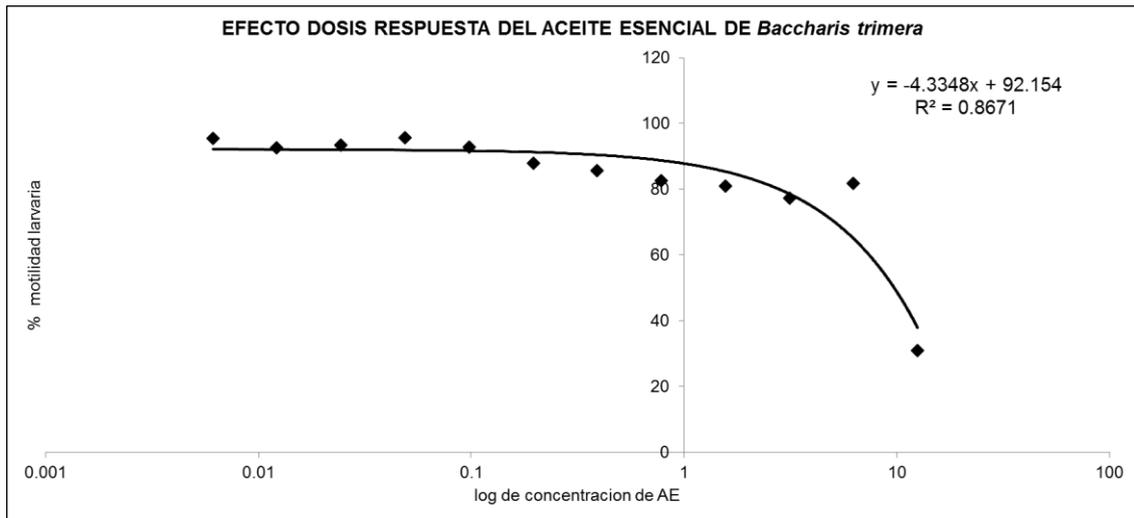
Porcentaje de motilidad larvaria de *H. contortus*, promedio de las tres repeticiones de las diferentes diluciones de AE y sus desvíos estándar.

- |                                       |                                         |
|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| E1- primera dilución del AE (12,5%)   | E7- séptima dilución del AE (0,19%)     |
| E2- segunda dilución del AE (6,25%)   | E8- octava dilución del AE (0,10%)      |
| E3- tercera dilución del AE (3,125%)  | E9- novena dilución del AE (0,049%)     |
| E4- cuarta dilución del AE (1,56%)    | E10- décima dilución del AE (0,025%)    |
| E5- quinta dilución del AE (0,78%)    | E11- onceava dilución del AE (0,013%)   |
| E6- sexta dilución del AE (0,39%)     | E12- doceava dilución del AE (0,0061%)  |
| C (-) control negativo PBS+DMSO al 1% | C (+) control positivo Levamisol (CLEV) |

Para el test de motilidad larvaria, de los resultados obtenidos se observa un leve efecto dosis-respuesta. El tratamiento E1 (12,5%) mostró falta de motilidad manteniendo las larvas móviles en un 29,28% o inhibiendo la motilidad de las larvas en un 70,72%. Los tratamientos E2 (6,25%) a E7 (0,1953%) se comportaron de manera similar con un promedio en el entorno del 82,29% de

movilidad. Por otra parte los tratamientos E8 (0,0977%) a E12 (0,0061%) también se comportaron de igual manera entre si, con un promedio de 92% de las larvas móviles, del orden del control negativo.

Para el cálculo de la IC50, en la Figura 11 se graficaron los porcentajes promedios de inhibición de la movilidad de larvas infectantes de *Haemonchus* en las distintas concentraciones del extracto a escala logarítmica.



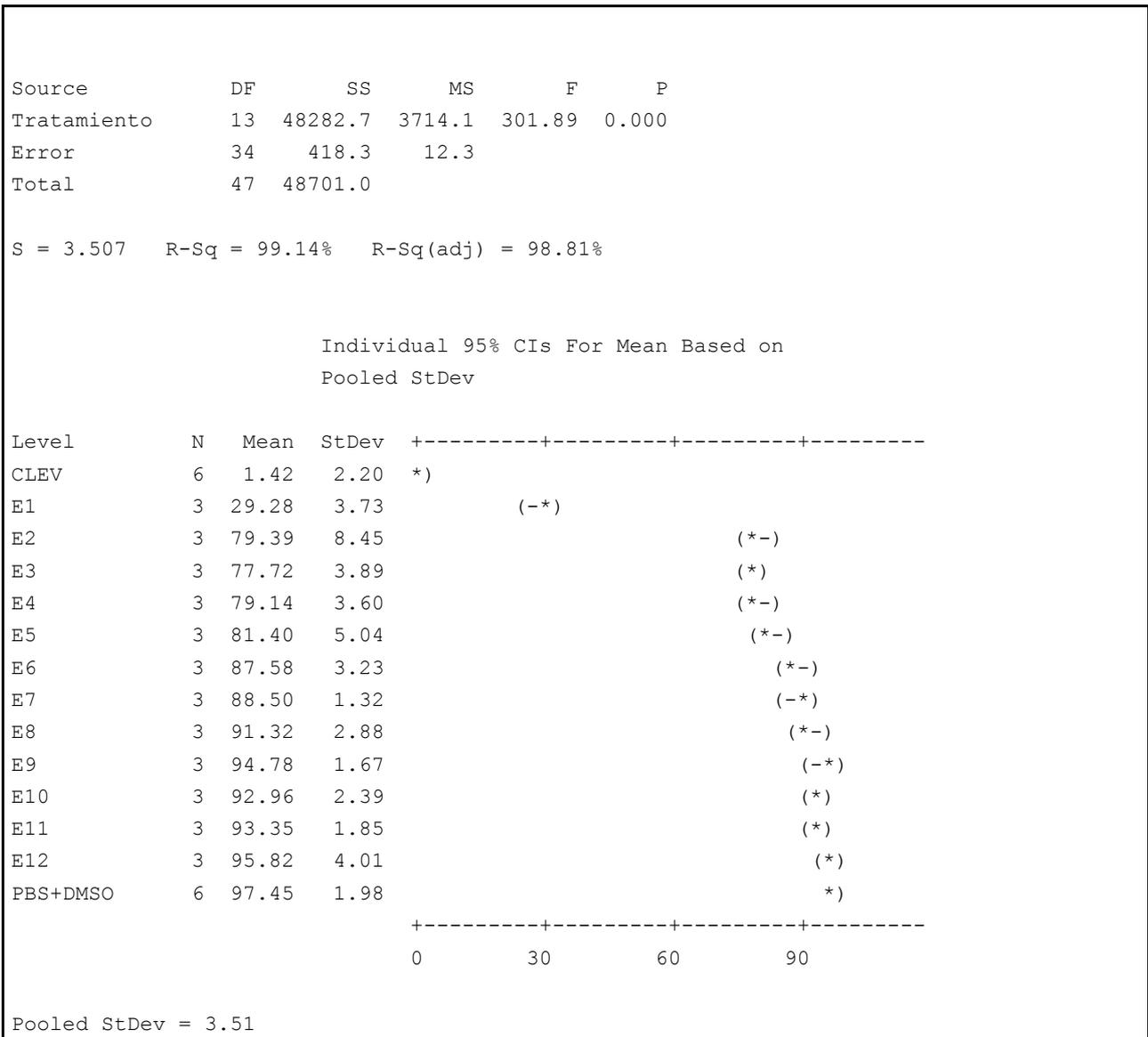
**Figura 11.** Efecto dosis respuesta sobre larvas infectantes de *H. contortus*.

Motilidad larvaria frente a las distintas diluciones del extracto o aceite esencial de *Baccharis trimera*, incluyendo tres repeticiones por cada tratamiento.

Se obtuvo un  $R^2 = 0,8671$  ( $r = 0,9312$ ) lo que indica que el grado de correlación entre el porcentaje de la movilidad y el logaritmo de la concentración que se obtuvo fue alto. A partir de la ecuación del gráfico se obtuvo el IC 50 = 9,725, del extracto inhibió la movilidad al 50% de las larvas infectantes de *H. contortus*. En la Tabla 6 se muestra el análisis estadístico de resultados.

Al comparar los tratamientos con respecto a los controles, se destaca únicamente el tratamiento E1 (12,5%) mostrando una motilidad de 29,28% o una inhibición del 70,72% de las larvas presentes, frente al control positivo (Levamisol) el cual se obtuvo un promedio de inhibición de 98,58%, mostrando de igual manera diferencias significativas entre el tratamiento que mejor actuó E1 (12,5%) y el control positivo Levamisol. Para E2 (6,25%) a E5 (0,7813%) hay un leve efecto sobre la movilidad. Para E6 (0,3906%) a E12 (0,0061%) el efecto es significativamente similar al control negativo.

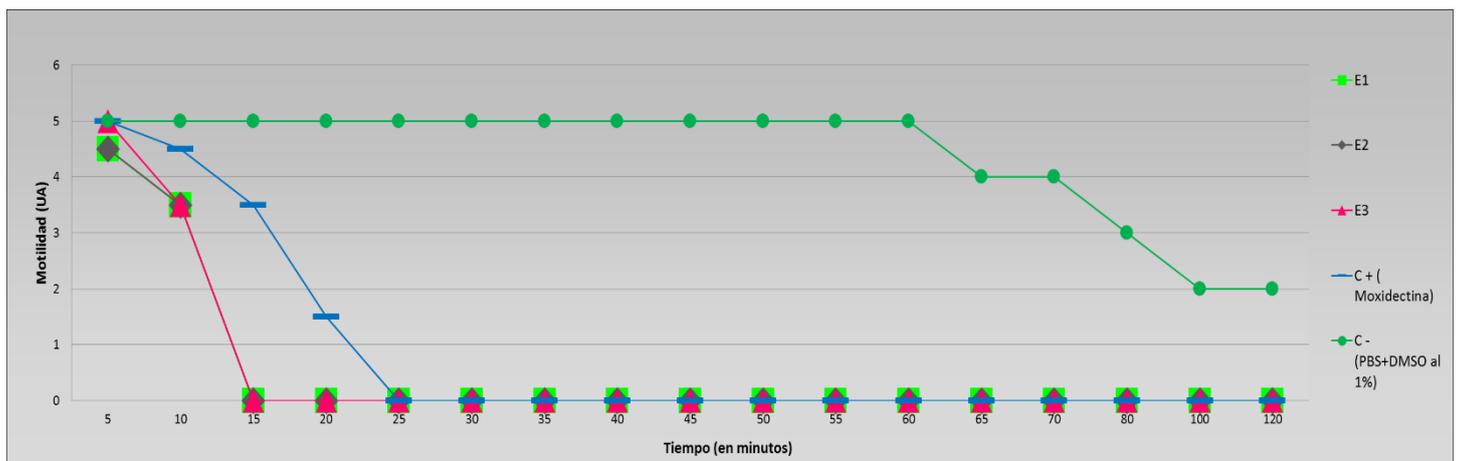
**Tabla 6.** Análisis de varianza entre los diferentes tratamientos con respecto a la motilidad de las larvas infestantes de *Haemonchus contortus*.



### 8.3 Efecto del AE de *Baccharis trimera* sobre la motilidad en adultos

Para este ensayo se seleccionaron adultos de *H. contortus* y se observó la evolución en el tiempo del efecto de las diferentes concentraciones de AE de *B. trimera* sobre la motilidad de los mismos. Para ellos se estableció una escala de unidades arbitrarias para poder realizar el registro del efecto. Se observó cada 5 minutos la motilidad durante 2 horas. En la placa de cultivo celular fueron colocados 5 *Haemonchus* adultos por pocillo para probar el efecto del extracto en las 10 concentraciones (12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%, 0,10%, 0,049%, 0,025%) por duplicado. Como para los últimos tratamientos (E8, E9, E10) se observaba luego de transcurridas las 2 h una motilidad casi aparente, se dejó más tiempo, y luego de once horas de iniciado el ensayo, para volver al día siguiente donde se pudo observar los últimos tres tratamientos para culminar el ensayo una hora más tarde donde se pudo comprobar que tanto los controles negativos (PBS+DMSO al 1%) y los tres tratamientos que restaban presentaban ausencia de motilidad.

Para analizar los resultados de este experimento se agruparon de acuerdo al efecto de AE en concentraciones altas, medias y bajas como se muestra en las Figuras (12, 13 y 14).



**Figura 12.** Efecto del AE de *B. trimera* a concentraciones altas sobre adultos de *H. contortus*.

C + ( Moxidectina) - control positivo

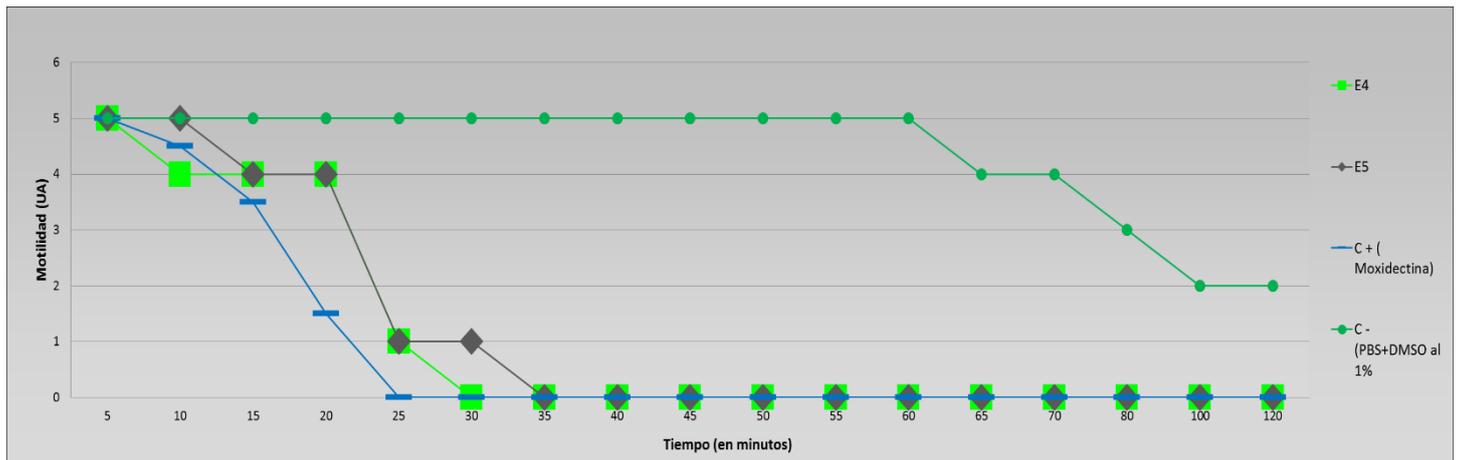
C - (PBS+DMSO al 1%) - control negativo

E1 - primera dilución del AE

E2 - segunda dilución del AE

E3 - tercera dilución del AE

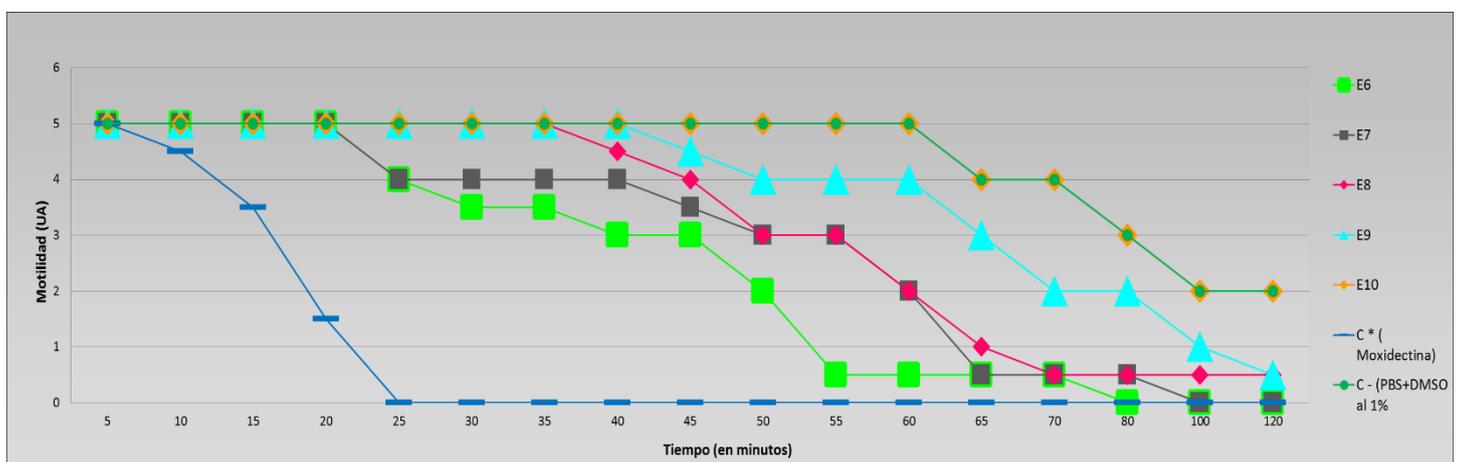
Se puede observar en la Figura 12 para altas concentraciones ensayadas, E1 (12,5%), E2 (6,25%) y E3 (3,13%), muestran un comportamiento similar al del control positivo (Moxidectin). A los 25 minutos de realizado el experimento no se observa motilidad de adultos en control positivo. A los 15 minutos de iniciado el ensayo, no se observa motilidad de adultos para los tres extractos.



**Figura 13.** Efecto del AE de *B. trimera* a las concentraciones intermedias sobre *H. contortus*.

C + ( Moxidectina) - control positivo                      E4 - cuarta dilución del AE  
 C - (PBS+DMSO al 1%) - control negativo                E5 - quinta dilución del AE

En la Figura 13 observamos que para las concentraciones de extracto medias, las concentraciones E4 (1,56%) y E5 (0,78%), el AE mostró un más lento efecto, ya que los adultos, presentan ausencia de motilidad a los 30 y 35 minutos respectivamente de realizado el experimento, es decir al cabo de 5 y 10 minutos posteriores con respecto al control positivo Moxidectin.



**Figura 14.** Efecto del AE de *B. trimera* a bajas concentraciones sobre *H. contortus*.

C + ( Moxidectina) - control positivo                      E6 - sexta dilución del AE  
 C - (PBS+DMSO al 1%) - control negativo                E7 - séptima dilución del AE  
                                                                                   E8 - octava dilución del AE  
                                                                                   E9 - novena dilución del AE  
                                                                                   E10 - décima dilución del AE

Para bajas concentraciones del AE (Figura 14), el comportamiento sobre el estadio adulto de este parásito a lo largo del tiempo tiene una tendencia similar al control negativo. Se puede observar que el efecto de los tratamientos desde E6 (0,39%) y E7 (0,19%) muestra ausencia de motilidad al cabo de las dos horas del ensayo.

Mientras que los tratamientos E8 (0,10%) a E10 (0,025%) los adultos van perdiendo lentamente la motilidad, y la pierden totalmente luego de trece horas de iniciado el experimento (no se muestran estos resultados).

En lo que respecta al tratamiento con el control positivo Moxidectina, como era esperable inhibió la motilidad de los adultos en un corto periodo de tiempo, demostrando su eficacia como adulticida (Aguilar-Tipacamú y Rodríguez-Vivas, 2002).

Por otra parte el control negativo PBS+DMSO al 1%, mostró también su inocuidad frente a la inhibición de la motilidad de los adultos al no verse afectados durante los primeros 60 minutos, perdiendo la motilidad trece horas de iniciado el ensayo, al igual que las diluciones E8 (0,09977), E9 (0,0488) y E10 (0,0244).

## **9. DISCUSIÓN**

Con el fin de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones parasitarias de gran importancia para la producción de nuestro país es que se ha comenzado con ensayos *in-vitro* mediante el uso de plantas que presentan propiedades antihelmínticas. La realización de ensayos *in-vitro* permite poner en contacto los diferentes compuestos de la planta a utilizar, con los diferentes estadios parasitarios. Las pruebas *in-vitro* han demostrado ser una estrategia racional y práctica, ahorrando tiempo, dinero y minimizando el número de los animales necesarios para el desarrollo de un nuevo agente.

Tomando como antecedente el estudio realizado por Azanza y Solaro, (2016), utilizando extractos de *B. trimera* sobre NGI en estadios de vida libre (huevos y larvas infectantes) y teniendo en cuenta que los principales NGI en ovinos son *H. contortus* y *T. colubriformis* nos planteamos profundizar en el uso de extractos de esta planta sobre *H. contortus* a la prevalencia y patogenicidad en Uruguay.

### **9.1 Efecto de *Baccharis trimera* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* en ovinos.**

En el test de eclosión de huevo el 100% pertenecían al género *Haemonchus* ya que provenían de hembras obtenidas directamente de abomasos de ovinos, seleccionadas por medio de sus características morfológicas.

Con el fin de disminuir el error en los resultados y que los resultados sean representativos, se procedió a realizar tres repeticiones por tratamiento.

Se pudo observar un efecto dosis-respuesta, lo que nos indica que a medida que disminuye la concentración del AE, la inhibición de la eclosión disminuye.

El mayor efecto se observa para la concentración del AE E1 (12,5%), logrando inhibir la eclosión en un 89,17%, podemos decir que se comportó con diferencias significativas con respecto al control positivo Ricobendazol.

El cálculo de IC 50 fue de 0,3274, las concentraciones desde E1 (12,5%) hasta E7 (0,1953%) muestran un efecto por encima del 50% de inhibición de la eclosión de huevos. A partir de la dilución E8 (0,0977) hasta E11 (0,0122%), se mantuvo por debajo del 50% de inhibición de la eclosión de huevos con un promedio aproximado de 32%. Para la última concentración del AE estudiada, E12 (0,0061%), se obtuvo un muy bajo porcentaje de inhibición, siendo de 25,89%, mostrando diferencias significativas con respecto al control negativo.

La Asociación Mundial para la promoción de la Parasitología Veterinaria aprobó ciertas pautas propuestas por Powers y col., (1982), para la evaluación de la eficacia antihelmíntica *in-vitro* del uso de drogas donde se considera que los agentes ATH eficaces son aquellos que logran inhibir el 90% de la eclosión de

huevos y de la motilidad larvaria, estableciendo que aquellos que inhiban el 80 a 90% serán considerados de moderada eficacia. Por lo que los resultados obtenidos con el uso del AE de *B. trimera* frente a huevos de *H. contortus* de ovinos fueron de moderada eficacia no alcanzando el 90% en la concentración del AE de E1 (12,5%), logrando inhibir la eclosión en un 89,17%, de igual manera podemos decir que se comportó diferente al control positivo Ricobendazol, pudiendo concluir que a pesar de no alcanzar los valores que se obtuvieron con el Ricobendazol, la dilución del AE E1 (12,5%) mostro resultados alentadores y ser efectivo frente a la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus*.

En cuanto al control positivo, Ricobendazol se pudo observar un promedio de inhibición de la eclosión de huevos del 98,01%, esperable en dicho fármaco por sus propiedades ovicidas (Ferreyra y col., 2002). El control negativo PBS+DMSO al 1% fue el que se obtuvo el menor porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos, llegando a un promedio de 14,72%.

En un trabajo similar al nuestro sobre *H. contortus* de ovinos pero utilizando extracto acuoso de *Annona muricata* Ferreira y col., (2013), obtuvieron para las diluciones de 12,5% y 6,25%, valores de inhibición de la eclosión de huevo del 66,97% y 47,42% respectivamente, inferiores a los obtenidos por nosotros con el AE de *B. trimera*, donde la inhibición de la eclosión de huevos fue para la dilución E1 (12,5%) del 89,17% y E2 (6,25%) del 72,69% mostrando una clara superioridad en la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus*.

## **9.2 Efecto de *Baccharis trimera* sobre la motilidad de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en ovinos.**

Con respecto al test de motilidad larvaria se trabajó con material puro de *H. contortus*, para ello los huevos obtenidos de hembras fueron incubados por 7 días en cámara húmeda hasta que eclosionaron a L1, una vez obtenidos las larvas puras se procedió al recuento y la utilización de estas larvas infectantes en el test de motilidad.

Como en el caso del test de eclosión de huevo se realizaron tres repeticiones por tratamientos, con el fin de disminuir o minimizar el porcentaje de error en los resultados obtenidos. Se colocaron 25 larvas por pocillos para facilitar el conteo y así disminuir el error en su posterior lectura, utilizando el promedio de las tres repeticiones ya que el número de larvas observadas por pocillos fue representativo en las tres repeticiones por tratamientos.

Con respecto a las distintas diluciones del AE ensayadas y la cantidad de larvas móviles observadas, se puede decir que hay un leve efecto dosis-respuesta al enfrentar L3 ante las diferentes concentraciones del extracto considerando E2 a E12.

De acuerdo a lo propuesto por Powers y col., (1982), que clasifica a los ATH como eficaces cuando logran inhibir más del 90 %, moderadamente eficaces

entre 80-90% de inhibición, para la dilución más concentrada que estudiamos en nuestro ensayo del AE (E1 al 12,5%), de *B. trimera*, puede ser considerado de baja eficacia ya que nos dio un 29,28% de motilidad o 70,72% de la inhibición larvaria.

En cuanto al control positivo para este test se utilizó Levamisol por sus propiedades larvicidas (Boggio, 2005), observándose un porcentaje promedio de movilidad de 1,42%. El control negativo el porcentaje promedio de larvas móviles fue de 97,45 %.

Si comparamos los resultados obtenidos con el extracto de *Annona muricata*, la cual también fue probada sobre larvas de *H. contortus*, podemos decir que nuestro AE de *B. trimera* se obtuvo valores similares a los obtenidos con *Annona*, el cual a la dilución al 12,5% inhibió la motilidad larval en un 74,62%, mientras que con el AE de *B. trimera* a la dilución E1 (12,5%) se obtuvo un promedio de inhibición de la motilidad larval de 70,72%, similares para ambos ensayos (Ferreira y col., 2013).

### **9.3 Efecto de *Baccharis trimera* sobre la motilidad de adultos de *Haemonchus contortus* en ovinos.**

Para el test de motilidad en adultos realizado a partir del material obtenido, abomasos de ovinos provenientes de plantas frigoríficas, para disminuir el margen de error se realizaron dos repeticiones por tratamiento.

En las primeras siete diluciones se pudo observar un efecto dosis-respuesta, lo que quiere decir que a medida que se disminuye la cantidad de AE de *B. trimera*, disminuye la inhibición de la motilidad de los adultos con respecto al tiempo, aumentando así el tiempo en perder completamente la motilidad. En cambio en las últimas tres diluciones E8, E9 y E10 se pudo observar que estuvieron móviles durante las dos horas de control del ensayo, perdiendo completamente la motilidad al cabo de trece horas de haber iniciado el ensayo junto al control negativo PBS+DMSO al 1%.

Podemos decir con respecto al ensayo realizado que las primeras tres diluciones E1 (12,5%), E2 (6,25%) y E3 (3,125%), tuvieron un comportamiento aún mejor que el control positivo Moxidectin, inhibiendo la motilidad por completo a las diluciones E1 (12,5%), E2 (6,25%) y E3 (3,125%), a los 15 minutos de haber comenzado el ensayo mientras que el control positivo pierde la motilidad a los 25 minutos. Pudiendo decir que las tres primeras diluciones fueron altamente efectivas al inhibir la motilidad de los adultos en menores tiempos que el control positivo.

Es importante destacar que para el control negativo (PBS+DMSO al 1%) se puede observar que a los 60 minutos comienza a perder motilidad.

A las trece horas de iniciado el ensayo, tanto el control negativo PBS+DMSO al 1%, como las diluciones E8 (0,09977), E9 (0,0488) y E10 (0,0244) perdieron la motilidad. La pérdida de motilidad podría explicarse por la falta de nutrientes al ser un parásito hematófago.

## **10. CONCLUSIONES**

- Para el test de eclosión de huevos, hay efecto dosis-respuesta.
- Para extracto de *B. trimera* al 12,5% se pudo observar diferencias significativas con respecto al control positivo Ricobendazol, con un porcentaje de inhibición de la eclosión de 89,17% y 98,01%, respectivamente.
- El efecto del AE (E1 12,5%) en el test de eclosión de huevo es de moderada eficacia.
- La IC50 fue de 0,3274% en la inhibición de la eclosión de huevos.
- En cuanto al test de motilidad larvaria, hay leve efecto dosis-respuesta.
- Se observó que la dilución del extracto E1 (12,5%) mostró una motilidad larvaria de 29,28%, teniendo diferencias significativas con respecto al control positivo Levamisol.
- La IC50 fue de 9,725% en la motilidad larvaria.
- El extracto de *B. trimera* fue más efectivo en el test de eclosión de huevos con respecto al test de motilidad larvaria ya que el IC50 fue menor.
- *B. trimera* para el test de motilidad del adulto mostró ser altamente efectivo mostrando ausencia de motilidad a mayor dilución E3 (3,125%) y menor tiempo que el control positivo.

## **11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1) Angulo-Cubillan FJ (2005), Nematodos Gastrointestinales, En: Catedra de Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia. Maracaibo-Venezuela, pp1-7. Capítulo 16.
- 2) Aguilar-Tipacamú G, Rodríguez-Vivas R (2002). Uso de la moxidectina para el tratamiento de los parásitos internos y externos de los animales. Rev, Biomed, 13: 43-51.
- 3) Aguilar ML, Mendoza de Gives P, Lopez Arellano ME, Liébiano Hernandez E (2011). Manual para la identificación de larvas de Nematodos Gastrointestinales en Rumiantes. Mexico, SAGARPA- INIFAP. Disponible en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/3244>. Fecha de consulta: 4 de junio de 2017.
- 4) Arece García J. da Fonseca A. López Leyva Y. Molina M. Puerto Abreu M. Roche Y. Sanavria A (2014). Efecto *in vitro* de extractos acuosos de *Moringa oleífera* y *Gliricida sepium* en el desarrollo de las fases exógenas de strongilídeos gastrointestinales de ovinos. Rev Salud Anim 36 (1): 28-34.
- 5) Arece García J, Barrabí Puerta M (2013). Actividad antihelmíntica *in vitro* de extracto acuoso de hojas y semillas de Nem (*Azadirachta indica* A. Juss). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario. Rev Salud Anim 35 (2): 103-108.
- 6) Azanza JM, Solaro P (2016), Eficiencia *in vitro* de *Baccharis trimera* en Nematodos Gastrointestinales de ovinos, Tesis, Facultad de Veterinaria, UDELAR, 56p.
- 7) Banchemo G, Mederos A (2013), Parasitosis gastrointestinales de ovinos y bovinos, situación actual y avances de la investigación. Rev. INIA. 34: 10-15.
- 8) Bath G, Hansen J, Kreek R, Van Wyk J, Vatta A (2001). Sustainable approaches for managing, Haemonchosis in sheep and goats, final report of FAO. Technical cooperation project No TCP/SAF/882 (A). Disponible en: <http://cni.inta.gov.ar/helminto/pdf%20alternativos/Sustainable%20approaches%20for%20managing%20haemonchosis%20in%20sheep%20and%20goats.pdf>, Consultado 14 marzo 2005.
- 9) Berreta E, Gonzalez H, Lavratto J, Mederos A, Salles J, Zamit W (1998), Utilización de pasturas seguras como método de control de las parasitosis gastrointestinales en corderos de destete. Jornada Técnica 6 de mayo de 2004, Durazno, Uruguay. P 27- 31.
- 10) Birriel E, Gonzales M, Varela J (2013) Tesis de Grado, Fraccionamiento Bioguiado de *Baccharis trimera* en búsqueda de agentes anti-*T. Cruzi*, Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica Montevideo, p 78.

- 11) Boch J, Supperer R (1988), Parasitología en medicina Veterinaria, Montevideo, Hemisferio Sur, 627p.
- 12) Bonino J, Duran del Campo A, Mari JJ (1987) Enfermedades de los Lanares, Montevideo, Hemisferio Sur, V1.
- 13) Boggio, J.C. (2005). Fármacos que actúan contra nematodos. En: Boggio, J.C.; Rubio, M.R. Farmacología Veterinaria. Córdoba, EDUCC. p 529-551.
- 14) Castells D (2004) Epidemiología y control de nematodos gastrointestinales en ovinos del Uruguay. Nematodos gastrointestinales de los ovinos y Saguaypé en ovinos y bovinos. Jornada técnica 6 de mayo 2004, Durazno, Uruguay. P 3-11.
- 15) Castells D, Nari A, Gayo V, Mederos A y Pereira D (2013) Epidemiología e impacto productivo de nematodos gastrointestinales en Uruguay. Montevideo, Hemisferio Sur, 15p.
- 16) Cordero del Campillo M, Rojo FA, Martinez AR, Sanchez MC, Hernandez S, Nabarrete I, Diez P, Quiroz H, Carvalho M (2001), Parasitología Veterinaria, Barcelona, McGraw-Hill, 987p.
- 17) Craig T (1993). Anthelmintic resistance. Veterinary parasitology. 46: 121-131.
- 18) Davies, P (2004), Fichas técnicas de cultivo. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Instituto Nacional de Investigacion Agropecuaria, serie FPTA, número 11. 262p.
- 19) Duarte, L.; Faria, N.; Fernández, S.; Robson, E.; Ronie, E. (2013). Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. Vet. Parasitol. 194 (1): 79– 82.
- 20) Entrocasso C, Giudici C, Steffan P (2013), Biología, Fisiología e inmunidad de los nematodos gastrointestinales y pulmonares. En: Fiel C, Nari a. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control, Montevideo, Hemisferio Sur, 1-27p.
- 21) Fagro, Facultad de Agronomía (2016) Laboratorio de Botánica, Universidad de la Republica, Uruguay. Disponible en: [www.fagro.edu.uy/botanica](http://www.fagro.edu.uy/botanica). Fecha de consulta: 12 de junio de 2017.
- 22) Fernández Abella, D. (1993) Principios de fisiología reproductiva ovina, Montevideo. Editorial Hemisferio Sur, 247p.
- 23) Ferreira L, Castro P, Chagas A, Franca S, Belebóni R (2013) *In-vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L.

(Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. Exp parasitol 134 (3): 326-333.

24) Ferreyra, D.A.; Fiel, C.; Monfrinotti, A.; Steffan, P (2002). Eficacia del ricobendazole-via subcutánea- contra los nematodos gastrointestinales del bovino. Rev Invest Agrop INTA. 31: 89-101.

25) Fiel CA (2005) Manual técnico: Antiparasitarios Internos y Endectocidas de Bovinos y Ovinos, Buenos Aires, UNICEN-Tandil, 17p.

26) Fiel C y Nari A (2013), Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes. Montevideo, Hemisferio Sur, 752p.

27) Fiel C, Steffan P (2012). Programa Control parasitario sustentable (CPS) Memorias de las 8.º Jornadas Veterinarias Latinoamericanas del Interior, organizadas por Drovét. Santa Fe, Argentina. 7 pp.

28) Foreyt WJ, (2001) Veterinary Parasitology, Reference Manual, 5a ed, Iowa Blackwell Publishing, 246p.

29) Freyre A, Cabrera PA, Parietti SM, Heinzen T, Falcón JD, D'Angelo JM, Molinari CA, Correa O Hernández Z, Lairihoy R (1995), Departamento de Parasitología Veterinaria Curso de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Guía del Curso Práctico, 2a ed, Universidad de la Republica, Montevideo-Uruguay, 95p.

30) Garcia, V.; Marques, S.; Nunes de Oliveira, R.; Sierpe Jeraldo, V.; Silva Santos, A.; Xavier A. (2014). Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. Rev. Exp. Parasitol. 139: 63–72.

31) Goldber V, Ciappesoni G, De Barbieri I, Rodriguez A, Montossi F (2011) Factores no genéticos que afectan la resistencia a parásitos gastrointestinales en Merino en Uruguay, Producción Ovina, 21: 1-11.

32) Habela M, Sevilla RG, Corchero E, Fruto JM, Peña J (2002). Nematodosis Gastrointestinales en ovino Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Mundo Ganadero. Facultad de Veterinaria de Cáceres, Universidad de Extremadura, España. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar/>. Fecha de consulta: 20 de Julio del 2017.

33) Jacobs D, Fox M, Gibbons L, Hermosilla C (2016) Principles of Veterinary Parasitology, Glasgow, Wiley Blackwell, 726p.

34) Jackson F (1993). Anthelmintic resistance- The state of play. British Veterinary Journal, 149: 123-138.

35) Lapage G (1976), Parasitología Veterinaria, México, Continental, 864p.

- 36) Lombardo P (2015), Caracterización química y bioquímica de aceites esenciales contra patógenos de los cítricos. Tesis Facultad de Agronomía, UDELAR, Montevideo, 129p.
- 37) Lombardo P, Guimaraes A, Franco J, Dellacassa E, Pérez Faggiani E (2016). Effectiveness of essential oils for postharvest control of *Phyllosticta citricarpa* (citrus black spot) on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 121: 1-8.
- 38) Manual Merck de Veterinaria (2007), 6a ed, Barcelona, Océano, 2711p.
- 39) Manquia JA, Valenzuela W, Leyva JC, Morales MI, Figueroa JA, (2013). Potencial del orégano como alternativa natural para controlar *Haemonchus contortus* en ovinos de pelo. *Rev Latinoamericana Rec Nat* 9 (1): 150-154.
- 40) Martin R, Robertson A (2000). Electrophysiological investigation of anthelmintic resistance. *Parasitology* 120: 87-94.
- 41) Martínez Grueiro M. (2002). Cribado antihelmíntico primario: sistemas para la evaluación de actividad nematocida *in vitro*. *Analecta Veterinaria*, 22 (1): 32-49.
- 42) Márquez Lara D (2007) Resistencia a los antihelmínticos en nematodos de rumiantes y estrategias para su control, Colombia, Produmedios, 170p.
- 43) Mbarria J, Maitho T, Mitema E, Muchuri D (1998). Comparative efficacy of pyrethrum with albendazole against sheep gastrointestinal nematodes. *Tropical Animal. Health and Production*. 30: 17-22.
- 44) Mederos A, (2002). Parasitosis Gastrointestinales de los Ovinos: Situación actual y avances en la investigación epidemiología de los nematodos gastrointestinales en Uruguay. Jornada Técnica, Santa Bernardina, Durazno, Uruguay p 4-7.
- 45) Minteguiaga M, Umpiérrez N., Xavier V., Lucas A., Mondín C., Fariña L., Cassel E., Dellacassa E. (2015), Recent Findings in the Chemistry of Odorants from Four *Baccharis* Species and Their Impact as Chemical Markers *Chem. Biodivers.* 12: 1339-1348.
- 46) Munguía X (2010). Manual de prácticas laboratorio de Parasitología. Sonora, México. Instituto Tecnológico de Sonora. Disponible en: [http://biblioteca.itson.mx/dac\\_new/tesis/741\\_leyva\\_ana.pdf](http://biblioteca.itson.mx/dac_new/tesis/741_leyva_ana.pdf). Consultado: 3 de abril de 2017.
- 47) Nari A, Cardozo H (1987), Enfermedades de los lanares. Montevideo-Uruguay, Hemisferio Sur, V.3.
- 48) Nari A (2001), Diagnóstico y control de resistencia antihelmíntica en pequeños rumiantes. 2do congreso latinoamericano de especialistas en

pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos. 6to congreso nacional de producción ovina. Merida, Yucatan, Mexico. P 35-49.

49) Niec R. (1968). Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastroentéricos de los bovinos y ovinos. Manual técnico no. 3.

50) Pérez C, Hernandez MM, de la Cruz P, Hernandez GI, Bolio GI (2014). Efecto antihelmíntico *in-vitro* del extracto metálico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gastrointestinales en ovinos. Tropical and subtropical Agroecosystem 17: 105-111.

51) Perrachon R, Peinado G, Ganzabal A, Montossi F, Banchero G, San Julian R, De Barbieri I (2001) Sistemas ovinos intensivos del Litoral Sur del Uruguay: Enfoques de la Investigación, Transferencia de Tecnología y Producción, INIA Boletín de Divulgación N° 78, 79p. Disponible en: <file:///C:/Users/Andres/Downloads/15630031107111643.pdf>. Fecha de consulta: 28 de agosto de 2017.

52) Powers K, Wood I, Eckert J, Gibson T, Smith H (1982) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). Vet. Parasitol. 10 (4): 265-284.

53) Puerto Abreu M, Arace j, López Y, Roche Y, Molina M, Sanavria A, Da Fonseca AH (2014). Efecto *in-vitro* de extractos acuosos de *Moringa oleífera* y *Gliricidia sepium* en el desarrollo de las fases exógenas de estrongilidios gastrointestinales de ovinos. Rev. Salud animal 36 (1): 28-34.

54) Quiroz H, (2002) Parasitología y Enfermedades Parasitarias en Animales Domésticos. México, Limusa, 876p.

55) Quiroz H, Figueroa JA, Ibarra F, López ME (2011) Epidemiología de Enfermedades Parasitarias en Animales Domésticos, Disponible en: <http://elygomez.aprenderapensar.net/files/2014/11/Quiroz-et-al-2011.pdf>. Fecha de consulta: 28 de marzo de 2017. México, 655p.

56) Rosa A, Ribicich M (2012). Parasitología y enfermedades parasitarias en veterinaria. Buenos Aires, Hemisferio sur, 325p.

57) Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) (2013) Manual Práctico de Producción Ovina, Montevideo, SUL, 245p.

58) Soulsby E (1987), Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos, 7° ed, México, Interamericana, 823p.

59) Suárez VH, Olaechea FV, Rossanigo CE, Romero JR (2007) Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. INTA, Anguil. La Pampa, Argentina, 296p.

- 60) Thienpont D, Rochette F, Vanparijs, O (1986). Diagnosing helminthiasis by coprological examination. 2<sup>a</sup> ed. Beerse, Jansen, 205 p.
- 61) Urribarren T (2015) Generalidades de Nematodos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/nematodos-generalidades.html>. Fecha de consulta: 4 de mayo de 2017.
- 62) Varela J, Cerecetto H, Gonzalez M (2016). Búsqueda de actividad anti *Trypanosoma cruzi* en plantas del Uruguay, Tesis Facultad de Ciencias, UdelaR, 95p.

## **12. ANEXOS**

### **12.1 Planilla de datos del test de eclosión de huevos**

TRATAMIENTOS	HUEVOS	LARVAS	TOTAL
CPBS+DMSO	14	73	87
CPBS+DMSO	11	61	72
CPBS+DMSO	17	64	81
CPBS+DMSO	12	74	86
CPBS+DMSO	11	85	96
CPBS+DMSO	8	68	76
CRIC	95	0	95
CRIC	114	3	117
CRIC	85	3	88
CRIC	96	0	96
CRIC	88	1	89
CRIC	104	1	104
E1	68	16	84
E1	73	5	78
E1	66	5	71
E2	61	26	87
E2	71	23	94
E2	63	24	87
E3	69	39	108
E3	63	24	87
E3	64	26	90
E4	63	36	99
E4	58	31	89
E4	60	32	92
E5	57	29	86
E5	53	35	88
E5	57	29	86
E6	49	37	86
E6	53	39	92
E6	68	37	105
E7	51	40	91
E7	48	34	82
E7	63	56	119
E8	42	46	88
E8	46	47	93
E8	41	41	82
E9	34	41	75
E9	40	48	88
E9	34	45	79
E10	31	44	75
E10	31	41	72
E10	29	42	71
E11	31	48	79
E11	35	51	86
E11	40	56	96
E12	23	63	86
E12	19	60	79
E12	25	68	93

## 12.2 Planilla de datos y análisis de ANOVA para eclosión de huevo

Dilusion	Inhhibición	Grupo
12.5	89,1666237	a
6.25	72,6868835	a
3.125	69,137931	a
15.625	64,6740981	m
0.78125	64,2618041	m
0.390625	59,7824482	m
0.1953125	55,8405726	m
0.09765625	49,0632128	b
0.048828125	44,6086178	b
0.0244140625	41,7446531	b
0.0122070313	40,5349491	b
0.0061035156	25,8921798	b

Summary of Data					
	Treatments				
	1	2	3	4	5 Total
N	3	4	5		12
$\Sigma X$	2.309.914	2.445.589	2.018.436		677.394
Mean	769.971	611.397	403.687		564.495
$\Sigma X^2$	180.141.233	150.044.291	84.532.308		414.717.832
Std.Dev.	106.874	41.698	8.733		171.444

Result Details				
Source	SS	df	MS	
Between-treatments	26.475.674	2	13.237.837	$F = 20.34274$
Within-treatments	5.856.662	9	65.074	
Total	32.332.335	11		

The  $f$ -ratio value is 20.34274. The  $p$ -value is .000458. The result is significant at  $p < .05$ .

### 12.3 Planilla de datos del test de motilidad larvaria

TRATAMIENTOS	LARVAS MOVILES	LARVAS NO MOVILES	TOTAL
CPBS+DMSO	22	0	22
CPBS+DMSO	23	1	24
CPBS+DMSO	26	1	27
CPBS+DMSO	27	1	28
CPBS+DMSO	22	0	22
CPBS+DMSO	25	1	26
CLEV	0	24	24
CLEV	0	22	22
CLEV	1	23	24
CLEV	0	24	24
CLEV	0	27	27
CLEV	1	22	23
E1	6	18	24
E1	9	20	29
E1	7	15	22
E2	18	4	22
E2	14	6	20
E2	19	3	22
E3	17	5	22
E3	20	7	27
E3	18	4	22
E4	22	5	27
E4	18	6	24
E4	17	4	21
E5	22	7	29
E5	18	3	21
E5	19	4	23
E6	24	4	28
E6	18	3	21
E6	21	2	23
E7	18	2	20
E7	22	3	25
E7	21	3	24
E8	27	2	29
E8	22	3	25
E8	26	2	28
E9	23	1	24
E9	22	1	23
E9	26	2	28
E10	28	3	31
E10	29	2	31
E10	19	1	20
E11	23	2	25
E11	25	2	27
E11	21	1	22
E12	21	1	22
E12	23	2	25
E12	22	0	22

## 12.4 Planilla de datos obtenidos en estadio adulto

<b>Tiempo (Minutos)</b>		<b>Pocillos (Muestra) por duplicado</b>		
5 minutos		E1	(+++++) ↓	4,5
		E2	(+++++) ↓	4,5
10 minutos		E1	(+++++) ↓	3,5
		E2	(+++++) ↓	3,5
		E3	(+++++) ↓	3,5
15 minutos		E1	(o)	0
		E2	(o)	0
		E3	(o)	0
20 minutos		E4	(+)	1
		E5	(++++)	4
25 minutos		E4	(+)	1
		E5	(+)	1
		E6	(++++)	4
		Control (+) Moxidectina		(o)
30 minutos		E4	(o)	0
		E5	(+)	1
		E6	(+++++) ↓	3,5
		E7	(++++)	4
35 minutos		E5	(+)	1
		E6	(+++++) ↓	3,5
		E7	(++++)	4
		E8	(+++++) ↓	5
40 minutos		E5	(+)	1
		E6	(+++)	3
		E7	(++++)	4
		E8	(+++++) ↓	4,5
		E9	(+++++) ↓	5
		E10	(+++++) ↓	5
45 minutos		E5	(+) ↓	0,5
		E6	(+++)	3
		E7	(+++++) ↓	3,5
		E8	(++++)	4
		E9	(+++++) ↓	4,5
		E10	(+++++)	5
50 minutos		E5	(+) ↓	0,5
		E6	(++)	2
		E7	(+++)	3
		E8	(+++)	3
		E9	(++++)	4
		E10	(+++++)	5
55 minutos		E5	(+) ↓	0,5
		E6	(+) ↓	0,5
		E7	(++)	2
		E8	(+++)	3
		E9	(++++)	4
		E10	(+++++)	5
60 minutos		E5	(o)	0
		E6	(+) ↓	0,5
		E7	(+)	1
		E8	(++)	2
		E9	(++++)	4
		E10	(+++++)	5
65 minutos		E6	(+) ↓	0,5
		E7	(+) ↓	0,5
		E8	(+)	1
		E9	(+++)	3
		E10	(++++)	4
		E10	(++++)	4
70 minutos		E6	(+) ↓	0,5
		E7	(+) ↓	0,5
		E8	(+) ↓	0,5
		E9	(++)	2
		E10	(++++)	4
		E10	(++++)	4
80 minutos		E6	(o)	0
		E7	(+) ↓	0,5
		E8	(+) ↓	0,5
		E9	(++)	2
		E10	(+++)	3
		E10	(+++)	3
100 minutos		E7	(o)	0
		E8	(+) ↓	0,5
		E9	(+)	1
		E10	(++)	2
120 minutos		E8	(+) ↓	0,5
		E9	(+) ↓	0,5
		E9	(+) ↓	0,5
		E10	(++)	2

## 12.5 Planillas de datos a altas, medias y bajas concentraciones, sobre adultos de *Haemonchus contortus* en ovinos

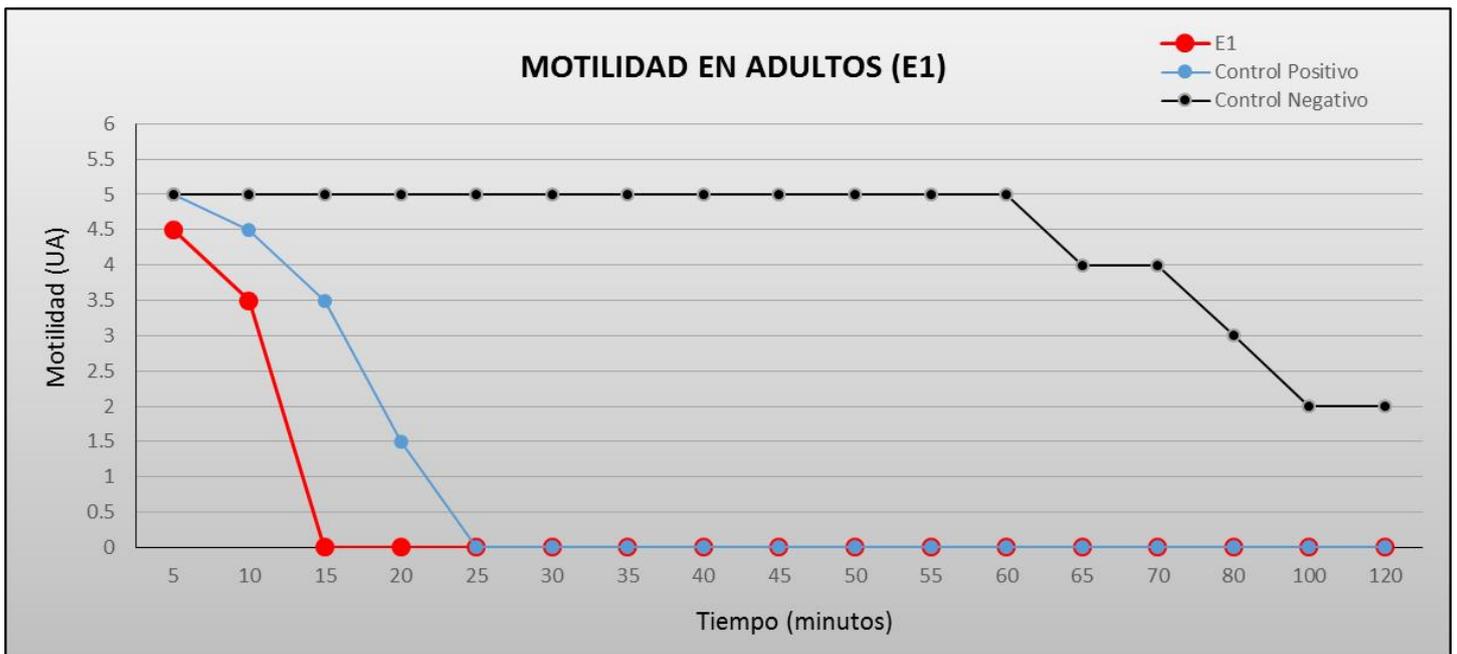
tiempo (minutos)	E1	E2	E3	C + ( Moxidectina)	C - (PBS+DMSO al 1%)
	motilidad	motilidad	motilidad	motilidad	motilidad
5	4,5	4,5	5	5	5
10	3,5	3,5	3,5	4,5	5
15	0	0	0	3,5	5
20	0	0	0	1,5	5
25	0	0	0	0	5
30	0	0	0	0	5
35	0	0	0	0	5
40	0	0	0	0	5
45	0	0	0	0	5
50	0	0	0	0	5
55	0	0	0	0	5
60	0	0	0	0	5
65	0	0	0	0	4
70	0	0	0	0	4
80	0	0	0	0	3
100	0	0	0	0	2
120	0	0	0	0	2

tiempo (minutos)	E4	E5	C + ( Moxidectina)	C - (PBS+DMSO al 1%)
	motilidad	motilidad	motilidad	motilidad
5	5	5	5	5
10	4	5	4,5	5
15	4	4	3,5	5
20	4	4	1,5	5
25	1	1	0	5
30	0	1	0	5
35	0	0	0	5
40	0	0	0	5
45	0	0	0	5
50	0	0	0	5
55	0	0	0	5
60	0	0	0	5
65	0	0	0	4
70	0	0	0	4
80	0	0	0	3
100	0	0	0	2
120	0	0	0	2

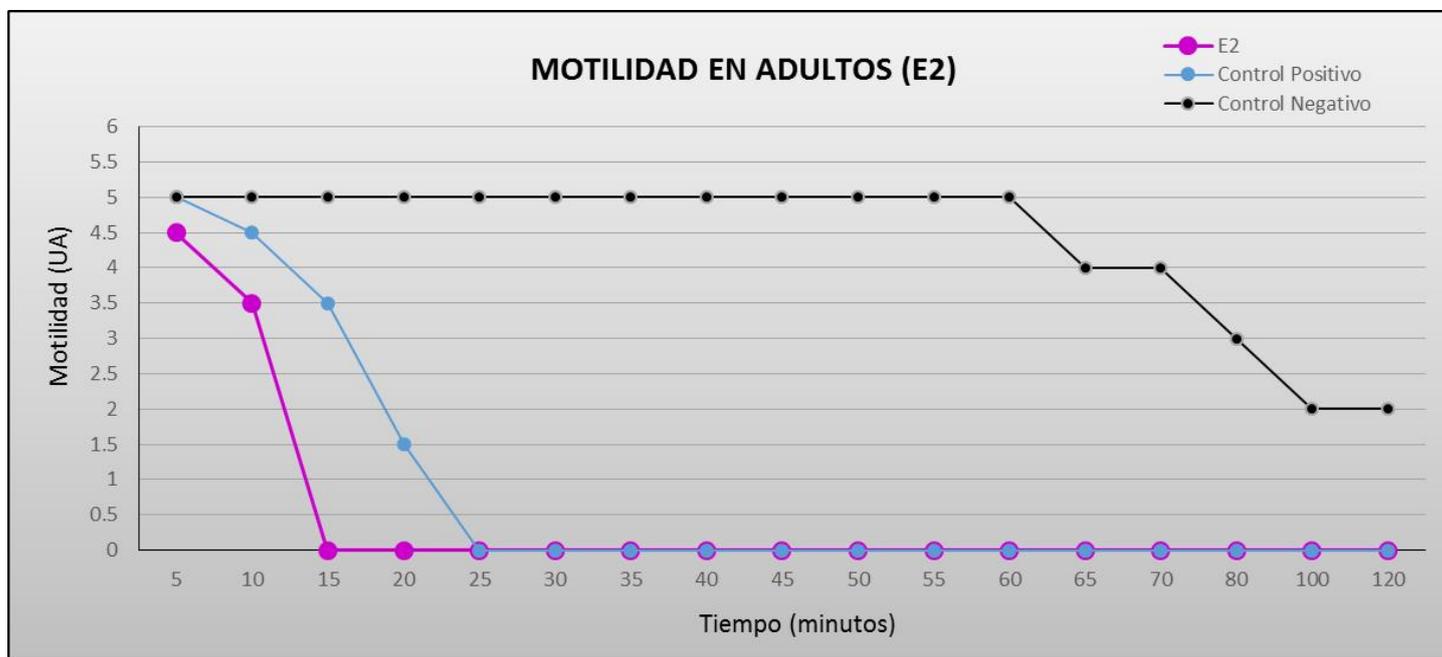
tiempo (minutos)	E6 motilidad	E7 motilidad	E8 motilidad	E9 motilidad	E10 motilidad	C * ( Moxidectina) motilidad	C - (PBS+DMSO al 1%) motilidad
5	5	5	5	5	5	5	5
10	5	5	5	5	5	4,5	5
15	5	5	5	5	5	3,5	5
20	5	5	5	5	5	1,5	5
25	4	4	5	5	5	0	5
30	3,5	4	5	5	5	0	5
35	3,5	4	5	5	5	0	5
40	3	4	4,5	5	5	0	5
45	3	3,5	4	4,5	5	0	5
50	2	3	3	4	5	0	5
55	0,5	3	3	4	5	0	5
60	0,5	2	2	4	5	0	5
65	0,5	0,5	1	3	4	0	4
70	0,5	0,5	0,5	2	4	0	4
80	0	0,5	0,5	2	3	0	3
100	0	0	0,5	1	2	0	2
120	0	0	0,5	0,5	2	0	2

**12.6 Efecto de cada una de las diluciones del extracto de *Baccharis trimera* sobre estadio adulto de *Haemonchus contortus***

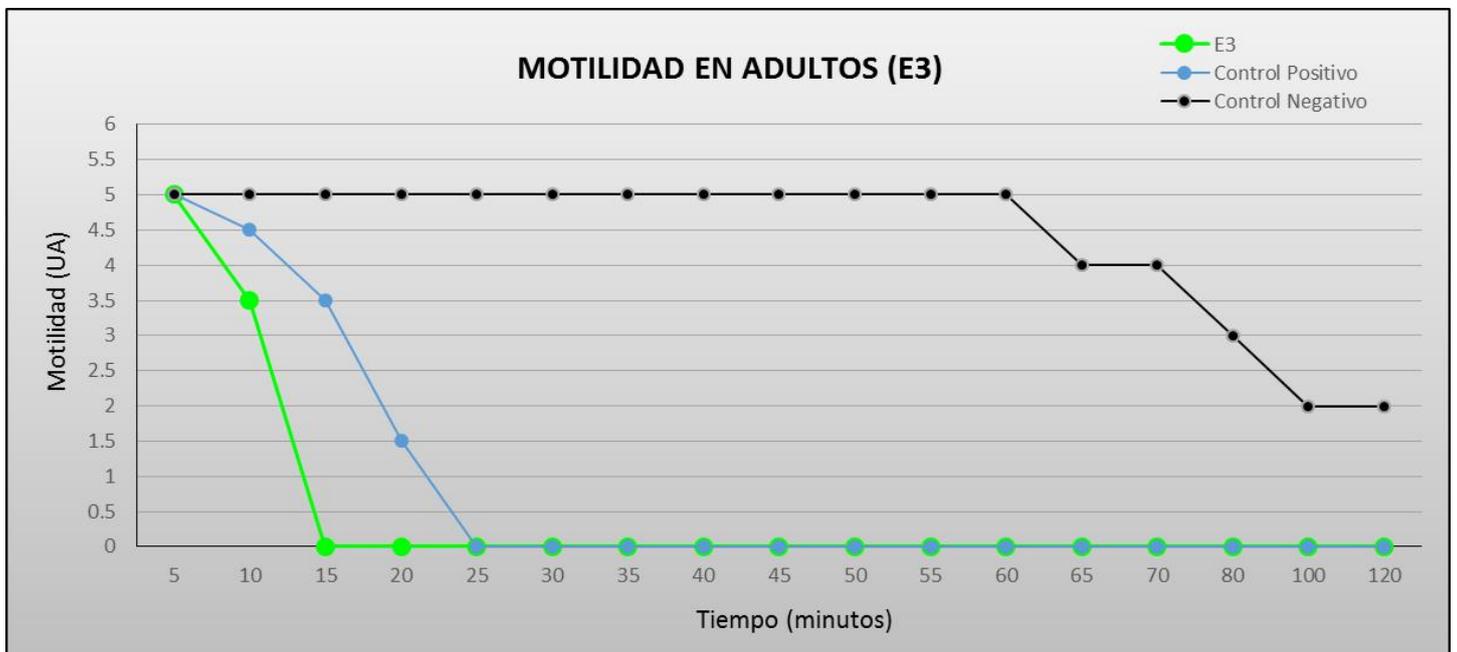
E1			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	4,5	5	5
10	3,5	4,5	5
15	0	3,5	5
20	0	1,5	5
25	0	0	5
30	0	0	5
35	0	0	5
40	0	0	5
45	0	0	5
50	0	0	5
55	0	0	5
60	0	0	5
65	0	0	4
70	0	0	4
80	0	0	3
100	0	0	2
120	0	0	2



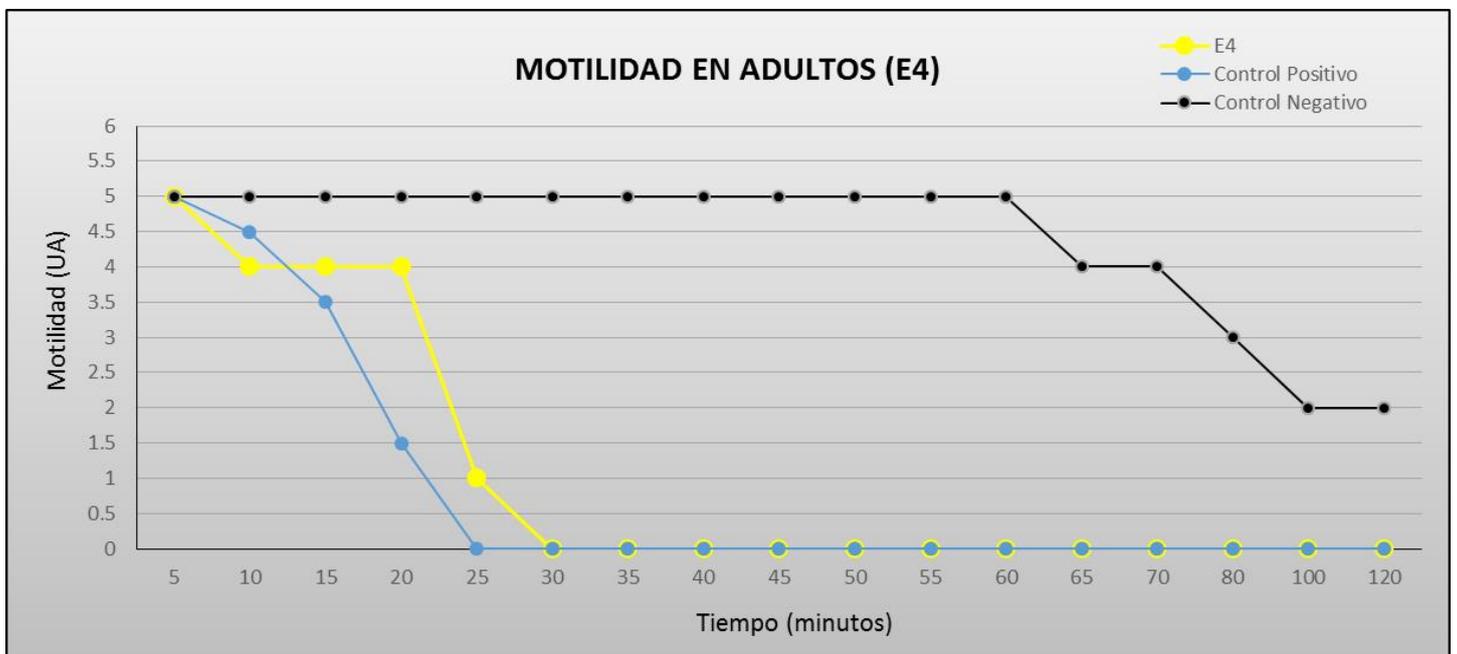
E2			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	4,5	5	5
10	3,5	4,5	5
15	0	3,5	5
20	0	1,5	5
25	0	0	5
30	0	0	5
35	0	0	5
40	0	0	5
45	0	0	5
50	0	0	5
55	0	0	5
60	0	0	5
65	0	0	4
70	0	0	4
80	0	0	3
100	0	0	2
120	0	0	2



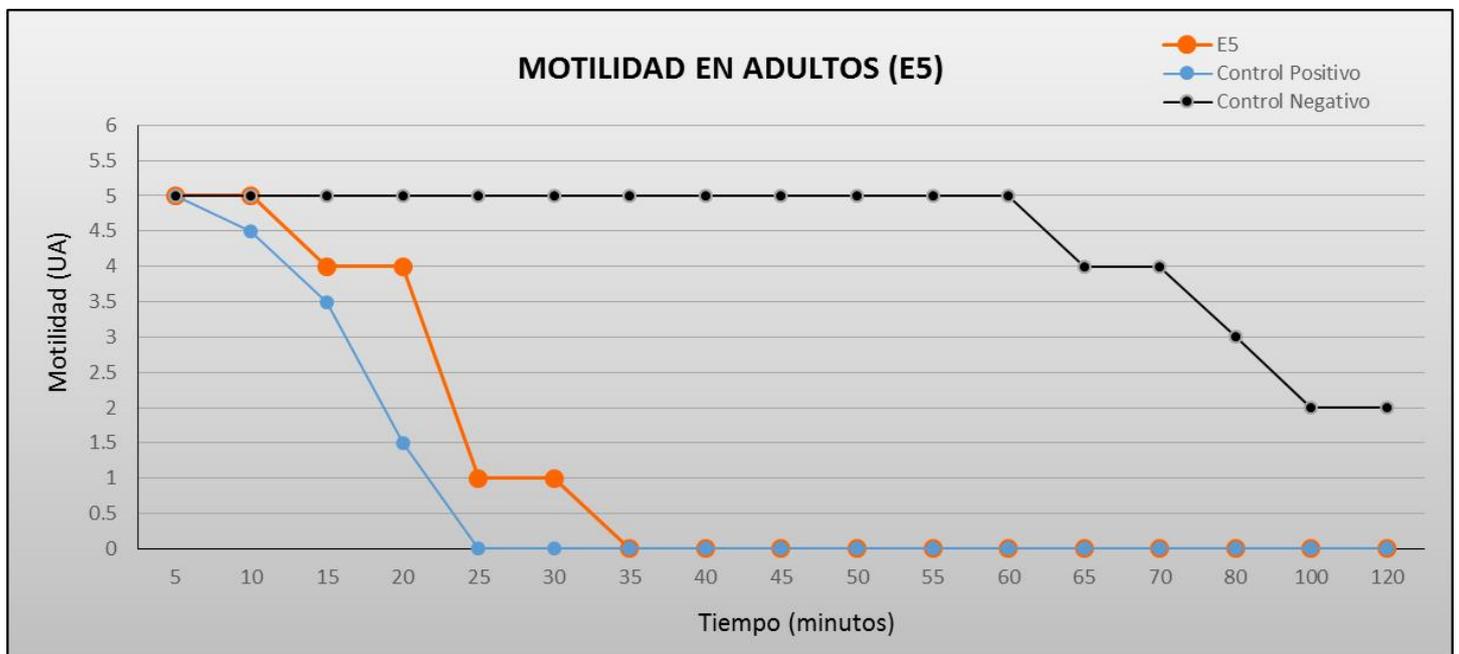
E3			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	5	5	5
10	3,5	4,5	5
15	0	3,5	5
20	0	1,5	5
25	0	0	5
30	0	0	5
35	0	0	5
40	0	0	5
45	0	0	5
50	0	0	5
55	0	0	5
60	0	0	5
65	0	0	4
70	0	0	4
80	0	0	3
100	0	0	2
120	0	0	2



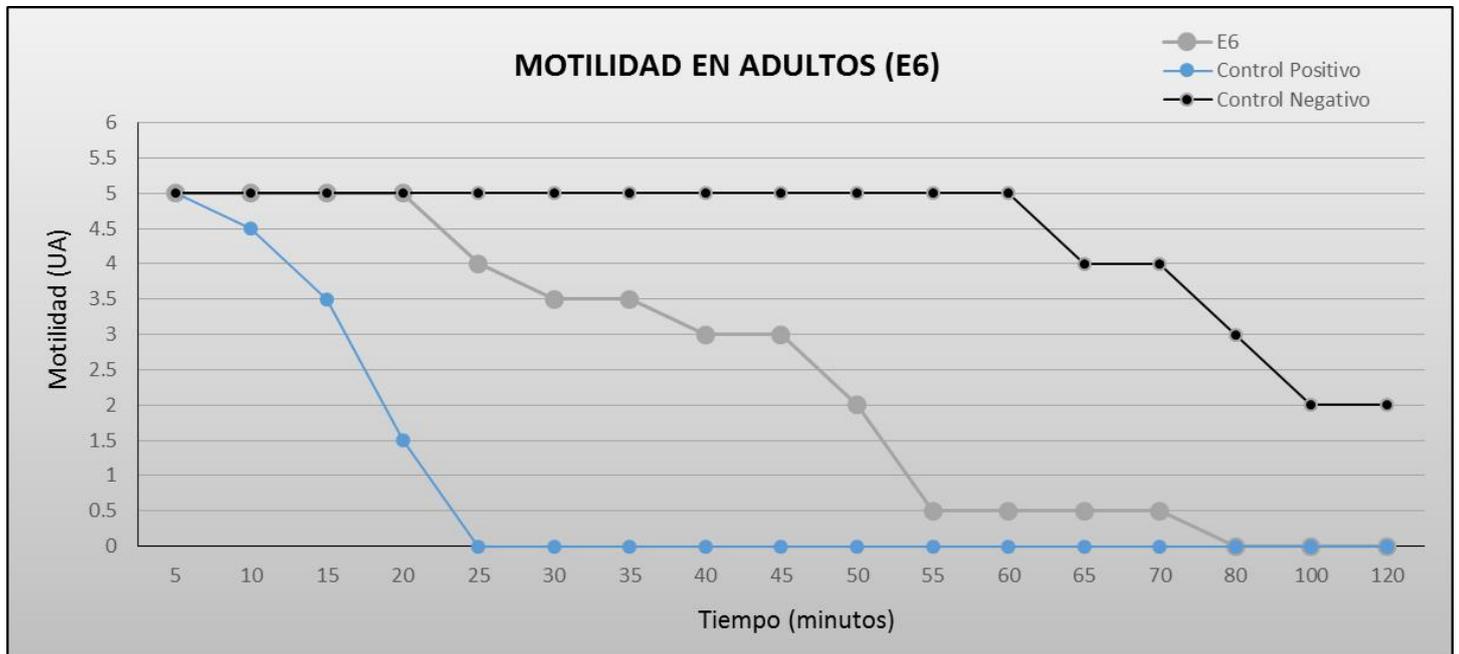
E4			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	5	5	5
10	4	4,5	5
15	4	3,5	5
20	4	1,5	5
25	1	0	5
30	0	0	5
35	0	0	5
40	0	0	5
45	0	0	5
50	0	0	5
55	0	0	5
60	0	0	5
65	0	0	4
70	0	0	4
80	0	0	3
100	0	0	2
120	0	0	2



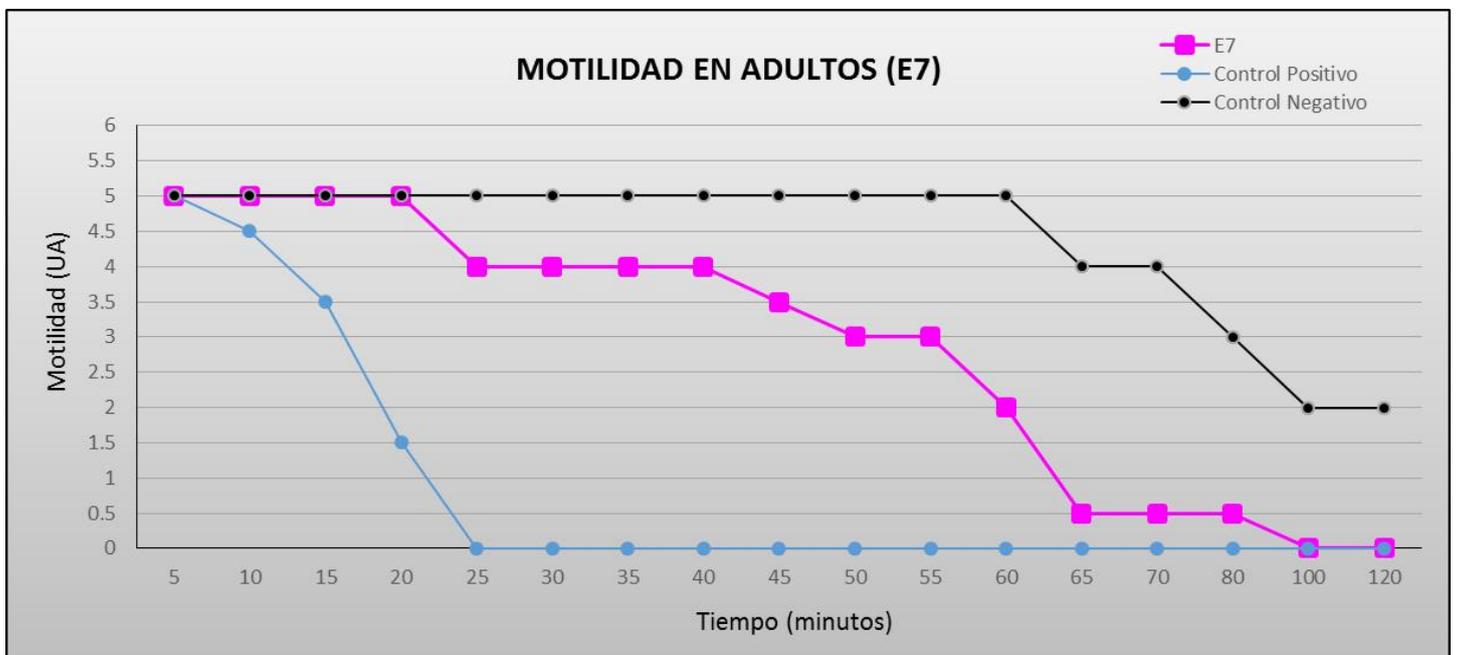
E5			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	5	5	5
10	5	4,5	5
15	4	3,5	5
20	4	1,5	5
25	1	0	5
30	1	0	5
35	0	0	5
40	0	0	5
45	0	0	5
50	0	0	5
55	0	0	5
60	0	0	5
65	0	0	4
70	0	0	4
80	0	0	3
100	0	0	2
120	0	0	2



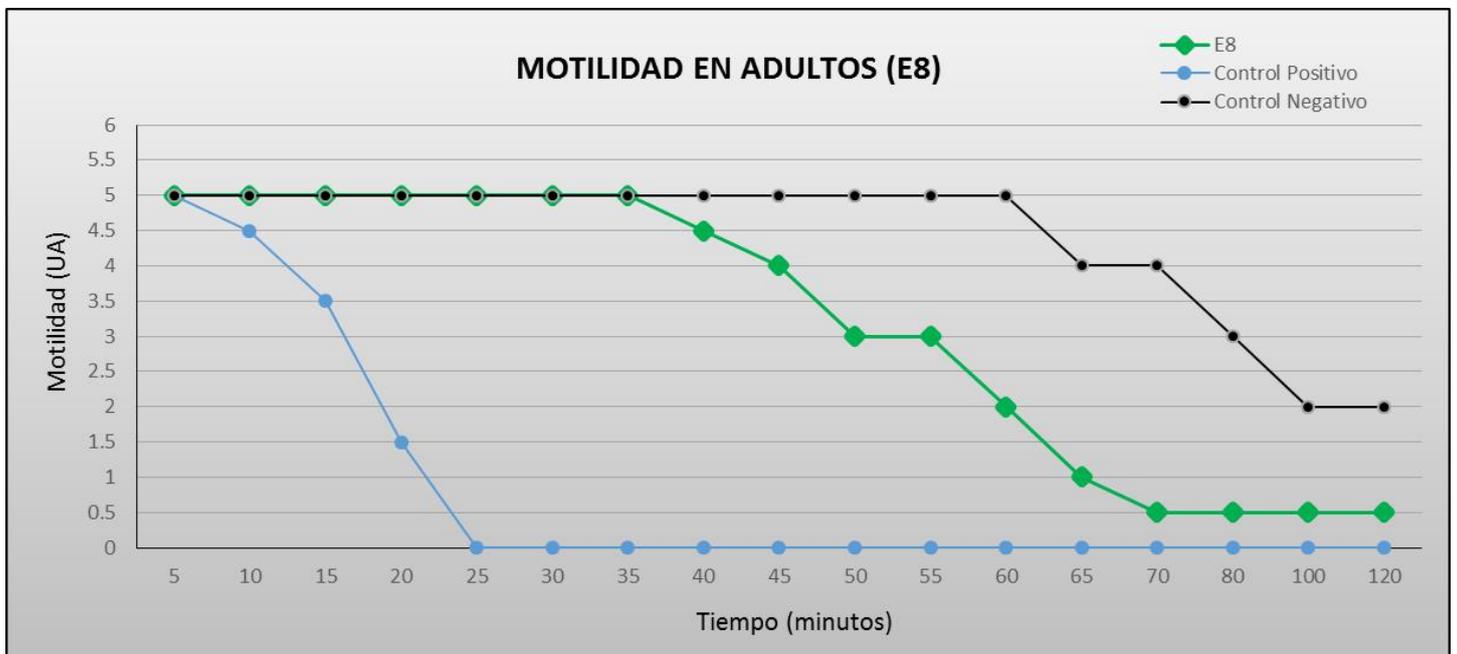
E6			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	5	5	5
10	5	4,5	5
15	5	3,5	5
20	5	1,5	5
25	4	0	5
30	3,5	0	5
35	3,5	0	5
40	3	0	5
45	3	0	5
50	2	0	5
55	0,5	0	5
60	0,5	0	5
65	0,5	0	4
70	0,5	0	4
80	0	0	3
100	0	0	2
120	0	0	2



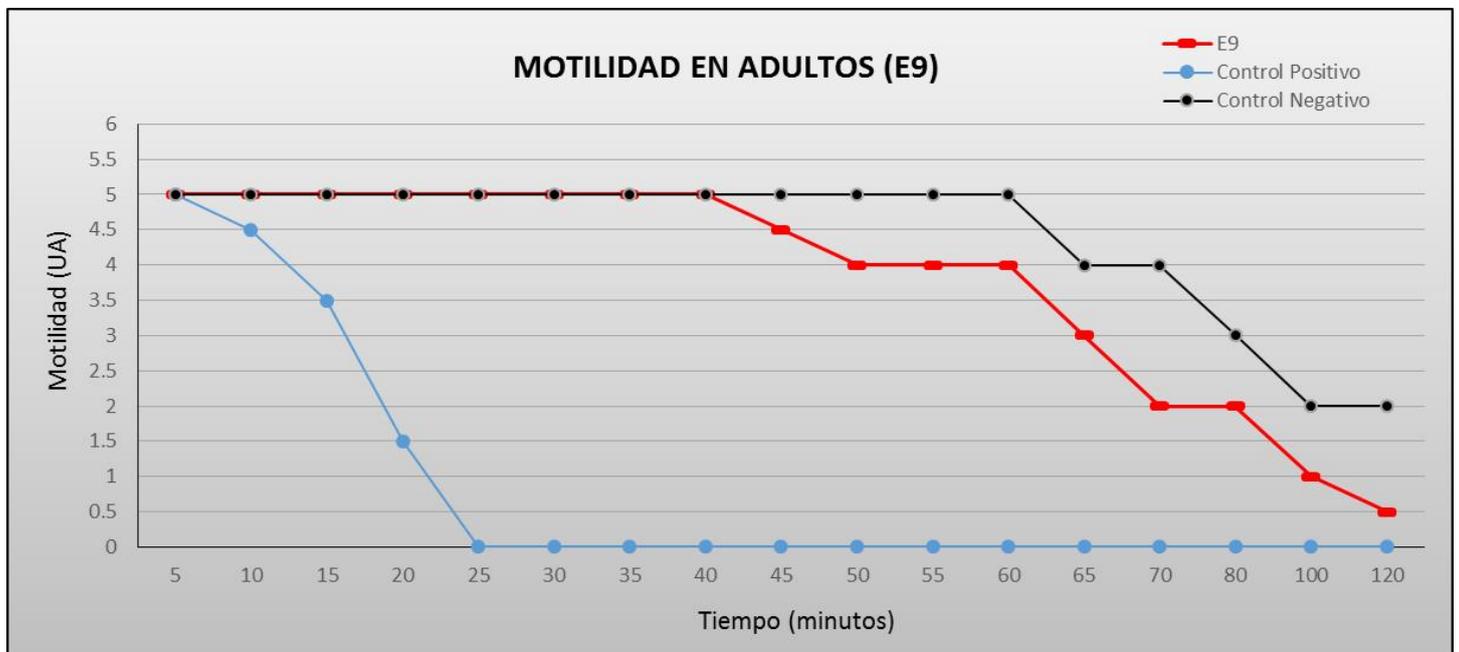
E7			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	5	5	5
10	5	4,5	5
15	5	3,5	5
20	5	1,5	5
25	4	0	5
30	4	0	5
35	4	0	5
40	4	0	5
45	3,5	0	5
50	3	0	5
55	3	0	5
60	2	0	5
65	0,5	0	4
70	0,5	0	4
80	0,5	0	3
100	0	0	2
120	0	0	2



E8			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	5	5	5
10	5	4,5	5
15	5	3,5	5
20	5	1,5	5
25	5	0	5
30	5	0	5
35	5	0	5
40	4,5	0	5
45	4	0	5
50	3	0	5
55	3	0	5
60	2	0	5
65	1	0	4
70	0,5	0	4
80	0,5	0	3
100	0,5	0	2
120	0,5	0	2



E9			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	5	5	5
10	5	4,5	5
15	5	3,5	5
20	5	1,5	5
25	5	0	5
30	5	0	5
35	5	0	5
40	5	0	5
45	4,5	0	5
50	4	0	5
55	4	0	5
60	4	0	5
65	3	0	4
70	2	0	4
80	2	0	3
100	1	0	2
120	0,5	0	2



E10			
tiempo (minutos)	motilidad	Control Positivo	Control Negativo
5	5	5	5
10	5	4,5	5
15	5	3,5	5
20	5	1,5	5
25	5	0	5
30	5	0	5
35	5	0	5
40	5	0	5
45	5	0	5
50	5	0	5
55	5	0	5
60	5	0	5
65	4	0	4
70	4	0	4
80	3	0	3
100	2	0	2
120	2	0	2

