

TÍTULO DE PATENTE NO. 339702

Titular(es): CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.; UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN

Domicilio: Calle 43 #130, Col. Chuburná de Hidalgo, 97200, Mérida, Yucatán, MÉXICO; Calle 60 No. 491-A x 57, Col. Centro, 97000, Mérida, Yucatán, MÉXICO

Denominación: COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UN EXTRACTO ESTANDARIZADO DE LONCHOCARPUS LONGISTYLUS COMO CONTROL NATURAL LARVICIDA E INHIBIDOR DE LA ECLOSIÓN DE LARVAS DE GARRAPATA RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A ORGANOFOSFORADOS, PIRETROIDES Y AMIDINAS

Clasificación: Int. Cl. 8: A61P7/00; A61P7/02; A61P7/04; A61K36/00; A61K36/48

Inventor(es): ROCIO DEL ROSARIO BURGÉS ARGÁEZ; ROGER IVÁN RODRÍGUEZ VIVAS; JOSÉ ALBERTO ROSADO AGUILAR; MARTA ELENA MENDEZ GONZÁLEZ; MIRBELLA DEL ROSARIO CÁCERES FARFÁN

Número:
MX/a/2011/013047

Fecha de presentación:
6 de diciembre de 2011

Hora:
12:04

País:

PRIORIDAD

Fecha:

Número:

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 6 de diciembre de 2031

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2ª fracción V, 6ª fracción III, y 69 de la Ley de la Propiedad Industrial.

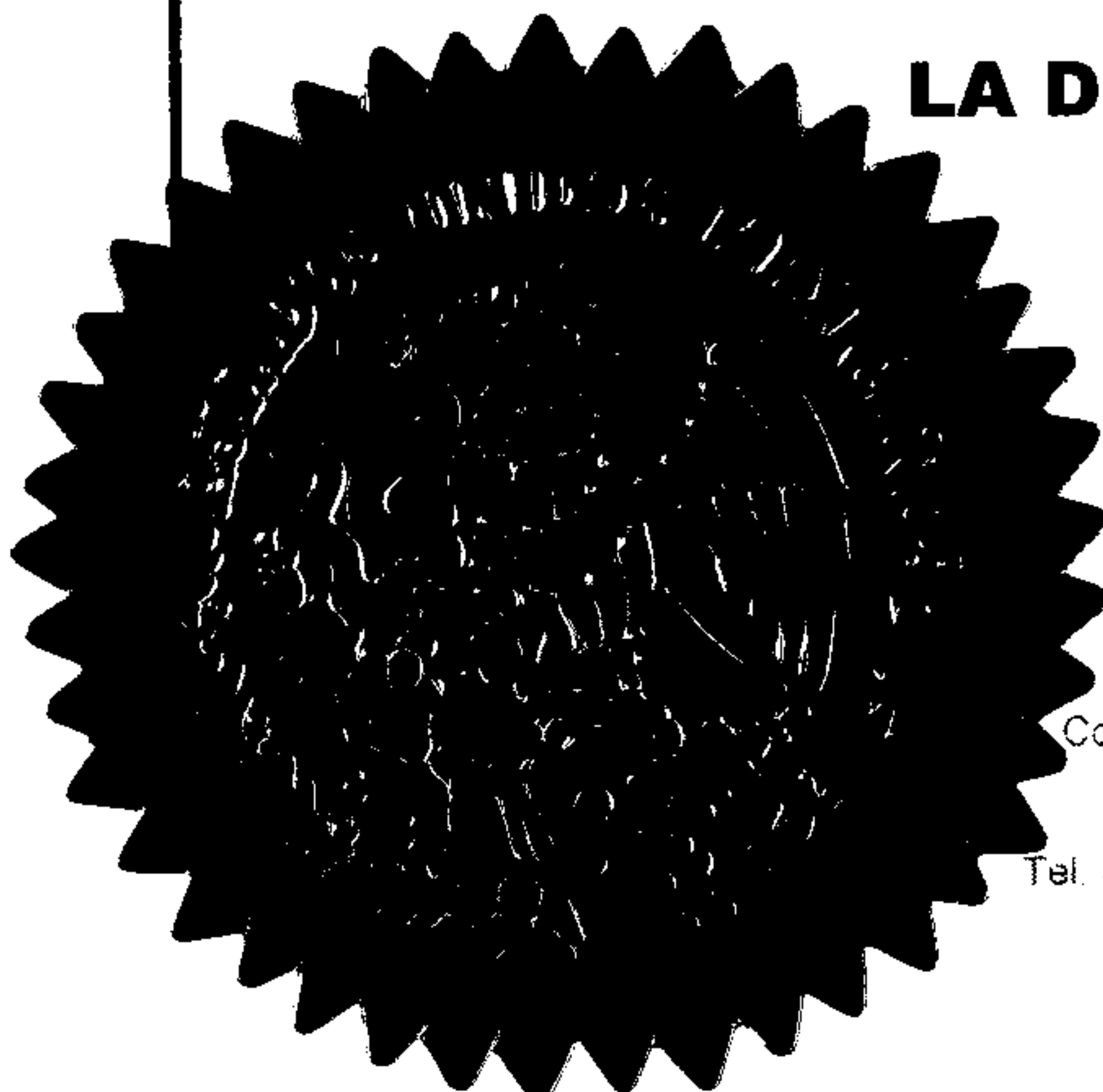
De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6ª fracciones III y 7ª bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 22/06/1999, reformada el 02/09/1994, 25/10/1999, 04/12/1999, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3ª fracción V inciso a), 4º y 12ª fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5ª fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 20 de mayo de 2016

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES

NAHANNY CANAL REYES



COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UN EXTRACTO
ESTANDARIZADO DE *Lonchocarpus longistylus* COMO CONTROL
NATURAL LARVICIDA E INHIBIDOR DE LA ECLOSIÓN DE LARVAS DE
GARRAPATA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* SUSCEPTIBLES Y
RESISTENTES A ORGANOFOSFORADOS PIRETROIDES Y AMIDINAS.



DESCRIPCIÓN

ANTECEDENTES.

1. Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica veterinaria que comprende un extracto de la especie vegetal *Lonchocarpus punctatus* (Fabaceae). Dicha formulación se utiliza como agente larvicida e inhibidor de la eclosión larval de garrapatas *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*). La formulación farmacéutica, objeto de la presente invención, brinda una solución para el control de larvas de garrapata *R. microplus*.

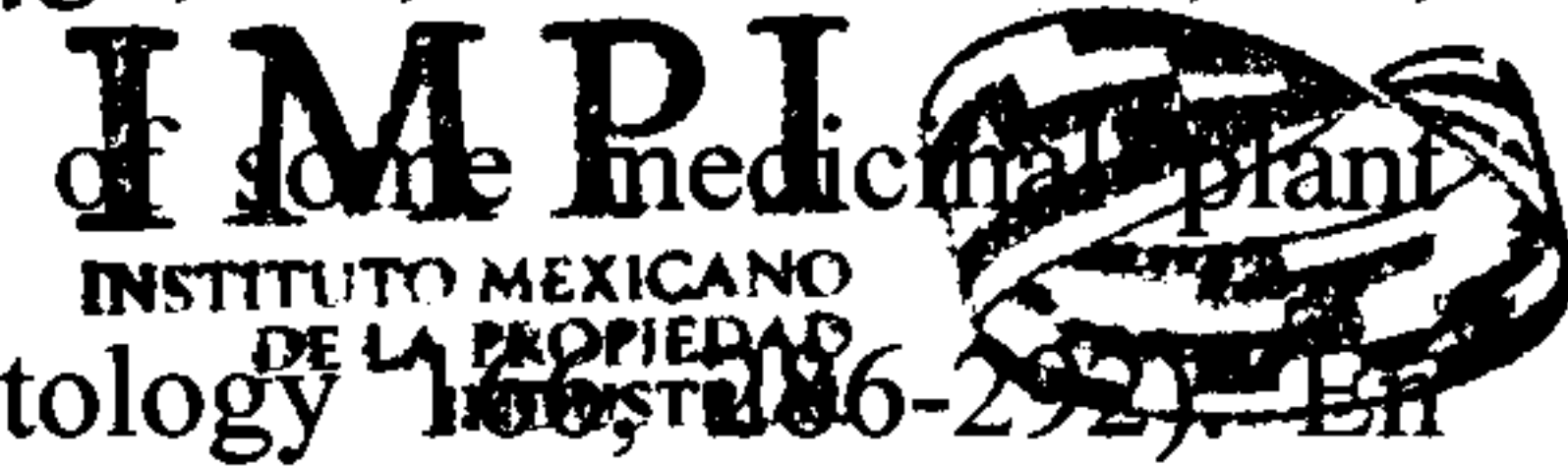
Dicha formulación comprende un extracto con una concentración conocida de compuesto activo que produce un efecto larvicida superior a los fármacos (Amitraz™) que actualmente se utilizan en el mercado.

Aún más, la formulación farmacéutica de extractos de *Lonchocarpus punctatus* de la presente invención es efectiva contra larvas de garrapata susceptibles y resistentes a los fármacos a base de compuestos organofosforados, piretrinas y amidinas.

2. Antecedentes generales de la invención

El género *Boophilus* recientemente reclasificado como el género *Rhipicephalus* (Horak, I.G. Camicas, J.L. & Keirans, J.E. 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttallidae: a world list of valid tick names. Experimental Applied Acarology 28, 27-54) es uno de los principales ectoparásitos que causan graves problemas en la ganadería de pastoreo. Además existen reportes que mencionan que el 80% de 1200 millones de cabezas de ganado están en riesgo por las garrapatas y las enfermedades que transmiten, causando pérdidas anuales

de 7,000 millones de dólares (Bagavan A., Kamaraj, C., Elango, G., Abduz-Zahir, A., Abdul-Rahuman, A. 2009. Adulticidal and larvicidal efficacy of some medicinal plant extracts against tick, fluke and mosquitoes. *Veterinary Parasitology* 166-292). En



México, las pérdidas ocasionadas por las garrapatas se calculan en 48 millones de dólares anuales (Alan R. Walker. 2011. Eradication and control of livestock ticks: biological, economic and social perspectives. *Parasitology* 138, 945-959).

A nivel mundial, el método más utilizado para el control de *R. microplus* es el uso de productos químicos tales como organofosforados (OF), piretroides (PS), amidinas (Am), fenilpirazolonas (F) y lactonas macrocíclicas (LM) (FAO, 1987). Sin embargo, los métodos convencionales de control son costosos de implementar, y pueden estar asociados con problemas de salud laboral de las personas que los manejan directamente (Rees, H. 1996. Exposure to sheep dip and the incidence of acute symptoms in a group of Welsh sheep farmers. *Occupational and Environmental Medicine* 53, 258-263). Aunado a esto se tiene la frecuencia de los tratamientos, ya que para ser efectivos, se requiere de la aplicación de tres o más tratamientos al año.

El principal problema del uso de las sustancias químicas contra las garrapatas es la aparición de resistencia a los acaricidas y la reaparición del parásito en zonas erradicadas, situación que dificulta las campañas de lucha contra este ectoparásito (Cardozo, H. & Franchi, M. 1995. Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. En: Enfermedades Parasitarias de Importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención. Editorial Hemisferio Sur, p. 369-402). La resistencia desarrollada por garrapatas se ha manifestado frente a casi todos los grupos químicos utilizados en su control; esto ha ocurrido preferentemente en áreas donde la utilización de acaricidas ha sido más sistemática (Betancourt Echeverri, J.A. 2006. La adopción del manejo integrado de garrapatas (MIG): un cambio de criterio. En: Colombia, Revista Regional Novedades Técnicas ISSN: 0123-0697, Editorial Corpoica Regional 9, Vol. 7, p.37-40).

La resistencia en la garrapata común del ganado bovino, *R. microplus*, fue reportada por primera vez en Australia en el año 1937, en Sudáfrica en 1938, en 1947 en Argentina, y en Brasil en 1950. Una cepa de garrapata aumenta su resistencia cuando por presiones de uso frecuente de un producto químico sobreviven los individuos portadores de los alelos

resistentes. Esta selección estará determinada por la frecuencia de uso y la concentración de los acaricidas. La resistencia se establece en una población debido a una mutación y puede ocurrir aún antes de que exista presión por el acaricida. Luego se desarrolla por la presión de los llamados “baños garrapaticidas”, para hacer emergencia cuando la frecuencia de homocigotos resistentes es importante, haciéndose visible a campo cuando supera el 10 % (Cardozo, H. & Franchi, M.1995. Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. En: Enfermedades Parasitarias de Importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención. Editorial Hemisferio Sur, p. 369-402).

Desde 1999, solo dos nuevas clases de ectoparasiticidas, Spinosad (para el control de la mosca del ganado y la pulga del perro) y Metaflumizona (control de pulgas en caninos y felinos), han ingresado a la industria farmacéutica veterinaria. Existe entonces la necesidad de nuevos acaricidas con innovadores mecanismos de acción, ya que la frecuencia con que ha aparecido la resistencia de *R. microplus* a muchos grupos de acaricidas, ha hecho pensar que se ha llegado a un momento crítico, en donde hay que prever la resistencia de las garrapatas a los 5 o 10 años de la primera aplicación de cualquier nuevo tipo de acaricida. Esta realidad, y el hecho de que el desarrollo de nuevos acaricidas es cada vez más complicado y costoso, resulta imperioso contar con estudios que permitan alargar al máximo su vida útil. Todo esto crea la necesidad de realizar investigaciones epidemiológicas determinando la dinámica de la población del parásito a través de conteos de garrapatas y estudios ecológicos; así como la búsqueda de nuevas alternativas de control (Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argáez, R., García-Vázquez, Z. & Méndez-González, M. 2010. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the Cattle tick *Rhipicephalus microplus* by larval inmersión test. Tropical and Subtropical Agroecosystems 12, 417-422).

La aplicación de las plantas o sus extractos para el control de ácaros y de insectos, se ha utilizado durante cientos de años en la medicina tradicional a causa de su actividad farmacológica y baja toxicidad. Tradicionalmente se han aprovechado las propiedades farmacológicas de algunas plantas para su aplicación como insecticidas botánicos (fitoinsecticidas) contra plagas y mosquitos fitófagos (Calmasur, O., Aslam, I. & Sahin, F. 2006. Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against

Tetranychus urticae Koch and *Bemisia tabaco* Genn. Indian Crop Production 23, 140-143).

Los extractos de plantas con propiedades repelentes y acaricidas pueden ser objeto de explotación comercial en contra de una variedad de insectos o garrapatas (Jensen, T. G.,



Garboui, S. & Palsson, K. 2006. Repellency of oils of Lemon, Eucalyptus, Geranium, and
 5 Lavander and the mosquito repellent MyggA natural to *Ixodes ricinus* in the laboratory and
 field. Journal of Medical Entomology 43, 731-736). Sin duda uno de los más importantes
 ha sido el extracto de piretro, obtenido de flores secas de *Chrysanthemum cinerariaefolium*,
 cuyos componentes activos son piretrinas, cinerinas y jasmolinas. Asimismo, se ha
 utilizado como insecticida el extracto acuoso de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*),
 10 cuyo principio activo es la nicotina. Además existen reportes de extractos de plantas con
 propiedades acaricidas contra garrapatas y ácaros (Lori, A., Grazioli, D., Gentile, E.,
 Mariano, G. & Salvatore, G. 2005. Acaricidal properties of the essential oil of *Melaleuca*
alternifolia Cheel against nymphs of *Ixodes ricinus*. Veterinary Parasitology 129, 173-176;
 Kim, S.I., Yi, J.H., Tak, J.H. & Ahn, Y.J. 2004. Acaricidal activity of plant essential oils
 15 against *Dermanyssus gallinae*. Veterinary Parasitology 120, 297-304). También se han
 reportado propiedades insecticidas y acaricidas en los compuestos formados por estilbenos
 (patente US-4,271,186).

En la planta *Lonchocarpus punctatus* Kunth se ha reportado la presencia de los estilbenos
 longistilina A, B, C y D (Marta, M. L., Di Chiara, G., Delle Monache, F. & Marini-Bettolo,
 20 G.B. 1979. Synthesis of Longistiline A, B, C, D and other new prenylated stilbenes.
 Gazzeta Chimica Italiana 109, 323-324), y en la corteza de la raíz los estilbenos longistilina
 A, B y C (Goncalves, de Lima., Marini-Bettola, G.B., Sousa, M., De Mello, J.F., Da Silva,
 E.C. De Oliveira, L.L. & Cotias, C.T. 1975. Antimicrobial substances from higher plants.
 XLVI. Initial observations on biological effects of extracts from the stem bark and root bark
 25 of *Lonchocarpus violaceus* (*Lonchocarpus punctatus*), a Mexican Mayan, Guatemalan and
 Honduran plant. Revista Do Instituto Antibiotic Universidad Federal Pernambuco Recife,
 15, 3-15).

Existe una patente (patente US-4,271,186) que describe la actividad insecticida de
 compuestos de tipo estilbeno obtenidos por síntesis total, en donde la posición 2 de uno de
 30 los anillos aromáticos de los estilbenos, se señala sustituida con grupos ester alquilados en

29 compuestos obtenidos por síntesis. La patente US-4,271,186 describe la aplicación insecticida de dichos compuestos en un gran número de artrópodos, en realidad que incluyen garrapatas adultas del género *Rhipicephalus*; sin embargo, no se indica su efectividad sobre larvas de garrapatas del mismo género, ni su efecto en la inhibición de la oviposición.



- 5 Tomando en cuenta este conocimiento y en la búsqueda de nuevos acaricidas con mayor efectividad, fácil disponibilidad y baja toxicidad, se consideró el uso de la planta *Lonchocarpus punctatus* Kunth para obtener un extracto para combatir larvas de garrapata del género *Rhipicephalus*, e inhibir la eclosión de las mismas, así como el aislamiento e identificación del agente activo responsable de la actividad larvicida.

10

SUMARIO DE LA INVENCION

Un primer objeto de la invención consiste en proporcionar un extracto etanólico, metanólico y hexánico de la planta *Lonchocarpus punctatus* para el empleo como larvicida en larvas de garrapatas de los géneros *Rhipicephalus*.

- 15 Otro objeto de la invención consiste en proporcionar un extracto etanólico, metanólico y hexánico de la planta *Lonchocarpus punctatus* para el empleo como inhibidor de la eclosión de larvas de garrapatas *R. microplus*.

Aún otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar un tratamiento para combatir larvas de garrapatas *R. microplus*.

- 20 Otro objeto consiste en proporcionar un tratamiento para combatir larvas de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a compuestos organofosforados, piretroides y amidinas.

- 25 Conforme a la presente invención, los anteriores objetivos se alcanzan por medio de proporcionar una composición farmacéutica que comprende un extracto etanólico, metanólico y hexánico de flores de *Lonchocarpus punctatus*.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

En la figura 1 se observa el perfil cromatográfico del extracto hexánico de raíz de *Lonchocarpus punctatus*.



5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Lonchocarpus punctatus Kunth es un árbol quasi-endémico de la Península de Yucatán en donde se le conoce por los nombres mayas de “balché”, “x-balché” y “saayab”. Su distribución incluye los estados de Yucatán, Quintana Roo, Chiapas (Ocosingo) en México, y en los límites de Belice y Guatemala. Es un árbol de hasta 18 metros de altura, que crece en hábitats de selva decidua y subdecidua (Duran, R., Trejo-Torres, C. & Ibarra-Martínez, G. 1998. Endemic phytotaxa of the Peninsula of Yucatan. Harvard Papers in Botany 3, 263-314). La corteza de esta planta es utilizada en las ceremonias mayas para la elaboración de una bebida alcohólica llamada “balché” (Standley, P. and Steyermark, J.A. 1946. Fieldiana: Botany, Chicago Natural History Museum, Chicago 24, 1-185). Entre otros usos está el uso ornamental, así como para el tratamiento del asma, dolor de cabeza, y como antitusivo (hojas), siendo la mezcla de la corteza, miel y agua utilizada para el dolor de estómago (Mendieta, R.M. and Del Amo, R.S. 1981. Plantas Medicinales del Estado de Yucatan, Xalapa, Veracruz, México).

En la planta total seca se ha reportado la presencia de los estilbenos longistilina A, B, C y D (Marta, M. L., Di Chiara, G., Delle Monache, F. & Marini-Bettolo, G.B. 1979. Synthesis of Longistiline A, B, C, D and other new prenylated stilbenes. Gazzeta Chimica Italiana 109, 323-324), y en la corteza de la raíz los estilbenos longistilina A, B y C (Goncalves, de Lima., Marini-Bettola, G.B., Sousa, M., De Mello, J.F., Da Silva, E.C. De Oliveira, L.L. & Cotias, C.T. 1975. Antimicrobial substances from higher plants. XLVI. Initial observations on biological effects of extracts from the stem bark and root bark of *Lonchocarpus violaceus* (*Lonchocarpus punctatus*), a Mexican Mayan, Guatemalan and Honduran plant. Revista Do Instituto Antibiotic Universidad Federal Pernambuco Recife, 15, 3-15). Si bien esta especie se encuentra relacionada filogenéticamente con las especies de los géneros *Derris* y *Lonchocarpus*, no posee compuestos de tipo rotenoide, como los mencionados para las especies *Derris elliptica*, *D. malaccensis*, *Lonchocarpus utilis* y *L. urucú*, en cuyas raíces se han aislado cantidades considerables de rotenona y deguelina, con

conocida actividad insecticida (Gomes, C.M.R., Gottlieb, O.R., Marini-Bettola, B.M. Delle
 Monache, F. & Polhill, R.M. 1981. Systematic significance of flavonoids in *Lonchocarpus* and
Lonchocarpus. Biochemical Systematics and Ecology 9, 129-147). Aún más importante,
 los compuestos de tipo estilbeno, como los encontrados en *L. punctatus*, ~~son conocidos por~~
 5 sus propiedades antifúngicas, y como mecanismos de defensa de las plantas (Chong, J.,
 Poutaraud. & Hugueney, P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. Plant Science
 177, 143-155; Patente USA -4,723,034); en el caso de la salud humana, estilbenos como el
 resveratrol contenido en las uvas, son conocidos por sus propiedades antioxidantes
 protectoras del sistema cardiovascular (Dasm M. & Das, D. 2010. Resveratrol and
 10 cardiovascular health. Molecular Aspects of Medicine 31, 503-512). Entre otras actividades
 reportadas para los compuestos de tipo estilbeno están como compuestos empleados en el
 tratamiento de la diabetes (Patente USA-6,245,814; Patente USA-6,624,197).

Cabe señalar que no todos los estilbenos contenidos en las distintas partes de la
 especie *Lonchocarpus punctatus* presentan actividad larvicida, se ha encontrado actividad
 15 solo en el 3,5-dimetoxi-*trans*-estilbeno presente en la flor de esta especie. Sin embargo, el
 extracto exhibe una actividad mayor en la inhibición de la eclosión larval con respecto al
 compuesto aislado.

Hasta antes de la presente invención, no se han reportado compuestos químicos
 aislados de esta planta con actividad larvicida ni inhibitoria de la eclosión larval en
 20 garrapatas *R. microplus*..

Los escasos estudios farmacológicos de *Lonchocarpus punctatus* reportan que el
 extracto metanólico de la corteza del tallo posee actividad antitumoral contra las líneas
 tumorales de Ehrlich y sarcoma 180 (Goncalves, de Lima., Marini-Bettola, G.B., Sousa,
 M., De Mello, J.F., Da Silva, E.C. De Oliveira, L.L. & Cotias, C.T. 1975. Antimicrobial
 25 substances from higher plants. XLVI. Initial observations on biological effects of extracts
 from the stem bark and root bark of *Lonchocarpus violaceus* (*Lonchocarpus punctatus*), a
 Mexican Mayan, Guatemalan and Honduran plant. Revista Do Instituto Antibiotic
 Universidad Federal Pernambuco Recife, 15, 3-15). Los inventores han encontrado que el
 extracto etanólico, metanólico y hexánico de las flores posee actividad larvicida, así como
 30 inhibitoria de la oviposición de garrapatas del género *Rhipicephalus* susceptibles y

resistentes a OF, PS y Am, identificándose al 3,5-dimetoxi-*trans*-estilbeno, como el componente activo larvicida, y a la composición química total del extracto de flor de *Lonchocarpus punctatus* propiedades inhibitorias de la eclosión larval.



La presente invención también se refiere a un método para la obtención de dicho extracto. Dicho método de extracción comprende extracciones sucesivas con disolventes orgánicos como etanol, metanol o hexano al 100% obteniéndose los respectivos extractos etanólicos, metanólicos y hexánicos con propiedades larvicidas.

La invención se refiere también al uso de dichos extractos para la fabricación de formulaciones farmacéuticas en forma líquida, apropiadas para la administración tópica o por inmersión de larvas de garrapata del género *Rhipicephalus*, pero con la notable ventaja de su efectividad en larvas de garrapatas tanto susceptibles como resistentes a los productos químicos a base de OF, PS y Am.

En la figura 1 se observa el perfil cromatográfico del extracto hexánico de flor de *Lonchocarpus punctatus* obtenido mediante un espectrómetro de gases marca Agilent technologies 6890N™ acoplado a un detector másico serie 5975B con una columna Ultra 1 empacada con 100% de metilsiloxano, a temperatura programada: temperatura inicial de 100 °C durante 2 min, luego rampa de 10 °C/min hasta alcanzar la temperatura final de 300 °C por 20 min. Como se aprecia, el extracto hexánico exhibe picos característicos (en minutos) a: 7.164, 15.629, y 17.997. En donde el compuesto activo denominado 3,5-dimetoxi-pinosilvin aparece a tiempo de retención de 15.629 min.

Los detalles característicos de esta formulación indicada para el control natural larvicida e inhibidor de la eclosión de larvas de garrapata *R. microplus* susceptibles y resistentes a OF, PS y Am se muestran en la siguiente descripción y en los ejemplos que se acompañan así como la preparación de los extractos de la especie vegetal utilizada, en la forma farmacéutica de dosificación, siguiendo los mismos signos de referencia para indicar los procedimientos y los ejemplos mostrados.

La formulación farmacéutica objeto de la invención es particularmente útil para el control natural larvicida e inhibidor de la eclosión de larvas de garrapatas susceptibles y resistentes a OF, PS y Am.



La formulación farmacéutica objeto de la invención se encuentra particularmente disponible para la administración tópica en forma líquida y puede ser elaborada por técnicas y métodos de fabricación convencionales.

El extracto de *Lonchocarpus punctatus*, puede ser mezclado con los excipientes como agua y Tween^{MR} 20 (polisorbato 20), disolventes que permiten el adecuado proceso de solubilización del ingrediente activo, para ser aplicado directamente sobre las larvas de garrapatas *R. microplus*.

El método para la obtención del extracto de *Lonchocarpus punctatus*, con el efecto farmacológico de la formulación objeto de la invención comprende las siguientes etapas:

Preparación del extracto de *Lonchocarpus punctatus*.

El proceso de preparación del extracto de *Lonchocarpus punctatus*, objeto de la invención, comprende las etapas de:

- a) Obtención de material vegetal,
- b) Secado del material vegetal, y
- c) Extracción con etanol, metanol o hexano.

a) Obtención de material vegetal

El material vegetal referido en esta invención se obtuvo en la ciudad de Mérida, Yucatán, depositándose una muestra en el herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. La colecta se llevo a cabo entre los meses de marzo, octubre y noviembre, que es cuando la planta presenta su ciclo de floración. Se colectaron las flores de la planta debido a su eficacia obtenida en estudios preliminares.

b) Secado del material vegetal

El material se seca hasta un 60% del contenido de humedad.

Puede utilizarse cualquier método de secado conocido en la técnica, por ejemplo puede utilizarse secado con aire caliente microondas o secado ambiental.

- 5 En el caso de secado ambiental, las flores son secadas a temperatura ambiente de 25-45°C por 3 días en un área ventilada.

c) Extracción

10 El material vegetal, seco se somete entonces a un procedimiento de maceración, que consiste en:

- i) colocar dicho material (1.49 Kg) en botellones de cristal de 10 L y añadir suficiente solvente, por ejemplo, metanol, etanol o hexano (5 L) hasta cubrirlo en su totalidad, dejándolo remojado por 24 h, tiempo en el cuál los compuestos químicos contenidos en el material vegetal se disuelven en el solvente para formar una suspensión de
- 15 múltiples compuestos, entre los que destacan el 3,5-dimetoxi-*trans*-estilbeno (3,5-dimetoxi-pinosilvin), 3,5,4'-trimetoxi-*trans*-estilbeno, 3,5,4'-trimetoxi-*cis*-estilbeno y 3,4,4',5-tetrametoxi-*trans*-estilbeno.

En una realización alternativa, la disolución puede realizarse bajo agitación, bajo una temperatura determinada, por ejemplo 25°C e incluir una etapa de molienda, por

20 ejemplo a un tamaño de partícula de 5 mm.

ii) Pasado este tiempo, el solvente que contiene los compuestos químicos disueltos (suspensión) se decanta y filtra. Esta operación se realiza por tres ocasiones con el objeto de obtener el extracto orgánico (hexánico, etanólico o metanólico) de las flores.

iii) Las suspensiones resultantes fueron concentradas y secadas en el laboratorio

25 mediante un evaporador rotatorio, por medio de calentamiento a 40 °C y a una presión de vapor de 200-300 mmHg, obteniéndose 174.3 g de extracto de color café oscuro y consistencia pastosa (con un rendimiento del 11.69% para el caso de extracción hexánica, y de 12 al 13% en el caso de extracciones directas con etanol o metanol.

iv) El extracto obtenido (174.3 g) se redisolvió en una mezcla de metanol-agua (2:3) y la suspensión resultante fue fraccionada mediante ~~partición cromatográfica~~ con los disolventes hexano y acetato de etilo hasta obtener los extractos de polaridad baja y mediana.



5 Se pueden utilizar otros procesos para la separación de los componentes del extracto, por ejemplo, cromatografías sucesivas en columna por gravedad empleando como sistemas de elución hexano y acetona, así como filtración en gel de sephadex™ en metanol.

Caracterización fitoquímica del extracto de *Lonchocarpus punctatus*. El extracto
10 obtenido conforme al proceso de la presente invención y en particular al extracto hexánico, se somete a un proceso de análisis cualitativo. Para dicho análisis se emplea un espectrómetro de gases marca Agilent Technologies 6890N™ acoplado a un detector
15 másico serie 5975B con una columna Ultra 1 empacada con 100% de metilsiloxano, a temperatura programada: temperatura inicial de 100 °C durante 2 min, luego rampa de 10 °C/min hasta alcanzar la temperatura final de 300 °C por 20 min. Como se aprecia (ver figura 1), el extracto hexánico exhibe picos característicos (en minutos) a: 7.164, 15.629, y 17.997. En donde el compuesto activo denominado 3,5-dimetoxi-*trans*-estilbeno (3,5-dimetoxi-pinosilvin) aparece a tiempo de retención de 15.629 min.

20 **Proceso de aislamiento del compuesto activo.** Una muestra de la fracción hexánica activa (9.4 g) se purificó por métodos cromatográficos. Primero, se usó una columna cromatográfica líquida al vacío (CLV), de 7 cm de diámetro y 5 cm de altura, empacada con gel de sílice de 200-400 mallas (Aldrich), y eluída con mezclas de polaridad creciente de los disolventes hexano y acetato de etilo, recolectándose un total de 10 fracciones.
25 Mediante análisis por Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) se pudo constatar que la fracción b contenía el componente activo, siendo ésta la fracción (130 mg) que se sometió al proceso de purificación. Esta fracción fue purificada mediante una columna de gravedad, de 2 cm de diámetro y una altura de 15 cm, con la mezcla de disolventes hexano-diclorometano (90:10), y finalmente una columna de

sephadex LH-20™ (1cm de diámetro/40 cm de altura) empleando metanol como eluyente obteniéndose 17.9 mg del compuesto activo 3,5-dimetoxi-*trans*-estilbeno.



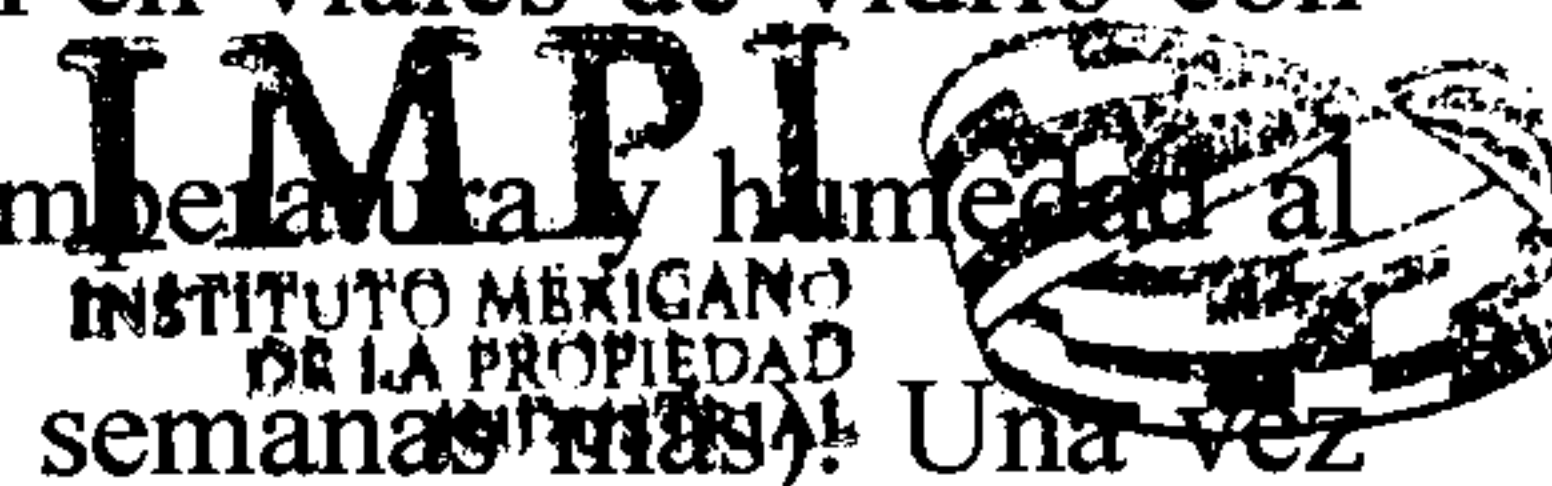
Caracterización del compuesto activo. El compuesto puro se obtuvo como un sólido amarillo. Para demostrar su pureza y obtener su peso molecular (240 uma), una muestra de este compuesto se inyectó a un cromatógrafo de gases, marca Agilent Technologies modelo 6890N™, acoplado a un detector másico, modelo 5975B™, de la misma marca. Asimismo, mediante comparación de sus datos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear de protón y carbono trece con los reportados en la literatura, el compuesto puro fue identificado como 3,5-dimetoxi-*trans*-estilbeno.

El extracto etanólico, metanólico y hexánico de la presente invención tiene actividad larvicida e inhibe la eclosión de larvas de garrapata del género *Rhipicephalus* con un porcentaje de mortalidad larval del 100%.

Caracterización biológica de extractos y compuesto puro. Para determinar la actividad larvicida de los extractos se recolectaron de cinco ranchos bovinos del estado de Yucatán cepas de garrapatas *R. microplus* caracterizadas previamente como multiresistentes (resistentes a los OF, PS y Am) (Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Arévalo, F., Fragoso-Sánchez, H., Santamaría, V.M. & Rosario-Cruz, R. 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology* 136, 335-342).. Para evaluar los extractos vegetales, se recolectaron 600 teleoginas (garrapatas adultas) de *R. microplus*, se depositaron en tubos de ensayo y se transportaron al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán. Una parte de las teleoginas se incubaron para evaluar el efecto en su progenie (fase A) y las demás se expusieron a bioensayos directamente (Fase B).

La producción de huevos se realizó con 20 teleoginas aisladas en cajas de Petri de plástico en completa oscuridad a temperatura controlada de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en una cámara húmeda (80-90% de humedad). Concluida la oviposición (dos semanas después de la

colecta de teleoginas) los huevos se recolectaron y se depositaron en viales de vidrio con tapón de algodón, sometiéndolas a las mismas condiciones de temperatura y humedad al que fueron expuestas las teleoginas para inducir la eclosión (dos semanas más). Una vez que las larvas eclosionaron, se esperó a que tengan una edad de 7 a 14 días, para ser



5 sometidas al diagnóstico de susceptibilidad con los extractos vegetales (Benavides, O.E.; Hernández, M.G.; Romero, N.A.; Castro, A.H.; Rodríguez, B.J.L.2001. Evaluación preliminar de extractos del Neem (*Azadirachta indica*) como alternativa para el control de la garrapata del ganado *B. microplus* (Acari: Ixodida). Revista Colombiana de Entomología 27,1-8; López, L.R. 2004. Susceptibilidad de adultos de la mosca *Haematobia irritans* L. 10 (Diptera: Muscidae) al hongo entomopatógeno *Metarhizum Anisopliae* (Metsch) Sor. (Hyphomycetes) (tesis de licenciatura). Tecoman (Colima) México: Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima).

Prueba de inmersión de larvas (Fase A): La prueba utilizada para diagnosticar la 15 susceptibilidad se realizó mediante la técnica de inmersión larval modificada descrita por Santamaría y Soberanes (Santamaría, V.M.; Soberanes, C.N.2001. Memorias del Curso-Taller sobre diagnóstico de resistencia a ixodicidas en garrapatas *Boophilus microplus*. Del 26 al 28 de septiembre de 2001, Jiutepec, Morelos, México. pp. 1-40). Esta técnica consiste en la 20 exposición por 10 minutos de larvas de garrapatas *R. microplus* de 7 a 15 días de eclosionadas, a distintas concentraciones de los extractos vegetales para luego ser introducidas a paquetes de papel filtro e incubadas. Esto se realiza con el objetivo de obtener porcentajes de mortalidad del orden de 0 a 100 que pueden ser analizados por medio de la metodología Probit.

25 Para los controles y para diluir los extractos vegetales y obtener la concentración (1 al 10%) se utilizó Tween 20 al 2%.

El llenado de paquetes se inició con los controles. Para colocar las larvas dentro del paquete se utilizó un pincel y se tomaron de 80 a 120 larvas dejándolas caer al paquete. Al concluir el llenado de los paquetes, se colocaron en una charola limpia y se introdujeron en una estufa de incubación a 27 +/- 2° C, con una humedad relativa de 80 a 90%, 30 permaneciendo por 48 horas (Santamaría, V.M.; Soberanes, C.N.; (2001). Memorias del

Curso-Taller sobre diagnóstico de resistencia a ixodidas en garrapatas *Boophilus microplus*.
Del 26 al 28 de septiembre de 2001, Jiutepec, Morelos, México. pp. 1-40)



En todas las muestras se realizaron tres a cinco repeticiones, incluyendo a los controles. La lectura de número de larvas vivas y muertas en los tratados y controles se efectuaron a las 48 horas (Santamaría y Soberanes, 2001).

Para calcular el porcentaje de mortalidad y mortalidad media se usó las siguientes fórmulas (Santamaría y Soberanes, 2001).

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{larvas muertas}}{\text{larvas totales}} \times 100$$

10

$$\text{Media del \% de mortalidad} = \frac{\text{mortalidad 1} + \text{mortalidad 2} + \text{mortalidad 3}}{3}$$

Fase B. Evaluación en teleoginas (garrapatas adultas). Las teleoginas se pesaron en una balanza analítica digital y se incluyeron aquellas que tuvieron un peso de 200 mg \pm 20. Se formaron 19 grupos homogéneos de 10 garrapatas que recibieron diferentes tratamientos (Chungsamarnyart, N.; Jansawan, W. 1996. Acaricidal Activity of peel oil of *Citrus* spp. on *Boophilus microplus*. Thailand. Kasetsart Journal (Nature Science) 30:112-117). En todos los tratamientos se realizaron tres a cinco repeticiones, incluyendo a los controles.

Prueba de inmersión de adultas. Cada grupo de garrapatas se sumergió por un minuto en el extracto y/o compuesto puro a la concentración indicada (10%) para posteriormente ser transferida a una placa de 24 pozos, con la finalidad que las garrapatas llevaran a cabo el proceso de oviposición se incubaron en una cámara húmeda (80-90% de humedad) en completa oscuridad a temperatura ambiente de 27 \pm 2 °C (Cen *et al.*, 1998).

La lectura se realizó por medio de un estereoscopio contando el número de teleoginas vivas y muertas en los tratados y controles a las 24 h, 48 h y hasta 15 días después de la inmersión para observar también si hay inhibición de la oviposición. (Chungsamarnyart, N.; Jiwajinda S.; Jansawan, W. 1990. Effect of plant crude-extracts on the cattle tick (*B. microplus*) Insecticidal Action I. Thailand. Kasetsart Journal Nature Sciences Supplement)24,28-31; Chungsamarnyart, N.; Jiwajinda S.; Jansawan, W. (1991b).

30

Acaricidal effect of plant crude-extracts on the tropical cattle tick (*B. microplus*) Thailand, Kasetsart Journal Nature Science. Supplement 25,90-100).



Posteriormente se compararon los grupos tratados con el control para determinar el índice de mortalidad (IM) que será calculado del número de garrapatas muertas por grupo dividido entre el número total de garrapatas incubadas por grupo; capacidad de puesta de huevos (CPH) que será calculada del peso de los huevos puestos por grupo dividido entre el peso total de las hembras ingurgitadas por grupo x 100 (Guedes, F.A.P.; Vaz, J.I.; Masuda, A.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. Brazil. Veterinary Parasitology. 94,117-125).

Para calcular el porcentaje de mortalidad y mortalidad media se usará las siguientes fórmulas (Santamaría y Soberanes, 2001).

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{teleoginas muertas}}{\text{teleoginas totales}} \times 100$$

$$\text{Media del \% de mortalidad} = \frac{\text{mortalidad 1} + \text{mortalidad 2} + \text{mortalidad 3}}{3}$$

5.1.6. Análisis Probit. Para obtener las CL50 y CL99 del extracto se utilizó la metodología Probit con los resultados de mortalidad de la concentración. Los resultados de la prueba se analizaron mediante el programa Polo-Plus (Le Ora Software, 2004), el cual proporcionó también información de la desviación estándar, la pendiente y los límites de confianza, parámetros para indicar si existen diferencias significativas en la sensibilidad a un insecticida determinado (Finney, D.J. 1971. Probit analysis, 3a. Ed. Cambridge Univ. Press. Great Britain. pp 333; Hubert, J.J. (1980). Bioassay. Kendal/Hunt Pub. Co.USA. pp 164).

Ejemplos de Aplicación

EJEMPLO 1.

El uso del extracto etanólico, metanólico o hexánico de *Lonchocarpus punctatus* para matar larvas de garrapata *R. microplus* susceptibles y resistentes OF, PS y Am.

Asimismo, tales extractos presentan actividad inhibitoria de la eclosión en teleoginas adultas.



El extracto metanólico, etanólico y hexánico y dos de sus componentes principales 3,5-dimetoxi-*trans*-estilbeno y 3,5,4'-*trans*-trimetoxiestilbeno de flor *Lonchocarpus punctatus* fueron evaluados en larvas de garrapata *R. microplus*, ectoparásito del ganado bovino.

Tabla 1. Actividad larvicida *in vitro* de extractos de *Lonchocarpus punctatus* y compuesto activo al 10% contra larvas de *Rhipicephalus microplus* resistentes a organofosforados, piretroides y amidinas.

Extractos	% mortalidad 1	% mortalidad 2	% mortalidad 3
Extracto metanólico de flor	100	100	100
Extracto hexánico de flor	100	100	100
Extracto etanólico de flor	100	100	100
Extracto metanólico de hoja	1.08	4.04	8.10
Extracto hexánico de hoja	3.44	3.17	3.63
Extracto metanólico de corteza	46.15	39.28	36.0
Extracto hexánico de corteza	54.68	85.71	85.18
Extracto metanólico de raíz	26.20	17.74	24.74
Extracto hexánico de raíz	29.67	26.88	14.86

Como se muestra en la tabla 1, los extractos hexánicos, metanólico y etanólicos de la flor de *L. punctatus* demuestran actividad larvicida del 100%, en tanto que los extractos de hoja y raíz no es significativa su actividad.

EJEMPLO 2.

El uso del extracto hexánico de *Lonchocarpus punctatus* para inhibir la eclosión de larvas de garrapata *R. microplus* resistentes a OF, PS y Am. En la Tabla 2 se muestran los resultados del efecto del *Lonchocarpus punctatus*

REIVINDICACIONES



- 1.- Una composición farmacéutica, garrapaticida, larvicida e inhibidor de la eclosión de larvas de garrapata *Rhipicephalus microplus* susceptibles y resistentes a organofosforados (OF), piretroides (PS) y amidinas (Am), caracterizada porque comprende un extracto de flores de *Lonchocarpus punctatus* en una concentración mínima de 4 % (v/v).
- 2.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, en donde la forma de administración es una formulación farmacéutica líquida que se aplica por aspersión o inmersión.
- 3.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 2, en donde la concentración final del extracto en la formulación farmacéutica líquida es entre 4% y 10% de extracto respecto del volumen total de la formulación farmacéutica líquida.
- 4.- La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, en donde el extracto se selecciona de un extracto metanólico, etanólico o hexánico.
- 5.- El uso de una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para preparar una composición garrapaticida útil en la erradicación de garrapata *Rhipicephalus microplus* resistentes a organofosforados (OF), piretroides (PS) y amidinas (Am) en animales.
- 6.- El uso de una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para preparar una composición larvicida útil en la erradicación de garrapata *Rhipicephalus microplus* resistentes a organofosforados (OF), piretroides (PS) y amidinas (Am) en animales.
- 7.- El uso de una composición farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para preparar una composición útil para inhibir la eclosión de

larvas de garrapatas *Rhipicephalus microplus* resistentes a organofosforados (OP),
piretroides (PS) y amidinas (Am) en animales.



21
RESUMEN



Se describe el uso del extracto metanólico, etanólico y hexánico de *Lonchocarpus punctatus*, para preparar una composición farmacéutica para inhibir la eclosión de larvas de garrapata del género *Rhipicephalus* resistente a organofosforados, piretroides y amidinas,

10

15

20

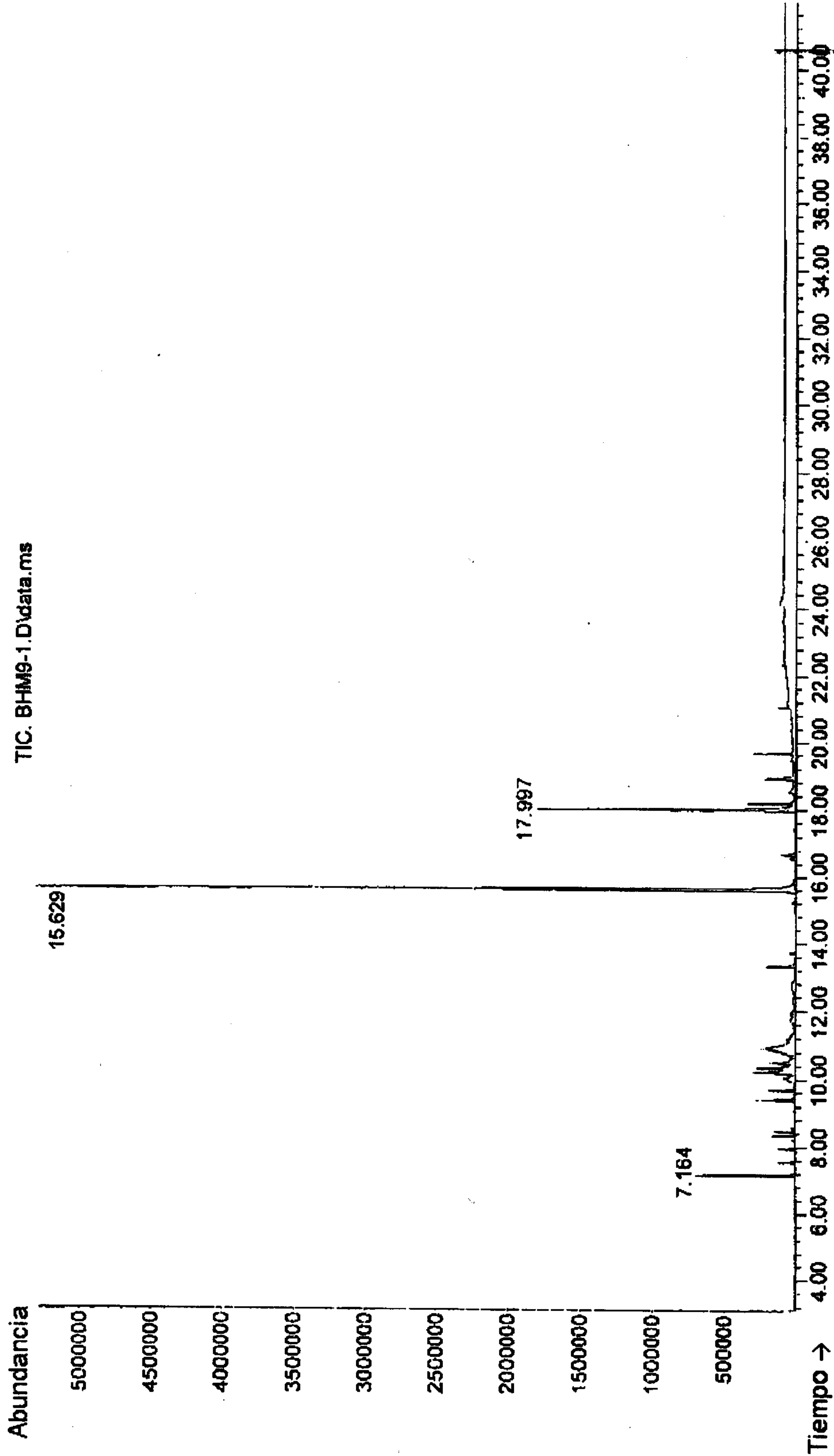


FIG. 1