



TÍTULO DE PATENTE No. 392508

Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

Domicilio: Av. Normalistas 800, Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO

Denominación: COMPOSICIONES QUÍMICAS PARA EL CONTROL DE ECTOPARÁSITOS.

Clasificación: **CIP:** A61K36/54; A01N65/24; A61K36/23; A61K36/67
CPC: A61K36/54; A01N65/24; A61K36/23; A61K36/67

Inventor(es): MOISÉS MARTÍNEZ VELÁZQUEZ; EDUARDO PADILLA CAMBEROS; GUSTAVO ADOLFO CASTILLO HERRERA; MIRNA ESTARRÓN ESPINOSA; ESTEFANIA LAZCANO DÍAZ

SOLICITUD

Número:

MX/a/2017/015394

Fecha de Presentación:

29 de Noviembre de 2017

Hora:

15:23

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 29 de noviembre de 2037

Fecha de Expedición: 23 de mayo de 2022

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I y antepenúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:

EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION
TRIBUTARIA|56|MX/2022/47570|MX/a/2017/015394|Título de patente normal|1220|RRGO|Pág(s)
1|DOEI2q7fIxoHqaEdDQGw2hkB/oA=

Sello Digital:

moi8g8I9Yg+Ta7tqbCDuhTVykUdfdS/rvogFstBNerGhY7lbyJBlhM4gFhWAYJTm8+Cmhj68K8XBmQlbUHpZv7r/zg
kkhhLS2Q9Ca1dHb2phEE25kFdQCjZDXiu2ZqGTRP+NILPGHJb2uTUSra6vLU5DxSyyIxVM0vLZOlkwi93/dvuXVRH
y1YDb6ULVXdo1vNjpsVU/poRTytvEU1cbFchz11FRtPHdoky2iYxeNg55oQ3pSWonGdKMpJKRhici+zuk/QD2oIm8M
0AC3WRPxmCV4ZgMD2Wj0Yfsn1NVlXlrBq/2ZCs3U3j5u1p079qOPqji99ka+foTkrhFXXg==



MX/2022/47570

COMPOSICIONES QUÍMICAS PARA EL CONTROL DE ECTOPARÁSITOS

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones químicas preparadas a partir de materia de origen vegetal, particularmente, la invención concierne a composiciones químicas basadas en mezclas de aceites esenciales de canela, comino y pimienta, que tienen potente actividad acaricida, particularmente contra las garrapatas que afectan al ganado bovino.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es uno de los ectoparásitos de mayor importancia en la industria ganadera debido al impacto económico negativo a los diferentes países ubicados en zonas templadas, subtropicales y tropicales, en donde dichas condiciones ambientales favorecen el desarrollo de las garrapatas, que de manera directa o indirecta limitan la producción ganadera generando pérdidas de más de 7 mil millones de dólares anualmente (*In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization, 2009).

Entre los daños que las garrapatas provocan de manera directa en el ganado se pueden considerar los efectos negativos sobre la ganancia de peso, la producción de leche, el daño en las pieles por efecto de picaduras, pérdida de sangre, y bajas en la fertilidad del ganado. Por otra parte, las garrapatas dificultan la movilización nacional de cabezas de ganado, la exportación de ganado en pie hacia los Estados Unidos y otros países, y también la introducción de razas en zonas de control con fines de mejoramiento de resistencia en el ganado a estos parásitos. Los daños que de manera indirecta provocan las garrapatas son derivados de que al actuar como vectores de una gama de agentes patógenos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* transmiten al ganado bovino enfermedades como la piroplasmosis o babesiosis bovina, afectando considerablemente la producción

ganadera.

De acuerdo con reportes de SENASICA (2016), el 30.60 % del territorio nacional está libre de garrapatas, mientras que en una superficie del 3.44 % del territorio nacional se ha logrado la erradicación de este ectoparásito; no obstante, el 65.96 % del territorio nacional se considera en la actualidad como superficie en control, en donde, con el propósito de reducir las poblaciones de garrapatas se han implementado una serie de acciones que permitan liberar a la industria ganadera del problema que constantemente representan las garrapatas. Tal es el caso de la Campaña Nacional para el control de la garrapata, en la cual se contempla el control químico mediante el uso de productos como los organofosforados, piretroides, amidinas y lactonas macrocíclicas; sin embargo, este método de control es costoso ya que se estima que anualmente en México se invierten aproximadamente \$942.23 millones de dólares, además de la contaminación al ambiente y de alimentos de consumo humano. Actualmente, para que este método funcione, se realizan en promedio 14 aplicaciones por año (Economical Assessment of *Rhipicephalus microplus* Tick Control in Mexico, 2016).

Además, el uso continuo de productos químicos ha favorecido el desarrollo de resistencia en las garrapatas, ocasionando que este tipo de control se vuelva cada vez más costoso y limitado, en relación a los sitios de acción para los nuevos productos, sin considerar el tiempo que se lleva el desarrollo y la limitada vida útil del mismo. De hecho, se ha reportado resistencia en las garrapatas a casi todos los grupos químicos que se emplean para su control, limitando los sitios de acción para nuevos productos, debido a lo cual se han implementado búsquedas de nuevas alternativas de control (Tick prevention at a crossroad: New and renewed solutions, 2012).

Existen también varios métodos no químicos, que se han empleado para el control de garrapatas, por ejemplo el uso de razas bovinas resistentes a garrapatas, ya sea por selección de animales naturalmente resistentes o por la introducción de sangre de otras razas de mayor resistencia en un hato; la rotación y descanso de praderas;

el control biológico mediante el empleo de hongos entomopatógenos, bacterias, nematodos entomopatógenos y algunas especies de hormigas, y vacunas basadas por ejemplo en el antígeno Bm86 (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). Sin embargo, ninguno de estos métodos ha logrado ser totalmente eficaz; de hecho, cuando se toma la opción del control no químico lo más recomendable es aplicar de manera sistemática la combinación de dos o más de estos métodos no químicos. Por esta causa el uso de productos químicos continúa siendo la opción más efectiva para el control y prevención de las garrapatas.

Una alternativa más, es utilizar sustancias químicas naturales producidas por las plantas, que en la forma de extractos proporcionan una serie de metabolitos secundarios que exhiben, entre otras funciones, actividad de defensa contra microorganismos e insectos. Así, pueden obtenerse los extractos naturales de plantas, o aceites vegetales, por medios químicos como el prensado de semillas y frutos oleaginosos, y un posterior proceso de refinamiento, o por medios químicos mediante la incorporación de los tejidos de la planta, (flores, hojas, tallos, raíces) en donde se encuentran los metabolitos con actividad acaricida en un solvente orgánico como el alcohol o más comúnmente en hexano, que es posteriormente removido por medio de algún procedimiento físico. Por otra parte, se pueden obtener además los aceites esenciales, que son formas altamente concentradas de la parte de la planta de la cual se extraen, por medio de técnicas de destilación con arrastre de vapor de agua o por expresión.

En el documento WO2013/050967, se describen composiciones que contienen extractos naturales con actividad pesticida, incluyendo aceite de neem, clavo, menta, canela, tomillo, orégano, ajo y/o mezclas de los mismos en combinación con un solvente polar para la prevención y control de infestaciones de artrópodos incluyendo chinches, garrapatas, ácaros, hormigas, piojos y cucarachas. Sin embargo, a lo largo del documento no se demuestra que de manera particular sea una medida altamente efectiva, particularmente para la prevención y control de las garrapatas que afectan a los bovinos, a saber la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Otros

ejemplos se muestran en los documentos de patente de la India 2452/DEL/2010 y 2196/DEL/2011, en donde describen respectivamente la obtención de extractos y fracciones de *Annona scumosa* y *Ageratum conyzoides*, así como su actividad acaricida contra *B. microplus*, provocando mortalidades de entre 50 y 100%. Un caso más es el documento de patente MX339702B, en donde se describe el proceso de obtención de un extracto metanólico, etanólico y hexánico de *Lonchocarpus punctatus*, la potente actividad larvicida (100%) y de inhibición de la eclosión de las larvas (90.4%) de los extractos obtenidos de las flores de la planta. No obstante, en todos los casos antes descritos, los extractos naturales de las diferentes plantas se obtienen mediante el uso de solventes como metanol, etanol, hexanol, cloroformo y n-butanol, que pueden, por una parte aumentar los costos del proceso de obtención de los extractos, y por otra parte representan un riesgo para la salud.

Otras alternativas más, se tienen de reportes en donde se proporciona evidencia de la actividad acaricida de los aceites esenciales.

Se ha probado la capacidad acaricida del aceite esencial de comino contra las larvas de garrapata (Martínez-Velázquez *et al.*, 2011b); y se ha reportado asimismo que al utilizarse en concentraciones del 5 % produce un efecto de inhibición de la oviposición de las garrapatas adultas de 63.4 %; provoca la disminución en el porcentaje de eclosión (14 %), y demuestra una capacidad de control de las garrapatas adultas del 95.5 % (Lazcano-Díaz E. *et al.*, 2016).

Y, en un reporte de Álvarez *et al.*, 2006, se refiere la comparación, evaluada *in vitro*, del efecto acaricida de varios extractos vegetales incluyendo pimienta negra, clavo de olor, ajo, chile picante, entre otros, respecto a la acción acaricida de un producto comercial basado en aceite esencial de canela. Mencionan que con el producto comercial de canela lograron producir un efecto del 100 % de mortalidad de las garrapatas, cuando utilizaron dicho producto en su máxima concentración; sin embargo, al diluirlo en una proporción 1:1 en agua, observaron que su actividad acaricida disminuyó casi totalmente. De acuerdo con los autores, la disminución de

la actividad puede ser causada por efecto de la dilución sobre uno o más metabolitos responsables en principio de la actividad acaricida del aceite de canela.

En estudios recientes se ha sugerido que los responsables de la actividad acaricida de los aceites esenciales son los componentes mayoritarios, que están presentes en la mezcla compleja de sustancias volátiles que los componen (Shivanandappa & Rajashekar, 2014; López & Villalobos, 2010; Price & Berry, 2006; Enan, 2001)

Por ejemplo, el aceite esencial de orégano ha demostrado tener actividad antibacterial, antioxidante, antifúngica e insecticida, y estas propiedades se atribuyen a sus componentes mayoritarios (Sánchez, *et al.*, 2010; Salgueiro, *et al.*, 2003; Hernández, *et al.*, 2009). Y, existen otros reportes en los que se ha probado que el aceite esencial de orégano provoca en larvas una mortalidad del 100 %, en concentraciones superiores al 1.25 % (Martínez-Velázquez *et al.*, 2011a), mientras que en garrapatas adultas se obtuvo una mortalidad < 8% (Flores *et al.*, 2016), donde se sugiere que la actividad se debe a tymol y carvacrol como componentes mayoritarios. Algunos reportes sugieren que a pesar de que se trate del mismo aceite esencial, su composición puede variar debido a las condiciones geográficas en que se desarrolló la planta de la cual se obtiene el aceite; tal es el caso del aceite de orégano obtenido en El Salvador, en donde sus componentes mayoritarios son β -caryophyllene y α -humulene, mientras que tymol y carvacrol fueron los compuestos mayoritarios en el aceite obtenido en Guatemala (Vernin, *et al.*, 2001; Salgueiro, *et al.*, 2003).

Se ha demostrado también que los compuestos individuales α -terpineol, eugenol y cinnamic alcohol tienen actividad insecticida contra las cucarachas americanas (*Periplaneta americana*), las cucarachas alemanas (*Blatella germanica*) y las hormigas carpinteras (*Camponotus pennsylvanicus* De Gee), pero la mezcla de los tres compuestos en proporción 1:1:1 fue mucho más tóxica para los mismos insectos (Enan, 2001); existen además reportes de que los componentes de menor importancia también pueden influir en la actividad biológica, por ejemplo lo reportado por Jian *et al.*, 2009, sobre la evaluación de compuestos supuestamente activos e

inactivos, de manera individual y en mezclas, del aceite esencial de *Litsea pungens* Hemsl y *L. cubeba* contra larvas de *Trichoplusia*, de donde se demuestra que es necesaria la presencia de todos los compuestos para la plena toxicidad de los aceites esenciales.

- 5 Así, dentro de los factores que deben ser valorados para utilizar los aceites esenciales como base de composiciones acaricidas, sobresalen aquellos que puedan causar un efecto de variación en las concentraciones de los diversos compuestos presentes en un determinado aceite esencial; factores que se relacionan a la forma de obtención de los aceites, o bien aquellos factores relacionados con las
- 10 plantas a partir de las cuales se obtienen los aceites. Un ejemplo de lo anterior se tiene en el caso del aceite de canela, el cual puede ser obtenido a partir de la corteza, de las hojas e incluso de las raíces de los árboles de canela, y se ha demostrado que la composición química del aceite de canela difiere de manera importante dependiendo de la parte de la planta de la cual se obtuvo, particularmente en relación
- 15 con algunos de los componentes mayoritarios como el cinnamaldehído, el eugenol y el alcanfor. Más aún, existen diferentes tipos de plantas pertenecientes al género *Cinnamomum*, y algunas especies de este género son utilizadas de manera intercambiable por las industrias alimenticia y farmacéutica; no obstante se ha comprobado también que los aceites obtenidos de dichas diferentes especies y
- 20 variedades de plantas no tienen los mismos componentes, o bien puede haber coincidencia de componentes, pero presentes en distintas proporciones (Barceloux DG. 2009).

Aunque hay todavía mucho por esclarecer respecto a los mecanismos mediante los cuales los aceites esenciales llevan a cabo su acción insecticida/acaricida, es de

25 resaltar que su uso, al igual que otros productos derivados de plantas como los extractos vegetales, tiene un gran potencial como insecticidas/acaricidas, con importantes ventajas respecto al uso de las sustancias químicas sintéticas específicas utilizadas hasta ahora como insecticidas/acaricidas, ya que al tratarse de mezclas complejas de compuestos volátiles, frenan el desarrollo de resistencia.

Prueba de ello se observó al tratar a 42 generaciones seguidas de *Plutella xylostella* con un extracto de semilla de almendra de neem, sin que se desarrollara resistencia (Rattan, 2010).

Se ha propuesto que es posible retrasar el desarrollo de resistencia, ya que los compuestos presentes en los aceites esenciales tienen diferentes mecanismos de acción, en diferentes sitios blanco, en comparación con los productos químicos, los cuales normalmente solo tienen un sitio blanco (de la Fuente, *et al.*, 2007). Los compuestos que normalmente se consideran de menor importancia, al estar en menor proporción pueden actuar como sinergistas, al aumentar la actividad de los principales compuestos a través de una amplia variedad de mecanismos, sin embargo, estos mecanismos aún no han sido ampliamente estudiados.

De manera habitual se acepta que en un fenómeno de sinergia es de esperarse que el efecto deseado causado por una mezcla o composición sea significativamente mayor al efecto logrado por la suma de las partes que la conforman; no obstante esto es solamente una acepción parcial de los aspectos que abarca el concepto de sinergia, en donde se involucra la completa integración de las partes para dar lugar a algo nuevo, con características y atributos distintos a las que por sí solas tenían las partes que lo originaron. En el caso de los aceites esenciales, su actividad repelente o acaricida puede verse afectada por su volatilidad y composición, existiendo una serie de factores que influirán en los mismos, por ejemplo el método de obtención o las condiciones climáticas y de componentes nutricionales del suelo en donde se cultivaron las plantas a partir de las cuales se realizó la obtención de los aceites. Una alternativa sugerida en el estado de la técnica es el uso de concentraciones más elevadas para asegurar su efectividad, pero esto implicaría un aumento de costos de los productos basados en aceites esenciales. Otra opción posible, es la búsqueda de asociaciones de aceites esenciales, de las cuales se esperaría que la combinación de la totalidad de compuestos presentes en cada uno de los aceites esenciales lograra potencializar el efecto de los compuestos activos en cada caso, es decir dar lugar a un efecto sinérgico; y al mismo tiempo sería deseable que en dicha asociación

de aceites esenciales se evitara sumar compuestos potencialmente tóxicos para el hospedero, que pudieran estar presentes en cada uno de los aceites seleccionados. Aunque en el estado de la técnica se ha reportado la interacción entre compuestos puros presentes en los aceites esenciales, como una alternativa de control de ácaros como las garrapatas, no hay a la fecha reportes sobre mezclas con base en combinaciones de aceites esenciales para el control de la garrapata. De manera que, se vislumbra la pertinencia de la utilización de composiciones de diferentes aceites esenciales, como base para la elaboración de formulaciones de alta efectividad acaricida contra la garrapata *B. microplus*, como alternativa para su control, y que permitirá retardar el desarrollo de resistencia, sin provocar daños al ambiente. Al formular un acaricida con base en diferentes aceites esenciales, se tiene la posibilidad de obtener un efecto sinérgico contra la garrapata del ganado bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 corresponde a un gráfico en el que se muestran los componentes principales del aceite esencial de comino (*Cuminum cyminum*).

La figura 2 corresponde a un gráfico en el que se muestran los componentes principales del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*).

La figura 3 corresponde a un gráfico en el que se muestran los componentes principales del aceite esencial de pimienta (*Pimenta dioica*).

La figura 4 ilustra gráficamente el efecto de inhibición de la oviposición de las garrapatas adultas tratadas con las composiciones basadas en mezclas de aceites esenciales de comino, pimienta y canela. Las composiciones se utilizaron al 10 % y en el gráfico se muestran composiciones comprendiendo comino:pimienta:canela en 4 proporciones distintas como sigue: 7) 0.33:0.33:0.33; 8) 0.166:0.166:0.666; 9) 0.666:0.166:0.166; y 10) 0.166:0.666:0.166.

La figura 5 ilustra gráficamente el efecto de disminución en el porcentaje de eclosión de las larvas de garrapata por el tratamiento con las composiciones basadas en mezclas de aceites esenciales de comino, pimienta y canela. Las composiciones se utilizaron al 10 % y en el gráfico se muestran composiciones comprendiendo comino:pimienta:canela en 4 proporciones distintas como sigue: 7) 0.33:0.33:0.33; 8) 0.166:0.166:0.666; 9) 0.666:0.166:0.166; y 10) 0.166:0.666:0.166.

La figura 6 muestra un gráfico en el que se refleja el porcentaje de mortalidad (porcentaje de control) de las garrapatas por efecto del tratamiento con las composiciones basadas en mezclas de aceites esenciales de comino, pimienta y canela. Las composiciones se utilizaron al 10 % y en el gráfico se muestran composiciones comprendiendo comino:pimienta:canela en 4 proporciones distintas como sigue: 7) 0.33:0.33:0.33; 8) 0.166:0.166:0.666; 9) 0.666:0.166:0.166; y 10) 0.166:0.666:0.166.

La figura 7 muestra imágenes correspondientes a los efectos producidos en las garrapatas adultas y en las larvas de garrapata, por los tratamientos con las composiciones basadas en mezclas de aceites esenciales de comino, pimienta y canela. A) Garrapatas adultas en oviposición tratadas con las composiciones de la invención. B) Garrapatas adultas en oviposición sin tratar. C) Cascarones y huevos de garrapatas sin eclosionar tratados con las composiciones de la invención. D) Larvas de garrapata sin tratar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Desde varios años atrás se ha considerado a los aceites esenciales una opción sumamente promisoría como potenciales acaricidas, insecticidas y repelentes; sin embargo, no se ha logrado hasta ahora reemplazar con su uso a los productos químicos sintéticos. Aún con ello, la opción de los aceites esenciales como medida de control de las garrapatas de bovinos para incluirse en el manejo integrado de plagas, continúa siendo tema de gran interés para diversos sectores de la investigación y la industria pecuaria.

Una de las cuestiones relacionadas al uso de aceites esenciales como insecticidas/acaricidas, se relaciona a la variación en los resultados que a la fecha se han obtenido. Variaciones que tienen que ver con las complejas composiciones químicas de los aceites esenciales; que además en un mismo tipo de aceite esencial pueden existir diferencias no solo en la cantidad de los compuestos químicos que lo conforman, sino también en la calidad de los mismos, así como en el tipo de estereoquímica de las moléculas presentes. Se ha visto que las diferencias pueden ocurrir por efecto de factores relacionados al cultivo de la planta de donde se obtiene el aceite esencial, por ejemplo las condiciones climáticas o la composición de la tierra; o bien por factores relacionados directamente a la fase de obtención del aceite esencial, considerando desde el órgano de la planta utilizado para la obtención del aceite, la edad de la planta, o bien el procedimiento de extracción que se emplea para recuperar el aceite, por ejemplo extracción con disolventes, extracción por fluidos supercríticos, expresión, o extracción por arrastre de vapor, entre otros.

Por lo que la inventiva propuesta planteada con la presente invención, es la provisión de composiciones químicas basadas en mezclas de aceites esenciales, que permitan tener composiciones más complejas, que tengan en los organismos objetivo diferentes sitios blanco y por lo tanto actividad incrementada, sin necesidad de utilizar altas concentraciones de los aceites esenciales individuales; otro efecto benéfico adicional que se proporciona mediante la invención es la posibilidad de retardar el desarrollo de resistencia en los organismos objetivo, cuyo control se busca. Otro efecto benéfico que se consigue mediante la presente invención, es que las composiciones comprendidas en la invención permiten una flexibilidad en las proporciones de los aceites esenciales; la posibilidad de variación en las proporciones empleadas en las mezclas de los aceites esenciales, de conformidad con la invención, permiten compensar variaciones posibles en los componentes individuales de la composición química final, asegurando su efectividad, sin implicar costos adicionales y sin que se afecte negativamente su efectividad.

Así pues, un objetivo primordial de la invención es proporcionar una composición en la que se combinan los aceites esenciales de comino (*Cuminum cyminum*), pimienta (*Pimenta dioica*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*), con actividad acaricida contra la garrapata *B. microplus*, que afecte su ciclo de reproducción en diferentes etapas de su ciclo biológico, como una alternativa de control de las garrapatas, permitiendo retardar el desarrollo de resistencia, y sin provocar daños en el ambiente.

Por consiguiente, una modalidad de la invención concierne a una composición de aceites esenciales, que se proporciona en diluciones al 5 y 10 %; en las cuales los aceites de comino, pimienta y canela pueden estar presentes en la composición en proporciones, respectivamente de 0.01- 36 %; 22-99.98 %; y 0.01-78 %; en un aspecto preferido de la invención, la composición de aceites esenciales se proporciona en una dilución al 10 %, en la cual los aceites de comino, pimienta y canela están presentes en proporciones, respectivamente de 10-30 %; 10-75 %; y 10-75 %.

Un aspecto de la invención se refiere a que los aceites esenciales de comino, pimienta y canela comprendidos en las composiciones químicas de la invención son obtenidos por arrastre de vapor, y son caracterizados para determinar su perfil de componentes mayoritarios.

En otra modalidad de la invención, las composiciones de la invención, a base de mezclas de comino, pimienta y canela, pueden ser utilizadas como ingrediente activo base de formulaciones para su aplicación en el ganado bovino para prevención, control y/o eliminación de las garrapatas del género *B. microplus*.

Con la intención de establecer con mayor claridad y precisión algunos de los aspectos y detalles característicos de la invención, se proporciona a continuación la pormenorización de una particular realización de la invención, así como algunos de los ejemplos de aplicación de la misma. Cabe señalar, no obstante, que dicha particular realización de la invención y dichos ejemplos de aplicación de la invención

serán proporcionados a continuación, meramente con fines ilustrativos más no limitativos del alcance de la materia objeto de la presente solicitud.

Método preferido de realización de la invención

Proceso de obtención de los aceites esenciales para las formulaciones.

5 De conformidad con la invención, los aceites de comino y pimienta se obtuvieron por métodos de destilación por arrastre de vapor, a nivel piloto con un extractor [diseño del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ)] donde se colocaron 5 kg de materia prima en un alambique cerrado herméticamente; a éste se le adaptó un tubo en forma de cuello de ganso, que sirvió
10 para dirigir los vapores al condensador, al cual en su salida se le colocó un vaso florentino, donde el aceite esencial se separó del agua por diferencia de densidad. El proceso duró 8 horas para comino y 12 horas para pimienta gorda, suministrando vapor a una presión de 0.5 Kg/m². Una vez obtenido el aceite esencial, la humedad residual se retiró con sulfato de sodio anhidro y el aceite se almacenó en frascos
15 ámbar. El aceite esencial de canela fue proporcionado por una casa comercial de manufactura y distribución.

Caracterización química de los aceites y composiciones basadas en las mezclas de aceites esenciales.

Se llevó a cabo la determinación de la composición química de los aceites, utilizando
20 un cromatógrafo de gases Agilent Technologies® modelo 7890B acoplado a un detector selectivo de masas modelo 5977A. La separación se llevó a cabo en una columna capilar de polietilenglicol HP-INNOWAX de 60 m x 0.25 mm de diámetro x 0.25 µm de espesor de película. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura del inyector 220°C; temperatura del detector 260°C; la temperatura
25 inicial del horno fue de 60°C durante 5 minutos, se aumentó a 250°C a una velocidad de 3°C/minuto durante 15 minutos; el volumen de inyección fue de 1µL, con una proporción de 1:160; el gas acarreador fue helio con un flujo de 0.8 mL/min. Los compuestos volátiles fueron identificados con los siguientes criterios: comparación

de los espectros de masas de cada uno de los componentes, con apoyo de la biblioteca Wiley 275.L y NIST, con la comparación del tiempo de retención con algunos compuestos puros y con la comparación de los índices de retención en fases similares a los reportados en la literatura. El porcentaje de cada componente fue calculado por la integración automática del área (unidades de área) de cada pico del cromatograma con ayuda del software ChemStation.

En el aceite esencial de *Cuminum cyminum* se identificaron 40 compuestos que representan el 96.44% de la composición total del aceite, en donde cuminaldehide, con el 28.08 % es el compuesto mayoritario, seguido de 2-careen-10-al, carvone y limonene con el 17.53%, 16.57% y 7.49%, respectivamente (Figura 1).

En el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* se identificaron 20 compuestos que representan el 98.08% de su composición total, con el 55.10% de cinnamaldehyde como componente mayoritario, seguido de β -caryophyllene con el 26.82%, α - humulene con el 4.61% y eugenol con el 3.45% (Figura 2).

En el aceite esencial de *Pimenta dioica* se identificaron 44 compuestos que representan el 95.92% de la composición total del aceite; entre los componentes mayoritarios se encuentran methyl eugenol con el 40.09%, eugenol con el 15.39%, myrcene con el 9.06% y β -caryophyllene con el 7.85% (Figura 3).

Se prepararon combinaciones de los aceites de comino, pimienta y canela en concentraciones al 5 y al 10%, en proporciones, respectivamente en los rangos de 10-30%; 10-75 %; y 10-75%.

Ejemplos de aplicación de la invención

Pruebas biológicas de las composiciones

Para la evaluación de las composiciones basadas en las mezclas de aceites esenciales, se recolectaron garrapatas adultas en los Estados de Guerrero, Jalisco, y en la zona Sur del Estado de México. Se trasladaron al laboratorio de la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica del CIATEJ, en donde una parte se mantuvo

en incubación para la obtención de larvas, mientras que el resto se sometió a bioensayos inmediatamente.

Las condiciones de incubación de las garrapatas para la obtención de huevos consistieron en temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ con 80% de humedad relativa (HR); después de un período de 14 días se colectaron los huevos, se colocaron en viales de vidrio con un tapón de algodón, y se sometieron a las mismas condiciones de temperatura y humedad mencionadas anteriormente para su eclosión, para la obtención de larvas de 7 días de eclosionadas (Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), 2011a).

Prueba de inmersión de adultas (AIT)

La prueba de inmersión de adultas se realizó de acuerdo a la NOM-ZOO-06-1993, 1994; las garrapatas adultas se sumergieron durante un minuto en las composiciones basadas en las mezclas de aceites esenciales; se retiró el exceso de humedad con papel y se incubaron a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ con 80% de HR. Catorce días después del tratamiento se procedió a retirar los huevos ovipositados, los cuales se pesaron y se colocaron en viales de vidrio, que se taparon con un tapón de algodón. Los huevos se incubaron, bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad antes descritas. Los pesos de los huevos se registraron en formas específicas (fecha, tratamiento y peso), posteriormente estos datos se utilizaron para calcular la capacidad de las formulaciones de inhibir la oviposición en las garrapatas tratadas, utilizando la siguiente fórmula:

$$\%I.O = \left(\left[\frac{PLt}{PLT} \right] - \left[\frac{PHLt}{PHLT} \right] \right) * 100$$

Donde:

PLt = Peso de hembras del lote tratado, PLT = peso de hembras del lote testigo, PHLt = Peso de huevos del lote tratado, PHLT = Peso de huevos del lote testigo.

Para determinar el efecto sobre la eclosión de los huevos, éstos se mantuvieron incubados durante 25 días; transcurrido ese tiempo se procedió a sacrificar por congelación, el contenido se homogenizó perfectamente y se tomó una alícuota para realizar el conteo de los cascarones y huevos en cada uno de ellos; de esta manera se calculó el porcentaje de eclosión alcanzado en cada grupo, la reproducción estimada y el porcentaje de control. La prueba se realizó por duplicado. El lote testigo no contenía combinaciones de los aceites esenciales.

$$R.E = \left(\frac{\text{Peso de huevos}}{\text{Peso de hembras adultas}} \right) (20,000 *) (\% \text{ eclosión})$$

10 Donde:

R. E= Reproducción estimada, *Constante que indica el número de huevos presentes en 1g.

$$\%C = \left(\frac{RET - REt}{RET} \right) * 100$$

Donde:

15 RET= Reproducción estimada en el lote testigo, REt = Reproducción estimada en el lote tratado.

En las pruebas AIT se evaluaron 10 composiciones comprendiendo diferentes combinaciones de los aceites de comino, pimienta y canela en concentraciones al 10 y 5%, estando presentes los aceites de comino, pimienta y canela en proporciones comprendidas en los rangos de, respectivamente 0 a 36 %; 0 a 99.98 % y 0 a 78 %.

Prueba de paquete de larvas (LPT)

Se realizó de acuerdo a la FAO (1971); se evaluaron 10 composiciones comprendiendo diferentes combinaciones de los aceites de comino, pimienta y canela en concentraciones al 10 y 5%, estando presentes los aceites de comino,

pimienta y canela en proporciones comprendidas en los rangos de, respectivamente 0 a 36 %; 0 a 99.98 % y 0 a 78 %. Las combinaciones de los aceites esenciales se diluyeron en una mezcla 2:1 de tricloroetileno y aceite de oliva. Se humedecieron papeles filtro (Whatman No. 1) de 7.5 x 8.5 cm con 900 μ L de cada muestra y se dejaron en campana de extracción durante 2 horas; se doblaron en forma de sobre utilizando sujeta papeles, se colocaron en promedio 100 larvas de 7 días de eclosionadas y se incubaron 24 horas a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ a 80% de HR. Los sobres fueron abiertos e inspeccionados, utilizando un microscopio estereoscópico, para registrar el número de larvas vivas y muertas. La prueba se realizó por duplicado.

10 Ejemplos de los resultados obtenidos se muestran en las figuras 4 a 7.

En las figuras 4, 5 y 6 se ilustra gráficamente el desempeño observado de 4 ejemplos de las composiciones de la invención, preparadas respectivamente como sigue: composición 7 (comino 0.33, pimienta 0.33 y canela 0.33); composición 8 (comino 0.166, pimienta 0.166 y canela 0.666); composición 9 (comino 0.666, pimienta 0.166 y canela 0.166); y composición 10 (comino 0.166, pimienta 0.666 y canela 0.166). Se evaluó el efecto sobre la inhibición de la oviposición (Figura 4); efecto en la inhibición del porcentaje de eclosión (Figura 5); y en el porcentaje total de control de las garrapatas (Figura 6).

En la Figura 7 se observan los efectos provocados por las composiciones basadas en la mezcla de aceites esenciales de comino, pimienta y canela, en garrapatas adultas en oviposición, así como en las larvas de las garrapatas. En el panel A se observa un efecto significativo de inhibición de la oviposición en las garrapatas adultas debido al tratamiento con las composiciones de la invención; en el panel B se observa la profusa oviposición de las garrapatas sin tratamiento. En el panel C se observan cascarones de las larvas que eclosionaron y se observan también huevos sin desarrollar, de coloración café; demostrando la capacidad de las composiciones de la invención, de disminuir el porcentaje de eclosión. En el panel D se observan larvas de garrapata que eclosionaron de los huevecillos no tratados con las composiciones de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Composición con actividad acaricida para la prevención y el control de infestaciones de garrapatas en cualquiera de sus cuatro fases de desarrollo, caracterizada porque comprende una mezcla de aceites esenciales de comino, pimienta y canela en una dilución de 10 % v/v respecto a la composición, y porque en la mezcla el aceite esencial de comino está presente en una proporción de 0.01 a 36 %; el aceite esencial de pimienta está presente en una proporción de 22 a 99.98 %; y el aceite esencial de canela está presente en una proporción de 0.01-78 % de la mezcla de aceites esenciales.
2. Composición de conformidad con u la reivindicación 1, caracterizada porque preferiblemente el aceite esencial de comino está presente en una proporción de entre 10 y 30 %; el aceite esencial de pimienta está presente en una proporción de entre 22 y 75 %; y el aceite esencial de canela está presente en una proporción de entre 10 y 75 % de la mezcla de aceites esenciales.
3. Composición de conformidad con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque incluye además un emulsificante adecuado para uso veterinario.
4. Composición de conformidad con una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada porque los aceites esenciales de comino, pimienta y canela son obtenidos por arrastre de vapor.
5. Uso de una composición como la que se describe en las reivindicaciones 1 a 4, para la elaboración de una formulación acaricida para la prevención y el control de infestaciones de garrapatas con efecto en cualquiera de sus cuatro fases de desarrollo.
6. Uso de conformidad con la reivindicación 5, en donde las cuatro fases de desarrollo de la garrapata incluyen: huevo, larva, ninfa, y adulta.

7. Uso de conformidad con la reivindicación 6, en donde las garrapatas son del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
8. Uso de conformidad con una de las reivindicaciones 5 – 7, en donde la formulación acaricida se encuentra en una presentación seleccionada de:
5 emulsión, cera, polvo, suspensión acuosa, dispersión aceitosa, pasta, concentrado emulsificante, o aerosol.

10

15

20

RESUMEN

Se describe la obtención y uso de composiciones químicas basadas en mezclas de aceites esenciales, que tienen actividad larvicida, que inhiben la oviposición de garrapatas adultas, y disminuyen significativamente el porcentaje de eclosión de larvas de garrapatas, con lo que se logra un alto grado de control de la garrapata *B. microplus*.

1/4

Figura 1

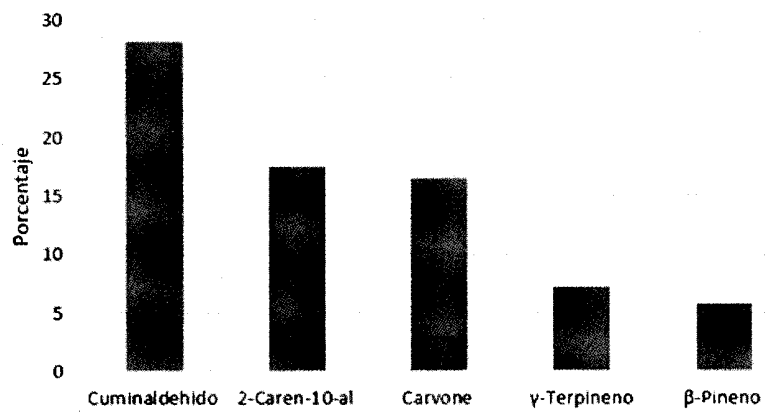
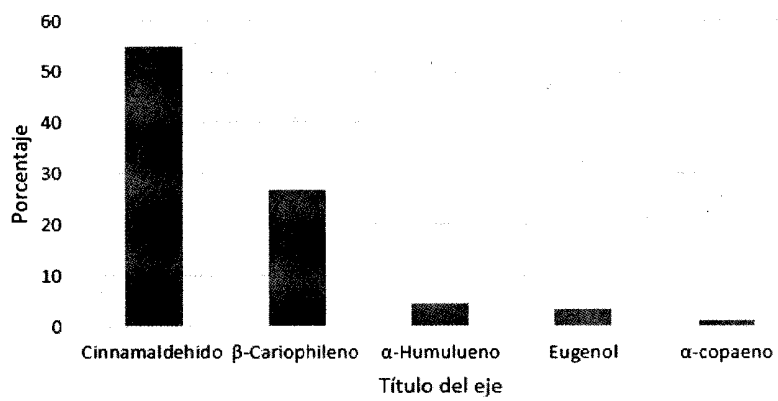


Figura 2



2/4

Figura 3

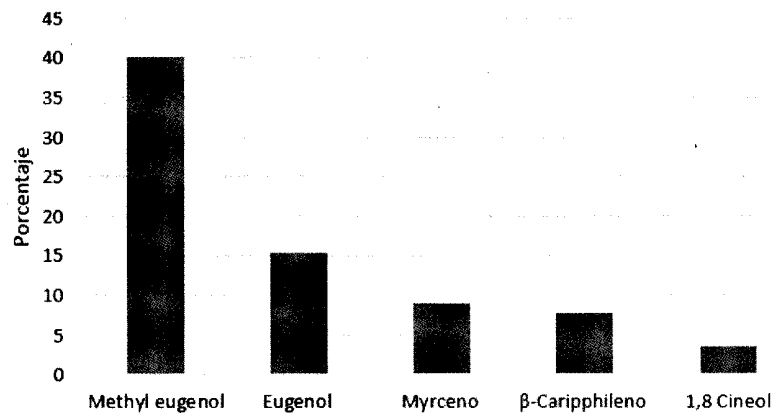
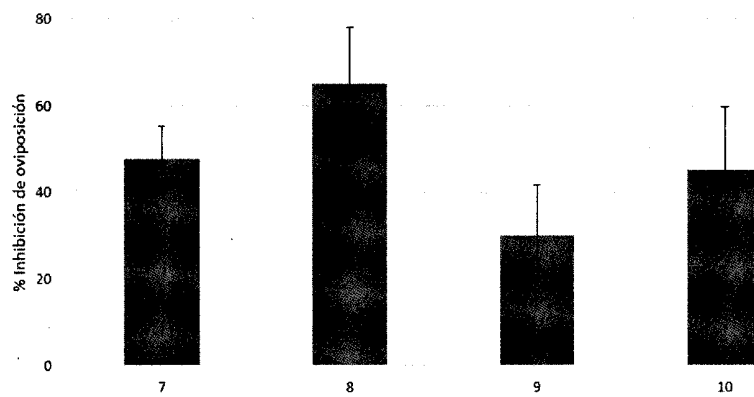


Figura 4



3/4

Figura 5

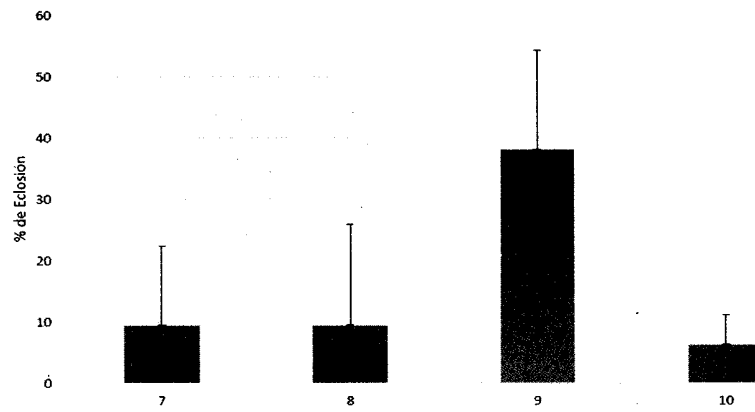
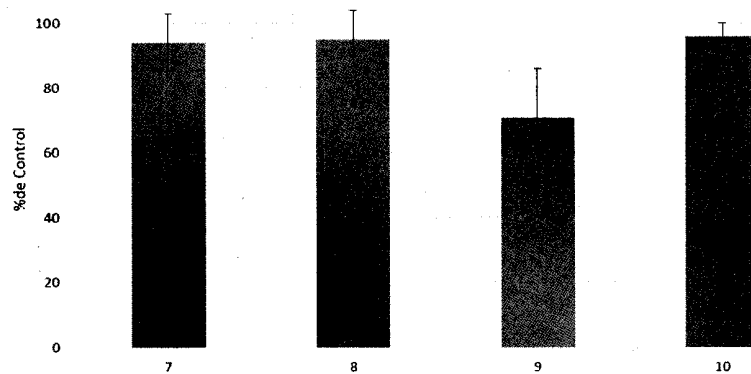


Figura 6



4/4

Figura 7

