UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

EFICACIA *IN VITRO* DE *BACCHARIS TRIMERA* EN NEMATODOS GASTROINTESTINALES DE OVINOS

“por”

Juan Manuel AZANZA GALLERO

María Pía SOLARO ARIETA

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción animal
MODALIDAD: Ensayo experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: _____
José Enrique Herrmann Orihuela

Segundo miembro (Tutor): _____
Zully Hernández Russo

Tercer miembro: _____
María Tersa Armúa Fernández

Cuarto miembro (Co-tutor): _____
Gabriela Ferragut Astol

Fecha: _____

Autores: _____
Juan Manuel Azanza Gallero

_____
María Pía Solaro Arieta

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Zully Hernández, tutora de tesis, por su completa dedicación, su compromiso y paciencia, compartiendo su conocimiento y afecto.
- A Gabriela Ferragut, co-tutora de tesis, por su constante colaboración y apoyo brindado.
- A Juan Cedano, por su buena disposición y colaboración en la parte estadística del trabajo.
- A la Ing. Agrónoma Elena Pérez por aportarnos el aceite esencial con el que se realizó la investigación.
- Al Laboratorio de Parasitología de la Regional Norte, Universidad de la República, por permitirnos utilizar las instalaciones y materiales para llevar a cabo el trabajo práctico.
- A nuestras familias y amigos, por el apoyo incondicional durante todos estos años.
- A nuestros compañeros de estudio, por todos los momentos compartidos.

TABLA DE CONTENIDO

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN…….....1

AGRADECIMIENTOS……..2

LISTA DE FIGURAS……..…….....5

LISTA DE TABLAS……..……...7

1. **RESUMEN**…….....8
2. **SUMMARY**……..9
3. **INTRODUCCIÓN**……...10
4. **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**……..12
   - 4.1 Taxonomía……..12
   - 4.2 Morfología……...12
   - 4.3 Ciclo biológico……...…13
   - 4.4 Epidemiología……...……..……..……...14
   - 4.5 Patogenia…….....17
   - 4.6 Sintomatología……...……..…...……....17
   - 4.7 Diagnóstico……..……..…....18
   - 4.8 Tratamiento y control……..……...….18
   - 4.9 Descripción de *Baccharis trimera* (Carqueja)……22
5. **HIPÓTESIS**……..……24
6. **OBJETIVOS**……..……..……..…….24
   - 6.1 Objetivo general……..……...24
   - 6.2 Objetivos específicos……..……..……..24
7. **MATERIALES Y MÉTODOS**……..……....25
   - 7.1 Material vegetal……...25
     - 7.1.1 Preparación de las diluciones del aceite esencial……..…..…25
   - 7.2 Obtención de huevos y larvas de nematodos gastrointestinales……..……...26
   - 7.3 Test de eclosión de huevos……...……...28
   - 7.4 Test de motilidad larvaria.……29

7.5 Análisis estadístico……30
8. RESULTADOS……..31
8.1 Cuantificación del efecto de *Baccharis trimera* sobre la eclosión de los huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos……31
8.2 Cuantificación del efecto nematodicida de *Baccharis trimera* sobre los estadios larvarios infectantes de gastrointestinales de ovinos……...35
9. DISCUSIÓN……...39
9.1 Cuantificación del efecto de *Baccharis trimera* sobre la inhibición de la eclosión de los huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos……39
9.2 Cuantificación del efecto nematodicida de *Baccharis trimera* sobre los estadios larvarios infectantes de gastrointestinales de ovinos…….....41
10. CONCLUSIONES……44
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……45
12. ANEXOS.....50
12.1 Resultados de las repeticiones de cada tratamiento del test de eclosión de huevos…….....50
12.2 Resultados de las repeticiones de cada tratamiento del test de motilidad larvaria……51

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquema del ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales en ovinos……...…….....14

Figura 2. Prevalencia de los géneros y/o especies de nematodos gastrointestinales en ovinos en Uruguay……..…….....15

Figura 3. Distribución estacional de los nematodos gastrointestinales en ovinos en Uruguay……..……..……...16

Figura 4. *Baccharis trimera* (Carqueja)……...25

Figura 5. Esquema de las distintas diluciones efectuadas del aceite esencial de *Baccharis trimera*…….26

Figura 6. Esquema del proceso de obtención de huevos de nematodos gastrointestinales a partir de un pool de materia fecal de ovinos……..……..….27

Figura 7. Test de eclosión de los huevos de nematodos gastrointestinales. Esquema de la placa de cultivo celular indicando las ocho diluciones aplicadas del aceite esencial…….28

Figura 8. Test de eclosión de los huevos de nematodos gastrointestinales. Esquema de la placa de cultivo celular indicando los controles positivos y negativos aplicados……..……...…29

Figura 9. Porcentaje promedio de inhibición de la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos frente a distintas diluciones del aceite esencial de *Baccharis trimera*, controles negativos y positivos, incluyendo tres repeticiones de cada tratamiento……..……..32

Figura 10. Efecto dosis-respuesta del aceite esencial de *Baccharis trimera* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos, partiendo del promedio de las tres repeticiones efectuadas de cada tratamiento……..…34

Figura 11. Porcentaje promedio de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales sin movilidad frente a diferentes diluciones del aceite esencial de *Baccharis trimera*, controles positivos y el negativo, incluyendo tres repeticiones de cada tratamiento……36

Figura 12. Efecto dosis-respuesta del aceite esencial de *Baccharis trimera* sobre la inhibición de la motilidad de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales de ovinos, partiendo del promedio de las tres repeticiones efectuadas de cada tratamiento……..……38

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Componentes químicos más relevantes del aceite esencial de *Baccharis trimera* y sus proporciones…….23

Tabla 2. Composición porcentual de los nematodos gastrointestinales utilizados en el test de eclosión de huevos……....31

Tabla 3. Análisis de varianza entre los diferentes tratamientos en relación a la inhibición de la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales.……..33

Tabla 4. Composición porcentual de los nematodos gastrointestinales utilizados en el test de migración larvaria……..35

Tabla 5. Análisis de varianza entre los distintos tratamientos con respecto a la inhibición de la motilidad de las larvas infestantes de nematodos gastrointestinales……..……..37

1. RESUMEN

En Uruguay, las nematodosis gastrointestinales constituyen las principales infecciones que deterioran la salud animal y que causan los mayores perjuicios económicos en la producción ovina. Dichas pérdidas, sumado al surgimiento de la resistencia a los antihelmínticos y a la presencia de residuos de los mismos en tejidos animales y en el ambiente, han llevado a la búsqueda de nuevas medidas de control de los nematodos gastrointestinales (NGI). En este sentido, el objetivo del trabajo fue evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro* del aceite esencial de *Baccharis trimera* (Carqueja) sobre los estadios de vida libre de los NGI de ovinos. La valoración del material vegetal se llevó a cabo en el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Veterinaria, CENUR Litoral Norte Salto de la Universidad de la República y los huevos y larvas infectantes se obtuvieron de muestras de materia fecal de ovinos infectados naturalmente con predominio de *Haemonchus* y en segundo lugar de *Trichostrongylus*. En el test de eclosión de huevos se utilizaron ocho diluciones del aceite (25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39 y 0,19%), un control positivo (Ricobendazol) y dos controles negativos (PBS+DMSO y Levamisol). En el test de motilidad larvaria se incluyeron cinco diluciones del aceite (25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56%), un control negativo (PBS+DMSO) y dos controles positivos (Levamisol y Ricobendazol). En ambos test se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, los cuales se dispusieron en placas de cultivo celular que se incubaron a 27°C. En las diluciones del aceite esencial de *Baccharis trimera* al 25 y 12,5% se obtuvo una inhibición de la eclosión del 100 y 98,96% respectivamente, no mostrando diferencias significativas entre ellas ni frente al Ricobendazol, pero sí respecto a los controles negativos y a las otras diluciones, que hasta la quinta se observó el efecto dosis respuesta y posteriormente se mantuvo entre el 46,87 y 48,95% de huevos sin eclosionar. La dosis letal 50 del aceite fue al 4,93% en la inhibición de la eclosión de los huevos. Por otro lado, en el test de motilidad larvaria también se observó un efecto dosis respuesta, pero no se encontraron diferencias significativas entre las distintas diluciones del aceite ni de ellas frente al Ricobendazol, en cambio difirieron estadísticamente con el Levamisol. Las tres primeras diluciones fueron significativamente diferentes al control negativo pero no ocurrió lo mismo con las últimas dos. La dosis letal 50 del aceite fue 16,77% en la inhibición de la motilidad de las larvas. A partir de estos resultados se demostró que el aceite esencial de *Baccharis trimera* fue más efectivo como ovicida que larvicida dado que la dilución a la cual se inhibió el 50% de la eclosión fue menor que la dilución a la que el 50% de las larvas dejaron de ser móviles. Estos efectos han sido verificados *in vitro* y de mantenerse la actividad sobre los huevos en estudios *in vivo*, contribuiría a reducir la contaminación de las pasturas.

2. SUMMARY

In Uruguay, gastrointestinal nematodes are the main infections that deteriorate animal health and cause the greatest economic damage in sheep production. These losses, coupled with the emergence of resistance to anthelmintics and the presence of residues thereof in animal tissues and in the environment, have led to the search for new measures of gastrointestinal nematodes (GIN). In this sense, the objective of this work was to evaluate the in vitro antiparasitic activity of the essential oil of *Baccharis trimera* (Carqueja) on the free living stages of the GIN of sheep. The evaluation of the plant material was carried out in the Laboratory of Parasitology, Veterinary School, CENUR Litoral Norte Salto of the University of the Republic and the eggs and infective larvae were obtained from samples of fecal matter of naturally infected sheep with predominance of *Haemonchus* and secondly from *Trichostrongylus.* In the egg hatch test, eight dilutions of the oil (25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 and 0.19%), a positive control (Ricobendazole) and two negative controls (PBS + DMSO and Levamisole) were used. Five dilutions of the oil (25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56%), a negative control (PBS + DMSO) and two positive controls (Levamisole and Ricobendazole) were included in the larval motility test. In both tests three replicates of each treatment were performed, which were placed in cell culture plates that were incubated at 27 ° C. In the dilutions of the essential oil of *Baccharis trimera* at 25 and 12.5%, a hatching inhibition of 100 and 98.96% respectively was obtained, showing no significant differences between them nor against the Ricobendazole, except with respect to the negative controls and to the other dilutions, that until the fifth the dose response effect was observed and later it was maintained between 46.87 and 48.95% of the eggs without hatching. The lethal dose 50 of the oil was 4.93% in inhibiting egg hatching. On the other hand, a dose response effect was also observed in the larval motility test, but no significant differences were found between the different dilutions of the oil and none of them in comparison to Ricobendazole, but they differed statistically with Levamisole. The first three dilutions were significantly different to the negative control but the same did not occur with the last two. The lethal dose 50 of the oil was 16.77% in the inhibition of larval motility. From these results it was demonstrated that the essential oil of *Baccharis trimera* was more effective as an ovicide than a larvicide since the dilution at which 50% of the hatching was inhibited was lower than the dilution at which 50% of the larvae were no longer mobile. These effects have been verified in vitro and the activity maintained on the eggs in in vivo studies, would contribute to reduce contamination of the pastures.

3. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis gastrointestinales representan uno de los problemas sanitarios más importantes en los sistemas de producción de ovinos a nivel mundial. Esto se debe a que afectan la salud y el bienestar de los animales, pudiéndose manifestar con diarrea, pérdida de apetito, anemia de distintos grados y mortalidad. Por otro lado las infecciones subclínicas, leves pero persistentes, cobran gran relevancia al ocasionar pérdidas económicas asociadas a la disminución de la producción de carne y lana y/o aumento de los costos necesarios para su control (Hernández y col., 1999; Banchero y Mederos, 2013).

A nivel del Uruguay, las nematodosis gastrointestinales constituyen las principales infecciones que deterioran la salud animal y que causan los mayores perjuicios económicos en la producción ovina. Estos efectos han sido cuantificados, existiendo en corderos altamente parasitados hasta un 50% de mortalidad, un 20% de disminución en el peso vivo y un 30% de reducción en la producción de lana (Berretta y col., 1998).

En el control de las parasitosis gastrointestinales no existe un protocolo único de tratamiento, sino que se han de valorar distintos aspectos tales como categorías animales, dotaciones, estado fisiológico, nivel nutritivo y las condiciones climáticas (Bonino, 2002). Ha de tenerse en cuenta que el equilibrio parásito-hospedador depende tanto de la carga y la combinación de géneros parasitarios como del clima, el manejo previo de las pasturas y la majada, la inmunidad adquirida y la interrelación con otras especies de animales (Cardozo y Nari, 1987). La erradicación resulta prácticamente imposible, siendo en todo caso más viable su control, es por esto que “debemos tratar de controlar las parasitosis hasta niveles compatibles con la producción” (Corchero y col., 2002).

En nuestro país, estas parasitosis han sido controladas de manera exitosa por más de 50 años mediante el uso de drogas antihelmínticas (ATH). Sin embargo, el uso frecuente de dichos fármacos ha presionado a los parásitos a la selección de cepas resistentes a los mismos al ser utilizados como único método de control. Esto ha derivado en los últimos años a la aparición de la resistencia antihelmíntica (RA) a diferentes grupos químicos y se ha transformado en uno de los inconvenientes sanitarios de mayor importancia en los rebaños ovinos en todo el mundo (Banchero y Mederos, 2013).

La situación resulta en un gran desafío para productores y técnicos, donde además de las pérdidas en la producción y del surgimiento de la RA, se generan graves consecuencias debidas a la presencia de residuos de ATH en los tejidos animales (Bonino, 2002). Los organismos internacionales y los mercados extranjeros son cada vez más exigentes en cuanto a los niveles permitidos de residuos de fármacos en los productos de origen animal, es por esto que la permanencia de los químicos en

los tejidos se torna una de las desventajas principales, sobre todo para los ATH de larga acción. Además de esto, existen ATH endectocidas que tienen un efecto perjudicial en el medio ya que se eliminan en las heces fundamentalmente como droga activa y con una permanencia prolongada en el ambiente, donde a dosis muy bajas, afectan a los ácaros encargados de la degradación de la materia fecal (Fiel, 2013).

En la actualidad se busca realizar un control integrado de los NGI que apunte a la reducción en el uso de los ATH y por ende, disminuya la probabilidad de aparición de RA a los mismos (Castells, 2004a). Para esto se han estudiado diferentes estrategias de control, tales como el manejo del pastoreo y la nutrición, el uso de forrajes bioactivos o nutracéuticos, el control biológico, las homeopatías, la inmunización con vacunas, la utilización de animales seleccionados por resistencia genética y el uso de hongos nematófagos (Banchero y Mederos, 2013). Además de esto, a nivel mundial se encuentra en investigación el uso de medicamentos de origen natural hechos a partir de plantas con propiedades antiparasitarias, lo cual permitiría un control ecológico disminuyendo el uso de fármacos sintéticos (Arce González y col., 2006).

En los últimos años diversos estudios han probado la actividad antihelmíntica de extractos vegetales frente a los NGI de ovinos, como ser los extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium,* los cuales fueron capaces de inhibir la eclosión de sus huevos (Arece García y col., 2014). Con respecto al aceite esencial de *Baccharis trimera*, si bien se ha comprobado su efecto antiséptico y desinfectante, su actividad como antifúngico y otras propiedades biológicas (Avancini y col., 2000; Casali y col., 2007), no se han encontrado trabajos nacionales o internacionales que verifiquen su acción frente a NGI de ovinos.

.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Taxonomía

Los NGI se ubican taxonómicamente en el Reino animal, Phyllum Nemathelminthes y Clase Nematoda, pudiendo distinguirse principalmente tres familias: Trichostrongylidae, Strongylidae y Trichuridae. A la familia Trichostrongylidae pertenecen los géneros *Ostertagia, Haemonchus, Trichostrongylus, Cooperia* y *Nematodirus;* a la familia Strongylidae los géneros *Chabertia, Oesophagostomum* y *Bunostomum;* mientras que dentro de la familia Trichuridae se encuentra al género *Trichuris* (Lapage, 1976; Armour y col., 2001).

En cuanto a su localización en el organismo, *Haemonchus, Ostertagia* y *Trichostrongylus axei* se ubican en abomaso; *Trichostrongylus colubriformis, Cooperia, Nematodirus* y *Bunostomum* a nivel de intestino delgado; *Oesophagostomum* en ciego y colon, *Chabertia* en colon, y *Trichuris* fundamentalmente en ciego (Armour y col., 2001).

4.2 Morfología

Los NGI son parásitos cilíndricos, de color blanquecino e incluso rojizo en caso de ser hematófagos, cuyo tamaño varía desde un par de milímetros a tres o cuatro centímetros. La cutícula puede ser lisa o estriada y en algunos casos tienen expansiones cuticulares anteriores, mientras que en su parte posterior en los machos del suborden Strongyloidea se encuentra la bolsa copuladora, donde se ubican otras estructuras quitinosas que intervienen en la cópula (Corchero y col., 2002).

El sistema digestivo es tubular. La boca, en la mayoría de los NGI, es una abertura sencilla que puede estar rodeada de dos o tres labios y que conecta directamente con el esófago. En algunos nematodos la cápsula bucal es pequeña, mientras que en otros es grande y puede contener dientes y al alimentarse introducir parte de la mucosa en dicha cápsula, donde es degradada por enzimas segregadas por glándulas adyacentes. Algunos helmintos pueden secretar sustancias anticoagulantes, lo que ocasiona que la mucosa continúe sangrando varios minutos después de que el parásito haya cambiado su lugar de alimentación. Aquellos nematodos con cápsula bucal pequeña, como los tricostrongilidos, suelen alimentarse de fluidos de la mucosa, de restos celulares, de productos de la digestión del hospedador o ser hematófagos (Soulsby, 1987; Armour y col., 2001).

En relación al esófago, generalmente es muscular y bombea el alimento hacia el intestino o puede ser de tipo capilar como en *Trichuris*. En el caso de las hembras el intestino termina en un ano, mientras que los machos tienen una cloaca donde confluyen el aparato digestivo y el reproductor (Armour y col., 2001).

Los sistemas reproductores son tubos filamentosos. Las hembras presentan ovario, oviducto y útero, los que terminan en una vagina que se abre en la vulva. En algunas especies puede estar presente una aleta vulvar. Por otro lado, los machos tienen un solo testículo y un vaso deferente que termina en un conducto eyaculador en el interior de la cloaca (Armour y col., 2001).

Con respecto a la morfología general de los huevos, estos son ovoides, de color grisáceos, de cáscara fina, con cámara de aire y el tamaño varía entre 70 y 90 micras, excepto en el caso de *Nematodirus* que alcanza alrededor de 200 micras. Los huevos son expulsados al medio junto con las heces en fase de blástula, con un número variable de blastómeros según la especie en cuestión (Corchero y col., 2002).

4.3 Ciclo biológico

Los NGI presentan generalmente un ciclo biológico simple y directo, pudiendo destacarse una fase parasitaria en el hospedador y otra no parasitaria de vida libre sobre las pasturas. Los huevos desarrollados por los nematodos hembras adultas son liberados al medio mezclados con la materia fecal de los ovinos infectados. Una vez en las pasturas, ante condiciones de temperatura media (alrededor de 25°C) y humedad elevada, eclosionan y pasan por tres etapas larvarias consecutivas: larva 1 (L1), larva 2 (L2) y larva 3 (L3) (Castells, 2004a). Durante los dos primeros estadios, las larvas se alimentan de bacterias y otros microorganismos, mientras que en la etapa de L3 retienen la cutícula del segundo estadio y no se alimentan, dependiendo de sus reservas acumuladas. En condiciones de campo, el intervalo de tiempo que va desde la eclosión de los huevos hasta el desarrollo de las L3, puede ser de 2 a 3 semanas (Mederos, 2002).

Luego de formadas las larvas infectantes L3, estas son ingeridas por los animales junto con los pastos. Al llegar al interior del rumen o abomaso, pierden la vaina protectora del segundo estado larval y se establecen en el órgano de elección. Dentro del aparato digestivo del ovino mudan a larva 4 (L4) y larva 5 (L5) y alcanzan el estado adulto diferenciándose en machos o hembras, los que inician la cópula. Posteriormente las hembras realizan la postura asegurándose la transmisión parasitaria a otros animales (Entrocasso y col., 2013). El potencial biótico de *Haemonchus contortus* es de 5000 a 15000 huevos por día, mientras que una hembra de *T. colubriformis* puede producir 450 huevos por día (Mederos, 2002). En la Figura 1 se esquematiza el ciclo biológico de los NGI en ovinos.

Figura 1. Esquema del ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales en ovinos.

Fuente: Mederos, 2002.

La prepatencia de estos parásitos varía de acuerdo a la especie, pudiendo extenderse desde 2 hasta 4 semanas (Entrocasso y col., 2013). Dicho periodo representa el tiempo que media entre la ingestión de larvas infestantes y la comprobación de los primeros huevos en materia fecal. Ante determinadas condiciones climáticas adversas el periodo prepatente puede demorarse, frenando las larvas su desarrollo en la mucosa del aparato digestivo del ovino y permanecen en estado de reposo o inhibición durante 3 a 5 meses hasta retomar su evolución normal; este fenómeno se conoce como hipobiosis (Suárez, 2007). Desde un punto de vista epidemiológico es considerado como un mecanismo de economía biológica, a través del cual estos vermes evitan cambios bruscos en sus poblaciones. Durante la hipobiosis los nematodos se mantienen con un metabolismo muy bajo hasta que se presenten condiciones de temperatura y humedad más favorables para su desarrollo en el ambiente. En Uruguay la hipobiosis se ha descripto para *H. contortus* en ovinos y *Ostertagia ostertagi* en bovinos (Cardozo y Nari, 1987).

4.4 Epidemiología

La tasa de eclosión y desarrollo de los NGI en sus distintas etapas larvarias en las pasturas y el tiempo de sobrevivencia en cada fase depende de las condiciones ambientales que varían según las especies involucradas. La temperatura y la humedad son factores cruciales para los estadios parasitarios de vida libre. En el caso de *H. contortus,* se produce un rápido desarrollo y elevada sobrevivencia larvaria ante climas cálidos y húmedos, mientras que el frío y el calor extremo y seco hacen descender su longevidad.

parasitarias varía entre 22 y 26°C, mientras que la humedad ideal es del 100%, siendo la humedad mínima requerida de 85% (Mederos, 2002).

Uruguay se ubica en una zona templada y al tratarse de un país de poca superficie y no montañoso, hace que se pueda esperar una distribución similar de géneros y especies parasitarias en toda su extensión. Los estudios realizados por Nari y col. en los años 1974-1976 y 1982-1984 en el CIVET “M.C.Rubino” han determinado que las especies de NGI que se desarrollan en ovinos en el Uruguay son fundamentalmente *H. contortus* (43%), *T. axei* (12%), *Nematodirus* spp. (11%), *T. colubriformis* (26%), *Ostertagia* spp. y otros (8%) (Mederos, 2002). En la Figura 2 se grafica la distribución general de los géneros y/o especies de nematodos en ovinos.

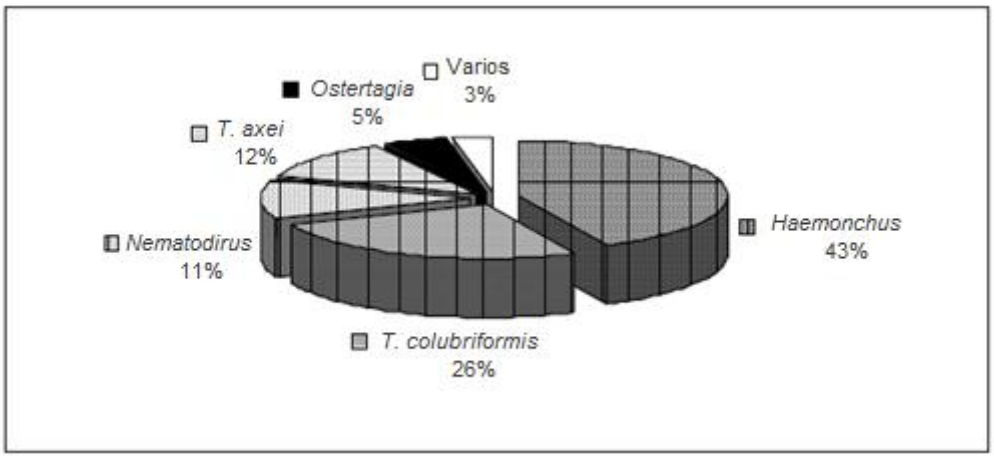

Figura 2. Prevalencia de los géneros y/o especies de nematodos gastrointestinales en ovinos en Uruguay.
Fuente: Castells, 2004a.

A su vez, los géneros parasitarios se distribuyen de manera diferente a lo largo del año en función de las condiciones climáticas presentes. De esta manera *H. contortus* predomina en clima cálido, fundamentalmente en primavera y otoño, durante el verano se puede encontrar en importantes proporciones cuando se asocia con alta humedad y en el invierno se reduce su aparición excepto ante la ocurrencia de veranillos. En el caso de *T. colubriformis,* se incrementa en clima más frío, esencialmente en invierno y en menor medida en otoño y primavera, mientras que en verano las poblaciones son bajas. *Ostertagia* se encuentra básicamente en invierno, mientras que *Oesophagostomum* se presenta todo el año y *Cooperia* entre octubre y noviembre (Castells, 2004a).
En la Figura 3 se muestra la distribución de los NGI más prevalentes de ovinos de acuerdo a las estaciones del año.

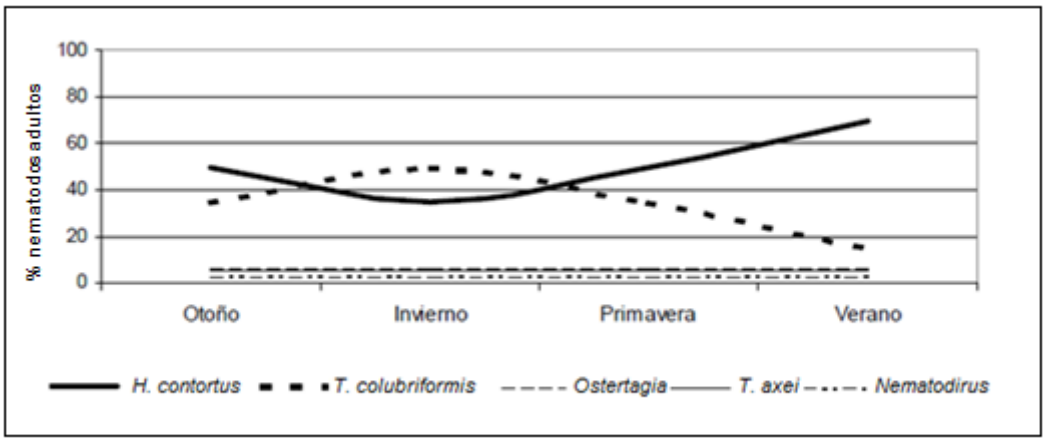

Figura 3. Distribución estacional de los nematodos gastrointestinales en ovinos en Uruguay.
Fuente: Castells, 2004a.

La severidad de las infecciones por nematodos se ve influenciada por ciertos factores, como ser la cantidad de larvas infestantes ingeridas, lo cual varía de acuerdo al clima, a la protección que aporta la vegetación a las larvas, a la carga animal y al hábito de pastoreo de los rumiantes presentes. Por otro lado, también incide la velocidad con que se desarrolla la resistencia adquirida en el hospedador, que depende de factores genéticos, nutricionales, del estado fisiológico y de las especies parasitarias. Asimismo la tasa de multiplicación intrínseca de las especies de parásitos, el manejo, las conductas de pastoreo y el uso de los ATH afectan las formas de presentación de estas infecciones parasitarias (Mederos, 2002).

La especificidad de hospedador varía según el género y la especie de parásito, existiendo nematodos que en relación al número de hospedadores que parasitan, se pueden clasificar como generalistas o especialistas. En algunas ocasiones, el estado inmunológico de los animales modifica esta característica y, parásitos especialistas pasan a tener un comportamiento generalista, ampliando así su espectro de hospedadores. Este fenómeno puede presentarse también en caso de pastoreo conjunto o alternado de bovinos y ovinos en zonas templadas, pudiendo instalarse los nematodos del bovino en el ovino y viceversa. Las praderas que albergaron ovinos parasitados con *Haemonchus* spp. y *T. colubriformis* pudieron limpiarse mediante el pastoreo con bovinos, mientras que en zonas tropicales los ovinos no lograron este efecto de limpieza sobre *H. placei* o *H. similis* de los bovinos, lo cual se explicaría por la posible infección cruzada de las especies de *Haemonchus* y que también se presenta en *Cooperia* (Entrocasso y col., 2013).

En los ovinos ocurre un fenómeno conocido como “alza de lactación” o “incremento primaveral”, coincidiendo con que la mayoría de las pariciones en esta especie se concentran en dicha estación. Antes y después de los partos y debido a los cambios hormonales que suceden en las madres, se deprimen los mecanismos de defensa

aumentando la población parasitaria con capacidad reproductiva y, en consecuencia, la eliminación de huevos en las heces. Esto deriva en un incremento de la contaminación de las pasturas garantizando la continuidad del ciclo en nuevos hospedadores susceptibles como son los corderos recién nacidos (Corchero y col., 2002). En el Uruguay se ha detectado que el pico del incremento de los recuentos de huevos de nematodos por gramo de materia fecal (HPG) ocurre entre la sexta y octava semana posparto (Cardozo y Nari, 1987).

4.5 Patogenia

La infección por los NGI causa una serie de efectos metabólicos que provocan un síndrome análogo a la subnutrición. Una de las principales acciones es la disminución de la ingesta voluntaria de alimentos, lo cual se puede atribuir al dolor que provocan las lesiones a nivel del aparato digestivo. Otro factor que lleva a la depresión de la ingesta es el cambio de ph abomasal, lo que afecta la digestión de proteínas reduciendo los niveles de aminoácidos estimuladores del apetito (Cardozo y Nari, 1987). Además de la pérdida de apetito, la patogenia parasitaria se manifiesta con alteraciones en la digestión, absorción de nutrientes, deposición de proteína, grasa y minerales, repercutiendo también en la reproducción e inmunidad del animal (Entrocasso y col., 2013).

Los parásitos del abomaso provocan una reacción inflamatoria progresiva con hiperemia y aumento de la producción de moco. *Haemonchus* spp. ocasiona la formación de pequeños coágulos de sangre y erosiones de la mucosa debidas a la descamación de las células epiteliales (Entrocasso y col., 2013).

La anemia es generalmente producida por parásitos hematófagos, fundamentalmente por *Haemonchus* spp., pero también puede ser ocasionada por parasitosis mixtas con predominio de nematodos “no chupadores”. Puede ser causada por la pérdida de gran cantidad de sangre antes de que el sistema eritropoyético entre en acción, por pérdida continua de sangre con una eritropoyesis deficiente que no alcanza la compensación, o bien, por agotamiento del sistema eritropoyético (Cardozo y Nari, 1987).

4.6 Sintomatología

Las Nematodosis Gastrointestinales de los ovinos se caracterizan por presentarse con morbilidad elevada, dado que la mayoría de los animales de un rebaño se ven afectados en mayor o menor medida, y generalmente baja mortalidad. Se pueden evidenciar casos en donde no se visualizan síntomas específicos, sin embargo se registran pérdidas en la producción al ocasionar el deterioro de los índices de conversión, retardo en el crecimiento y disminución de la capacidad reproductiva (Hernández y col., 1999; Hernández y Fernández, 2012). La sintomatología clínica se presenta fundamentalmente en animales jóvenes y suele ser de tipo

gastrointestinal, como ser diarreas de intensidad variable, heces fluidas de color negruzco e incluso con sangre o puede acompañarse de anemia, edema submandibular, ascitis, pérdida de lana, adelgazamiento y muerte (Corchero y col., 2002).

En relación a *H. contortus*, por ser un parásito hematófago, se lo asocia fundamentalmente a cuadros de anemia, mientras que *T. colubriformis* al alimentarse de tejidos de la pared intestinal se manifiesta principalmente por diarreas y retardo en el crecimiento (Castells, 2004a).

4.7 Diagnóstico

La mayoría de las Nematodosis Gastrointestinales en ovinos se presentan en forma subclínica, motivo por el cual el diagnóstico clínico no tiene gran valor, y en caso de existir sintomatología evidente, solo tendría valor orientativo. Por tal motivo, se recomienda combinar la información clínico-epidemiológica con los análisis de laboratorio para arribar a un diagnóstico (Corchero y col., 2002).

En el diagnóstico parasitológico se utilizan fundamentalmente técnicas coprológicas como ser el conteo de HPG de materia fecal mediante la técnica de Mc Master, la identificación de las larvas de nematodos obtenidas en los cultivos a través de los métodos de Robert O´Sullivan o Corticelli y Lai y, por otro lado, la necropsia de los animales muertos o sacrificados que permite obtener los parásitos en los diferentes hábitat y visualizar las lesiones ocasionadas por los mismos (López y col., 2013).

En este sentido, resulta conveniente efectuar los muestreos de materia fecal y las pruebas de laboratorio correspondientes de manera rutinaria cada uno o dos meses, lo que permitiría conocer la dinámica de las poblaciones de NGI y por ende aplicar los antiparasitarios en los momentos necesarios y acorde a los géneros predominantes (Cuéllar, 2009a).

4.8 Tratamiento y control

Actualmente están disponibles en la industria farmacéutica una gran variedad de ATH válidos para el control de las nematodosis. Dentro de las drogas nematodicidas se encuentran los Benzimidazoles, entre ellos Albendazol, Fenbendazol, Thiabendazol y los Probenzimidazoles como Netobimin, Febantel y Tiofanato; el grupo de los Imidazotiazoles con el Levamisol y Tetramisol; y las Lactonas Macrocíclicas que incluyen las Avermectinas y Milbemicinas. En relación a los Imidazotiazoles, estos presentan buena actividad frente a las formas adultas y en menor medida frente a los estadios larvarios. Por otro lado, las Lactonas Macrocíclicas representan a los antiparasitarios endectocidas por excelencia (Corchero y col., 2002).

De todos los métodos de control existentes, debido a su practicidad e impacto inmediato, los químicos han sido los más frecuentemente utilizados. Sin embargo, ante la situación actual en la cual la RA, el potencial daño ambiental, los residuos en tejidos animales y la sustentabilidad han cobrado gran importancia, el enfoque del control de los nematodos se ha modificado. Se apunta a la disminución en la frecuencia del uso de ATH así como a la incorporación de nuevas medidas de control, lo que se conoce como control integrado de parásitos (Salles, 2002). Esta propuesta consiste en combinar los tratamientos ATH estratégicos con otras formas de control que se ajusten a los sistemas de explotación y a las condiciones climáticas, además de alternar los distintos productos químicos (Corchero y col., 2002).

Uno de los métodos alternativos más estudiado y difundido es el manejo de la nutrición y el pastoreo (Banchero y Mederos, 2013). Este último se basa en planificar estrategias que reduzcan la probabilidad de contacto entre las larvas infestantes y el hospedero. De esta forma los sistemas de pastoreo pueden ser rotativos, en los que la subdivisión en parcelas disminuye la permanencia o aumenta los periodos de descanso, o bien alternos, en los cuales se alternan especies (bovinos y ovinos) o categorías (adultos y jóvenes) (Castells, 2004b). En este sentido, la reducción de la contaminación parasitaria de una pastura puede lograrse a partir del pastoreo previo con categorías adultas de bovinos en aquellos potreros destinados al pastoreo con las categorías ovinas más susceptibles, como ser corderos y ovejas de cría. Durante el pastoreo previo resulta imprescindible considerar la carga animal de forma de lograr una buena limpieza de las pasturas desde el punto de vista parasitario y dejar un adecuado remanente de forraje para el pastoreo posterior con ovinos (Berretta y col., 1998).

Al evaluar el grado de contaminación de las pasturas por los estadios no parasitarios de los nematodos, encontramos desde pasturas limpias con insignificantes o nulos niveles de contaminación, hasta pasturas sucias con elevado riesgo de infección para los animales (Salles, 2002). El uso de pasturas “seguras” junto a la administración racional de los ATH, permite reducir la presión de selección de los parásitos gastrointestinales hacia la resistencia a las drogas, además de disminuir los costos sanitarios (Berretta y col., 1998).

Sin embargo, se debe considerar el concepto de “poblaciones en refugio”, es decir aquellas subpoblaciones de estadios de vida libre (principalmente huevos y larvas de nematodos) que no son directamente afectadas por los antiparasitarios debido a que la presión del tratamiento se efectúa solamente en una pequeña proporción de la población total de nematodos. Por tal motivo, el tamaño de la población en refugio tiene un rol fundamental en el efecto de “dilución” de la relación parásitos susceptibles y resistentes, de forma que a un menor número de estadios en refugio mayor posibilidad de desarrollo de RA. Los estadios en refugio se pueden ver

afectados por condiciones climáticas adversas, por depredadores o bien, por no coincidir con su hospedero (Nari, 2001).

La RA es un fenómeno ampliamente difundido en la mayoría de los países productores de ovinos y puede definirse como una modificación heredable en la habilidad individual de los parásitos para sobrevivir a las dosis terapéuticas recomendadas. En un establecimiento múltiples factores pueden contribuir en el desarrollo de RA, entre ellos la introducción de animales procedentes de predios con diagnóstico de RA y el manejo inadecuado de las drogas ATH, como ser el elevado número de dosificaciones o la utilización reiterada de un mismo principio activo. En el Uruguay, a partir de un estudio realizado por DILAVE “M. C. Rubino” en ovinos en el año 1994, se diagnosticó la resistencia a los Benzimidazoles en el 80% de los predios, mientras que el 71% y el 1,2% de los establecimientos presentaron resistencia a los Levamisoles e Ivermectinas respectivamente (Banchero y Mederos, 2013).

En la actualidad otras opciones de control están siendo estudiadas, dentro de las cuales se pueden citar la producción de vacunas contra helmintos, la selección de animales genéticamente resistentes a las infecciones por nematodos, las homeopatías y el control biológico utilizando hongos nematófagos (Cuadro y col., 2004). En referencia a la primera de ellas, a nivel del Uruguay, el Secretariado Uruguayo de la Lana ha efectuado trabajos en base a una vacuna con antígenos ocultos de *H. contortus*, cuyos resultados demostraron la reducción del conteo de HPG de NGI hasta en un 82% tras la administración de cuatro dosis del inmunógeno. En el caso de las homeopatías, estas pueden ser preparadas con parte de patógenos o bien extractos de plantas que apuntan a mejorar la respuesta inmune frente a las infecciones parasitarias (Banchero y Mederos, 2013). Con respecto a los hongos nematófagos, su efecto fundamental consiste en combatir los estadios de vida libre de los NGI que se encuentran en la materia fecal (Cuéllar, 2009b).

Por otro lado, el sistema FAMACHA© constituye un método práctico para evaluar clínicamente a los animales, conociendo indirectamente el estado de la parasitosis y, en base a esto, tomar la decisión de aplicar o no el tratamiento ATH. Se basa en la visualización de la coloración de la mucosa ocular y compararla en una escala de cinco grados, administrando el fármaco antiparasitario de forma selectiva a los ovinos que lo requieran. Esto permite disminuir la presión de selección hacia la aparición de cepas resistentes de NGI y contribuye a aumentar la proporción de parásitos susceptibles en refugio. Cabe destacar que este método es aplicable exclusivamente en aquellos casos de infección con parásitos hematófagos, como por ejemplo *H. contortus* (Cuéllar, 2009b; Fthenakis y col., 2013).

También se encuentra en investigación la utilización de plantas con propiedades antihelmínticas debido a la acción de sus principios activos. Esta opción constituye

un método ecológico para el tratamiento de las parasitosis y podría contribuir en la disminución del uso de los químicos sintéticos (Arece García y Barrabí Puerta, 2013).

Las plantas medicinales son consideradas una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y a su bajo o nulo efecto tóxico. Dichas plantas presentan un gran reservorio de sustancias que se origina a partir de las actividades metabólicas vinculadas a sus sistemas de defensa contra microorganismos, insectos y animales herbívoros. Los extractos vegetales y aceites esenciales constituyen una mezcla compleja de estos metabolitos secundarios, los cuales pueden ser extraídos de las plantas por distintos métodos como ser la destilación por arrastre de vapor. Los principales compuestos químicos de estas mezclas son mono y sesquiterpenos, incluyendo carbohidratos, alcoholes, éter, aldehídos y cetonas, a los cuales se les adjudica las fragancias y propiedades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales. Estos extractos y aceites esenciales tienen un amplio espectro de efectos farmacológicos, mostrando propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas y otras actividades biocidas (Castro y col., 2010).

Se documentan experiencias que han evaluado la eficacia del uso de distintos extractos vegetales en el control de los parásitos. En Cuba se demostró que *Bromelia pinguin* (piña de ratón) fue efectiva para el control de *Haemonchus* spp. en terneros y, posteriormente se reveló su efectividad frente a infecciones con *Oesophagostomum columbianum* en ovinos en México (Arece García y Barrabí Puerta, 2013). Por otro lado, en Cuba también se evidenció que extractos acuosos de *Moringa oleifera* (paraíso francés) y *Gliricida sepium* (mata ratón) fueron capaces de inhibir en forma significativa la eclosión de huevos de estrongiloideos gastrointestinales de ovinos, con efecto dependiente de las dosis utilizadas (Arece García y col., 2014). La acción antihelmíntica *in vitro* del extracto metanólico de hojas de *Gliricida sepium* contra NGI de ovinos fue demostrada en un ensayo realizado en México, evidenciando el mismo efecto dosis-respuesta (Bolio López y col., 2014).

Los estudios llevados a cabo en Brasil a partir del extracto acuoso de las hojas de la planta *Annona muricata* L. (guanábana), obtuvieron resultados favorables en la inhibición de la eclosión de huevos y en afectar la motilidad larvaria de *H. contortus* de ovinos (Beleboni y col., 2013).

4.9 Descripción de *Baccharis trimera* (Carqueja)

En Uruguay existe una amplia variedad de plantas medicinales, entre ellas *Baccharis trimera*, un arbusto o subarbusto de color verde vivo, sin pelos y muy ramoso, que mide entre 40 y 70 cm de altura. Esta especie perenne de ciclo estival es dioica, por lo que pueden encontrarse individuos masculinos y femeninos por separado. Se caracteriza por presentar tallos con tres alas y hojas muy reducidas o nulas, mientras que sus flores crecen en capítulos dispuestos en espiga en los extremos de las ramas, siendo los masculinos de forma globosa y los femeninos cilíndricos. Con respecto a sus frutos, son muy pequeños, ligeramente comprimidos y provistos de pappus (corona de pelos). La floración ocurre entre los meses de febrero y abril, incluso hasta junio, y el fruto madura desde marzo hasta principios de mayo (Davies, 2004).

Esta maleza es una especie nativa muy común que se distribuye por todo el territorio y vive en campo bruto, en suelos muy variados, excepto en los muy húmedos, siendo más agresiva en los suelos arenosos. Se encuentra en mayor densidad en aquellos predios arados y pastoreados de manera muy descuidada. Se caracteriza por no resultar apetecible para el ganado, sin embargo los brotes jóvenes pueden ser algo comidos por los ovinos cuando se sobrecarga o bien en los periodos de escasez de las pasturas. Dicho arbusto también se encuentra en el sur de Brasil, en el nordeste de Argentina y en Paraguay (Davies, 2004).

Esta planta es utilizada popularmente por la sociedad en infusiones con propiedades digestivas, en problemas de hígado (infusión al 1-2%), como febrífugo y tónico amargo (infusión al 10%). Asimismo, se cita su uso en la región como antirreumática y antihelmíntica y en diabetes, gastroenteritis, anorexia, gripe y resfríos. Además se utiliza externamente para el tratamiento de heridas y ulceraciones.
En relación a su composición química, se han aislado a partir de sus partes aéreas compuestos fenólicos flavonoides, lactonas diterpénicas, tricotecenos, mono y sesquiterpenos, alcoholes y acetato de carquejilla (Davies, 2004). Por otro lado, en la Tabla 1 se indican los componentes químicos más relevantes del aceite esencial de *Baccharis trimera* y las proporciones de cada uno de ellos.

Tabla 1. Componentes químicos más relevantes del aceite esencial de *Baccharis trimera* y sus proporciones.

Material vegetal	Principales compuestos (%)					
Baccharis trimera	Acetato de Carquejilla (47,8)	B-pineno (9,1)	Palustrol (7,3)	B-felandreno (6,2)	(E)-β-ocimeno (4,0)	Viridiflorol (3,9)

Fuente: Lombardo, 2015.

Con respecto a las actividades biológicas del extracto vegetal de *Baccharis trimera*, los trabajos efectuados en Brasil en el año 2000, han revelado su acción como desinfectante y antiséptico, presentando las bacterias gram-positivas (fundamentalmente *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis*) una mayor sensibilidad que las gram-negativas (Avancini y col., 2000). Por otro lado, los estudios realizados en Brasil en 2005 comprobaron que los extractos crudos de varias especies de plantas inhiben el crecimiento de las formas amastigotes y promastigotes de *Leishmania (L.) amazonensis* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi,* mostrando *Baccharis trimera* actividad moderada frente a los mismos, con una inhibición del crecimiento del 64.6, 58.3 y 65.8% respectivamente (Cortez y col., 2005). Asimismo, se ha demostrado su efecto antiparasitario frente a *Rhipicephalus microplus* y *Schistosoma mansoni* en los estudios realizados en Brasil en los años 2010 y 2012 respectivamente (Duarte y col., 2013; Garcia y col., 2014). Además, se ha evidenciado la actividad antifúngica de dicho extracto ante las levaduras *Candida albicans* y *Saccharomyces cereviceae* en ensayos realizados en Argentina (Casali y col., 2007). Sin embargo, no se han encontrado trabajos nacionales ni en otros países que evalúen la actividad antiparasitaria del aceite esencial de *Baccharis trimera* frente a NGI.

5. HIPÓTESIS

El aceite esencial de *Baccharis trimera* presenta actividad antiparasitaria frente a los estadios de vida libre de los nematodos gastrointestinales de ovinos.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro* del aceite esencial de *Baccharis trimera* sobre los estadios de vida libre de los nematodos gastrointestinales de ovinos.

6.2 Objetivos específicos

- Cuantificar el efecto de *Baccharis trimera in vitro* sobre la inhibición de la eclosión de los huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos.
- Cuantificar el efecto nematodicida de *Baccharis trimera in vitro* sobre los estadios larvarios infectantes de nematodos gastrointestinales de ovinos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material vegetal

El producto estudiado fue el aceite esencial de la planta *Baccharis trimera*, la cual pertenece a la familia Asteraceae y se conoce comúnmente como Carqueja (Figura 4). Dicho material fue aportado por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Salto Grande, grupo de la Ingeniera Agrónoma Elena Pérez; el cual consiste en un aceite esencial obtenido a partir de 150 a 180 gramos de las partes aéreas de la planta. Para esto se utilizó un equipo destilador (tipo 241, EYSSERIC, Nyons, Francia) de aceites esenciales de plantas aromáticas que procede mediante el arrastre de vapor (Lombardo, 2015).

Figura 4. *Baccharis trimera* (Carqueja).
Fuente: Davies, 2004.

7.1.1 Preparación de las diluciones del aceite esencial

La primer dilución del aceite esencial, en el caso del test de eclosión de huevos, se preparó al 25% colocando en el primer tubo eppendorf 310 µL del extracto madre y 930 µL del diluyente buffer fosfato salino (PBS) a pH=7 con dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%, lo cual se mezcló hasta quedar homogéneo. A continuación se colocaron 620 µL del diluyente en los siete tubos restantes. Para la preparación de estas diluciones se tomaron 620 µL del primer tubo para ser agregados al segundo eppendorf y, una vez homogeneizada la solución en este último se tomaron 620 µL, lo que se agregó al tercero y finalmente se mezcló. Este proceso se repitió sucesivamente hasta completar las ocho diluciones. En la Figura 5 se esquematiza el proceso de preparación de las ocho diluciones del aceite.

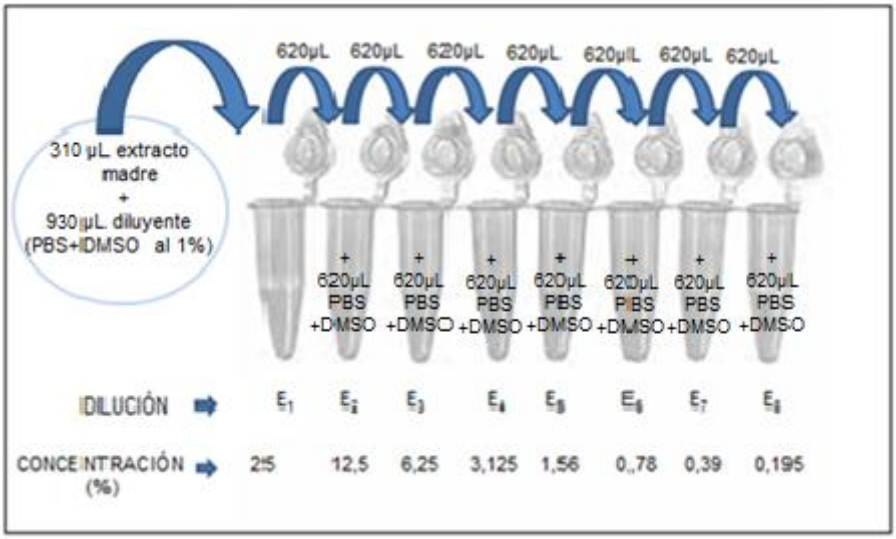

Figura 5. Esquema de las distintas diluciones efectuadas del aceite esencial de *Baccharis trimera.*

E_1 – primera dilución del aceite
E_2 – segunda dilución del aceite
E_3 – tercera dilución del aceite
E_4 – cuarta dilución del aceite
E_5 – quinta dilución del aceite
E_6 – sexta dilución del aceite
E_7 – séptima dilución del aceite
E_8 – octava dilución del aceite

En el caso del test de motilidad larvaria la primer dilución del aceite también se preparó al 25% colocando 165 µL del extracto madre y 495 µL del diluyente (PBS+DMSO al 1%). Posteriormente se colocaron 330 µL del diluyente en los cuatro tubos restantes y se efectuaron diluciones seriadas a partir de la E_1. Para esto se tomaron 330 µL del primer tubo eppendorf para ser colocados en el segundo y, una vez homogeneizada la solución se tomaron 330 µL de este último y se colocaron en el tercero y se mezcló. Este proceso se repitió sucesivamente hasta completar las cinco diluciones.

7.2 Obtención de huevos y larvas de nematodos gastrointestinales

En la evaluación de la actividad antiparasitaria del aceite se utilizaron NGI en sus estadios de vida libre, valorándose la acción sobre los huevos y las larvas infectantes. Estos estadios se obtuvieron a partir de materia fecal extraída directamente del recto de ovinos infectados naturalmente con nematodos y provenientes de predios agropecuarios particulares. Una vez colectadas las muestras, estas fueron procesadas en el Laboratorio de Parasitología, Facultad de Veterinaria, CENUR Litoral Norte Salto de la Universidad de la República.

En primer lugar se realizó la verificación de la presencia de huevos de NGI mediante la técnica de Willis (Carballo y col., 2004). Una vez confirmados se procedió a la obtención de los mismos de acuerdo a la metodología descripta por Coles y col. (1992) que consistió en mezclar parte de la materia fecal colectada con solución

sobresaturada de cloruro de sodio, se depositó en una copa de sedimentación y, tras diez minutos, se recuperó el material sobrenadante conteniendo los huevos. Posteriormente el concentrado de huevos se colocó en tubos Falcon de 50 mL, se agregó agua destilada hasta completar y se centrifugó durante cinco minutos. Una vez cumplido el tiempo, se retiraron los tubos de la centrífuga y se desechó el sobrenadante. Este proceso de lavado con agua destilada se repitió tres veces, con la finalidad de extraer la solución sobresaturada de cloruro de sodio en su totalidad y así disponer de los huevos de NGI obtenidos. Por otra parte, con el resto de la materia fecal recolectada y con la finalidad de identificar los huevos morfológicamente indiferenciables, se realizó un cultivo de larvas procediendo de acuerdo al método de Roberts y O'Sullivan y el posterior reconocimiento de los géneros involucrados (Niec, 1968). A continuación, en la Figura 6 se esquematiza el proceso de obtención de los huevos de NGI.

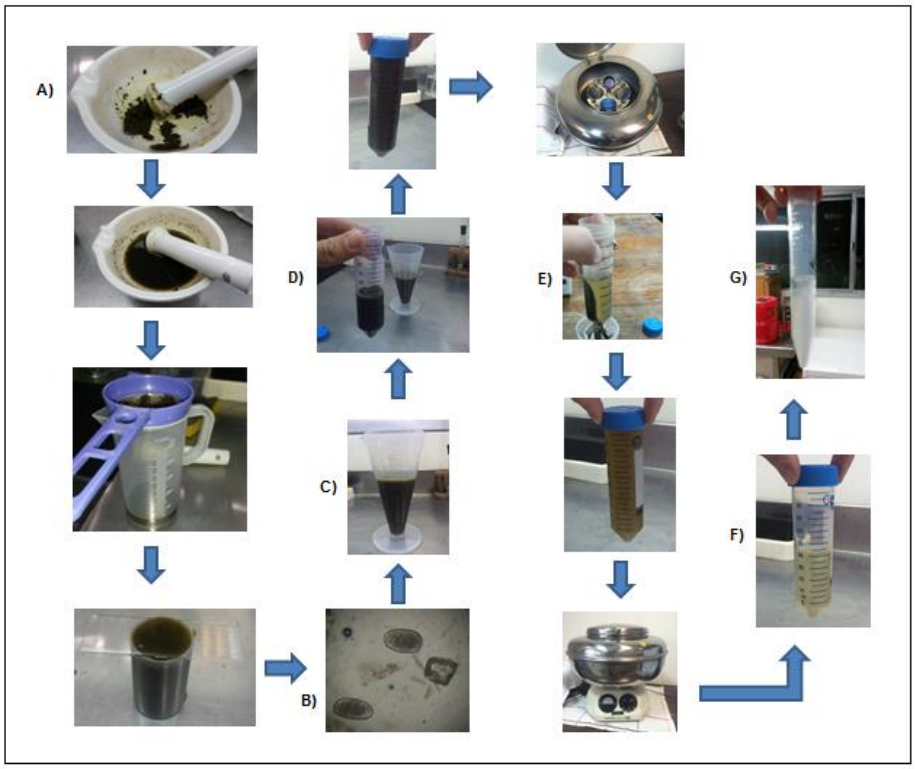

Figura 6. Esquema del proceso de obtención de huevos de nematodos gastrointestinales a partir de un pool de materia fecal de ovinos.

A) Técnica de Willis
B) Confirmación de la presencia de huevos de NGI por observación al microscopio
C) Copa de sedimentación conteniendo los huevos de NGI
D) Primer lavado con agua destilada
E) Segundo lavado con agua destilada
F) Tercer lavado con agua destilada
G) Huevos de NGI en agua destilada

En la valoración nematodicida, las larvas infestantes de NGI se obtuvieron a partir del cultivo de materia fecal de ovinos procedente de otro establecimiento agropecuario y siguiendo la metodología previamente mencionada.

7.3 Test de eclosión de huevos

La evaluación del desarrollo y eclosión de los huevos se realizó en dos placas de cultivo celular de 24 pocillos (Nunclon, Denmark), en donde se colocaron en cada uno de ellos 200 µL de agua destilada conteniendo entre 25 y 128 huevos de NGI. En 8 pocillos se adicionaron 200 µL del aceite esencial en ocho diluciones diferentes (25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,19%). En los pocillos que actuaron como control positivo se agregó 200 µL de Ricobendazol a la dosis de 12,5 mg/mL, el cual inhibe la eclosión al ser ovicida (Ferreyra y col., 2002). Por otra parte, se utilizaron dos controles negativos agregando en los pocillos correspondientes 200 µL de sustancias no ovicidas como Levamisol a la dosis de 2 mg/mL (Boggio, 2005), y en otro PBS+DMSO. Se efectuaron tres repeticiones de cada uno de los tratamientos especificados (Beleboni y col., 2013; Arece García y col., 2014). En la Figura 7 y en la 8 se esquematizan los diferentes tratamientos efectuados en las placas.

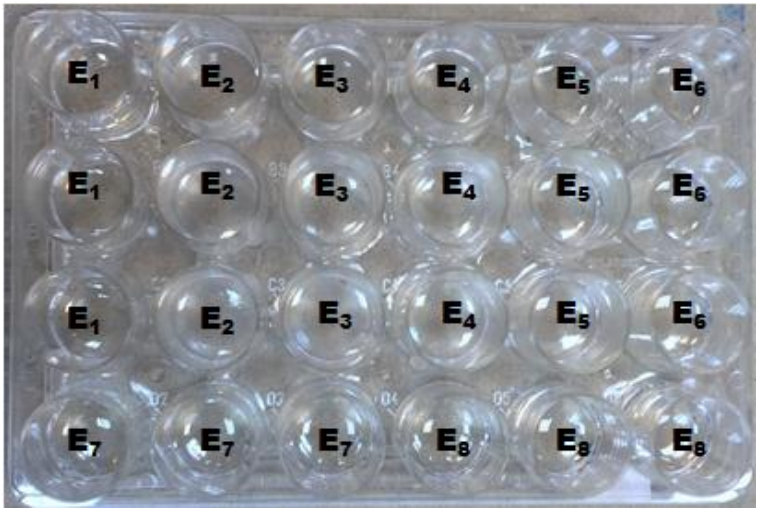

Figura 7. Test de eclosión de los huevos de nematodos gastrointestinales. Esquema de la placa de cultivo celular indicando las ocho diluciones aplicadas del aceite esencial.

E_1 – primera dilución del aceite
E_2 – segunda dilución del aceite
E_3 – tercera dilución del aceite
E_4 – cuarta dilución del aceite
E_5 – quinta dilución del aceite
E_6 – sexta dilución del aceite
E_7 – séptima dilución del aceite
E_8 – octava dilución del aceite

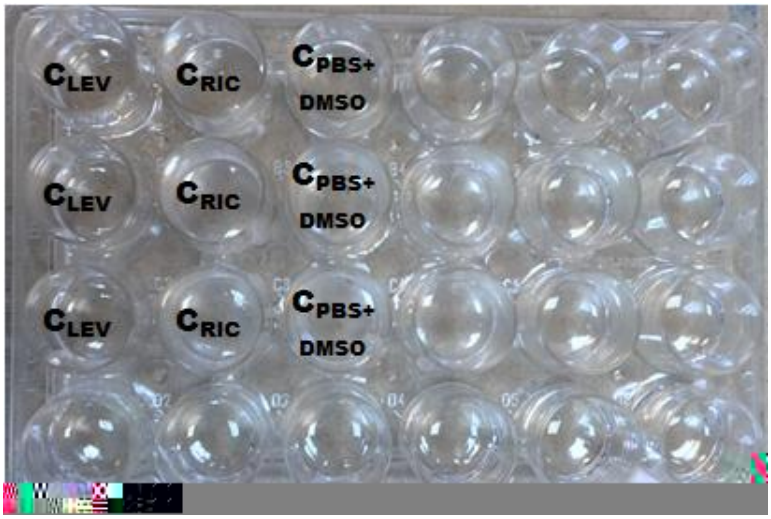

Figura 8. Test de eclosión de los huevos de nematodos gastrointestinales. Esquema de la placa de cultivo celular indicando los controles positivos y negativos aplicados.

C_{LEV} – control negativo Levamisol
C_{RIC} – control positivo Ricobendazol
$C_{PBS+DMSO}$ – control negativo PBS+DMSO

Las placas se incubaron a una temperatura de 27°C en condiciones de humedad, controlando cada 24 horas la eclosión de los huevos y, tras una semana de incubación, se cuantificaron los huevos no eclosionados y las larvas presentes en cada uno de los pocillos mediante la observación al microscopio óptico a 4x y 10x (Beleboni y col., 2013; Arece García y col., 2014).

7.4 Test de motilidad larvaria

En una placa de 24 pocillos (Nunclon, Denmark) se colocaron entre 10 y 82 larvas infestantes de NGI contenidas en 100 µL de agua destilada en cada uno de ellos. Luego se agregaron 100 µL del aceite esencial en cinco diluciones diferentes (25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%) en 5 de los pocillos. En los pocillos que actuaron como controles positivos se agregó en uno de ellos 100 µL de Ricobendazol a la dosis de 12,5 mg/mL y en el otro 100 µL de Levamisol a la dosis de 2 mg/mL al poseer los dos fármacos acción larvicida (Boggio, 2005). Por otra parte, como control negativo se utilizaron pocillos en los que se añadió 100 µL de PBS+DMSO, sustancia que no influye en la vitalidad de las larvas.
Se realizaron tres repeticiones de cada uno de los tratamientos y se incubó la placa durante 24 horas a una temperatura de 27°C y en condiciones de humedad. Una vez trascurridas las 24 horas, se adicionaron 400 µL de solución PBS en cada uno de los pocillos debido a la disminución de su volumen y se dejó la placa a temperatura ambiente. Finalmente, transcurridas otras 24 horas, se evaluó el efecto nematodicida determinando el número de larvas móviles e inmóviles mediante la observación de las mismas al microscopio óptico con el aumento 4x (Beleboni y col., 2013; Arece García y col., 2014).

8. RESULTADOS

8.1 Cuantificación del efecto de *Baccharis trimera* sobre la inhibición de la eclosión de los huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos

Los huevos de los NGI utilizados en el test de eclosión correspondieron a los géneros *Haemochus* y *Trichostrongylus*, diagnosticados a partir de la identificación de las larvas infectantes obtenidas del cultivo. En la Tabla 2 se detallan los porcentajes de cada uno de los géneros parasitarios presentes en las heces procesadas.

Tabla 2. Composición porcentual de los nematodos gastrointestinales utilizados en el test de eclosión de huevos.

Género parasitario	Porcentaje
Haemonchus spp.	92%
Trichostrongylus spp.	8%

A los efectos de evaluar la acción de *Baccharis trimera,* en primer lugar se calcularon los porcentajes promedios de inhibición de la eclosión de huevos de NGI a partir de las tres repeticiones efectuadas de cada una de las diluciones del aceite esencial y de los controles negativos (PBS+DMSO, Levamisol) y del positivo (Ricobendazol), los cuales fueron graficados con sus respectivos desvíos estándar en la Figura 9.

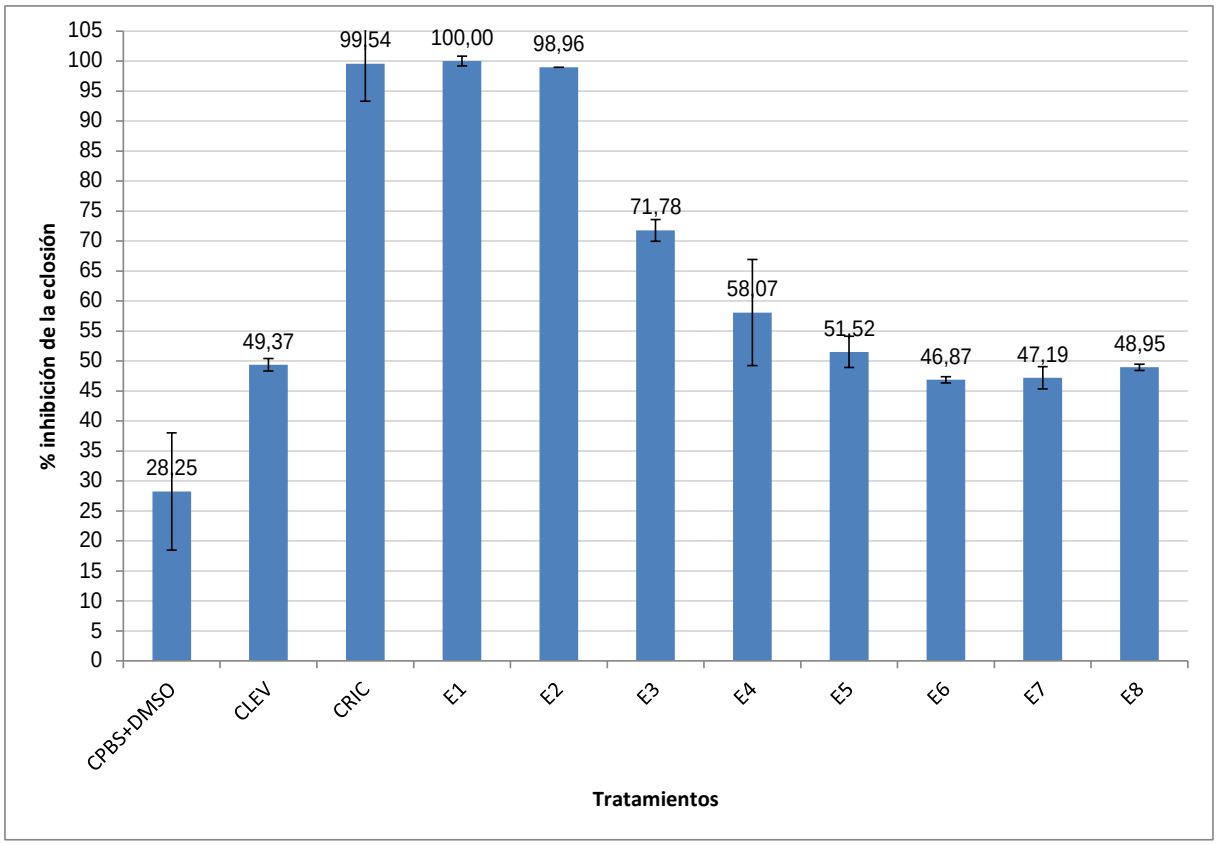

Figura 9. Porcentaje promedio de inhibición de la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos frente a distintas diluciones del aceite esencial de *Baccharis trimera*, controles negativos y positivos, incluyendo tres repeticiones de cada tratamiento.

$C_{PBS+DMSO}$ – control negativo PBS+DMSO
C_{LEV} – control negativo Levamisol
C_{RIC} – control positivo Ricobendazol
E_1 – primera dilución del aceite
E_2 – segunda dilución del aceite
E_3 – tercera dilución del aceite
E_4 – cuarta dilución del aceite
E_5 – quinta dilución del aceite
E_6 – sexta dilución del aceite
E_7 – séptima dilución del aceite
E_8 – octava dilución del aceite

Se visualizó que el aceite a las diluciones del 25 (E_1) y 12,5% (E_2) tuvo un comportamiento similar al control positivo con una tasa de inhibición de la eclosión del 100 y 98,96% respectivamente. En las siguientes diluciones hasta la E_5 se observó que a medida que disminuía la cantidad del aceite esencial fue menor el porcentaje de inhibición de la eclosión. Posteriormente y hasta el último tratamiento con el aceite esencial, la tasa de inhibición de la eclosión se mantuvo prácticamente al mismo nivel entre 46,87 y 48,95%, cercano al valor alcanzado en el control negativo Levamisol. Con respecto a los controles negativos se observó que el PBS+DMSO fue el que generó el menor porcentaje de inhibición de la eclosión.

El análisis de la inhibición de la eclosión de los huevos de NGI entre los diferentes tratamientos se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis de varianza entre los diferentes tratamientos en relación a la inhibición de la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales.

```
Source        DF        SS      MS        F      P
TRATAMIENTO   10  18977,0  1897,7  152,26  0,000
Error         22    274,2    12,5
Total         32  19251,2

S = 3,530   R-Sq = 98,58%   R-Sq(adj) = 97,93%


                            Individual 95% CIs For Mean Based on
                            Pooled StDev
Level       N    Mean  StDev   +---------+---------+---------+---------
CLEV        3   49,37   6,22           (-*)
CPBS+DMSO   3   28,25   1,06   (*-)
CRIC        3   99,54   0,80                                   (-*-)
E1          3  100,00   0,00                                   (-*-)
E2          3   98,96   1,80                                   (-*)
E3          3   71,78   8,85                        (-*)
E4          3   58,07   2,58                    (*-)
E5          3   51,52   0,51                 (-*)
E6          3   46,87   1,85               (-*)
E7          3   47,19   0,51               (-*-)
E8          3   48,95   2,10                (-*)
                            +---------+---------+---------+---------
                           25        50        75       100

Pooled StDev = 3,53
```

Se observó que las diluciones del aceite al 25 (E_1) y 12,5% (E_2) no presentaron diferencias significativas entre ellas ni frente al control positivo, pero si respecto a los dos controles negativos y a las otras diluciones. Por otro lado, desde la dilución E_5 del aceite y hasta la última (1,56, 0,78, 0,39 y 0,19%) no fueron estadísticamente diferentes entre ellas. A su vez, tampoco se obtuvieron diferencias significativas con el control negativo Levamisol, sin embargo si difirieron del control PBS+DMSO. En relación a la tercera y cuarta dilución del aceite (6,25 y 3,13%) presentaron un efecto intermedio de acción entre las dos primeras y las cuatro últimas diluciones.

Posteriormente se efectuó el cálculo de la DL_{50} y en la Figura 10 se graficaron los porcentajes promedios normalizados de inhibición de la eclosión de huevos en las distintas concentraciones del aceite a escala logarítmica.

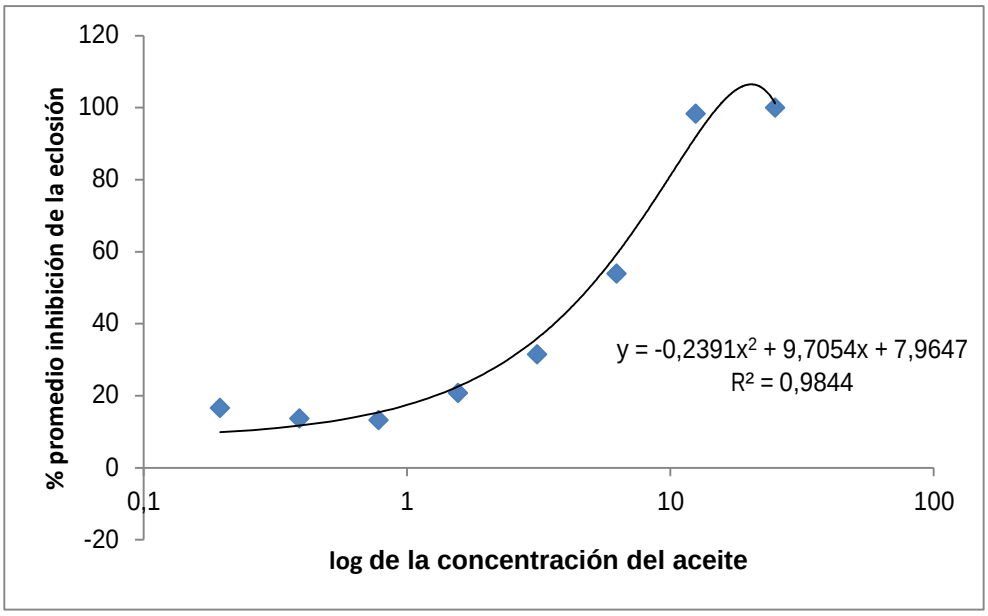

Figura 10. Efecto dosis-respuesta del aceite esencial de *Baccharis trimera* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos, partiendo del promedio de las tres repeticiones efectuadas de cada tratamiento.

Se apreció el efecto dosis-respuesta del aceite esencial, es decir que a medida que el aceite estuvo menos diluido en cada tratamiento el porcentaje promedio de inhibición de la eclosión de huevos fue mayor, con un valor de R^2 = 0,9844 (r = 0,9922) que indica que el nivel de correlación entre el porcentaje de inhibición de la eclosión y el logaritmo de la concentración es elevado, dado que cuanto más cercano a 1 sea el valor de r mayor es el grado de correlación.
A partir de la ecuación del gráfico se obtuvo que a la dilución 4,93% del aceite se inhibió la eclosión del 50% de los huevos.

8.2 Cuantificación del efecto nematodicida de *Baccharis trimera* sobre los estadios larvarios infectantes de gastrointestinales de ovinos

Las larvas infectantes de NGI utilizadas en el test de motilidad pertenecieron mayoritariamente al género *Haemonchus* y en menor medida a los géneros *Trichostrongylus*, *Oesophagostomum* y *Ostertagia*. A continuación en la Tabla 4 se detalla la proporción de cada uno de los géneros presentes en la materia fecal procesada.

Tabla 4. Composición porcentual de los nematodos gastrointestinales utilizados en el test de migración larvaria.

Género parasitario	Porcentaje
Haemonchus spp.	64%
Trichostrongylus spp.	25%
Oesophagostomum spp.	10%
Ostertagia spp.	1%

Con la finalidad de evaluar el efecto de *Baccharis trimera,* en primera instancia se calcularon los porcentajes promedios de larvas sin motilidad en cada dilución del aceite y en los controles positivos (Ricobendazol y Levamisol) y el negativo (PBS+DMSO), lo cual se graficó en la Figura 11 incluyendo los desvíos estándar en cada tratamiento.

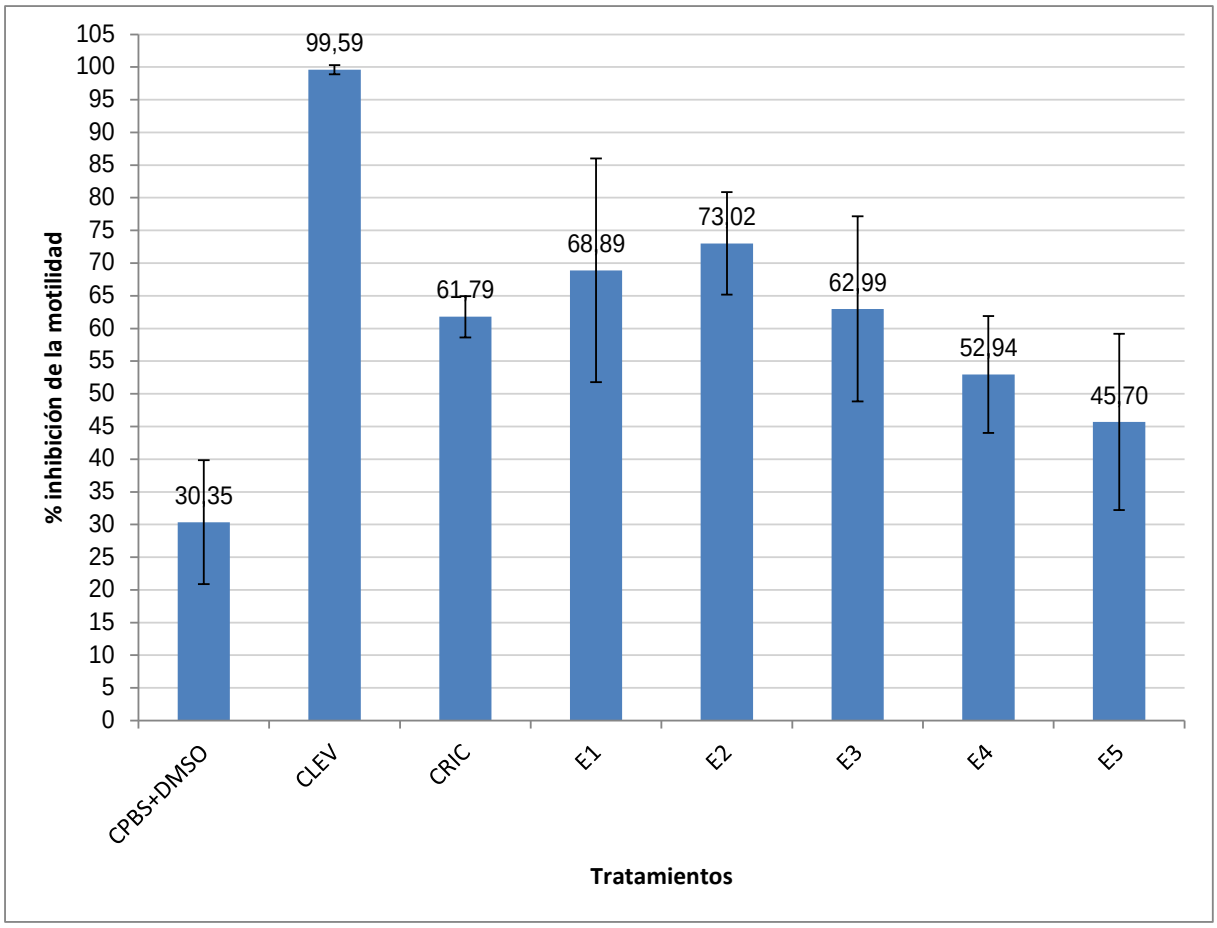

Figura 11. Porcentaje promedio de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales sin movilidad frente a diferentes diluciones del aceite esencial de *Baccharis trimera*, controles positivos y el negativo, incluyendo tres repeticiones de cada tratamiento.

$C_{PBS+DMSO}$ – control negativo PBS+DMSO
C_{LEV} – control positivo Levamisol
C_{RIC} – control positivo Ricobendazol
E_1 – primera dilución del aceite
E_2 – segunda dilución del aceite
E_3 – tercera dilución del aceite
E_4 – cuarta dilución del aceite
E_5 – quinta dilución del aceite

Se observó que el control negativo PBS+DMSO fue el que obtuvo el menor porcentaje de inhibición de la motilidad larvaria, mientras que en el control positivo Levamisol se obtuvo un porcentaje de inhibición comprendido entre el 99 y 100%. Sin embargo en el control positivo Ricobendazol se visualizó que alrededor del 40% de las larvas conservaban la motilidad. Con respecto al aceite esencial, las dos primeras diluciones (25 y 12,5%) se comportaron de manera similar alcanzando un porcentaje de inhibición de la motilidad en torno al 70%, mientras que en el resto de las diluciones (6,25, 3,13 y 1,56%) se apreció que a medida que disminuyó la cantidad del aceite disminuyó el porcentaje de larvas inmóviles.

El análisis de la inhibición de la motilidad de las larvas infectantes de NGI entre los distintos tratamientos se presenta a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de varianza entre los distintos tratamientos con respecto a la inhibición de la motilidad de las larvas infestantes de nematodos gastrointestinales.

```
Source        DF      SS     MS       F       P
TRATAMIENTO    7    8798   1257   10,96   0,000
Error         16    1835    115
Total         23   10633

S = 10,71    R-Sq = 82,74%    R-Sq(adj) = 75,19%


                              Individual 95% CIs For Mean Based on
                              Pooled StDev
Level       N    Mean   StDev  ---+---------+---------+---------+------
CLEV        3   99,59    0,70                                (----*----)
CPBS+DMSO   3   30,35    9,48  (----*----)
CRIC        3   61,79    3,17             (-----*----)
E1          3   68,89   17,11                (-----*----)
E2          3   73,02    7,86                  (----*----)
E3          3   62,99   14,17               (----*----)
E4          3   52,94    8,94          (----*----)
E5          3   45,70   13,49       (----*-----)
                              ---+---------+---------+---------+------
                                25         50        75        100

Pooled StDev = 10,71
```

Se visualizó que no hubo diferencias significativas entre las cinco diluciones efectuadas del aceite esencial y ninguna fue estadísticamente diferente al control positivo Ricobendazol. Sin embargo, todas ellas fueron significativamente diferentes al control positivo Levamisol. Por otra parte, hubo diferencias significativas al relacionar las tres primeras diluciones del aceite (25, 12,5 y 6,25%) con el control negativo PBS+DMSO, no así con las diluciones E_4 y E_5 (3,13 y 1,56%). Por otro lado, los tres controles incluidos en este ensayo fueron significativamente diferentes entre sí.

En otra etapa, se procedió a calcular la DL_{50} y en la Figura 12 se graficaron los porcentajes promedios normalizados de inhibición de la motilidad de las larvas infestantes en las distintas concentraciones del aceite a escala logarítmica.

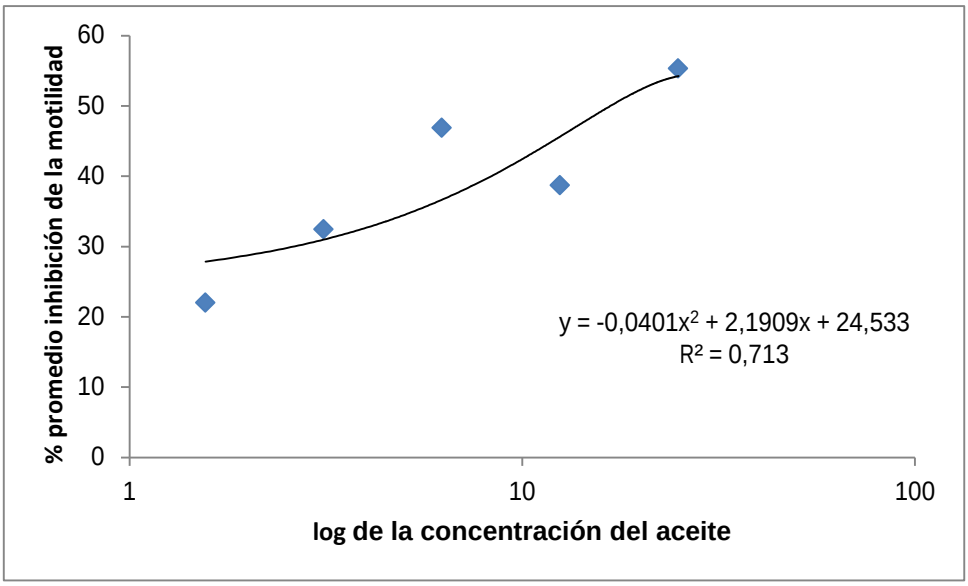

Figura 12. Efecto dosis-respuesta del aceite esencial de *Baccharis trimera* sobre la inhibición de la motilidad de larvas infestantes de nematodos gastrointestinales de ovinos, partiendo del promedio de las tres repeticiones efectuadas de cada tratamiento.

Se visualizó el efecto dosis-respuesta del aceite esencial, en donde a medida que el aceite estuvo más diluido el número de larvas móviles fue mayor, con un valor de R^2 = 0,713 (r = 0,8444) que indica que el grado de correlación entre el porcentaje de la inhibición de la motilidad y el logaritmo de la concentración fue alto.
A partir de la ecuación del gráfico se determinó a 16,77% como la dilución a la cual se inhibió la motilidad del 50% de las larvas infestantes de NGI.

9. DISCUSIÓN

La realización de ensayos *in vitro* para identificar plantas con propiedades antihelmínticas presenta como principales ventajas su bajo costo y rápida respuesta, lo que permite el estudio de una gran cantidad de plantas en un menor periodo de tiempo (Arece García y col., 2014). Además de esto, los compuestos o sustancias a evaluar son puestos en contacto directo con los estadios parasitarios, ya sean huevos, larvas o bien el parásito adulto. Sin embargo, sustancias cuya eficacia se ha demostrado *in vitro* no necesariamente tendrán el mismo efecto *in vivo*. Esta diferencia en los resultados puede deberse a distintos factores, como ser la farmacología de los compuestos en el organismo del hospedador, la biodisponibilidad, la destrucción de sustancias activas por la flora intestinal y el metabolismo del rumen (Bolio López y col., 2014).

Con la finalidad de evaluar la actividad antiparasitaria del aceite esencial de *Baccharis trimera* frente a NGI de ovinos y debido a que no se han encontrado estudios nacionales ni internacionales sobre este efecto, se realizó un estudio *in vitro* como primera etapa en el proceso de investigación.

9.1 Cuantificación del efecto de *Baccharis trimera* sobre la inhibición de la eclosión de los huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos

En el test de eclosión, el 92% de los huevos pertenecían al género *Haemonchus* y un 8% al género *Trichostrongylus*. Esta composición parasitaria no resultó la más representativa para la estación del año en que se realizó la colecta de materia fecal con la finalidad de obtener dichos huevos. Las muestras fueron recolectadas a fines del mes de Junio, momento en el cual suele disminuir la población de *Haemonchus* y comienza a incrementarse la de *Trichostrongylus.* Sin embargo, la ocurrencia de un veranillo en el invierno pudo modificar la dinámica de las poblaciones parasitarias con un incremento de *Haemonchus* (Castells, 2004a). En consecuencia, los resultados descriptos anteriormente para el test de eclosión de huevos se aplican básicamente al género *Haemonchus*, pudiendo variar la actividad antiparasitaria del aceite esencial ante otra población con distintos géneros o proporciones de los mismos.

A los efectos de disminuir el margen de error de los resultados, se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento. Por otro lado, al inicio del ensayo y de acuerdo a la técnica descripta por Beleboni y col. (2013), el objetivo fue colocar 100 huevos de NGI en cada pocillo de las placas utilizadas, pero una vez efectuado el conteo final el número de huevos varió entre 25 y 128, como se puede ver en el Anexo 12.1. Por tal motivo, el análisis de los datos en vez de realizarlo en base al número de elementos parasitarios presentes, se utilizó el porcentaje promedio de las tres repeticiones de cada tratamiento.

En las primeras cinco diluciones del aceite se observó un efecto dosis respuesta, es decir que a medida que disminuyó la cantidad del mismo la inhibición de la eclosión fue menor. En cambio, en las últimas tres diluciones la inhibición de la eclosión se mantuvo en un nivel de aproximadamente 47%. Este comportamiento del efecto del aceite esencial se podría explicar porque las sucesivas diluciones fueron realizadas a la mitad de la anterior y por ende, las diferencias en la cantidad del producto en las últimas diluciones fue menor y por lo tanto el porcentaje de inhibición de la eclosión fue similar.

Powers y col. (1982) han planteado pautas para la evaluación de la eficacia antihelmíntica *in vitro* de las drogas, las que fueron adoptadas por World Associations of the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.). De acuerdo con estos autores los agentes antihelmínticos altamente eficaces son aquellos que inhiben más del 90% de la eclosión de los huevos y de la motilidad larvaria, en tanto aquellos químicos que inhiben el 80 a 90% deben ser considerados moderadamente eficaces. En este sentido, los resultados obtenidos con el aceite esencial de *Baccharis trimera* frente a huevos de NGI de ovinos, particularmente la dilución E_1 (25%) y la E_2 (12,5%) con el 100 y 98,96% de inhibición de la eclosión, similar al control positivo, permite la clasificación del aceite esencial como altamente efectivo.

Con respecto al tratamiento que actuó como control positivo Ricobendazol, obtuvo una de las más altas tasas de inhibición de la eclosión, lo cual ratificó la actividad como ovicida de este fármaco (Ferreyra y col., 2002). Por su parte, en el control negativo PBS+DMSO se alcanzó la tasa más baja de inhibición de la eclosión, lo que demostró la inocuidad del buffer y del disolvente (Arece García y col., 2014). En cambio en el control Levamisol, no se corroboró completamente la acción del químico como no ovicida (Boggio, 2005) ya que el mismo inhibió el 49,37% de la eclosión de los huevos. Sin embargo, ha de considerarse que en torno al 30% de los huevos utilizados eran no viables, lo que se desprende del resultado del control negativo PBS+DMSO en donde no fueron capaces de eclosionar. En el caso de los cestodos, existen estudios que comprueban que los huevos eliminados pueden encontrarse en distintos estados de madurez, como ser huevos maduros, inmaduros, en estado semisenescente o bien senescente. Solamente aquellos huevos en estado maduro pueden continuar evolucionando, mientras que en los otros casos son rechazados por el hospedador o se produce la muerte del embrión antes o después de su enquistamiento (Cabrera, 1994). Por lo que el porcentaje de huevos que no eclosionaron en el control negativo podría deberse a que correspondieron a huevos que no alcanzaron el estado de madurez o eran inviables.

Al comparar con la eficacia del extracto acuoso de las hojas de *Annona muricata*, el aceite esencial de las partes aéreas de *Baccharis trimera* fue más efectivo en la prueba de eclosión de huevos. Esto se debe a que en el ensayo con *Annona muricata*, en las diluciones al 25, 12,5 y 6,25% la inhibición de la eclosión fue del

79.12%, 66.97% y 47.42% respectivamente, siendo estos valores menores a los obtenidos en el trabajo con el aceite esencial de *Baccharis trimera* para las mismas diluciones. Si bien el extracto de *Annona muricata* se enfrentó a huevos de *H. contortus* únicamente (Beleboni y col., 2013), en el test efectuado con *Baccharis trimera* el 92% de los huevos utilizados pertenecían a dicho género.

Otros estudios han demostrado que los extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* y el extracto metanólico de esta última fueron capaces de inhibir la eclosión de huevos de NGI en ovinos, evidenciándose al igual que en el ensayo con *Baccharis trimera*, un efecto dosis respuesta. Sin embargo, no se han podido comparar sus efectos dado que las concentraciones de los productos fueron expresadas en distintas unidades (Arece García y col., 2014; Bolio López, 2014).

9.2 Cuantificación del efecto nematodicida de *Baccharis trimera* sobre los estadios larvarios infectantes de gastrointestinales de ovinos

En el test de motilidad larvaria el 64% de las larvas utilizadas pertenecían al género *Haemonchus*, lo cual se atribuye a la época en que se colectó la materia fecal a partir de la cual se obtuvieron las larvas infectantes. Las muestras fueron recolectadas en el mes de Mayo y precisamente en el otoño se suelen presentar condiciones climáticas favorables fundamentalmente para dicho género. Asimismo, en esta estación comienzan a producirse incrementos en la población de *Trichostrongylus,* lo que explicó su aparición en un 25%. Por otra parte, *Oesophagostomum* se cuantificó en un 10% dado que es un género que puede presentarse en todas las épocas del año, mientras que *Ostertagia* al aumentar en épocas de frío, esencialmente en el invierno, se registró en tan solo el 1% (Castells, 2004a).

En este ensayo al predominar *Haemonchus*, aunque en menor medida que en el test de eclosión de huevos, los resultados obtenidos sobre motilidad larvaria tienen una fuerte participación de dicho género, los cuales podrían variar si se modifica la composición de la población parasitaria.

Al igual que en el test de eclosión, se efectuaron tres repeticiones de cada tratamiento con la finalidad de reducir el margen de error en los resultados. Al comienzo del estudio el objetivo fue colocar 50 larvas de NGI en cada pocillo de la placa utilizada, pero una vez efectuado el conteo final el número de larvas varió entre 10 y 82, como se puede ver en el Anexo 12.2. Es por esto que el análisis de los datos en vez de realizarlo en base al número de elementos parasitarios presentes, se usó el porcentaje promedio de las tres repeticiones de cada tratamiento.

En cuanto a las distintas diluciones efectuadas del aceite esencial, se observó un efecto dosis respuesta en donde a medida que la cantidad del aceite fue menor la

inhibición de la motilidad de las larvas también fue menor. En este caso y a diferencia del test de eclosión de huevos, no hubo diferencias estadísticas entre las diluciones.

De acuerdo a las pautas descriptas por Powers y col. (1982) y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las diluciones más concentradas del aceite esencial de *Baccharis trimera*, este ha de ser considerado de baja efectividad dado que la inhibición de la motilidad larvaria se ubicó entre el 60 y 80%. Sin embargo, el comportamiento podría ser diferente frente a diluciones del aceite más concentradas, teniendo en cuenta que al 25% fue la máxima dilución utilizada.

En el tratamiento que actuó como control positivo Levamisol se observó la mayor tasa de inhibición de la motilidad larvaria. Esto comprobó la actividad como larvicida del fármaco, el cual produce una parálisis espástica al actuar como antagonista selectivo en los receptores nicotínicos y acetilcolínicos de las células musculares de los parásitos (Boggio, 2005). En cambio, en el caso del control positivo Ricobendazol no se verificó completamente su efecto larvicida ya que no interfirió en la movilidad del 40% de las larvas. Este bajo porcentaje de inhibición de la motilidad podría ser consecuencia de la RA por parte de las larvas de NGI utilizadas frente al producto, dado que estudios efectuados en Uruguay revelaron la existencia de RA a los Benzimidazoles en el 80% de los establecimientos evaluados (Banchero y Mederos, 2013). Por otra parte, el control negativo PBS+DMSO generó la más baja tasa de inhibición de la motilidad larvaria al no interferir en su vitalidad y motilidad (Arece García y col., 2014).

Al comparar los resultados obtenidos con el aceite esencial de *Baccharis* trimera con el estudio que probó el extracto de *Annona muricata,* este último fue más eficaz en la inhibición de la motilidad larvaria, sobre todo en las diluciones al 25 y 12,5% que alcanzaron una inhibición de la motilidad del 89.08 y 74.62% respectivamente, siendo estos valores mayores a los obtenidos con el aceite de *Baccharis trimera*. Sin embargo ha te tenerse en cuenta que el extracto de *Annona muricata* se enfrentó solamente a larvas de *H. contortus*, mientras que en el ensayo con *Baccharis trimera* un 64% de las larvas pertenecían a dicho género y el resto a otros géneros de NGI de ovinos.

Con respecto a los componentes químicos más relevantes del aceite esencial utilizado en este ensayo y descriptos por Lombardo (2015), no se han encontrado trabajos que identifiquen si alguno de estos principios activos presenta propiedades antihelmínticas. Otros estudios han descripto a los fenoles como los principales metabolitos secundarios presentes en la carqueja, dentro de los cuales se encuentran los taninos condensados (Silva, 2005). A estos últimos junto a las saponinas, también presentes en *Baccharis trimera* (Borella y col., 2006), se les podría atribuir el efecto antihelmíntico. En el caso de las saponinas, estas reducen la tensión superficial de los huevos y por ende inhiben la eclosión, mientras que las

plantas que contienen taninos han exhibido actividad antihelmíntica *in vitro* e *in vivo* frente a NGI en ovinos en diversos ensayos, lo cual ha sugerido que fueron los responsables de este efecto (Bolio López y col., 2014). Sin embargo, si bien los taninos condensados y las saponinas están presentes en la planta, no necesariamente se van a encontrar en su aceite esencial.

Aunque no se han encontrado trabajos que evalúen el efecto del aceite esencial de *Baccharis trimera* frente a NGI de ovinos, existen estudios realizados a nivel internacional que han encontrado que el extracto acuoso y el de diclorometano de *Baccharis trimera* presentaron actividad antiparasitaria frente a *Rhipicephalus microplus* y *Schistosoma mansoni* (Duarte y col., 2013; Garcia y col., 2014). También se han documentado trabajos que evaluaron el efecto inhibitorio del extracto de *Baccharis trimera* frente a las formas amastigotes y promastigotes de *Leishmania (L.) amazonensis* y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Cortez y col., 2005). Si bien estos productos no se tratan de aceites esenciales, estos podrían presentar componentes químicos compartidos y responsables de la actividad antihelmíntica. Por otro lado, no se han podido comparar sus efectos antiparasitarios debido a que las concentraciones de los extractos y el aceite fueron expresadas en diferentes unidades.

A partir de los test efectuados se demostró que el aceite esencial de *Baccharis trimera* fue más efectivo en su actividad como ovicida que larvicida, dado que la dilución a la cual se inhibió el 50% de la eclosión de los huevos fue menor que la dilución en la que el 50% de las larvas de NGI dejaron de ser móviles.
A pesar de que se obtuvieron resultados favorables en ambos casos, esto no implica que el aceite tenga un efecto similar frente a los parásitos adultos de NGI.
Por otro lado, estos efectos han sido verificados *in vitro* por lo que se podría confirmar el efecto ATH solamente después de un ensayo *in vivo.*
Sin embargo, si la acción ATH demostrada *in vitro* puede aplicarse *in vivo*, la administración del aceite esencial a los ovinos infectados con NGI podría disminuir el conteo de huevos en las heces y por ende reducir la contaminación de las pasturas.

10. CONCLUSIONES

- Los géneros parasitarios involucrados en el test de eclosión de huevos fueron *Haemonchus* y *Trichostrongylus*, mientras que en el test de motilidad larvaria, además de dichos géneros, se diagnosticó *Oesophagostomum* y *Ostertagia,* pero siempre predominando *Haemonchus.*
- En el test de eclosión de huevos, las diluciones del aceite esencial de *Baccharis trimera* al 25 y 12,5% tuvieron un comportamiento similar al control positivo Ricobendazol con una tasa de inhibición de la eclosión del 100 y 98,96% respectivamente y difirieron significativamente de los controles negativos.
- La DL_{50} del aceite fue al 4,93% en la inhibición de la eclosión de los huevos.
- En el test de motilidad larvaria, las diluciones del aceite esencial al 25 y 12,5% tuvieron un comportamiento similar con una tasa de inhibición de la motilidad en torno al 70%. Sin embargo, no alcanzaron el nivel de inhibición del control positivo Levamisol, pero mostraron diferencias significativas con el control negativo.
- La DL_{50} del aceite fue al 16,77% en la inhibición de la motilidad de las larvas.
- El aceite esencial de *Baccharis trimera* fue más efectivo como ovicida que larvicida, dado que la DL_{50} fue menor en el test de eclosión de huevos que en el test de motilidad larvaria.
- De mantenerse la actividad de *Baccharis trimera* sobre los huevos de NGI en estudios *in vivo*, contribuiría a reducir la contaminación de las pasturas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acevedo, P.; Figueroa, J. (2011). Epidemiología y control de nematodos gastrointestinales en ovinos en clima templado. En: Quiroz, H.; Figueroa J.A.; Ibarra, F.; López, M. A. Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. México, Ed. LIMUSA, p 327-344.

2. Arce González, M.; Avello Oliver, E.; Camacho Escandón, M.; Peña Rodríguez, F.; Silveira Prado, E. (2006). Actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos de *Azadirachta indica* A Juss*, Momordica charantia* L. y *Chenopodium* (*Teloxys*) *ambrosioides* L. Weber. REDVET 7 (11). Disponible en: http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106/110601.pdf. Fecha de consulta: 27 de octubre de 2016.

3. 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 estrongilídos gastrointestinales de ovinos. Rev Salud Anim 36 (1): 28-34.

4. Arece García, J.; Barrabí Puerta, M. (2013). Actividad antihelmíntica *in vitro* de exctracto 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.

5. Armour, J.; Duncan, J.; Dunn, A.; Jennings, F.; Urquhart, G. (2001). Parasitología Veterinaria. Zaragoza. Ed. Acribia, 355 p.

6. Avancini, C.; Mundstock, E.*;* Wiest, J. (2000). Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. Arq Bras Med Vet Zootec 52 (3): 230-234.

7. Banchero, G.; Mederos, A. (2013). Parasitosis gastrointestinales de ovinos y bovinos: situación actual y avances de la investigación. Rev INIA. 34: 10-15.

8. Beleboni, R.; Castro, P.; Chagas, A.; Ferreira, L.; Franca, S. (2013). *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceace) against *Haemochus contortus* from sheep. Exp Parasitol 134 (3): 327-332.

9. Berretta, E.; González, H.; Levratto, J.; Mederos, A.; Salles, J.; Zamit, W. (1998). Utilización de pasturas "seguras" como método de control de las parasitosis gastrointestinales en corderos de destete. Jornadas Técnicas 6 de mayo de 2002, Durazno, Uruguay. p 29-33.

10. Boggio, J.C. (2005). Fármacos que actúan contra nematodes. En: Boggio, J.C.; Rubio, M.R. Farmacología Veterinaria. Córdoba, EDUCC. p 529-551.

11. Bolio López, G.; De la Cruz, P.; Hernández, G.; Hernández, M.; Pérez, C. (2014). Efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto metalónico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gastrointestinales de ovinos. Rev Trop subtrop Agroecosyst. 17 (1): 105-111.

12. Bonino, J. (2002). Resistencia antihelmíntica de parásitos gastrointestinales en ovinos. Parasitosis gastrointestinales de los ovinos: situación actual y avances de la investigación. Jornadas Técnicas 31 de octubre de 2002, Durazno, Uruguay. p 8-12.

13. Borella, J.C.; Duarte, D.P.; Novaretti, A.; Menezes, J.; França, C.; Rufato, C.; Santos, P.; Veneziani, R.; Lopes, N. (2006). Variabilidade sazonal do teor de saponinas de Baccharis trimera (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. Rev Bras Farmacog. 16 (4): 557-561.

14. Cabrera, P. (1994). Cestodosis. En: Nari, A.; Fiel, C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Montevideo, Ed Hemisferio Sur. 519 p.

15. Carballo, M.; Fernández Barrios, S.; Rista, A. (2004). Examen microscópico por enriquecimiento – Flotación cualitativa. En: Carballo, M.; Fernández Barrios, S.; Rista, A. Manual de trabajos prácticos de parasitología. Montevideo, bolsa del libro, p 34-35.

16. Cardozo, H.; Nari, A. (1987). Enfermedades causadas por parásitos internos. En: Bonino, J.; Durán del Campo, A.; Mari, J.J. Enfermedades de los lanares. Montevideo, Ed Hemisferio Sur, p 1-51.

17. Casali, Y.; Correa, S.; Davicino, R.; Mattar, M.; Micalizzi, B.; Pettenati, E. (2007). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Rev Peru Biol. 14 (2): 247-251.

18. Castells, D. (2004a). Epidemiología y control de nematodos gastrointestinales de ovinos en el Uruguay. Nematodos gastrointestinales de los ovinos y Saguaypé en ovinos y bovinos. Jornadas Técnicas 6 de mayo de 2004, Durazno, Uruguay. p 3-11.

19. Castells, D. (2004b). Métodos integrados de control de parásitos gastrointestinales: manejo del pastoreo. Seminario de actualización: parasitosis gastrointestinales en ovinos y bovinos. Jornadas Técnicas 19 de Agosto de 2004, Tacuarembó, Uruguay. p 2-5.

20. Castro, B.; García, C.; Martínez, A.; Ortega, J. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Química Viva. 9 (2): 86-96.

21. Coles, G.C.; Bauer, C.; Borgsteede, F.H.; Geerts, S.; Klei, T.R.; Taylor, M.A.; Waller, P.J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet Parasitol. 44 (1-2): 35-44.

22. Corchero, E.; Fruto, J.M.; Habela, M.; Peña, J.; Sevilla, R.G. (2002). Nematodosis Gastrointestinales en ovinos. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_ovinos/87-nematodosis_gastrointestinales.pdf. Fecha de consulta: 29 Junio de 2016.

23. Cortez, D.; Dias, F.; Luize, P.; Maza, P.; Mello, J.; Morello, L.; Nakamura, C.; Tiuman, T.; Ueda-Nakamura, T. (2005). Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi.* São Paulo, Brasil. Rev Bras Cienc Farm. 41 (1): 85-94.

24. Cuadro, R.; De Barbieri, I.; Mederos, A.; Montossi, F. (2004). Efecto de la utilización de leguminosas con taninos condensados en el manejo integrado de los parásitos gastrointestinales en ovinos: resultados preliminares. Seminario de actualización: parasitosis gastrointestinales en ovinos y bovinos. Jornadas Técnicas 19 de Agosto de 2004, Tacuarembó, Uruguay. p 11-19.

25. Cuéllar Ordaz, J. A. (2009a). La nematodiasis gastrointestinal ovina, una enfermedad que causa retraso en el crecimiento y mortandad. Tecnologías para Ovinocultores. Serie: Sanidad. 245-249. Disponible en: http://www.uno.org.mx/sistema/pdf/sanidad/lanematodiasisgastrointestinal.pdf. Fecha de consulta: 31 agosto de 2016.

26. Cuéllar Ordaz, J.A. (2009b). Nuevas opciones para el control de nematodos gastroentéricos en ovinos. Disponible en: http://iberovinos.com/iberovinos/images/stories/cyted/Archivos-Sanidad/Control-antiparasitario/Nuevas-opciones-de-control-antiparasitario-Cuellar.pdf. Fecha de consulta: 31 de agosto de 2016.

27. Davies, P. (2004). Fichas técnicas de cultivo. Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Serie FPTA, N° 11. 261 p

28. Duarte, L.; Faria, N.; Fernandes, 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.

29. 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, Ed. Hemisferio Sur, p 3-27.

30. Ferreyra, D.A.; Fiel, C.; Monfrinotti, A.; Steffan, P (2002). Eficacia del ricobendazole-via subcutanéa- contra los nematodes gastrointestinales del bovino. Rev Invest Agrop INTA. 31 (3): 89-101.

31. Fiel, C. (2013). Parasitosis gastrointestinal de los bovinos: epidemiología, control y resistencia a antihelmínticos. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/53-Parasitosis_gastrointestinal.pdf. Fecha de consulta: 31 de agosto de 2016.

32. Fthenakis, G.; Gallidis, E.; Papadopoulos, E.; Ptochos, S. (2013). Evaluation of the FAMACHA© system for the targeted selective anthelmintic treatments for potential use in small ruminants in Greece. Small Rum Res. 110: 124-127.

33. 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.

34. Hernández, Z.; Fernández, D.; Kemayd, J.; Soares de Lima, A.; Urrutia, J.; Villegas, N.-, Bentancur, O.; Rodríguez, R.; Saldanhas, S.; Surraco, L. (1999). Efecto de los nematodos gastrointestinales sobre la productividad de ovejas Corriedale y Merino. Peso vivo y crecimiento de lana. Prod Ovina. 12: 51-62.

35. Hernández, Z.; Fernández, D. (2012). Effect of gastrointestinal nematodes on ovulation rate of Merino ewes in Uuruguay. Rev Port Buiatría, p 58.

36. Lapage, G. (1976). Phylum Nemathelminthes. En: Parasitología Veterinaria. México, Continental. 49-57.

37. Lombardo, P. (2015). Caracterización química y bioactividad de aceites esenciales contra patógenos de los cítricos. Tesis Facultad de Agronomía, UDELAR, Montevideo. 129 p.

38. López, O.; González, R.; Osorio, M.; Aranda, E.; Díaz, P. (2013). Cargas y especies prevalentes de nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo destinados al abasto. Rev Mexicana Cien Pec, México. 4 (2): 223-234.

39. Mederos, A. (2002). Epidemiología de los nematodos gastrointestinales de los ovinos en Uruguay. Parasitosis gastrointestinales de los ovinos: situación actual y avances de la investigación. Jornadas Técnicas 31 de octubre de 2002, Durazno, Uruguay. p 4-8.

40. Nari, A. (2001). Diagnóstico y control de resistencia antihelmíntica en pequeños rumiantes. II congreso latinoamericano de especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos. XI Congreso Nacional de Producción Ovina. Mérida, Yucatán, México. p 39-48.

41. Niec, R. (1968). Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastroentéricos de los bovinos y ovinos. Buenos Aires, Argentina, INTA. Manual Teórico n° 3. p 5-13.

42. Powers, K.G.; Wood, I.B.; Eckert, J.; Gibson, T.; Smith, H.J. (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.

43. Salles, J. (2002). Métodos de control integrado de las parasitosis gastrointestinales. Manejo del pastoreo con criterio parasitario. Parasitosis gastrointestinales de los ovinos: situación actual y avances de la investigación. Jornadas Técnicas 31 de octubre de 2002, Durazno, Uruguay. p 25-28.

44. Silva, F. (2005). Teor de fenóis, flavonóides e óleos essenciais em calos, plântulas e plantas em caqueja [Baccharis trimera (Less) D.C. ASTERACEAE]. Tesis de Doctorado en Agronomía, Universidad Federal de Lavras, Lavras. 133 p.

45. Soulsby, E. (1987). Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México, Ed. Interamericana, p. 136-140.

46. Suárez, V. H. (2007). Nematodes. Sistemática y bionomía de los principales nematodos de los lanares. En: Suárez, V.H.; Olaechea, F.V.; Rossanigo, C.E.; Romero, J.R. Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América. INTA. Disponible en: http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-publi70_-_ver_editores_y_autores_colaboradores.pdf. Fecha de consulta: 15 Julio.

12. ANEXOS

12.1 Resultados de las repeticiones de cada tratamiento del test de eclosión de huevos

TRATAMIENTO	UBICACIÓN	HUEVOS	LARVAS	TOTAL
$C_{PBS+DMSO}$	A_2	7	18	25
$C_{PBS+DMSO}$	B_2	15	36	51
$C_{PBS+DMSO}$	C_2	35	93	128
C_{LEV}	D_1	28	31	59
C_{LEV}	D_2	43	54	97
C_{LEV}	D_3	49	38	87
C_{RIC}	A_3	71	1	72
C_{RIC}	B_3	86	0	86
C_{RIC}	C_3	102	0	102
E_1	A_4	68	0	68
E_1	B_4	62	0	62
E_1	C_4	67	0	67
E_2	A_5	54	0	54
E_2	B_5	62	2	64
E_2	C_5	77	0	77
E_3	A_6	38	19	57
E_3	B_6	46	23	69
E_3	C_6	41	9	50
E_4	D_4	39	29	68
E_4	D_5	33	26	59
E_4	D_6	39	25	64
E_5	A_1	52	50	102
E_5	B_1	39	36	75
E_5	C_1	49	46	95
E_6	A_2	36	39	75
E_6	B_2	45	49	94
E_6	C_2	34	42	76
E_7	A_3	38	43	81
E_7	B_3	43	47	90
E_7	C_3	45	51	96
E_8	A_4	42	47	89
E_8	B_4	45	48	93
E_8	C_4	40	38	78

12.2 Resultados de las repeticiones de cada tratamiento del test de motilidad larvaria

TRATAMIENTO	UBICACIÓN	LARVAS MÓVILES	LARVAS NO MÓVILES	TOTAL
$C_{PBS+DMSO}$	A_1	7	3	10
$C_{PBS+DMSO}$	B_1	15	4	19
$C_{PBS+DMSO}$	C_1	15	10	25
C_{LEV}	D_4	1	81	82
C_{LEV}	D_5	0	42	42
C_{LEV}	D_6	0	40	40
C_{RIC}	D_1	15	26	41
C_{RIC}	D_2	18	25	43
C_{RIC}	D_3	17	30	47
E_1	A_2	2	10	12
E_1	B_2	7	7	14
E_1	C_2	8	22	30
E_2	A_3	2	9	11
E_2	B_3	5	12	17
E_2	C_3	10	20	30
E_3	A_4	6	22	28
E_3	B_4	17	25	42
E_3	C_4	28	29	57
E_4	A_5	7	12	19
E_4	B_5	31	27	58
E_4	C_5	29	28	57
E_5	A_6	25	16	41
E_5	B_6	24	14	38
E_5	C_6	19	30	49