

Artículo Original / Original Article

Actividad demodocida *in vitro* de aceites esenciales de *Alpinia officinarum*, *Zingiber officinale* y *Eruca sativa*

[*In vitro* demodocidal activity of essential oils from *Alpinia officinarum*, *Zingiber officinale* and *Eruca sativa*]

Humberto Maldonado¹, Dary Mendoza², Gloria Garavito¹, Marta Lizarazo³, Luis Escaf³ y Eduardo Egea¹

¹Grupo de Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Norte, Puerto Colombia, Atlántico, Colombia

²Grupo de Productos Naturales y Bioquímica de Macromoléculas, Universidad del Atlántico, Puerto Colombia, Atlántico, Colombia

³Fundación Clínica Oftalmológica del Caribe, Barranquilla, Atlántico, Colombia

Reviewed by:
Ana María Mesa
Universidad de Antioquia
Colombia

Maite Rodriguez
Universidad Andres Bello
Chile

Correspondence:
Dary MENDOZA:
darymendoza@mail.uniatlantico.edu.co

Section Biological activity

Received: 27 July 2024
Accepted: 20 October 2024
Accepted corrected: 18 November 2024
Published: 30 March 2025

Citation:
Maldonado H, Mendoza D, Garavito G,
Lizarazo M, Escaf L, Egea E.
Actividad demodocida *in vitro* de aceites
esenciales de *Alpinia officinarum*,
Zingiber officinale y *Eruca sativa*
Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat
24 (2): 273 - 287 (2025)
<https://doi.org/10.37360/blacpma.25.24.2.20>

Abstract: *Demodex spp* are ectoparasite mites that reside in the hair follicles and human sebaceous glands. The purpose was to evaluate the demodocidal activity of essential from *Eruca sativa* Mill seeds, *Alpinia officinarum* Hance rhizomes, and *Zingiber officinale* Roscoe rhizomes using an *in vitro* dose-response assay. The *A. officinarum* (LC₅₀ = 0.24% w/v) and *E. sativa* (LC₅₀ = 0.39% w/v) oils were more effective in controlling the mite than *Z. officinale* oil (LC₅₀ = 0.95% w/v) at 20 min of exposure. The demodocidal activity was associated with the majority volatile and semi-volatile compounds in oils; for example, isothiocyanates in *E. sativa* oil (80.2%) and terpenoids in *Z. officinale* (62.8%) and *A. officinarum* (77.5%) oils. Future studies will be aimed at determining the mechanisms of acaricidal action and safety in the treatment of cutaneous demodicosis.

Keywords: Acaricidas; essential oils; demodicosis; *Demodex spp*; mites

Resumen: *Demodex spp* son ácaros ectoparásitos que residen en folículos pilosos y glándulas sebáceas de humanos. El propósito fue evaluar la actividad demodocida de aceites esenciales de semillas de *Eruca sativa* Mill, rizomas de *Alpinia officinarum* Hance y rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe, mediante un ensayo *in vitro* dosis-respuesta. Los aceites de *A. officinarum* (CL₅₀ = 0,24%p/v) y *E. sativa* (CL₅₀ = 0,39%p/v) fueron más efectivos en el control del ácaro comparado con el aceite de *Z. officinale* (CL₅₀ = 0,96%p/v) a los 20 min de exposición. La actividad demodocida fue asociada a compuestos volátiles y semivolátiles mayoritarios presentes en los aceites; por ejemplo, isotiocianatos en el aceite de *E. sativa* (80,2%) y terpenoides en los aceites de *Z. officinale* (62,8%) y *A. officinarum* (77,5%). Estudios futuros estarán dirigidos a determinar los mecanismos de acción acaricida y seguridad en el tratamiento de la demodicosis cutánea.

Palabras clave: Acaricidas; aceites esenciales; demodicosis; *Demodex spp*; ácaros.

INTRODUCTION

Los ácaros *Demodex folliculorum* y *D. brevis* (*Demodex spp*) son ectoparásitos que residen en los complejos pilosebáceos oculares y de la piel ocupando diferentes sitios topográficos. Con mayor frecuencia estos ácaros colonizan los folículos pilosos de pestañas y glándulas sebáceas del rostro (mejillas, frente, nariz, mentón y surco naso labial) (Zhong *et al.*, 2019); y, con menor frecuencia, el tronco y extremidades (Mongi *et al.*, 2018). Se considera que la infestación por *Demodex* es muy frecuente en humanos, con una incidencia promedio del 13 al 70% en todo el mundo, siendo generalmente asintomática (Yan *et al.*, 2020); no obstante, esta incidencia puede estar influenciada por factores como la edad (entre 84 - 100% en mayores de 60 años) y el padecimiento de enfermedades autoinmunes (Chudzicka-Strugała *et al.*, 2023). Así mismo, estudios clínicos coinciden que una sobrepoblación de estos ácaros puede desencadenar procesos inflamatorios crónicos en la piel (Chioveanu *et al.*, 2024) que afectan la calidad de vida de quien lo padece.

Las infestaciones severas por *Demodex* se conocen como demodicosis y se han asociado con enfermedades como acné (Paichitrojjana y Paichitrojjana, 2023), rosácea (Forton, 2020) dermatitis seborreica (Karabay y Çerman, 2020) e inflamación de los párpados o blefaritis (Sarac *et al.*, 2020). Algunos fármacos como la ivermectina y metronidazol se han usado en el tratamiento tópico y sistémico de la demodicosis, con diferentes informes de éxito (Salem *et al.*, 2013; Jacob *et al.*, 2019; Ávila *et al.*, 2021; Helm, 2022); otras opciones de tratamiento incluyen combinaciones de antibióticos, antiinflamatorios esteroides y factores de crecimiento de fibroblastos (Luo *et al.*, 2016); así como, una combinación de isotretinoína e permetrina aplicadas de manera tópica (Paichitrojjana y Paichitrojjana, 2022). No obstante, los posibles efectos adversos a mediano y largo plazo ocasionados por algunos de estos fármacos, así como el desarrollo de resistencia por parte del ácaro (Jacob *et al.*, 2019), han motivado la búsqueda de tratamientos alternativos.

El aceite esencial (AE) extraído del árbol de té (*Melaleuca alternifolia* Cheel) (Lam *et al.*, 2020; Kairey *et al.*, 2023) y su componente mayoritario, el Terpinen-4-ol (Tighe *et al.*, 2013; Evren Kemer *et al.*, 2021), han sido ampliamente investigados por su actividad demodocida, demostrándose su efectividad, mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*. En la actualidad

existen en el mercado varios productos para la higiene de párpados a base de aceite de árbol del té (AAT) y Terpinen-4-ol. Karakurt y Zeytun, (2018), demostraron la eficiencia del tratamiento de la blefaritis por *Demodex* con un champú que contiene 7,5% de AAT, causando reducción completa de la densidad de ácaros en el 36% de los pacientes y reducción parcial en 64%. Otro estudio reportó tiempos de supervivencia *in vitro* de *Demodex* de tres productos para la limpieza y el lavado de ojos que contienen 2,0% de AAT ($95,9 \pm 25,2$ min), 7,5% de AAT ($67,1 \pm 21,8$ min) y 0,5% de Terpinen-4-ol ($27,3 \pm 6,0$ min) (Bulut y Tanriverdi, 2021). Los tiempos de supervivencia del *Demodex* se lograron reducir significativamente usando 50% del AAT (7,0 min) y 50% de Terpinen-4-ol (4,5 min); no obstante, se ha reportado que concentraciones altas (> 15%) pueden ocasionar efectos indeseables, como irritación ocular (Savla *et al.*, 2020; Li-Zhen *et al.*, 2022) y dermatitis de contacto (de Groot y Schmidt, 2016).

En la literatura científica también se describe la actividad demodocida de otros AEs, aunque la información sobre concentraciones efectivas o tiempos de supervivencia del ácaro es limitada. Liu *et al.* (2015), describieron el efecto demodocida de los aceites puros del clavo de olor, fruto de naranja, jengibre silvestre de Manchuria, corteza de canela, rizomas de *Alpinia officinarum* y cáscara de fresno espinoso, observando tiempos letales (TL) < 30 min. Huang *et al.* (2021), publicaron resultados de estudios *in vitro* de actividad anti-*Demodex* de AE puros de *Salvia officinalis* (TL = 7,0 min) y Galanga (TL = $14,4 \pm 1,1$ min); 25% de aceite de pimienta (TL = 11,0 min) y 50% de aceite de alcanfor (TL = 8,0 min). Así mismo, un estudio más reciente (Paichitrojjana y Chalermchai, 2023) informó sobre el efecto demodocida de los aceites esenciales puros de limoncillo (TL₅₀ = 2,0 min), albahaca dulce (TL₅₀ = $2,2 \pm 0,6$ min), clavo (TL₅₀ = $2,4 \pm 0,8$ min), galanga menor (TL₅₀ = $8,2 \pm 2,0$ min) y jengibre (TL₅₀ = $8,6 \pm 1,9$ min); estos resultados fueron comparables con los obtenidos con el AAT puro (TL₅₀ = $2,6 \pm 1,3$ min), bajo las mismas condiciones experimentales.

La presente investigación se enfocó en las plantas *Alpinia officinarum* Hance (Galanga), *Zingiber officinale* Roscoe (Jengibre) y *Eruca sativa* Mill (rúcula), como fuente de AE aplicables al tratamiento de la demodicosis humana. Las dos

primeras son plantas aromáticas que pertenecen a la familia Zingiberaceae; se encuentran ampliamente distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de Asia y América, donde son apreciadas por su valor culinario y propiedades medicinales como antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano y antifúngico (Ding *et al.*, 2019; Mao *et al.*, 2019). Así mismo, estas especies exhiben actividad repelente y biocida contra diferentes clases de insectos (Madreseh-Ghahfarokhi *et al.*, 2018; Ruttanaphan *et al.*, 2020; Wong *et al.*, 2023) y ácaros (Liu *et al.*, 2015; Madreseh-Ghahfarokhi *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2022). Por su parte, *E. sativa* es otra planta culinaria que pertenece a la familia Brassicaceae, muy apreciada por su alto valor nutricional, propiedades hepatoprotectoras y anticancerígenas (Garg y Sharma, 2014). Recientemente, varios estudios han descrito el potencial de los aceites y extractos de *E. sativa* en el control de insectos plaga (Mehran *et al.*, 2019) y ácaros (Masoumi *et al.*, 2019; Carriço *et al.*, 2023).

La presente investigación tuvo el objetivo evaluar la actividad demodocida *in vitro*, concentración letal media (CL₅₀) y tiempo letal medio (TL₅₀), de los AE de rizomas de *Alpinia officinarum*, rizomas de *Zingiber officinale*, y semillas de *Eruca sativa*. Los resultados obtenidos contribuyen a la caracterización bioactiva de plantas culinarias con potencial aplicación en el tratamiento de las infecciones cutáneas asociadas a *Demodex spp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Aceites esenciales de Alpinia officinarum (AO) y *Zingiber officinale* (ZO)

El aceite de AO (Nombre del producto comercial: Galanga Oil) fue comprado en Hunan Nutramax Inc. China (Lote NMGAO-160316); mientras que el aceite de ZO (Nombre del producto comercial: Ginger Oil F.C.C.) se obtuvo del fabricante Charkit Chemical Corporation, China (Lote L130910).

Aceite esencial de semillas de Eruca sativa (ES)

Las semillas de ES fueron compradas a un distribuidor local (Fercon S.A, Yumbo, Colombia). La extracción del aceite de las semillas se realizó mediante hidrodestilación asistida por microondas en un equipo tipo Clevenger con reservorio de destilación Dean-Stark adaptado a un microondas convencional con potencia de salida 720 watt y frecuencia de radiación 2.5 GHz. La muestra (250 g

de semillas) se mezcló con 300 mL de agua destilada en un balón pyrex de 1 L y se sometió a extracción por 2 horas con intervalos de 10 min. El rendimiento de extracción se calculó a través de la relación del volumen de aceite esencial obtenido y la masa del material vegetal utilizado en la extracción.

Composición química de los AE

El perfil y cantidad relativa de los compuestos volátiles y semi-volátiles presentes en los aceites de AO, ZO y ES se determinaron mediante Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) en un equipo Agilent Technologies 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, Agilent Technologies 5973) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (full scan). La columna empleada fue DB-5MS [5%-fenilpoli (dimetilsiloxano), 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm] (J & W Scientific, Folsom, CA, EE. UU). La inyección se realizó en modo Split (50:1), Viny = 1 µL. Los compuestos determinados en la muestra de AE se identificaron con base en sus índices de retención de Van den Dool y Kratz y por comparación de los espectros de masas obtenidos y los almacenados en las bases de datos del “National Institute of Standards and Technology” (NIST).

Demodex spp

Los ácaros se obtuvieron de las pestañas de 35 pacientes adultos (35 - 60 años), con diagnóstico clínico de blefaritis, quienes ingresaron por consulta externa a la Fundación Clínica Oftalmológica Del Caribe (FOCA) en la ciudad de Barranquilla, Colombia. Todos los pacientes enrolados en el estudio firmaron consentimiento informado. La confirmación diagnóstica de infestación por *Demodex spp.*, se realizó bajo examen en lámpara de hendidura (Carl Zeiss, SL 130). A cada paciente se le retiraron dos pestañas por parpado, con una pinza relojero (Rumex), previa confirmación de la presencia de ácaros *Demodex* (Figura N° 1). Se obtuvieron entre 5 y 12 ácaros por pestaña, los cuales se depositaron en placas de poliestireno de seis pozos (Millipore Ref. N° 703001), que contenían 3 mL de solución salina isotónica (NaCl 0,9%p/v). Las muestras se almacenaron en una cámara de pruebas ambientales (SHEL LAB, Modelo HC30-R), a una humedad relativa del 90% y temperatura de 30°C, durante un tiempo máximo de 12 horas antes de la

realización de los bioensayos de actividad, de acuerdo con lo descrito (Maldonado *et al.*, 2021).

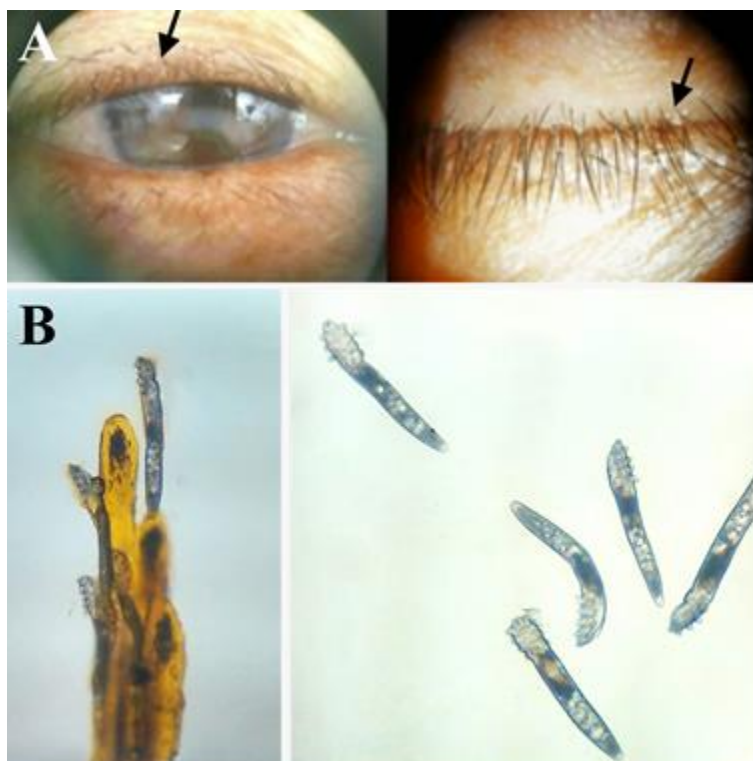


Figura N° 1

Ácaros *Demodex* spp., en paciente con diagnóstico de blefaritis A) presencia de caspa cilíndrica; B) formas adultas del *Demodex* spp.

Bioensayo demodocida

Se llevó a cabo un diseño experimental unifactorial completamente aleatorizado (Tabla N° 1). Todos los AE puros se diluyeron en el emoliente Cetiol V®

(Decyl Oleate, $C_{28}H_{54}O_2$), a la concentración especificada en el diseño.

Tabla N° 1

Diseño del experimento de actividad demodocida

Descripción de los Tratamientos:	Aceite esencial de <i>Alpinia officinarum</i> (AO) Aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i> (ZO) Aceite esencial de <i>Eruca sativa</i> (ES)
Variable Independiente:	Concentraciones de cada AE: - 1,0 % v/v - 0,5 % v/v - 0,25 % v/v - 0,125 % v/v
Número de Replicas	Tres por cada tratamiento
Variables respuestas: 2	Concentración letal media (CL ₅₀) Tiempo letal medio (TL ₅₀)
Número total de tratamientos por aceite	12

La evaluación de la actividad demodocida se realizó mediante prueba de contacto sobre láminas portaobjetos, con un número de ácaros por tratamiento de 35 ± 5 para el aceite de AO (N Total = 138 ácaros); 22 ± 3 para el aceite de ZO (N Total = 94 ácaros) y 40 ± 5 para el aceite de ES (N Total = 179 ácaros). Cada concentración del AE (5 μ L) se adicionó directamente al cuerpo de los ácaros adultos, seguido estos se observaron bajo la luz de un microscopio óptico Leica DM1000. El período de observación fue de 1 min cada 5 min durante 2 horas. Se monitoreo el efecto de cada uno de los aceites sobre el movimiento y la morfología del Demodex. Los indicadores de la muerte de los ácaros fueron: a) ausencia de movimiento de los apéndices (quelíceros) y patas durante un minuto; b) cambio de forma o fragmentación del cuerpo del ácaro. Como testigo (control negativo) de la prueba se usó únicamente Cetiol V. Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado bajo las mismas condiciones de temperatura (30°C) y humedad relativa del 90%.

Análisis estadísticos

Los resultados se presentaron como concentración letal media (CL₅₀) y tiempo letal medio (TL₅₀) por cada tratamiento. Las curvas de supervivencia de Demodex spp., se realizaron por el método de Kaplan-Meier y la prueba de log-rank. Los valores de CL₅₀ se determinaron mediante el modelo de regresión Probit con corrección de mortalidad mediante la fórmula de Abbott (1925). Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (k muestras) para establecer diferencias estadísticamente significativas entre las medias aritméticas, con un valor $p < 0.05$ estadísticamente significativo. Todas las pruebas se realizaron con el paquete estadístico SPSS

versión 21.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, USA) y Statgraphisc Centurion V21.

Consideraciones éticas

Todas las personas enroladas en el estudio fueron pacientes de la Fundación Clínica Oftalmológica del Caribe (FOCA), quienes firmaron consentimiento informado. La investigación fue aprobada por el comité de bioética de la fundación Universidad del Norte previo al estudio del cumplimiento de las normas internacionales de investigaciones biomédicas y buenas prácticas médicas; las disposiciones determinadas en la Ley 84 de 1989 y los lineamientos consignados en la resolución No. 008430 de 1993 expedida el Ministerio de Salud de Colombia.

RESULTADOS

Aceites esenciales (AE)

El rendimiento de extracción del AE de semillas de ES fue de 0,3% p/p, este aceite fue de apariencia translúcida y de color amarillo; la composición química determinada por CG-EM, reveló alto contenido de metabolitos azufrados (80,5% de isotiocianatos), nitrilos (13,2%) y terpenos (1,4%) (Tabla N° 2). Por su parte, el análisis químico volátil del AE de rizomas de AO identificó 17 compuestos con predominio de monoterpenos (77,5%), como: β -pineno (36,8%), α -pineno (17,9%), β -felandreno (12,7%) y limoneno (9,0%) (Tabla N° 3); mientras que en el AE de rizomas de ZO se identificaron 40 compuestos, en su mayoría sesquiterpenos (62,8%) como: α -zingibireno (26,6%), β -bisaboleno (9,9%), β -sesquifelandreno (9,6%) y trans- α -farneseno (9,3%) (Tabla N° 4). Los cromatogramas están disponibles en el material suplementario.

Tabla N° 2
Composición química mediante CG-EM del aceite esencial de semillas de *E. sativa*

N° pico	t _R	Compuesto	Cantidad relativa (%)
1	4,85	Disulfuro de carbono	3,7
2	12,61	Furfural	0,1
3	17,47	α -Pineno	0,1
4	18,14	Canfeno	0,1
5	19,38	β -Pineno	0,1
6	19,47	6-metil-5-heptem-2-ona	0,1
7	19,74	β -Mirceno	0,1
8	19,97	Compuesto azufrado derivado del isotiocianato, NI	0,1

9	21,57	Limoneno	0,1
10	21,66	β -Felandreno	0,1
11	21,86	1,8-Cineol	0,5
12	22,09	Fenilacetaldéhidó	0,1
13	26,81	Metil pentil isotiocinató	0,3
14	27,98	Compuesto azufrado NI	0,2
15	28,68	Metil-tio pentil nitrilo	13,2
16	29,81	Neral	0,1
17	30,83	Geranial	0,2
18	32,45	Compuesto azufrado derivado del isotiocinató, NI	0,2
19	38,34	Isotiocinató de 4-(metiltio) butilo	80,2
20	40,89	Compuesto azufrado, NI	0,4

tR: Tiempo de retención (min); NI: No identificado

Tabla N° 3

Composición química mediante CG-EM del aceite esencial de rizomas de *A. officinarum*

N° pico	t _R	Compuesto	Cantidad relativa (%)
1	17,26	α -Pino	17,9
2	17,97	Canfeno	0,4
3	19,31	β -Pino	36,8
4	19,57	β -Mirceno	0,4
5	20,40	α -Felandreno	0,2
6	20,85	α -Terpino	0,1
7	21,22	ρ -Cimeno	3,2
8	21,49	Limoneno	9,0
9	21,58	β -Felandreno	12,7
10	31,11	Trans-cinamaldehído	9,4
11	36,70	Trans- β -cariofileno	3,0
12	37,91	α -Humuleno	0,3
13	38,51	<i>ar</i> -Curcumeno	1,0
14	38,95	α -Zingibireno	3,2
15	39,11	α - <i>trans</i> -Farneseno	0,4
16	39,35	β -Bisaboleno	0,9
17	39,89	β -Sesquifelandreno	1,3

Tabla N° 4

Composición química mediante CG-EM del aceite esencial de rizomas de *Z. officinale*

N° pico	t _R	Compuesto	Cantidad relativa (%)
1	18,65	α -Pino	1,4
2	19,45	Canfeno	3,9
3	20,68	β -Pino	0,2

4	20,75	6-Metil-5-hepten-2-ona	1,0
5	20,99	β -Mirceno	0,7
6	21,87	α -Felandreno	0,2
7	22,86	Limoneno	0,9
8	22,97	β -Felandreno	3,0
9	23,04	1,8-Cineol	2,9
10	25,21	Terpinoleno	0,2
11	25,64	Linalool	0,5
12	27,73	Citronelal	0,2
13	28,80	Borneol	0,7
14	29,07	Terpinen-4-ol	0,2
15	29,58	α -Terpineol	0,5
16	30,50	Citronelol	1,0
17	31,06	Neral	4,1
18	31,38	Geraniol	1,0
19	32,13	Geranial	7,0
20	33,01	2-Undecanona	0,4
21	36,04	α -Copaeno	0,5
22	36,24	Acetato de geranilo	0,1
23	37,04	β -Elemeno	0,8
24	38,40	γ -Elemeno	0,3
25	38,92	Cis- β -Farneseno	0,2
26	39,64	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,4
27	40,01	<i>ar</i> -Curcumeno	6,1
28	40,27	Germacreno D	1,9
29	40,45	α -Zingibireno	26,6
30	40,59	Trans-Trans- α -Farneseno	9,3
31	40,85	β -Bisaboleno	9,9
32	41,26	δ -Amorfeno	0,5
33	41,36	β -Sesquifelandreno	9,6
34	41,45	Trans- γ -Bisaboleno	0,3
35	41,50	7-epi- α -Selino	0,4
36	42,16	Elemol	0,7
37	42,30	Trans-Nerolidol	0,7
38	43,28	Trans-Hidrato de sesquisabineno	0,3
39	44,46	10-epi- γ -Eudesmol	0,4
25	45,30	β -Eudesmol	0,7

Bioensayo acaricida

Una evaluación inicial del rango de concentración para el bioensayo acaricida permitió determinar que

concentraciones de AE > 1% v/v causaron muerte del 100% de los ácaros *Demodex spp* a los pocos minutos de exposición, observándose parálisis de las patas,

separación de los ácaros unidos a las pestañas, encogimiento y fragmentación del cuerpo del ácaro

(Figura N° 2).

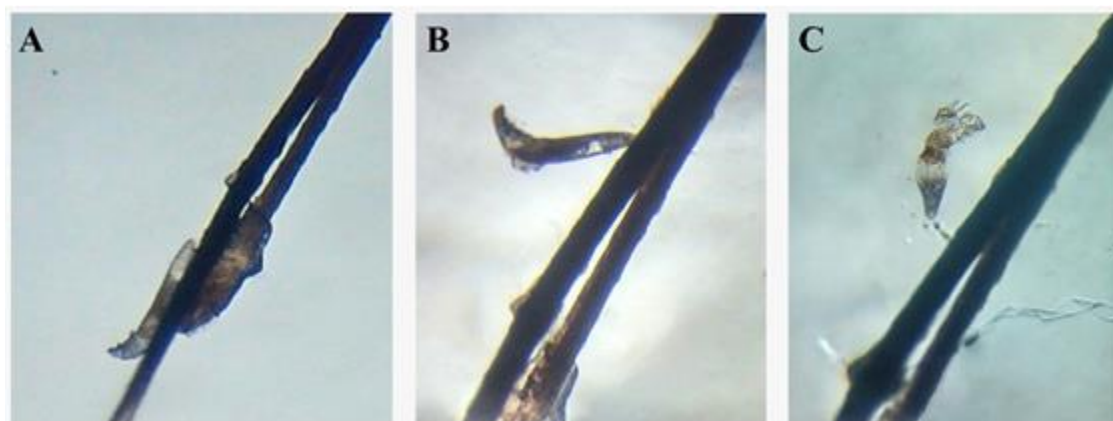


Figura N° 2

Microfotografía del efecto de los aceites esenciales sobre la morfología del ácaro *Demodex spp.* A) ácaro unido a las pestañas en el tiempo cero; B) ácaro separado de las pestañas y C) ácaro deshidratado y fragmentado después de 10 min de exposición al aceite de AO

Cuando se evaluaron concentraciones entre 0,125 - 1% v/v de cada AE, se observó aumento del TL₅₀ a medida que se disminuye las concentraciones del AE. Los mejores resultados se obtuvieron con el aceite de AO (TL₅₀ = 12 ± 2 min), seguido por el

aceite de ES (TL₅₀ = 14 ± 2 min) y ZO (TL₅₀ = 19 ± 3 min), a una concentración de AE del 1 %v/v. Para el caso de los aceites de ES y AO, no se observó diferencia significativa a concentraciones ≤ 0,25 %v/v (Tabla N° 5).

Tabla N° 5

Tiempo medio de muerte (TL₅₀) de *Demodex* en diferentes concentraciones de aceites esenciales

Concentración (%v/v)	TL ₅₀ - min (Media ± DE)		
	AO	ZO	ES
0,125	160 ± 67 ^{e*}	132 ± 35 ^d	54 ± 9 ^{bc}
0,250	20 ± 6 ^a	57 ± 2 ^c	22 ± 3 ^a
0,500	15 ± 4 ^a	40 ± 5 ^b	18 ± 2 ^a
1,000	12 ± 2 ^a	19 ± 3 ^a	14 ± 2 ^a

Los valores de la media seguidos por letras diferentes, dentro de cada columna, son significativamente diferentes según la prueba estadística de Kruskal-Wallis (valor $p < 0.05$)

A los 20 min de exposición, las mejores actividades biocidas se obtuvieron con el aceite de AO (CL₅₀ = 0,24%v/v; CL₉₀ = 0,42%v/v); seguido

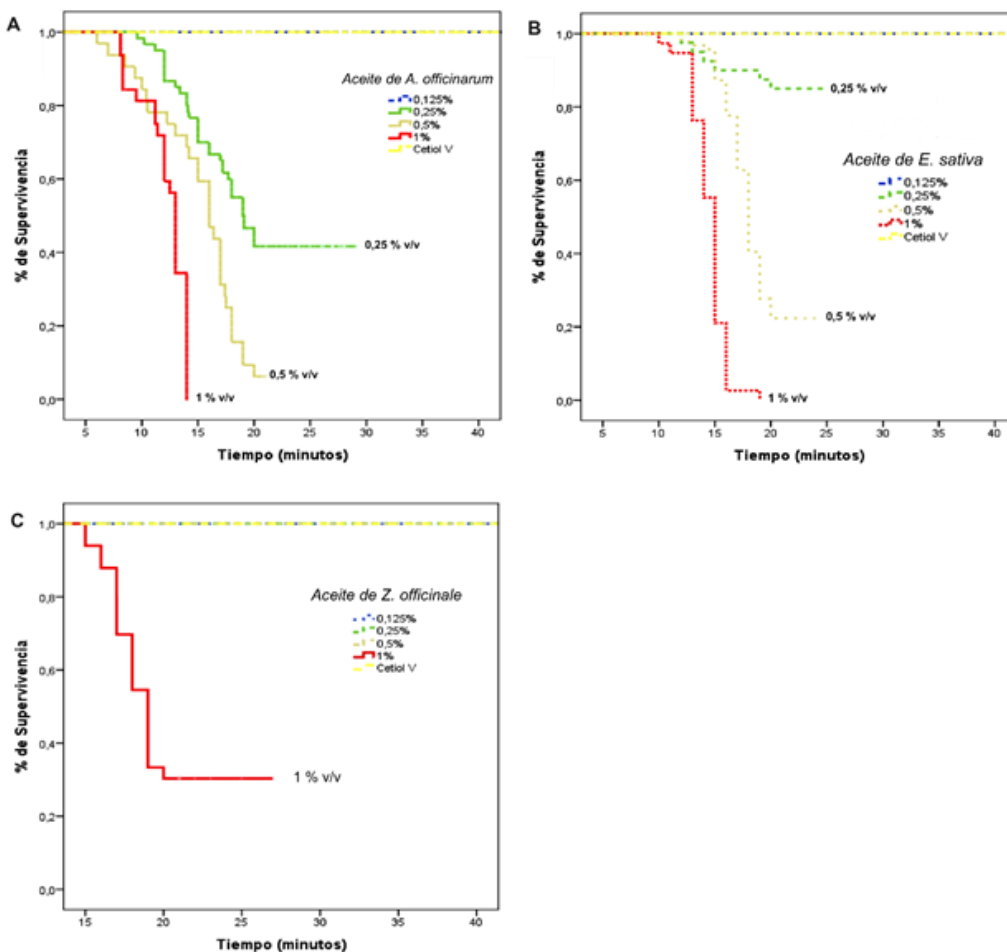
por el aceite de ES (CL₅₀ = 0,39%v/v; CL₉₀ = 0,57%); y el aceite de ZO (CL₅₀ = 0,96 %v/v; CL₉₀ = 1,06 %v/v) (Tabla N° 6).

Tabla N° 6
Resultados análisis Probit para la concentración letal de los aceites de
A. officinarum* (AO), *Z. officinale* (ZO) y *E. sativa* (ES) sobre *Demodex spp

Aceite	N°	b ± ES	R	r ²	CL ₅₀	CL ₉₀	ER	X ²	P
<i>AO</i>	137	-0,148 ± 0,176	-0,943	87,62	0,24 (0,20-0,28)	0,42 (0,36 – 0,54)	1,191–0,148/C	1,050	0,31
<i>ZO</i>	97	0,784 ± 0,060	0,976	94,59	0,96 (0,92-0,99)	1,065 (1,14 – 1,02)	-0,125+0,920*C ²	0,001	0,99
<i>ES</i>	179	0,559 ± 0,080	0,898	80,68	0,39 (0,35 – 0,43)	0,57 (0,53 – 0,65)	1,075+0,559*ln(C)	0,009	0,92

N° = número de ácaros por tipo de aceite; b = pendiente de la recta; R = coeficiente de correlación; r² = Porcentaje ajustado explicado por el modelo; CL = Concentración letal expresado en % y límites de Confianza; ER= ecuación del modelo de regresión; X² = Chi-cuadrado; P = significancia

Figura N° 4



Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de *Demodex spp* expuesta a los aceites esenciales de
A) *A. officinarum*; B) *E. sativa* y C) *Z. officinale*

La Figura N° 4 muestra la proporción acumulada de ácaros supervivientes a las diferentes concentraciones de aceite evaluadas, evidenciándose la influencia del tipo y concentración del aceite en la actividad demodocida (Log-rank analysis $p < 0,000$). Los porcentajes de supervivencia más bajos del Demodex se alcanzaron a las concentraciones 0,5 y 1,0% de los aceites de AO y ES; 100% de los ácaros murieron a la concentración del 1,0%. Con el aceite de ZO, el efecto acaricida solo se observó a la concentración del 1,0%, causando muerte del 72% de los ácaros.

DISCUSIÓN

Los AE son una mezcla compleja de compuestos volátiles de bajo peso molecular que desempeñan funciones protectoras contra patógenos en las plantas. A nivel experimental, existe suficiente evidencia que respalda el uso de los AE para contrarrestar un espectro amplio de microorganismos patógenos, como bacterias (Gheorghita *et al.*, 2022), hongos (Dumitrescu *et al.*, 2023) y ectoparásitos (Nardoni y Mancianti, 2022; Anholetto *et al.*, 2024). En la actualidad el AAT cuenta con buen número de estudios *in vitro* e *in vivo* que respaldan su actividad acaricida contra *D. folliculorum*, siendo usado en un amplio rango de concentraciones (2 – 100%) (Bezabh *et al.*, 2022). Aunque se ha informado de la eficacia demodocida de otros AE extraídos de plantas aromáticas, incluidos rizomas de AO y ZO, se desconocen las concentraciones y tiempos letales medios (CL_{50} y TL_{50}) (Liu *et al.*, 2015; Paichitrojjana y Chalermchai, 2023). Esta información es necesaria para definir la mejor relación entre la eficiencia y la seguridad de los AE, toda vez que algunos pueden ocasionar irritación y dermatitis de contacto.

Los AE incluidos en el presente estudio (AO, ZO y ES) causaron la muerte de los Demodex dentro de los 20 minutos posteriores a la exposición a una concentración del 1%. Este resultado indica el fuerte efecto letal *in vitro* de los AE, especialmente del AO ($TL_{50} = 12 \pm 2$ min) y ES ($TL_{50} = 14 \pm 2$ min) y en menor grado para el aceite de ZO ($TL_{50} = 19 \pm 3$ min). Estos tiempos superan a los informados para el AAT al 2% ($95,9 \pm 25,2$ min) (Bulut y Tanriverdi, 2021) y 2,5% ($54,0 \pm 6,1$ min) (Yurekli y Botsali, 2021). Un dato adicional, fue que los ácaros expuestos a los AE experimentaron los siguientes fenómenos: a) separación del ácaro unidos a las pestañas, b) parálisis de las patas y c) encogimiento

seguido de fragmentación por la parte central del cuerpo. Estos cambios se constituyen en evidencia sólida de que los aceites contienen por lo menos un compuesto acaricida potencialmente eficaz para matar el ácaro Demodex, que actúa tanto a nivel del sistema nervioso del ácaro y como agente deshidratante.

La actividad biocida de los AE está relacionada con su composición química, un ejemplo de esto son los terpenos presentes en el AAT. Tighe *et al.* (2013), reportó tiempos de supervivencia media para componentes de AAT en concentraciones entre 100 y 10%. Cuando se comparan los tiempos medidos de supervivencia del Demodex, a una misma concentración (por ejemplo, 25%), se evidencian diferencias en la potencia de cada compuesto: 4-terpineol ($8,3 \pm 3,1$ min), γ -terpineno (> 150 min), α -terpineno ($61,6 \pm 11,6$ min), α -terpineol ($22,8 \pm 3,9$) y 1,8-cineole ($23,5 \pm 3,9$ min). En otro estudio se comprobó la actividad demodocida de otro componente de AAT, el linalool, con tiempos medios de supervivencia de 10 min (rango: 5 - 21 min), a una concentración del 100% (Cheung *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta lo anterior la caracterización química de los aceites de ES, AO y ZO por CG-EM se utilizó, tanto para verificar la calidad de los AE usados, como para explorar la presencia de compuestos con potencial actividad biocida.

El aceite de las semillas de *E. sativa* mostró contenido mayoritario de isotiocianatos y nitrilos (93,7%), los cuales se originan por la hidrólisis de glucosinolatos que se acumulan en las semillas de ES (Pagnotta *et al.*, 2022). A la fecha existen pocos estudios experimentales sobre el uso acaricida de glucosinolatos o de plantas con alto contenido de glucosinolatos (Rehman *et al.*, 2018; Mehran *et al.*, 2019; Masoumi *et al.*, 2019; Claros-Cuadrado *et al.*, 2019); sin embargo, se conoce que los productos de su hidrólisis (isotiocianatos alifáticos y aromáticos) poseen fuerte actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de microorganismos patógenos (Ej: *Bacillus subtilis*, *Campylobacter jejuni*, *Candida sp.*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus lacti* y *Vibrio parahaemolyticus*, entre otros) (Abdel-Massih *et al.*, 2023). Los isotiocianatos también son reconocidos agentes acaricidas y repelente para algunas de especies de ácaros (Seifi *et al.*, 2018).

Para el caso del aceite de AO utilizado en el presente estudio, el análisis por CG-EM reveló mayoritariamente monoterpenos oxigenados, seguidos de hidrocarburos sesquiterpénicos, siendo los componentes más abundantes β -pineno, α -pineno, β -felandreno y limoneno, lo que es consistente con los aceites de rizoma de AO recolectados en la provincia de Gaozhou, China (Van et al., 2021). El aceite de ZO presentó mayoritariamente sesquiterpenos α -Zingibireno, β -Bisaboleno, β -Sesquifelandreno y Trans- α -Farneseno, estos compuestos son característicos de la mayoría de los aceites de ZO obtenidos de plantas originarias de países asiáticos, siendo el α -Zingibireno el componente predominante en la mayoría de los casos (cantidad relativa entre 10,3 - 40%) (Mahboubi, 2019; Zhang et al., 2022; Yu et al., 2022).

Si bien, se desconoce el mecanismo de acción acaricida de los aceites de AO y ZO, se plantea una posible asociación con el contenido de monoterpenos y sesquiterpenos. Por ejemplo, compuestos como el 1,8-cineol y el Terpinen-4-ol (presentes en el aceite de OZ) son reconocidos inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), una enzima que desempeña funciones clave en la neurotransmisión colinérgica de los vertebrados e invertebrados (Mills et al., 2004). Así mismo, otros terpenos como (-)-citronelal, limoneno y α -pineno (presentes en el aceite de AO y OZ) se han asociado con inhibición de AChE del ácaro de las plantas, el *Tetranychus urticae* Koch (Abdelgaleil et al., 2019). Otros compuestos monoterpenicos, reportados por su actividad anti-AChE de ácaros, son la pulegona, mentona, linalool y fenchona (Sánchez-Ramos y Castañera, 2000); así como, los compuestos timol, carvacrol, citral, eucaliptol y R-(-)-carvone, que exhibieron actividad acaricida contra el ectoparásito *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Cardoso et al., 2020). En otros casos, la actividad biocida contra ácaros fue

asociada con el bloqueo de la señalización del neurotransmisor inhibitorio GABA (ácido gamma-aminobutírico), por inhibición de la enzima transaminasa del GABA (GABA-T) (Abdelgaleil et al., 2019). El AE de rizomas de AO, contiene monoterpenos como el limoneno, α -pineno y trans-cinamaldehído, los cuales poseen actividad inhibitoria de AChE y GABA-T (Burçul et al., 2020).

CONCLUSIÓN

En la actualidad existe un interés creciente por minimizar el uso de moléculas sintéticas en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos; en este sentido, los productos naturales se visualizan como una alternativa viable para el desarrollo de formulaciones antiparasitarias de aplicación tópica. El presente estudio demostró que AEs de especies culinarias como AO, ZO y ES son una buena alternativa para controlar y destruir al ácaro *Demodex* causante de la blefaritis. Adicionalmente, se evidenció que la actividad acaricida depende del tipo de AE, la concentración y el tiempo de exposición, siendo los aceites de rizomas de AO y de semillas de ES los que presentaron mayor actividad anti-*Demodex in vitro*. Estudios futuros estarán dirigidos a identificar los compuestos responsables de la actividad demodocida en cada uno de los aceites y estudiar su mecanismo de acción. Al trabajar con los compuestos puros se minimiza la variabilidad en la potencia de los aceites debido a cambios en su composición química natural, asociada a la procedencia de la materia prima o a otros factores como métodos de extracción.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores del presente artículo son los inventores de la patente titulada "Compositions for Treating Infections Caused by the Mite *Demodex Spp*" WIPO IP PORTAL. Publication Number WO/2016/108070.

REFERENCIAS

- Abdelgaleil SAM, Badawy MEI, Mahmoud NF, Marei AEM. 2019. Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Pestic Biochem Physiol* 156: 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.02.006>
- Abdel-Massih RM, Debs E, Othman L, Attieh J, Cabrerizo FM. 2023. Glucosinolates, a natural chemical arsenal: More to tell than the myrosinase story. *Front Microbiol* 14: 1130208. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1130208>
- Anholeto LA, Blanchard S, Wang HV, Chagas ACS, Hillier NK, Faraone N. 2024. *In vitro* acaricidal activity of essential oils and their binary mixtures against *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis* 15: 102309. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2024.102309>

- Ávila MY, Martínez-Pulgarín DF, Rizo Madrid C. 2021. Topical ivermectin-metronidazole gel therapy in the treatment of blepharitis caused by *Demodex spp.*: A randomized clinical trial. **Cont Lens Anterior Eye** 44: 101326. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2020.04.011>
- Bezabh SA, Tesfaye W, Christenson JK, Carson CF, Thomas J. 2022. Antiparasitic activity of Tea Tree Oil (TTO) and its components against medically important ectoparasites: A systematic review. **Pharmaceutics** 14: 1587. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081587>
- Bulut A, Tanriverdi C. 2021. Anti-Demodex effect of commercial eyelid hygiene products. **Semin Ophthalmol** 36: 719 - 722. <https://doi.org/10.1080/08820538.2021.1897859>
- Burčul F, Blažević I, Radan M, Politeo O. 2020. Terpenes, phenylpropanoids, sulfur and other essential oil constituents as inhibitors of cholinesterases. **Curr Med Chem** 27: 4297 - 4343. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180330092607>
- Cardoso ADS, Santos EGG, Lima ADS, Temeyer KB, Pérez de León AA, Costa LM, Junior, Soares AMDS. 2020. Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. **Vet Parasitol** 280: 109090. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109090>
- Carriço E, Marchiori JJP, Holtz AM, Bolsoni EZ, Piffer ABM, Aguiar RL, Fontes PSF, Moreira RMG. 2023. *Eruca vesicaria* (Arugula) extract: Possible acaricidal effect against red palm mite. **Rev Gestão Social Amb** 18: e04468. <https://doi.org/10.24857/rgsa.v18n3-019>
- Cheung IMY, Xue AL, Kim A, Ammundsen K, Wang MTM, Craig JP. 2018. *In vitro* anti-demodectic effects and terpinen-4-ol content of commercial eyelid cleansers. **Contact Lens Anterior Eye** 41: 513 - 517. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2018.08.003>
- Chioveanu FG, Niculet E, Torlac C, Busila C, Tatu AL. 2024. Beyond the surface: understanding demodex and its link to blepharitis and facial dermatoses. **Clin Ophthalmol** 18: 1801 - 1810. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S440199>
- Chudzicka-Strugała I, Gołębowska I, Brudecki G, Elamin W, Zwoździak B. 2023. Demodicosis in different age groups and alternative treatment options: A review. **J Clin Med** 12: 1649. <https://doi.org/10.3390/jcm12041649>
- Claros Cuadrado JL, Pinillos EO, Tito R, Mirones CS, Gamarra Mendoza NN. 2019. Insecticidal properties of capsaicinoids and glucosinolates extracted from *Capsicum chinense* and *Tropaeolum tuberosum*. **Insects** 10: 132. <https://doi.org/10.3390/insects10050132>
- de Groot AC, Schmidt E. 2016. Tea tree oil: contact allergy and chemical composition. **Contact Dermatitis** 75: 129 - 143. <https://doi.org/10.1111/cod.12591>
- Ding P, Yang L, Feng C, Xian J. 2019. Research and application of *Alpinia officinarum* in medicinal field. **Chin Herbal Med** 11: 132 - 140. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2019.04.003>
- Dumitrescu E, Muselin F, Tîrziu E, Folescu M, Dumitrescu CS, Orboi DM, Cristina RT. 2023. *Pimpinella anisum* L. essential oil a valuable antibacterial and antifungal alternative. **Plants** 12: 2428. <https://doi.org/10.3390/plants12132428>
- Evren Kemer Ö, Karaca EE, Özek D. 2021. Efficacy of cyclic therapy with terpinen-4-ol in *Demodex blepharitis*: Is treatment possible by considering Demodex's life cycle? **Eur J Ophthalmol** 31: 1361 - 1366. <https://doi.org/10.1177/1120672120919085>
- Forton FMN. 2020. The pathogenic role of demodex mites in rosacea: A potential therapeutic target already in erythematotelangiectatic rosacea? **Dermatol Ther** 10: 1229 - 1253. <https://doi.org/10.1007/s13555-020-00458-9>
- Garg G, Sharma V. 2014. *Eruca sativa* (L.): Botanical description, crop improvement, and medicinal properties. **J Herbs Spices Med Plant** 20: 171 - 182. <https://doi.org/10.1080/10496475.2013.848254>
- Gheorghita D, Robu A, Antoniac A, Antoniac I, Ditu LM, Raiciu AD, Tomescu J, Grosu E, Saceleanu A. 2022. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils against four different microbial strains. **Appl Sci** 12: 9482. <https://doi.org/10.3390/app12199482>
- Helm CJ. 2022. Treatment of ocular Demodex infestation with topical ivermectin cream. **Am J Ophthalmol Case Rep** 26: 101551. <https://doi.org/10.1016/j.ajoc.2022.101551>
- Huang CX, Li H, Luo HQ, Fu QM, He BS, Bao MH. 2021. Essential oils for the treatment of demodex. In: Zhu

- T, Anpo M, Sharifi A, (Eds). E3S web of conferences. EDP Sciences.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202127104034>
- Jacob S, VanDaele MA, Brown JN. 2019. Treatment of Demodex-associated inflammatory skin conditions: A systematic review. **Dermatol Ther** 32: e13103. <https://doi.org/10.1111/dth.13103>
- Kairey L, Agnew T, Bowles EJ, Barkla BJ, Wardle J, Lauche R. 2023. Efficacy and safety of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil for human health: A systematic review of randomized controlled trials. **Front Pharmacol** 14: 1116077. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1116077>
- Kang MS, Park JH, Lee HS. 2022. Acaricidal potential of active components derived from *Alpinia galanga* rhizome oils and their derivatives against *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol** 86: 313 - 326. <https://doi.org/10.1007/s10493-022-00685-z>
- Karabay E, Çerman A. 2020. *Demodex folliculorum* infestations in common facial dermatoses: acne vulgaris, rosacea, seborrheic dermatitis. **Ann Bras Dermatol** 95: 187 - 193.
<https://doi.org/10.1016/j.abd.2019.08.023>
- Karakurt Y, Zeytun E. 2018. Evaluation of the efficacy of tea tree oil on the density of Demodex mites (Acari: Demodicidae) and ocular symptoms in patients with demodectic blepharitis. **J Parasitol** 104: 473 - 478.
<https://doi.org/10.1645/18-46>
- Lam NSK, Long XX, Li X, Yang L, Griffin RC, Doery JC. 2020. Comparison of the efficacy of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil with other current pharmacological management in human demodicosis: A systematic review. **Parasitology** 147: 1587 - 1613. <https://doi.org/10.1017/S003118202000150X>
- Li-Zhen A, Lan-Hui Y, Yao L, Hong-Fei L. 2022. Efficacy and safety of tea tree essential oil with different concentrations in the treatment of *Demodex blepharitis*. **Int Eye Sci** 12: 104 - 108.
<https://doi.org/10.3980/j.issn.1672-5123.2022.1.22>
- Liu J, Sun YS, Li CP. 2015. Volatile oils of chinese crude medicines exhibit antiparasitic activity against human Demodex with no adverse effects *in vivo*. **Exp Ther Med** 9: 1304 - 1308.
<https://doi.org/10.3892/etm.2015.2272>
- Luo Y, Sun YJ, Zhang L, Luan XL. 2016. Treatment of mites folliculitis with an ornidazole-based sequential therapy: A randomized trial. **Medicine** 95: e4173. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004173>
- Madreseh-Ghahfarokhi S, Pirali Y, Dehghani-Samani A, Dehghani-Samani A. 2018. The insecticidal and repellent activity of ginger (*Zingiber officinale*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) essential oils against *Culex theileri* Theobald, 1903 (Diptera: Culicidae). **Ann Parasitol** 64: 351 - 360.
<https://doi.org/10.17420/ap6404.171>
- Madreseh-Ghahfarokhi S, Dehghani-Samani A, Pirali Y, Dehghani-Samani A. 2019. *Zingiber officinalis* and *Eucalyptus globulus*, potent lethal/repellent agents against *Rhipicephalus bursa*, probable carrier for zoonosis. **J Arthropod Borne Dis** 13: 214 - 223.
- Mahboubi M. 2019. *Zingiber officinale* Rosc. essential oil, a review on its composition and bioactivity. **Clin Phytosci** 5: 6. <https://doi.org/10.1186/s40816-018-0097-4>
- Maldonado H, Mendoza D, Garavito G, Lizarazo M, Escaf L, Egea E. 2021. Enhancing survival of *Demodex folliculorum* (Acari: Demodicidae) under *in vitro* conditions: Effect of temperature and culture media. **Persian J Acarol** 10: 491 - 499. <https://doi.org/10.22073/pja.v10i4.69561>
- Mao QQ, Xu XY, Cao SY, Gan RY, Corke H, Beta T, Li HB. 2019. Bioactive compounds and bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Foods** 8: 185. <https://doi.org/10.3390/foods8060185>
- Masoumi M, Moharramipour S, Ayyari M. 2019. Acaricidal activity of *Eruca sativa* seed oil and its methanolic extract on *Tetranychus urticae* (red form). **J Entomol Soc Iran** 39: 81 - 92.
<https://doi.org/10.22117/jesi.2019.122732.1248>
- Mehran R, Ramin K, Saeid M. 2019. Insecticidal activity of *Artemisia sieberi*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Thymus persicus* and *Eruca sativa* oils against German cockroach, *Blattella germanica* (L.). **J Asia-Pacific Entomol** 22: 1090 - 1097. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.08.013>
- Mills C, Cleary BJ, Gilmer JF, Walsh JJ. 2004. Inhibition of acetylcholinesterase by Tea Tree oil. **J Pharm Pharmacol** 56: 375 - 379. <https://doi.org/10.1211/0022357022773>
- Mongi F, Laconte L, Casero R. 2018. Demodex genus: colonizing parasites of healthy people or mites associated

- with ocular pathology? **Rev Arg Microbiol** 50: 369 - 373. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.09.002>
- Nardoni S, Mancianti F. 2022. Essential oils against *Sarcoptes scabiei*. **Molecules** 27: 9067. <https://doi.org/10.3390/molecules27249067>
- Pagnotta E, Ugolini L, Matteo R, Righetti L. 2022. Bioactive compounds from *Eruca sativa* Seeds. **Encyclopedia** 2: 1866 - 1879. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2040129>
- Paichitrojjana A, Paichitrojjana A. 2022. Successful treatment of ivermectin refractory demodicosis with isotretinoin and permethrin cream. **J Am Acad Dermatol** 26: 98 - 100. <https://doi.org/10.1016/j.jocr.2022.06.017>
- Paichitrojjana A, Paichitrojjana A. 2023. Case series of demodicosis in acne vulgaris patients. **Clin Cosmet Invest Dermatol** 16: 3363-3368. <https://doi.org/10.2147/CCID.S441581>
- Paichitrojjana A, Chalermchai T. 2023. Comparison of in vitro killing effect of Thai herbal essential oils, tea tree oil, and metronidazole 0.75% versus ivermectin 1% on *Demodex folliculorum*. **Clin Cosmet Invest Dermatol** 16: 1279 - 1286. <https://doi.org/10.2147/CCID.S414737>
- Rehman S, Shahzad B, Bajwa AA, Hussain S, Rehman A, Cheema SA, Abbas T, Ali A, Shah L, Adkins S, Li P. 2018. Utilizing the allelopathic potential of *Brassica* species for sustainable crop production: A review. **J Plant Growth Regul** <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9798-7>
- Ruttanaphan T, de Sousa G, Pengsook A, Pluempanupat W, Huditz HI, Bullangpoti V, Le Goff G. 2020. A novel insecticidal molecule extracted from *Alpinia galanga* with potential to control the pest insect *Spodoptera frugiperda*. **Insects** 11: 686. <https://doi.org/10.3390/insects11100686>
- Salem DA, El-Shazly A, Nabih N, El-Bayoumy Y, Saleh S. 2013. Evaluation of the efficacy of oral ivermectin in comparison with ivermectin-metronidazole combined therapy in the treatment of ocular and skin lesions of *Demodex folliculorum*. **Int J Infect Dis** 17: e343 - e347. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.11.022>
- Sánchez-Ramos I, Castañera P. 2000. Acaricidal activity of natural monoterpenes on *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), a mite of stored food. **J Stored Prod Res** 37: 93 - 101. [https://doi.org/10.1016/s0022-474x\(00\)00012-6](https://doi.org/10.1016/s0022-474x(00)00012-6)
- Sarac G, Cankaya C, Ozcan KN, Cenk H, Kapicioglu YK. 2020. Increased frequency of *Demodex blepharitis* in rosacea and facial demodicosis patients. **J Cosmet Dermatol** 19: 1260 - 1265. <https://doi.org/10.1111/jocd.13150>
- Savla K, Le JT, Pucker AD. 2020. Tea tree oil for *Demodex blepharitis*. **Cochrane Database Syst Rev** 6: CD013333. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013333.pub2>
- Seifi R, Moharramipour S, Ayyari M. 2018. Acaricidal activity of different fractions of *Moringa peregrina* on two spotted spider mites *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Ind Crops Prod** 125: 616 - 621. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.031>
- Tighe S, Gao YY, Tseng SC. 2013. Terpinen-4-ol is the most active ingredient of Tea Tree Oil to kill Demodex mites. **Transl Vis Sci Technol** 2: 2. <https://doi.org/10.1167/tvst.2.7.2>
- Van HT, Thang TD, Luu TN, Doan VD. 2021. An overview of the chemical composition and biological activities of essential oils from *Alpinia* genus (Zingiberaceae). **RSC Adv** 11: 37767 - 37783. <https://doi.org/10.1039/d1ra07370b>
- Yan Y, Yao Q, Lu Y, Shao C, Sun H, Li Y, Fu Y. 2020. Association between demodex infestation and ocular surface microbiota in patients with *Demodex blepharitis*. **Front Med** 7: 592759 <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.592759>
- Yu DX, Guo S, Wang JM, Yan H, Zhang ZY, Yang J, Duan JA. 2022. Comparison of different drying methods on the volatile components of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by HS-GC-MS coupled with fast GC E-Nose. **Foods** 11: 1611. <https://doi.org/10.3390/foods11111611>
- Yurekli A, Botsali A. 2021. The comparative *in vitro* killing activity of tea tree oil versus permethrin on *Demodex folliculorum* of rosacea patients. **J Cosmet Dermatol** 21: 2268 - 2272. <https://doi.org/10.1111/jocd.14701>
- Wong FF, Abdullah MO, Hii YR, Chang SY, Wahab NA, Yun HAH, Jaafar MZ, Ag A. 2023. A preliminary investigation of China ginger and Kuching local ginger species: Oil extracts and synthesis towards potential greener insect repellent. **J Nat Pest Res** 6: 100061. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100061>
- Zhang S, Zhang L, Yu M, Luo D, Chen S, Liu W, Zhang Y, Zhang L, Zhao T. 2022. Essential oils of *Zingiber*

officinale: Chemical composition, *in vivo* alleviation effects on TPA induced ear swelling in mice and *in vitro* bioactivities. **Front Nutr** 9: 1043175. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1043175>

Zhong J, Tan Y, Li S, Peng L, Wang B, Deng Y, Yuan J. 2019. The prevalence of *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in cylindrical dandruff patients. **J Ophthalmol** Article 8949683: 1 - 7. <https://doi.org/10.1155/2019/8949683>