

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS DE *Melinis minutiflora*, EFECTO
IXODICIDA Y REPELENCIA (*in vivo e in vitro*) SOBRE LARVAS *Amblyomma*
cajennense

TESIS

Presentada como requisito parcial para la obtención del grado de:
Maestría en Ciencias en el Área de Ciencias Zootécnicas y Veterinarias

PRESENTA:

PRIMITIVO GABRIEL IRIARTE DEL HOYO

Xalisco, Nayarit, Junio 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
Posgrado en Ciencias Biológicas Agropecuarias y
Pesqueras

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado CBAP-UAN
P R E S E N T E

Asunto: Voto aprobatorio, solicitud examen de Maestría

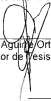
Con base al reglamento del Posgrado en Ciencias Biológicas Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, le informo que se ha revisado el trabajo de Tesis de Maestría del MVZ. **Primitivo Gabriel Iriarte del Hoyo**, titulado:

"Identificación de compuestos químicos de *Melinis minutiflora*, efecto ixodicida y repelencia (*in vivo* e *in vitro*) sobre larvas *Amblyomma cajennense*"


Que presenta el candidato, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS ZOOTECNICAS Y VETERINARIAS, motivo por el cual, se considera que el documento cumple con los requisitos para ser discutido en el examen de defensa de Tesis. Por lo anterior expuesto, se otorga el voto aprobatorio.

Se extiende la presente a los 14 días de Mayo de 2013, para los trámites administrativos que al interesado convengan.


ATENTAMENTE
Comité tutorial:



Dr. Jorge Aguilar Ortega
Director de Tesis




Dr. Sergio Martínez González
Asesor



Dr. José Lenin Loya Olguín
Asesor



Dr. Alejandro Ángel Gómez Danés
Asesor



Dr. Ricardo Rafael Ulta Castañeda
Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS Y PESQUERA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/109/13

Xalisco, Nayarit; 16 de mayo de 2013

Ing. Alfredo González Jáuregui
Director de Administración Escolar
Presente.

Con base al oficio de fecha 14 de mayo de 2013, enviado por los **CC. Dr. Jorge Aguirre Ortega, Dr. Sergio Martínez González, Dr. José Lenin Loya Olguín, Dr. Alejandro Ángel Gómez Dánes y Dr. Ricardo Rafael Ulloa Castañeda**, donde se nos indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza al **C. Primitivo Gabriel Iriarte del Hoyo**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

"Por lo Nuestro a lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado



C.c.p.-Expediente.

JDGP/ref.

DEDICATORIA

A mi madre; Marisela Iriarte, quien con su amor, ejemplo, esfuerzo y sacrificio me han mostrado el camino y me han enseñado que las pequeñas cosas hacen grandes hombres.

A Yasmin, quien con su amor, confianza y respeto me ha permitido soñar y confiar en el futuro.

A Gael y Rafael, que a pesar del tiempo no dedicado, cada momento me expresan su amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Aguirre Ortega, por la amistad, consejo y gran colaboración durante estos años de estudio. Por la acertada dirección de este trabajo y de mi plan de estudios.

A mis asesores, que me guiaron en todo momento, ayudándome a salir de mis tropiezos y estimulándome en los aciertos: Dr. Sergio Martínez González, Dr. Alejandro A. Gómez Danes, Dr. J. Lenin Loya Olguin, Dr. Ricardo Ulloa Castañeda.

Al Dr. Jorge Molina Torres, del Laboratorio de Fitobioquímica, Departamento de Biotecnología y Bioquímica CINEVESTAV Unidad Irapuato, Guanajuato, México; por las facilidades otorgadas al permitirme realizar las pruebas de Cromatografía y Espectrometría de masa así como su interpretación y poder tomar las mejores decisiones para enriquecer la información de esta investigación.

A Dr. Manuel Fernández Ruvalcaba, por donación de la semilla de *Melinis minutiflora* y apoyo en estadia realizada en laboratorio del CENID-Parasitología Veterinaria de Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria, Jiutepec, Morelos, México.

Al CONACYT, ya que con su apoyo fue primordial para lograr esta investigación.

A Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández, del Cuerpo Académico de Investigación en Bioquímica de Universidad Autónoma de Nayarit; por su ayuda incondicional en los procesos de obtención de los extractos, indispensables para la realización de esta investigación.

Al personal del Laboratorio de Resistencia y Taxonomía de Garrapata, del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nayarit, en especial al MVZ Francisco Ruíz Dimas, por su ayuda en la obtención e identificación de la garrapata *Amblyomma cajennense*, en localidades de del Municipio de Tepic y Santiago Ixcuintla, Nayarit.

RESUMEN

En el área tropical y subtropical, uno de los principales problemas zoonosarios que afecta principalmente a la producción bovina, es la garrapata, además trasmite las enfermedades Anaplasmosis y Babesiosis. El objetivo del estudio fue identificar los componentes químicos en los extractos de tallo y hoja del pasto *Melinis minutiflora*, así como evaluar la actividad repelente al nivel *in vitro* e *in vivo* y el efecto ixodicida contra larvas de garrapata *Amblyomma cajennense*. Los datos obtenidos de repelencia *in vitro* y mortalidad de larvas fueron analizados y transformados por la función de Arco seno; en tanto la prueba *in vivo* consistió en la recuperación de larvas adheridas por el método de Franela en los tiempos (7, 14, 21 días de post-infestación) en parcelas de pastos (tratamientos) *Melinis minutiflora*, *Andropogon gayanus*, *Brachiaria brizantha* y *Cenchrus ciliaris*, los resultados de cuatro tratamientos y seis repeticiones se analizaron en PROC GLM, la prueba de medias se comparó por Tukey ($P < 0.05$), mediante el paquete estadístico (SAS, 2002). *M. minutiflora* mostró el mayor efecto repelente ($P < 0.05$) por la menor cantidad de larvas recuperadas (2.41 ± 1.26) que el resto de pastos, en *C. ciliaris* (600.89 ± 131.74), *A. gayanus* (72.48 ± 63.24) y *B. brizantha* (57.32 ± 53.90), no se presentó diferencia ($P > 0.05$) entre estos dos últimos pastos. Las diferencias ($P < 0.05$) en repelencia fueron observadas en los tres periodos de muestreo. El extracto del tallo y las hojas del *Melinis minutiflora* obtenido con el solvente orgánico etanol, mostraron efecto repelente y acaricida en el orden de 72 a 78% y 77 a 84%, respectivamente, el mayor efecto acaricida corresponde al extracto de hoja. Asimismo fueron identificados 12 compuestos químicos para tallo y 7 para hoja por cromatografía de gases. Los de mayor abundancia en tallo y hoja fueron el Acido 1,2-Benzenedicarboxílico (33.42% y 59.44%) y Dibutil ftalato (34.45% y 25.23%, respectivamente). Se concluye que los componentes químicos presentes en *M. minutiflora* poseen efecto repelente y acaricida en larvas de *A. cajennense*.

Palabras clave: Efecto repelente, *Melinis minutiflora*, *Amblyomma cajennense*, ixodicida, compuestos químicos.

ABSTRACT

In tropical and subtropical regions, one of the main zoonotic problem that affect livestock productivity, mainly cattle, are ticks, which, transmit diseases such as Anaplasmosis y Babesiosis, also. The objective of this study was to identify the extracts chemical compounds of leaves and stems of *Melinis minutiflora* grass, as well as, repellent activity evaluation *in vivo* and *in vitro* and ixodicide effect against larvae of tick *Amblyomma cajennense*. Data obtained from *in vitro* repellency and mortality of larvae trials were analyzed and processed by the arc function. *In vivo* trial consist in larvae recovery from different grasses (Treatments: *Melinis minutiflora*, *Andropogon gayanus*, *Brachiaria brizantha* and *Cenchrus ciliaris*) by Flannel method at 7, 14, 21 days post-infestation. Each treatment had six replicates. Results were analyzed using PROC GLM, when significant difference ($P < 0.05$) between the treatments was detected, means were compared by Tukey test (SAS, 2002). *M. minutiflora* showed the strongest repellence against larvae ($P < 0.05$) since a smaller amount of larvae (2.41 ± 1.26) was recovered, compared to other grasses, *C. ciliaris* (600.89 ± 131.74), *A. gayanus* (72.48 ± 63.24) and *B. brizantha* ($57.32 \text{ in.} \pm 53.90$). No difference ($P > 0.05$) was found between *Andropogon gayanus*, and *Brachiaria brizantha*. Repellence differences ($P < 0.05$) were observed on three sampling times. Extract of steams and leaves of *Melinis minutiflora* obtained with etanol showed repellent and ixodicide effect ranging between 72 - 78% and 77 -84%, respectively. Leaves extract showed greater ixodicide effect. 12 and 7 compounds were identified by GLPC from steam and leaves respectively. Leaves and steams had same predominant compounds: 1,2-Benzenedicarboxylic acid (33.42% and 59.44%, in leaves and steams, respectively) and Dibutyl italato (34.45% and 25.23%, in leaves and steams, respectively). It is concluded that chemical compounds present in *M. minutiflora* have repellent and acaricide effect against *A. cajennense* larvae.

Key words: Repellent effect, *Melinis minutiflora*, *Amblyomma cajennense*, ixodicida, chemical compounds.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
CONTENIDO	viii
INDICE DE CUADROS	xi
INDICE DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS E HIPOTESIS	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. La garrapata <i>Amblyomma cajennense</i>	4
3.2. Ciclo biológico de la garrapata <i>Amblyomma cajennense</i>	4
3.3. Técnicas de recolección de larvas	6
3.4. Deterioro en el animal	6
3.5. Métodos de control	7
3.5.1. Uso de productos químicos	7
3.5.2. Manejo de control no químico	7
3.6. Plantas forrajeras con propiedades contra la garrapata	9
3.6.1. Gramíneas con propiedades de repelencia a garrapata	9
3.6.2. Comparación de forrajeras anti-garrapatas	10
3.7. Mecanismo de defensa de las plantas	13
3.8. Solventes para la extracción de aceites esenciales y su efecto en garrapata	14
3.9. Identificación de los componentes de los aceites esenciales	15
3.10. Aplicación de Técnica de Paquete de larvas y Prueba de Olfactómetro	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. Localización experimental	17

4.2.	Características del material experimental	17
4.3.	Preparación y obtención de material y extractos para aceites esenciales de <i>M. minutiflora</i> e identificar compuestos químicos	19
4.3.1.	Incubación de garrapatas y obtención de larvas (<i>A. cajennense</i>)	21
4.4.	Metodologías de Bioensayos en contextos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	23
4.4.1.	Investigación de etapa experimental 1, efecto de pastos <i>M. minutiflora</i> , <i>A. gayanus</i> , <i>B. brizantha</i> y <i>C. ciliaris</i> a garrapata <i>A. cajennense</i> en ambiente <i>in vivo</i>	23
4.4.2.	Investigación de etapa experimental 2, análisis de compuestos químicos de <i>M. minutiflora</i> por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM)	25
4.4.3.	Investigación de etapa experimental 3, evaluar repelencia (olfatómetro) en larvas de <i>A. cajennense</i> de aceites esenciales en <i>M. minutiflora</i> en medio <i>in vitro</i>	27
4.4.4.	Investigación de etapa experimental 4, efecto ixodicida en larvas de <i>A. cajennense</i> sobre los aceites esenciales en <i>M. minutiflora</i> en condición <i>in vitro</i>	29
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
5.1.	Etapa experimental 1. Evaluación de actividad antigarrapata de pastos <i>M. minutiflora</i> , <i>A. gayanus</i> , <i>B. brizantha</i> y <i>C. ciliaris</i> sobre larvas de <i>A. cajennense</i> .	31
5.2.	Etapa experimental 2. Composición química e identificación de aceites esenciales por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) en <i>M. minutiflora</i> .	35
5.3.	Etapa experimental 3, repelencia en larvas <i>A. cajennense</i> de aceites esenciales de <i>M. minutiflora</i> .	39
5.4.	Etapa experimental 4, actividad ixodicida en larvas de <i>A. cajennense</i> con extractos de <i>M. minutiflora</i> .	42

6. CONCLUSIONES	46
7. REFERENCIAS	47

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medias de número de larvas <i>A. cajennense</i> adheridas a franela (Prueba de Barrido) en tres tiempos de muestreo (post-infestación) en pastos.	32
Cuadro 2. Condiciones Climáticas de sitio experimental en Mora, Nayarit, México, al realizar Prueba de Barrido (octubre 2011).	32
Cuadro 3. Compuestos químicos identificados por CG-EM, a partir de extracto de tallo y hoja de <i>Melinis minutiflora</i> .	36
Cuadro 4. Medias de repelencia de larvas de <i>Amblyomma cajennense</i> con extracto etanólico en <i>Melinis minutiflora</i> .	40
Cuadro 5. Medias de mortalidad de larvas <i>Amblyomma cajennense</i> referidas a extractos de tallo y hoja de <i>M. minutiflora</i> y el testigo.	42

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de ciclo evolutivo de *Amblyomma cajennense* 1. Primer huésped, 2. Segundo huésped, 3. Tercer huésped. A. Macho adulto; B. Hembra adulta; C. Hembra ovigera; D. Huevo; E. Huevo con embrión; F. Huevo con larva; G. Eclosión; H. Larva en ayuno; I. Larva alimentándose; J. Larva en el suelo muda; K. Ninfa; L. Ninfa parásita; M. Muda en la ninfa; N. Adulto en ayuno. Tomado de Quiroz (1994). 5
- Figura 2. Distribución de las parcelas experimentales, tratamientos y repeticiones. 18
- Figura 3. Siembra de cada pasto (*Melinis minutiflora*, *Brachiaria brizantha*, *Andropogon gayanus*, *Cenchrus ciliaris*), en parcelas asignadas al azar. 19
- Figura 4. Corte de uniformización a 40 cm de altura y 90 días de siembra de pastos o tratamientos. 20
- Figura 5. Proceso de extracción con calor utilizando equipo Soxhlet. 21
- Figura 6. Colecta de huevecillos de *A. cajennense*, pesaje de 250 mg (en aprox. 5000 larvas). 22
- Figura 7. Prueba de Barrido en unidad de muestreo con método de Franela en tratamientos de *M. minutiflora*, *A. gayanus*, *B. brizantha* y *C. ciliaris*. 24
- Figura 8. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890^a y detector de masas selectivo Agilent Technologies No.5975C utilizado en la detección de componentes de *M. minutiflora*. 26
- Figura 9. Cristal-olfactómetro en forma de Y empleado en pruebas de repelencia en tratamientos de Tallo y Hoja de *M. minutiflora*. 28

Figura 10. Conteo de larvas muertas y vivas, previa aplicación de extracto etanólico de <i>M. minutiflora</i> .	30
Figura 11. Figura 11. Media de larvas <i>A. cajennense</i> adheridas a la franela (Prueba de Barrido) de los tres tiempos 7, 14, 21 días post-infestación.	33
Figura 12. Figura 12. Media de larvas <i>A. cajennense</i> colectadas por la técnica de Barrido a los 7, 14 y 21 días de postinfestación en parcelas experimentales.	34
Figura 13. Bioensayo de repelencia de larvas <i>Amblyomma cajennense</i> con extractos de tallo y hoja de <i>M. minutiflora</i> en solvente etanol a 99.5%.	39
Figura 14. Media de larvas repelidas con tubo-Y Olfactómetro, utilizando extractos de órganos de pasto <i>M. minutiflora</i> .	40
Figura 15. Porcentaje de mortalidad de larvas <i>A. cajennense</i> relacionadas al extracto de tallo y hoja de <i>M. minutiflora</i> .	42
Figura 16. Media de larvas muertas, utilizando extractos de tallo y hoja de <i>M. minutiflora</i>	43

1. INTRODUCCIÓN

En las zonas tropical y subtropical a nivel mundial, el principal problema zoonosario de la ganadería bovina son las garrapatas y las enfermedades que transmiten como la Anaplasmosis y Babesiosis (Quijada *et al.*, 2005). En México se estima que estos ácaros producen infestaciones, pérdida de peso, bajo rendimiento productivo, daño a la piel y pérdidas de los vacunos por aproximadamente 48 millones de dólares (USD) anuales, y a nivel mundial cerca de 7,000 millones de dólares (Rodríguez *et al.*, 2011).

Ante este impacto económico negativo de las garrapatas en general, en México la especie mayormente investigada a sido *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, siendo el principal género bajo combate y control en el país investigado, sin embargo la especie *Amblyomma* es considerado el segundo problema de importancia (Quijada *et al.*, 2005). La distribución geográfica de *Amblyomma cajennense* es en la zona tropical, templada y árida en México en 609,857 Km², que representa el 31%; *R. (B.) microplus* se distribuye en 1,043,772 Km², que equivale al 53.0% del área nacional; y *R. annulatus* muestra mayor afinidad por la zona árida y templada en una superficie aproximada de 539,087 Km², siendo el 27.0% del país (Álvarez *et al.*, 2007; Rodríguez, 2006; Moissant *et al.*, 2002).

El principal método de control de la garrapata es la aplicación de acaricidas químicos, sin embargo, el uso frecuente e indiscriminado de este tipo de pesticidas ha favorecido el desarrollo de cepas de ácaros resistentes a éstos, además de impactar negativamente al medio ambiente, además de provocar la presencia de residuos químicos en los alimentos de origen animal (Murgueitio *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2008; Linares, 2008; Rodríguez, 2005).

Con el fin de minimizar este problema, en años recientes el uso de medidas de control no químico ha recibido especial atención, con la idea de favorecer el desarrollo de programas de control integrado. Entre estas opciones no químicas se

encuentra, la aplicación de medidas de modificación del hábitat, uso de razas resistentes, quema controlada, control biológico y las plantas con características anti-garrapatas (Kaaya, 2000; Quiroz, 2000).

Los metabolitos secundarios son sustancias químicas producidas por algunas especies de plantas para su defensa, comunicación y reproducción, teniendo estas cualidades específicas de acuerdo a su ruta biosintética, entre ellas, el efecto contra garrapata y otros parásitos (Iriarte *et al.*, 2012; Avalos, 2009; Vivanco *et al.*, 2005; Prates *et al.*, 1998).

El pasto gordura (*Melinis minutiflora*), forrajera que crece en zonas tropicales y subtropicales, caracterizada por secretar una oleorresina por sus tricomas en las hojas y tallos, los cuales son responsables de un fuerte olor a melaza; el ganado al inicio no le agrada el consumo por el olor, pero se adapta y lo consume en buena medida, siendo esta secreción propicia del efecto antigarrapata que ahuyenta o repele; además de presentar el efecto ixodicida a las garrapatas, especialmente a las larvas, reportado en la literatura como característica de este pasto, efecto que ha sido evaluado en la garrapata *R. (B.) microplus* y *Rhipicephalus appendiculatus* en bioensayos realizados en parcelas y laboratorio, a través de la presencia de un compuesto químico volátil como posible responsable del efecto repelente, donde se cree necesario realizar investigación del efecto del pasto gordura sobre la garrapata *A. Cajennense*, siendo esta garrapata junto con *R. (B.) microplus* las especies de mayor importancia económica y productiva (Iriarte *et al.*, 2012; Muro *et al.*, 2004, Hernández *et al.*, 1989).

El propósito de esta investigación fue la identificación de los compuestos químicos de *Melinis minutiflora*, asimismo evaluar el efecto ixodicida y repelente (*in vivo* e *in vitro*) sobre larvas *Amblyomma cajennense*.

2. OBJETIVOS E HIPOTESIS

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto repelente e ixodicida de los componentes químicos presentes en *Melinis minutiflora* sobre la garrapata *Amblyomma cajennense*.

Objetivos específicos

1. Comparar el efecto repelente de respuesta del pasto *M. minutiflora*, *Andropogon gayanus*, *Brachiaria brizantha*, y *Cenchrus ciliaris* sobre *A. cajennense* en condiciones *in vivo*.
2. Extraer e identificar los compuestos químicos del pasto gordura con efecto repelente relacionado a *A. cajennense*.
3. Medir la acción repelente en larvas de *A. cajennense* de los aceites esenciales de *Melinis* en ambiente *in vitro*.
4. Valorar el efecto ixodicida de los aceites esenciales de *M. minutiflora* sobre larvas *A. cajennense* en medio *in vitro*.

HIPOTESIS

Los compuestos químicos presentes en pasto gordura (*Melinis minutiflora*) tienen un efecto repelente e ixodicida en la garrapata *Amblyomma cajennense*.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. La garrapata *Amblyomma cajennense*

El género *Amblyomma* corresponde a artrópodos de la clase Arácnida, subclase Acari, orden Parasitiforme, suborden Ixodida, súper familia Ixodoidea y familia Ixodidae, del cual existen identificadas más de 33 especies entre las que se destaca la especie *A. cajennense*, descrita por Fabricius en 1787 (Linares, 2008).

Esta garrapata debe utilizar una serie de adaptaciones que le permitan asegurar la sobrevivencia, ya que por el continuo cambio de hospederos se genera amplias pérdidas, el problema es superado porque la hembra oviposita alrededor de 3,500 huevecillos. También la distribución espacial en el hospedero es considerada como un factor importante, ya que es posible fijarse en sitios que son de difícil acceso al hospedero, como la región perianal, inguinal, axilar, cuello y cabeza. Esta especie está también limitada a factores ambientales como temperatura y humedad, que oscila entre los 25 - 28°C y entre los 80 - 90% de humedad relativa, aunque estos datos son variables (Rodríguez, 2006; Moissant *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2000).

3.2. Ciclo biológico de la garrapata *Amblyomma cajennense*

El ciclo biológico de la garrapata *Amblyomma cajennense*, se caracteriza por ser heteroxena que requiere de tres hospederos (Osorio *et al.*, 2012; Souza, 2011), con una duración que varía de 235-1416 días, dependiendo de las condiciones ambientales. El ciclo biológico consiste en una serie de cambios metamórficos y consta de 4 estadios: huevo, larva, ninfa y adulto, como se muestra en la figura 1.

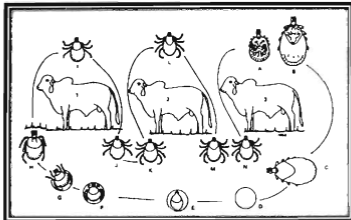


Figura 1 Esquema de ciclo evolutivo de *Amblyomma cajennense* 1. Primer huésped, 2. Segundo huésped, 3. Tercer huésped. A. Macho adulto; B. Hembra adulta; C. Hembra ovígera; D. Huevo; E. Huevo con embrión; F. Huevo con larva; G. Eclosión; H. Larva en ayuno; I. Larva alimentándose; J. Larva en el suelo muda; K. Ninfa; L. Ninfa parásita; M. Muda en la ninfa; N. Adulto en ayuno. Tomado de Quiroz, (1994).

Estas fases se dividen en los siguientes ciclos. 1) La fase no parasita, que comprende cuando la hembra se encuentra llena de sangre en el ambiente, dividiéndose en cinco periodos: preoviposición, oviposición, post-oviposición, incubación y eclosión. 2) La fase de encuentro, es el proceso de transferencia de las larvas de la vegetación al hospedero, que percibe dos periodos: pasivo y búsqueda, en el pasivo es un estímulo posterior a la eclosión de la larva, y en el espacio de búsqueda, éstas dependen de su reserva para sobrevivir y detectar desde la parte superior de las plantas. A partir de aspectos de comportamiento y fisiológicos, el movimiento del cuerpo de los animales hace que aumente su actividad, cuando son estimuladas por el desprendimiento del dióxido de carbono (CO_2), ácido butírico y láctico, amoníaco (a partir de desechos de origen animal), calor, sombra y las vibraciones, éstos hacen que adopten una posición particular al sostenerse en las

dos patas posteriores y extendiendo el par anterior para tratar de adherirse al posible hospedero. 3) En la fase parasítica, es donde se completa el ciclo biológico de la garrapata, localizándose ninfas y adultos (Bissinger, 2010; Álvarez, 2008; Álvarez, 2007; Rodríguez, 2006; Muro *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2003).

3.3. Técnicas de recolección de larvas

De acuerdo a Fernández (1996), comparó cuatro técnicas de recolección de larvas en parcelas infestadas artificialmente, dos técnicas de arrastre, la de bandera de un solo recorrido y bandera de doble recorrido, más dos técnicas con CO₂, una de plato con hielo seco y otra barril con hielo seco, obteniendo el mejor resultado con la técnica de arrastre de bandera en doble recorrido, ya que se recolectó la mayor cantidad de larvas.

3.4. Deterioro en el animal

La picadura de garrapatas de *Amblyomma cajennense* puede producir dolor, irritación e inquietud de los animales, parálisis por la neurotóxicas contenidas en su saliva, pérdida considerable de peso como consecuencia de un abundante parasitismo (se estima que para completar su ciclo, se ingiere de 1 a 3 mL de sangre), e incluso genera un cuadro de anemia. Son factores predisponentes de infecciones secundarias y pueden transmitir microorganismos causales de Fiebre de Q (*Coxiella burnetii*), Tularemia (*Francisella tularensis*), o la Fiebre manchada de las montañas rocosas (*Rickettsia rickettsii*), en México se le reporta como transmisora mecánica de Anaplasmosis y Brucelosis (Quijada *et al.*, 2005).

La acción patógena anterior descrita repercute en el estado de salud del hospedero, en menor o mayor magnitud, dependiendo del grado de infestación, estado nutricional y raza del ganado, entre otros factores este daño es expresado en pérdida de peso y reducción de leche en hembras lactantes, principalmente (Castelblanco *et al.*, 2013).

3.5. Métodos de control

El control está basado casi exclusivamente en la aplicación de garrapaticidas en la fase de vida parasita en el animal (donde está cerca el 5% de la población de parásitos), siendo que en los pastos existe una gran población disponible (alrededor del 95%) para infestar o reinfestar al hospedador (Saueressig, 2002).

3.5.1. Uso de productos químicos

En el control químico, el método más eficiente para el control de garrapatas es la utilización de productos químicos a una frecuencia de tratamientos variables, dependiendo del nivel de infestación de los animales. Los productos químicos se agrupan en familias que presentan similitud en su estructura química y sitio de acción; sin embargo se presentan diferencias en cuanto al sitio de acción entre parásitos de diferentes géneros, siendo muy pocos los que tienen acción cruzada. El método químico utilizado como herramienta de control, se puede utilizar considerando varias estrategias: la aplicación y formulación del producto, la selección depende de la costumbre de los productores, recursos disponibles y el impacto económico al sistema productivo.

Actualmente existen en el mercado seis grupos de productos químicos para el control de garrapatas en México: los Organofosforados, Piretroides, Amidinas, Endectocidas, Fenilpirazolonas e Inhibidores del desarrollo. Además se encuentran las mezclas de éstos, de los cuales se recomienda a los productores un uso apropiado para no generar resistencia del ácaro (Rodríguez, 2006).

3.5.2. Manejo de control no químico

Limpieza mecánica de la vegetación. En el control no químico está la limpieza mecánica del pastizal, el corte de la vegetación reduce la densidad de garrapatas de un 50 a 85% por hectárea, esta práctica podría ser utilizada para el control de *Amblyomma cajenense*, que como ya mencionamos, garrapata muy abundante en

medios nativos de zonas tropicales y subtropicales del país. Se ha observado que la aplicación de herbicidas en la vegetación foliar de porte bajo es menos eficaz a la limpieza mecánica del control de la garrapata, siendo más efectiva para la etapa de larva (Fernández, 1999).

Quema controlada. El fuego afecta directamente a las garrapatas por la exposición que sufren a altas temperaturas los estados de larva, hembra adulta y huevecillo, indirectamente tiene un efecto por la destrucción de la capa de vegetación que le sirve de protección a la garrapata (Rodríguez, 2006).

Rotación de potreros. El fundamento de este sistema es impedir que las garrapatas en su forma de larva activa, encuentren al hospedero para que sucumban por inanición, el sistema de rotación necesita el descanso obligado de las pasturas, por espacio de tiempo que varía de acuerdo al lugar, índice de agostadero y cantidad de garrapatas, pero por lo general no va más allá de 3 meses; sin embargo existe cierta inconformidad para utilizar este sistema por considerarlo que hay pérdida de pastura, lo que resulta cierto, porque es necesario evaluar los costos de mantener algunos potreros altamente infestados de garrapata y otros sostenidos en límite tolerable y conveniente (Fernández, 1999).

Razas resistentes. La resistencia en el ganado, el uso de animales resistente a la garrapata se puede lograr por la selección de éstos, a los que se les note menos población y su posterior cruzamiento con otros animales con la misma característica; además de introducir el encaste del *Bos indicus*, ello dependerá de las necesidades del tipo de explotación (Frish, 1999, Fernández, 1999).

Plantas anti-garrapata. Se ha descrito que varias especies de garrapatas dependen no solamente de la presencia de vegetación de tamaño menor, como los pastos, ya que el matorral y maleza lo requieren para mantener su balance hídrico; también se emplea a las plantas como plataforma para aumentar la posibilidad de alcanzar al animal susceptible de ser parasitado, esta relación puede ser utilizada por plantas

que interfieren con la etapa del encuentro entre la garrapata y hospedero, y principalmente en vacunos al utilizar plantas que tengan propiedades antigarrapatas (Castelblanco *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2004a).

3.6. Plantas forrajeras con propiedades contra la garrapata

Ensayos realizados en plantas forrajeras determinó que *Melinis minutiflora*, *Andropogon gayanus*, *Bracharia brizantha*, *Hiparrhenia rufa* y las leguminosas *Stylosanthes humilis* S. *hamata*, *Gynandropsis ginandra*, *Leucaena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum* presentan efecto de repelencia al exponer la garrapata al forraje (Fernández, 2004a; Muro *et al.*, 2004; Gohole *et al.*, 2003; Lwande *et al.*, 1999; Prates *et al.*, 1998; Mwangi *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 1989; Hernández *et al.*, 1982; Thompson *et al.*, 1978).

Cabe mencionar que estudios realizados en otras plantas como *Dyospiros anisandra*, se ha demostrado la propiedad repelente (Rosado *et al.*, 2008), la revisión de Williams (1996), describe el potencial de control con varios extractos y compuestos aislados de tallo y hojas del árbol Nim, experimentos de laboratorio y campo revelaron que el extracto de la arborea es toxico para más de 400 especies de insectos y ácaros plaga, citando especialmente a *R. (B.) microplus* y *Amblyomma cajennense*, algunos de los cuales han desarrollado resistencia a los pesticidas convencionales.

3.6.1. Gramíneas con propiedades de repelencia a garrapata

Existen gramíneas forrajeras tropicales y subtropicales que tienen la característica de repeler o atrapar a larvas de garrapata que afectan al ganado bovino en pastoreo, en particular larvas de *Rhipicephalus (B.) sp.* y *Amblyomma sp.*, entre éstas refieren a los pastos: gordura, insurgentes, llanero y jaragua. El efecto antigarrapata de gramíneas se debe a diferentes motivos, por ejemplo el pasto jaragua ofrece temperatura y humedad desfavorables para el desarrollo de larvas, afectando la

sobrevivencia de éstas. El zacate gordura se caracteriza por secretar una oleorresina por sus largos y numerosos tricomas en sus hojas y tallos, es responsable de un fuerte olor a melaza, secreción que propicia el efecto repelente, que ahuyenta a la larva impidiendo que ascienda a la punta del pasto para esperar al hospedero. La planta de insurgentes a través de sus vellos pequeños y finos que proliferan del macollo, genera una secreción densa con olor característico que repele las larvas. El llanero le corresponde el efecto por alta densidad de largas vellosidades no glandulares, que se manifiesta mejor en plantas maduras de 6 meses (Fernández *et al.*, 2004a; Muro *et al.*, 2004; Cruz, 2000; Prates *et al.*, 1998).

3.6.2. Comparación de forrajeras anti-garrapatas

Muro *et al.* (2003), demostró que las leguminosas forrajeras *Stylosanthes humilis* y *S. hamata*, presentan propiedades de repelencia a larvas de *Boophilus microplus*, oscilando en un 68 - 92% para *S. humilis* y 70 - 82% para *S. hamata*, de acuerdo a ensayo *in vitro*. Por su parte Fernández *et al.* (2004b), efectuaron una comparación *in vivo* de cuatro leguminosas infestándolas durante cinco estaciones con larvas de *R. (B.) microplus*, se implementaron 24 parcelas de 35 m², separación de 1 m entre ellas, cada parcela con cinco subparcelas de 5 x 1 m de ancho, pasillo de 0.5 m de ancho entre subparcelas, se infestó con 5000 larvas, utilizándose para la recolección de larvas la "Técnica de Bandera" a los 7, 14 y 21 días posteriores a infestación en cada época, lográndose la importancia que las cuatro leguminosas manifiestan el efecto repelente.

Fernández *et al.* (2004a), al realizar comparación anti-garrapata en dos pastos, gordura (*Melinis minutiflora*) y llanero (*Andropogon gayanus*) hacia *R. (B.) microplus*, se utilizó como control el pasto buffel (*Cenchrus ciliaris*), el estudio realizado durante tres años (estaciones) en parcelas establecidas, se infestaron con 5000 larvas, en la recolección de larvas se empleó el Método de Barrido con una manta, se contaron las larvas adheridas y se mostró que *M. minutiflora* y *A. gayanus* manifestaron el

efecto repelente, donde *M. minutiflora* expresó un mayor resultado de repelencia ($P < 0.05$) en tres estaciones de otoño consecutivas.

Estudio de Cruz (2000), evaluó el efecto repelente contra larvas de *Boophilus microplus* en pasto *Andropogon gayanus* y el testigo el pasto *Cenchrus ciliaris*, se efectuó en cuatro infestaciones con 10,000 larvas a diferentes edades de las plantas a 3, 6, 9, y 12 meses de edad en parcelas de 4.8 m², el resultado fue a través de la recuperación de larvas en parcelas por el método de bandera, periodo de cuatros semanas después de la infestación, se obtuvo repelencia en *A. gayanus* únicamente en plantas maduras de 6 meses de edad o más, teniendo una respuesta altamente significativa ($P < 0.01$) con respecto al control *C. ciliaris*.

Lwande *et al.* (1999), efectuó comparación de repelencia frente a *Rhipicephalus appendiculatus* en compuesto comercial N,N-dietiltoluamide y sustancias químicas del vegetal *Gynandropsis gynandra*, el procedimiento de extracción de aceite esencial fue por hidrodestilación, la identificación de los compuestos por cromatografía líquida de aceites volátiles, combinada por cromatografía de gases-espectrometría de masas de aceite volátil, el extracto se evaluó en bioensayos de repelencia, el resultado expresó el efecto aditivo de los compuestos químicos de *G. gynandra*, la mayor repelencia fue en producto comercial, además la mayor proporción fue en carvacrol (29.2%), *trans*-fitol (24.0%), linalol (13.3%), *trans*-2-metilciclopentanol (7.2%) y β -cariofileno (4.4%), los de mayor repelencia fueron *m*-cimeno, nonanal, 1- α -terpineol, β -ciclocitral, nerol, *trans*-geraniol, carvacrol, β -ionona, *trans*-geranilacetona y nerolidol.

De acuerdo con Aparecido *et al.* (2010), el aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* a concentración de 50%, e igual para *Cymbopogon nardus* presentó un efecto acaricida en larvas de *Amblyomma cajennense* de 53.1% y 61.1%, respectivamente; además en *Anocentor nitens* el aceite esencial de *C. nardus* al 50% con misma concentración que *Eucalyptus citriodora* se reportó el 100 % de mortalidad en *A. cajennense*. Por su parte Bissinger (2010), afirma que hay productos naturales con

propiedad repelente contra mosquitos y garrapata, a base de monoterpeneo (para-metano-3,8-diol) en conjunto con citronelol, citronela, geraniol, isopulegol y delta pineno en el árbol de goma de Australia (*Corymbia citriodora*), el 2-undecanona (metil-nonil) fue aislado a partir de tricomas glandulares en tomate silvestre *Lycopersicon hirsutum*, se presentó la mayor repelencia en prueba de papel filtro en especies de *Amblyomma sp* y *Dermacentor sp* en 98.1% hacia DEET (N, N-dietil-3-metilbenzamida). Igualmente el ácido graso dodecanoico (láurico) fue evaluado en el coco y almendra, se presentó repelencia de 86.5% en bioensayos contra garrapata *Ixodes ricinus* (Ferreira, 2011).

Bioensayo realizado por Velázquez *et al.* (2011), demuestra un efecto acaricida de extractos vegetales a diferentes concentraciones, se presentó un 100% de mortalidad a larvas de *R. (B.) microplus*, en la identificación de compuestos del aceite esencial se atribuye el resultado acaricida en los vegetales de estudio: en comino (cuminaldehído al 22.03%, γ -terpineno 15.69%, 2-Caren-10 12.89%), en pimienta de Jamaica (metilo eugenol 62.7%, y eugenol 8.3%), en albahaca (linalol 30.61% y estragol 20.04%), esta planta sin efecto repelente. Por su parte Silveira *et al.* (2007), evaluó el efecto acaricida de componentes químicos: timol, mentol, ácido salicílico y salicilato de metilo a *R. (B.) microplus*, en tres concentraciones (0.25, 0.5, y 1.0%), cinco repeticiones mediante prueba de paquete de larvas, obteniéndose para timol una tasa de mortalidad de 100% y para los demás de 0.52 a 9.76% respectivamente.

También Carroll *et al.* (2007), realizó bioensayo de repelencia ensayando dos terpenoides aislados de *Callicarpa americana* (*Lamiaceae*) en contra de ninfas de *Ixodes scapularis* y garrapata *Amblyomma americanum*, los terpenoides calicarpenal e intermedeol a concentración de 155 nmol/m² mostró repelencia de 98 y 96% hacia *I. scapularis*, respectivamente y para *A. americanum* de 20 y 40%.

3.7. Mecanismo de defensa de las plantas

Se han localizado cerca de 3000 metabolitos secundarios de origen vegetal con actividad biológica sobre distintos organismos, los compuestos fotoquímicos comprenden amplia variedad de estructuras químicas, se mencionan los terpenoides, alcaloides, compuestos fenólicos, azufrados, iridoides, esteroides, entre otros (Mareggian, 2001).

Metabolitos primarios. Al conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en organismo vegetal componen su metabolismo, la mayor parte del carbono, nitrógeno y energía culminan en elementos de las células, necesarios para el funcionamiento de los organismos, se refiere a aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos en las plantas que desempeñan funciones denominadas metabolitos primarios (Ávalos, 2009).

Metabolitos secundarios. Al conjunto de reacciones químicas que efectúan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas, a partir de otras más simples, también se conocen para degradar complejas y obtener las simples; las plantas son organismos autótrofos que además del metabolismo primario tienen metabolismo secundario, les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa, a los compuestos derivados del metabolismo secundario se nombran metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas que realizan funciones ecológicas, se caracterizan por diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Ávalos, 2009; Acosta *et al.*, 2007).

Metabolitos secundarios de tricomas. Los metabolitos secundarios de tricomas de varias especies vegetales juegan un papel importante en la protección fitosanitaria contra insectos, se agrupan monoterpenos con características insecticidas. Estudio de Prates *et al.* (1998), atestiguan actividad acaricida con procedimiento descrito por Stone y Haydock (1962), se manifiesta que el aceite esencial de *M. minutiflora* tuvo

una mortalidad de 100% al contacto ante las larvas en tiempos diferentes, se mostró que 1,8-Cineol, Hexanol y Citronelol fueron letales al tiempo de 5 min, β -pinene mostró letalidad a 10 min, linalol a 15 minutos, isopinocampone a 45 min y alcanfor a los 60 min. los principales componentes fueron ácido propiónico (43.0%) y monoterpenoide 1,8-cineol (10.6%).

3.8. Solventes para la extracción de aceites esenciales y su efecto en garrapata

El método de extracción por destilación ha sido utilizado por varios investigadores, pero el solvente ha variado entre ellos, Muro *et al.* (2004) manejaron como mejor elección la acetona en *M. minutiflora*; Muro *et al.* (2003), emplearon el hexano en la extracción de leguminosas (*Stylosanthes humilis* y *S. hamata*); Sutherst *et al.* (1982), manejaron el metanol para extracción del aceite esencial de *Stylosanthes*; Calle (1983), aplicó el éter de petróleo en *M. minutiflora*; Prates *et al.* (1998), utilizaron el solvente éter dietil en *M. minutiflora*, por lo que el uso de solventes distintos revela una cantidad diversa de compuestos químicos identificados en la cromatografía y espectrometría.

Al respecto De Souza (2003), midió la sensibilidad de la garrapata *R. (B.) microplus* a los solventes: alcohol metílico, etílico, acetona, DMSO, acetato de etila, mistura de triton y xilol, utilizando técnicas de sensibilidad en papel impregnado, inmersión de larvas y sumersión de garrapatas ingurgitadas, donde se obtuvo la menor mortalidad en papel impregnado e inmersión, el solvente alcohol etílico tuvo el menor efecto garrapaticida con 3.9% de mortalidad.

Rodríguez *et al.* (2009), analizaron el efecto de *Rhipicephalus (B.) microplus* en extractos alcohólicos de cinco plantas con diferente método de extracción y distintas diluciones, por la técnica de lixiviación se tuvo una eficacia en diluciones de 5:10 en tabaco, caso inverso para extractos alcohólicos en vegetales: *Bidens pilosa* (chipaca), *Brugmasia arbórea* (borrachero), *Sambucus nigra* (sauco) y *Ambrosia*

cumanenses (altamisa), que no fueron efectivos con la técnica Soxhlet, se observó eficacia hasta la dilución de 7.5:10 en altamisa, de 5:10 (borrachero), y 2.5:10 en tabaco, habiendo mortalidad de 80%, 60% y 85%, respectivamente. No obstante a que los extractos de chipaca y sauco no fueron eficaces, se tomó como mínimo efectivo la mortalidad del 60%, los extractos de plantas utilizadas tuvieron el efecto ixodocida, aunque solo en algunos casos, ya que la mortalidad no alcanza el mínimo de eficacia, además los extractos de tabaco, borrachero y chipaca mostraron más validez cuando fueron analizados por la técnica Soxhlet.

Elango (2011), al realizar extractos alcohólicos de plantas por método Soxhlet, utilizándolos contra *R. (B.) microplus* obtuvo un 100% de mortalidad con la prueba de paquete de larvas, en los extractos manejó como solvente orgánico metanol en *A. marmelos*, *A. lineata*, *A. paniculata*, *C. hirsutus*, *E. próstata*; similar procedimiento empleó Tobón (2011) con metanol en método Soxhlet para la extracción en *M. minutiflora*. De igual forma Goncalves *et al.* (2007), demostraron en pruebas de paquete de larvas e inmersión de adultas de *R. (B.) microplus*, que el solvente acetona produce una mortalidad de 100% para los solventes metanol y solo etanol el resultado de 45.3 y 14.2%, respectivamente.

3.9. Identificación de los componentes de los aceites esenciales

Muro *et al.* (2004), estudiaron la identificación de compuestos químicos en *M. minutiflora* por cromatografía de gases acoplado al espectrómetro de masas, equipado con selector de masas número 5973, para la separación cromatográfica se utilizó una columna capilar (HP núm. 19091-433, 30 m x 0.2 mm), cubierta con metil siloxano (0.25 µm de grosor) y helio como gas de arrastre. La temperatura inicial de 150°C y máxima de 325°C, tiempo inicial de tres minutos y gradiente de 4°C por minuto, un tiempo total de 60.5 minutos a una presión de 13.28 psi.

La identificación con cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas que realizaron Prates *et al.* (1998) en *M. minutiflora*, fue un método diferente al

efectuado por Muro (2004), con equipo Hewlett-Packard 5890 HP, columna capilar de número (30 m x 0.2 mm y diámetro interno 0.25 µm), donde se aplicó helio como gas de arrastre, en fase estacionaria SE-54, temperatura inicial de 50 a 180°C, gradiente de 4°C por minuto, en seguida 20°C/min hasta 250 °C, y detector de masas con modelo HP 5971. Así como en la identificación de compuestos en planta *Gynandropsis ginandra* se manejó distinto cromatógrafo de gases, siendo acoplado al espectrómetro de masas (Lwande *et al.*, 1999).

3.10. Aplicación de Técnica de Paquete de larvas y Prueba de Olfactómetro

Para la prueba de paquete de larvas (PPL) se ha empleado como bioensayo para evaluar la eficacia de compuestos sintéticos y extractos de origen natural relativo a la garrapata, técnica que adoptada por la FAO como una principal prueba de diagnóstico de resistencia en garrapata, consiste en exponer larvas en superficie de papel filtro, previamente impregnado con ixodicidas, la mortalidad larval se cuantifica 24 horas después de su exposición (Rosado *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2006; Stone, 1962). Por su parte la técnica de repelencia por medio de tubo de cristal con forma de Y-olfactómetro, ha sido empleada para evaluar la repelencia de larvas de garrapata en extractos vegetales diferentes, donde la han evaluado Muro *et al.* (2004), Gohole *et al.* (2003), Muro *et al.* (2003), Lwande *et al.* (1999), Mwangi *et al.* (1995), y Ndungu *et al.* (1995).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización experimental

Etapa experimental 1. Evaluación de repelencia (Prueba de Barrido) en los pastos: *M. minutiflora*, *Andropogon gayanus*, *Brachiaria brizantha* y *Cenchrus ciliaris* a larvas de *A. cajennense*, efectuándose en sitio del Ejido de Mora del municipio de Tepic, Nayarit, con ubicación geográfica a 21°, 29' LN y 104°, 53' LO.

Etapa experimental 2. Extracción e identificación a nivel *in vitro* de aceites esenciales en *M. minutiflora*, la obtención de extractos se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Nayarit, la ubicación geográfica de 21°, 29' LN y 104°, 53' LO. El proceso de identificación de compuestos químicos se realizó en el Laboratorio de Fitobioquímica del Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV Unidad Irapuato, la ubicación geográfica a 20°, 40' LN y 101°, 20' LO.

Etapa experimental 3. La prueba de repelencia se realizó en Laboratorio de Resistencia y Taxonomía en Garrapata del Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de Nayarit, ubicado en Tepic, Nayarit, la ubicación geográfica de 21°, 31' LN y 104°, 54' LO y altitud de 920 m.

Etapa experimental 4. La prueba ixodocida, también se realizó en mismo Laboratorio con localización y ubicación geográfica ya descrita.

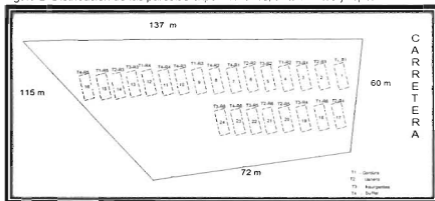
4.2. Características del material experimental

La semilla del pasto gordura (*Melinis minutiflora*) se obtuvo del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), instalaciones del INIFAP en el estado de Morelos, siendo empleada en sitio experimental descrito para su establecimiento al inicio del período de lluvias, en julio del 2011. Además del gordura se establecieron otros pastos: insurgentes (*Brachiaria*

brizantha), llanero (*Andropogon gayanus*) y buffel (*Cenchrus ciliaris*), se obtuvo la semilla en casa comercial, donde se mantuvieron libres de maleza para su desarrollo.

Para la asignación de parcelas experimentales y tratamientos, el terreno fue preparado con labores de barbecho, rastreo y surcado, se emplearon estacas para demarcar las 24 parcelas de 35 m² cada una, a distancia entre ellas de 1 m. Los pastos o tratamientos y sus repeticiones fueron asignados aleatoriamente, como se muestra en la Figura 2 de localización en el terreno, los tratamientos: (T₁ gordura, T₂ llanero, T₃ insurgentes y T₄ buffel), seis repeticiones cada uno, cada parcela con cinco unidades de muestreo (5 m de largo X 1 m de ancho), pasillos de 0.5 m entre ellas y la unidad de muestreo se conformó por 3 surcos.

Figura 2. Distribución de las parcelas experimentales, tratamientos y repeticiones.



El establecimiento de los pastos en parcelas experimentales fue al inicio del período de lluvias, antes descrito. Asignadas las unidades de muestreo en las parcelas y previo a la siembra, se realizó prueba de germinación de la semilla para su viabilidad, la siembra fue manual a chorrillo poco denso, depositándose en fondo del surco, cobertura de suelo de la semilla (5 cm), densidad de semilla de 12 kg/ha de los

zacates y distancia entre surcos (ver la figura 3) de 25 cm (Fernández *et al.*, 2004; Aguirre *et al.*, 2001). Se utilizó fertilización básica (100-50-50 Kg de Nitrógeno-Fosforo-Potasio de NPK/ha), aplicándose el 50% del nitrógeno y demás nutrientes al inicio de siembra, el resto del N a 45 días después de siembra, además se aplicó Paratión metílico al 3% para el control de hormigas, las plantas estuvieron desarrolladas a los 90 días para evaluar la biomasa forrajera en las pruebas en condiciones de *in vivo* e *in vitro* (Fernández *et al.*, 2004).



Figura 3. Siembra de cada pasto (*Melinis minutiflora*, *Brachiaria brizantha*, *Andropogon gayanus*, *Cenchrus ciliaris*), en parcelas asignadas al azar.

4.3. Preparación y obtención de material y extractos para aceites esenciales de *M. minutiflora* e identificación de compuestos químicos.

La prueba para condiciones *in vivo*. Al inicio del otoño se realizó un corte de uniformización de los pastos o tratamientos, a 40 cm de altura y 90 días de fecha de siembra, para uniformizar (observar figura 4) la distancia de recorrido de larvas infestadas en prueba de Barrido por el método de Bandera (Fernández *et al.*, 2004b).



Figura 4. Corte de uniformización a 40 cm de altura y 90 días de siembra de pastos o tratamientos

La preparación de pruebas en medios *in vitro*. La obtención de extractos para evaluar los aceites esenciales en *M. minutiflora* se realizó posterior a 90 días de siembra y crecimiento de plantas, se tomaron muestras por triplicado, formándose dos tratamientos para esta variable (T_1 Tallo, y T_2 Hoja), previo al proceso de extracción se fraccionó el forraje (tallo y hoja), se pesaron 50 g de cada muestra e iniciándose la preparación del equipo Soxhlet, se colocó un papel filtro (Whatman No.1) en parte del extractor del equipo, luego de colocarse la muestra correspondiente del pasto, se vertieron 150 mL del solvente etanol a 96% en el matraz del equipo, lista la muestra en equipo Soxhlet, se procedió una hora para el primer reflujo y dejándose 2 horas más hasta efectuar 4 reflujo por muestra, el procedimiento fue a 80°C. En seguida se vació el extracto crudo en frasco ámbar, se almacenó a 4°C hasta siguiente procedimiento. Los extractos se concentraron por evaporación del solvente en equipo denominado Roto evaporador (ACME®) a temperatura 40 a 50°C, cada muestra se cuantificó para tener el pesaje de extracción. A continuación cada muestra fue resuspendida en 50 mL en solvente etanol a 99.5%, se colocaron en frascos ámbar

para la prueba de ensayo *in vitro*, su análisis se llevó a cabo en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas.

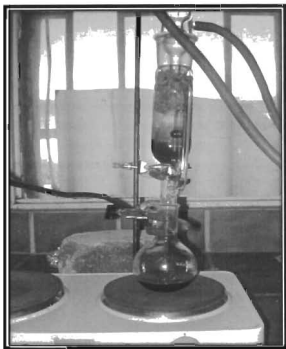


Figura 5. Proceso de extracción con calor utilizando equipo Soxhlet

4.3.1. Incubación de garrapatas y obtención de larvas (*A. cajennense*)

La obtención de larvas. El primer paso fue la obtención de garrapatas para la reproducción de larvas de *A. cajennense*, se colectaron ácaros adultos ingurgitados en localidades identificadas por el personal del Laboratorio de Resistencia y Taxonomía de Garrapata, del Comité de Fomento y Protección Pecuaria de Nayarit. La colecta de garrapatas en etapa de preoviposición fue manual y directamente del

vacuno para comprobar la taxonomía con microscopio Estereoscópico (ZEISS®). Luego fueron depositadas 10 garrapatas por caja en 18 cajas Petri. Para la obtención de huevecillos se utilizó incubadora (Precisión Incubator®, modelo 6) en condiciones de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa 80-90% para estimular la oviposición de garrapatas en un periodo de 14 días.

Inmediatamente después se colectaron los huevecillos de garrapatas, se pesaron 250 mg en báscula (ADAM®), un equivalente aproximado (ver figura 6) a 5.000 huevecillos (Muro *et al.*, 2004), éstos se colocaron en viales de vidrio de 15 ml con tapón de algodón, a continuación se incubaron durante 19 días hasta la eclosión de las larvas, que se mantuvieron en incubadora por 15 días de post-eclosión, quedando así disponibles para los bioensayos.

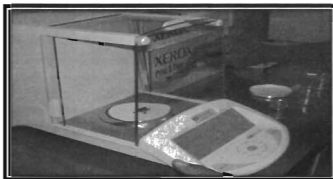


Figura 6. Colecta de huevecillos de *A. cajennense*, pesaje de 250 mg (en aprox. 5000 larvas).

4.4. Metodologías de Bioensayos en contextos *in vivo* e *in vitro*

4.4.1. Investigación de etapa experimental 1, efecto de pastos *M. minutiflora*, *A. gayanus*, *B. brizantha* y *C. ciliaris* a garrapata *A. cajennense* en ambiente *in vivo*

Los tratamientos T₁ *M. minutiflora*, T₂ *A. gayanus*, T₃ *B. brizantha* y testigo T₄ *C. ciliaris* asignados aleatoriamente, seis repeticiones en cinco unidades de muestreo por repetición, algunos materiales no desarrollaron favorablemente, por lo cual se realizó la prueba de Barrido para el T₁ con 30, T₂ 25, T₃ 20 y T₄ 25 unidades de muestreo. La variable dependiente fue el número de larva adherida a la franela (Fernández *et al.*, 2004a).

La prueba se condujo de la siguiente forma, el proceso de infestación consistió en colocar aproximadamente 5000 larvas de *A. cajennense* en cada unidad de muestreo de cada repeticiones y tratamientos, procedimiento realizado entre las 7-8 hrs AM, se colocaron las larvas en porción basal de los tallos de pastos, posteriormente se orientó el vial con larvas activas en la unidad de muestreo, por el centro del transecto se desplazó linealmente hacia los extremos para facilitar la salida de las larvas del vial y así asegurar la distribución uniforme de la infestación (Fernández, 1996).

Colocadas las larvas para prueba de Barrido en técnica de Franela, que consistió en emplear una tela de color blanco de 2 X 1 m, colocándose en la parte posterior un tubo de PVC de 1.2 m, atado con fibra de nylon y para proveer mayor contacto con el tapiz vegetal se pusieron plomos en la parte inferior, en el extremo anterior de la manta se fijó también una tabla para mayor soporte, a continuación se desplaza ésta sobre el follaje de pastos durante un minuto, otorgándose 5 deslizamientos en transectos del área experimental.

Posteriormente se efectuaron los barridos en las unidades de muestreo, que consistió en el deslizamiento de la manta sobre la biomasa por cada componente de muestreo y tratamiento en los tiempos de 7, 14 y 21 días de post-infestación.

Subsiguientemente se identificaron los registros de parcela, unidad de muestreo, pasto y fecha, las muestras de larvas de *A. cajennense* se cuantificaron en Laboratorio con ayuda de lupa estereoscópica, considerándose como larva infestante aquella adherida (ver figura 7) a la superficie de la manta (Álvarez, 2007; Fernández *et al.*, 2004b).



Figura 7. Prueba de Barrido en unidad de muestreo con método de Franela en tratamientos de *M. minutiflora*, *A. gayanus*, *B. brizantha* y *C. ciliaris*.

El análisis estadístico se utilizó un diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con un arreglo de parcelas divididas con medidas repetidas (Littell *et al.*, 1998), con cuatro tratamientos (T_1 gordura, T_2 llanero, T_3 insurgentes y testigo T_4 buffel), tres tiempos (7, 14 y 21 d) y seis repeticiones, los datos se analizaron mediante un PROC MIXED (Wang y Goonewardena, 2004) y se realizaron contrastes

ortogonales lsmeans ajustadas a Tukey ($P < 0.05$) con el software estadístico SAS, versión 2002 (Herrera, 2011).

El modelo matemático empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \tau_j + \eta_{ij} + (\tau\delta)_j + e_{ijk}$$

$i=1,2,\dots,r$ $j=1,2,\dots,p$ $k=1,2,\dots,q$

μ = media general

β_i = efecto del bloque completo

τ_j = efecto del tratamiento j

η_{ij} = efecto del elemento aleatorio de error sobre la parcela (ij)

δ_k = efecto del subtratamiento k dentro de la parcela (ij)

$(\tau\delta)_{jk}$ = la interacción entre el tratamiento j y el tratamiento k

e_{ijk} = el error sobre la parcela chica (unidad de muestreo) (ijk)

Y_{ijk} = el valor de la característica en estudio.

4.4.2. Investigación de etapa experimental 2, análisis de compuestos químicos de *M. minutiflora* por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM)

Para la variable de identificación de los compuestos (aceites esenciales) del pasto gordura la asignación de tratamientos fue T_1 Tallo y T_2 Hoja y los extractos vegetales de esta prueba fue descrita en metodología para obtención del material experimental. Los compuestos químicos a identificar fueron mediante información resultante del impacto electrónico de su masa espectral, orden de elusión y tiempo de retención por CG de compuestos conocidos y mediante el paquete computacional integrado el equipo de laboratorio, las variables experimentales de esta etapa son la identificación de compuestos químicos y % de abundancia relativa.

La prueba de identificación de compuestos de aceites esenciales fue mediante equipo con las características de CG Agilent Technologies 7890⁹, temperatura inicial del horno de 150°C y máxima de 280°C, tiempo inicial de tres minutos y gradiente de 4°C por minuto, un tiempo total de 60.5 minutos, se utilizó presión de 24.942 psi, gas de arrastre helio grado cromatográfico, se empleó columna capilar J&W No. 122-0162DB-1ms con temperatura máxima de 340°C, longitud nominal de 60 m y diámetro nominal de 0.25 μm , el flujo fue constante 1 ml/min, un promedio de velocidad de 26.906 cm/seg y salida de presión de vacío, se empleó inyector automático realizándose cinco lavados en post inyección (A) con acetato de etilo y otras 5 post inyecciones (B) con alcohol isopropílico, el volumen de inyección fue de 1 μL con jeringa de 10 μL , usándose detector de masas selectivo Agilent Technologies No.5975C y computadora Hewlett Packard.

Las muestras que se aplicaron al sistema del equipo (ver figura 8), se analizaron y obtuvieron los picos de elusión de la columna de los compuestos contenidos en cada muestra, así como el tiempo de retención.



Figura 8. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890⁹ y detector de masas selectivo Agilent Technologies No 5975C utilizado en la detección de componentes de *M. minutiflora*

4.4.3. Investigación de etapa experimental 3, evaluar repelencia (olfactómetro) en larvas de *A. cajennense* de aceites esenciales en *M. minutiflora* en medio *in vitro*

En la prueba de repelencia la asignación de tratamientos fueron T₁ Tallo, T₂ Hoja y T₃ Etanol a 99.5% (control), la obtención de extractos de *M. minutiflora* fue descrita en descripción del material experimental, en prueba de olfactómetro se aplicaron los dos extractos vegetales o tratamientos (T₁ Tallo y T₂ Hoja), seis repeticiones y como control el uso de etanol al 99.5%.

Se utilizó un cristal-olfactómetro (ver figura 9) en forma de Y con dimensiones de 9 cm de largo, 0.5 cm de diámetro interno y 0.8 cm de diámetro externo (Pirex[®]), el procedimiento fue impregnar una torunda de algodón con 1 mL del extracto correspondiente, se desecaron al ambiente por 24 horas, enseguida fueron colocados los tratamientos en un brazo del olfactómetro, en el otro brazo se ubicó otra torunda de algodón impregnada con etanol al 99.5%, en la parte inferior del olfactómetro se instaló una torunda más para evitar la salida de larvas, luego fue introducido lote de 1000 larvas de *A. cajennense* en el extremo libre del olfactómetro, dejándose ascender en las paredes por 20 minutos, después se cuantificaron las larvas que ascendieron en cada brazo, se utilizó un olfactómetro nuevo para cada ensayo, una vez obtenida la información se calculó el porcentaje de repelencia con la fórmula siguiente de Fernández *et al.* (2004) y Waladde (1982):

Larvas en el brazo con torunda impregnada
en tratamiento evaluado

$$\text{Repelencia} = \frac{\text{Larvas en el brazo con torunda impregnada en tratamiento evaluado}}{\text{Larvas que subieron a los dos brazos del olfactómetro}} \times 100$$

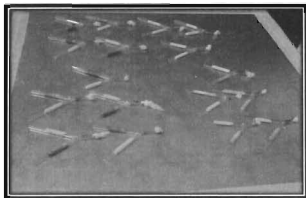


Figura 9. Cristal-olfactómetro en forma de Y empleado en pruebas de repelencia en tratamientos de Tallo y Hoja de *M. minutiflora*

El análisis estadístico de resultados del porcentaje de repelencia fueron transformados mediante la función arco seno para procesar los datos en ANOVA de completamente al azar y prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$) con el paquete estadístico SAS, versión 2002 (Herrera, 2011)

Formula de Arco seno de raíz cuadrada Y: $\arcsin \sqrt{Y} = \text{Sin}^{-1}(\sqrt{Y})$.

El modelo matemático empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, 3, \dots, t \quad j = 1, 2, 3, \dots, n$

Y_{ij} = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

μ = Media general

τ_i = Efecto del tratamiento i.

ε_{ij} = Error aleatorio, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

4.4.4. Investigación de etapa experimental 4, efecto ixodicida en larvas de *A. cajenense* sobre los aceites esenciales en *M. minutiflora* en condición *in vitro*

Para la prueba ixodicida la asignación de tratamientos fueron T₁ Tallo, T₂ Hoja y T₃ Etanol a 99.5% (control), la obtención de extractos fue descrita anteriormente, la prueba de paquete de larvas se aplicaron en los dos extractos de *M. minutiflora* (T₁ Tallo y T₂ Hoja), seis repeticiones y como control el uso de etanol a 99.5%.

Para esta prueba se tomaron 5 mL de cada extracto, colocándose dos hojas de papel de filtro (Whatman No. 10), se impregnaron de la solución en la caja de Petri, se aplicaron 100 larvas, aproximadamente entre las dos hojas del papel filtro, el grupo control se preparó de igual forma, pero impregnándose de etanol a 99.5%, las cajas de Petri fueron cubiertas y selladas, se incubaron por 24 horas a 27°C y a 85% de HR, transcurrido el tiempo se evaluó el porcentaje de mortalidad de larvas, se cuantificaron con ayuda de lupa estereoscópica, contador de uso en laboratorio, y aguja entomológica (ver la figura 10).

Obtenida la información se estimó el Porcentaje de Mortalidad de larvas, aplicándose la fórmula de Bravo *et al.*, (2008) y Abbott (1925) siguiente:

$$\text{Mortalidad} = \frac{\% \text{ Mortalidad Tratadas} - \% \text{ Mortalidad Control}}{100 - \% \text{ Mortalidad Control}} \times 100$$



Figura 10. Cuento de larvas muertas y vivas, previa aplicación de extracto etanólico de *M. minutiflora*.

El análisis estadístico de resultados del porcentaje de mortalidad fueron transformados mediante la función arco seno para procesar los datos en ANOVA de completamente al azar y prueba de medias de Tukey ($P < 0.05$) con el paquete estadístico SAS, versión 2002 (Herrera, 2011).

Formula de Arco seno de raíz cuadrada Y: $\text{arcsine } \sqrt{\bar{Y}} = \text{Sin}^{-1}(\sqrt{\bar{Y}})$.

El modelo matemático empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$i = 1, 2, 3, \dots, t \quad j = 1, 2, 3, \dots, n$

Y_{ij} = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

μ = Media general

τ_i = Efecto del tratamiento i.

ε_{ij} = Error aleatorio, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Etapa experimental 1. Evaluación de actividad antigarrapata de pastos *M. minutiflora*, *A. gayanus*, *B. brizantha* y *C. ciliaris* sobre larvas de *A. cajennense*.

Los resultados obtenidos de larvas *A. cajennense* adheridas en método de Franela muestran diferencias ($P < 0.05$) en los cuatro tratamientos (Figura 11) y en los tres tiempos de muestreo (Figura 12). El efecto repelente fue mayor para *Melinis minutiflora*, una repelencia moderada para *Andropogon gayanus* y *Brachiaria brizantha*, el menor resultado para el testigo, *Cenchrus ciliaris* (Cuadro 1). Esta investigación se efectuó en el periodo de otoño con las variables climáticas que se describen en el (Cuadro 2), al inicio de la semana 1 se realizó la infestación de larvas y en semanas subsecuentes se realizaron los tres muestreos.

Los resultados promedio de los tres tiempos de muestreo fueron 2.39 ± 8.7 E.E. (error estándar) en *M. minutiflora*, 72.48 ± 10.30 *A. gayanus*, 56.48 ± 11.68 *B. brizantha* 1192.04 ± 10.3 en *C. ciliaris*, los cuales difieren de resultados obtenidos en igual época de otoño y similares condiciones climáticas del estudio de Fernández *et al.* (2004a), en pastos infestados con larvas de *R. microplus* adheridas a la manta utilizando en prueba de Barrido (396 ± 110 en *M. minutiflora*, 544 ± 136 *A. gayanus* y 802 ± 176 *C. ciliaris*, con diferencias estadísticas en éstos). La divergencia numérica marcada de las larvas entre los estudios, es atribuible a que fue evaluado con distintas especies de larvas, sin embargo la repelencia concuerda en ambos, en las otras estaciones el mismo autor reportó para invierno 4 ± 6 D.E. (desviación estándar) en *M. minutiflora*, 23 ± 6 *A. gayanus* y diferente a 37 ± 8 en *C. ciliaris*, primavera (2 ± 1.5 *M. minutiflora*, 35 ± 26 *A. gayanus* y 68 ± 6 *C. ciliaris*) y verano (2 ± 1.5 *M. minutiflora*, 35 ± 26 *A. gayanus*, 68 ± 6 *C. ciliaris*), se confirma que existió repelencia a larvas solo para *M. minutiflora* y *A. gayanus*.

Cuadro 1. Medias de número de larvas *A. cajennense* adheridas a la franela (Prueba de Barrido) en tres tiempos de muestreo (post-infestación) en pastos

GRAMINEAS	TIEMPOS			Media \pm E.E
	7	14	21	
1. <i>M. minutiflora</i>	2.43 \pm 0.17Aa	2.53 \pm 0.15Aa	2.21 \pm 0.09Aa	2.39 \pm 0.13A
2. <i>A. gayanus</i>	131.49 \pm 16.97Ab	54.08 \pm 16.97Bb	31.88 \pm 16.97Bb	72.48 \pm 10.30B
3. <i>B. brizantha</i>	83.27 \pm 19.07Ab	47.87 \pm 19.07Bb	38.32 \pm 19.07Bb	56.48 \pm 11.68B
4. <i>C. ciliaris</i>	1181.15 \pm 16.97Ac	1276.81 \pm 16.97Ac	1118.17 \pm 16.97Ac	1192.04 \pm 10.3C
Media \pm E.E	349.59 \pm 8.87B	345.33 \pm 8.87B	297.65 \pm 8.87A	

Literales mayúsculas entre las filas para cada tratamiento son diferentes $P < 0.05$.

Literales minúsculas entre las columnas para cada tiempo son diferentes $P < 0.05$.

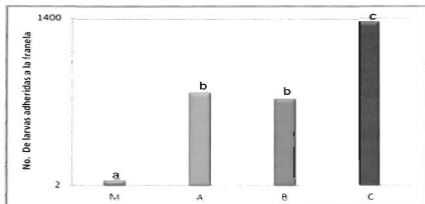
Cuadro 2. Condiciones Climáticas de sitio experimental en Mora, Nayarit, México, al realizar Prueba de Barrido (octubre 2011)

SEMANA	Temperatura °C media (min-max)	Humedad Relativa %
1	23.80 (18.76-30.24)	83.03
2	21.85 (18.39-24.59)	89.04
3	23.29 (18.81-29.54)	83.91
4	22.18 (17.00-28.88)	85.63

Fuente: Meteorológico, INIFAP 2013.

De acuerdo a investigación realizada por Cruz (2000), en parcelas infestadas de larvas *R. microplus* en cuatro tiempos de infestación y colecta de larvas (en 3, 6, 9 y 12 meses de post- aplicación) se obtuvieron los resultados siguientes: *A. gayanus* 2614.0 \pm 35.6, 1623.1 \pm 32.4, 1100.5 \pm 31.8, 1203.1 \pm 30.7 y para *C. ciliaris* 2514.2 \pm 33.3, 2255.5 \pm 28.9, 1904.0 \pm 30.2 y 2453.3 \pm 31.8, respectivamente en cada tiempo de colecta con su desviación estándar, los resultados mostraron un efecto antigarrapata mayor en *A. gayanus* que en *C. ciliaris*, situación similar a lo logrado en este estudio.

Figura 11. Media de larvas *A. cajennense* adheridas a la franela (Prueba de Barrido) de los tres tiempos 7, 14, 21 días post-infestación.



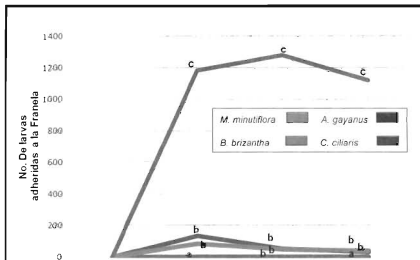
Letras diferentes en las barras presenian diferencia $P < 0.05$.

Abreviaturas: M (*M. minutiflora*), A (*A. gayanus*), B (*B. brizantha*), C (*C. ciliaris*)

Por su parte Thompson *et al.* (1978) en pasto *M. minutiflora* y *A. gayanus* infestados con 40,000 larvas

/80 cm² de *R. microplus* obtuvieron los siguientes resultados a 14 días de post-infestación, 520 larvas en *M. minutiflora* y 502 en *A. gayanus*, a 21 días 56 larvas en *M. minutiflora* y 329 colectadas en prueba de Barrido en *A. gayanus*, se infiere que fue recuperado el mayor número de larvas al compararse con resultado de esta investigación; lo anterior se atribuye al número de larvas utilizadas en la infestación, además se confirma la repelencia de los pastos hacia la garrapata. Igualmente la acción antigarrapata de *M. minutiflora* también coincide con el resultado de Mwangi *et al.* (1995) y Furlong (1998).

Figura 12. Media de larvas *A. cajennense* colectadas por la técnica de Barrido a los 7, 14 y 21 días de postinfestación en parcelas experimentales.



Literales diferentes en las líneas manifiestan diferencia $P < 0.05$.

En parcelas de leguminosas y pastos (*S. humilis*, *S. hamata* y *A. gayanus*, *C. ciliaris*) infestadas con larvas de *R. microplus* en una sola época de aplicación, se colectaron 321.9 ± 10.6 , 1195.9 ± 20.36 y 2389.9 ± 30.7 , 2578 ± 29.3 , respectivamente en cada especie forrajera con misma prueba y su desviación estándar (D.E.), manifestándose una mayor repelencia en las leguminosas *Stylosanthes* (Fernández *et al.*, 1999a), y además un efecto similar al encontrado por Sutherst, (1982).

En otras leguminosas (*M. artropurpureum*, *S. humilis*, *S. hamata* y *L. leucocephala*), se obtuvo del igual forma la repelencia con larvas de *R. microplus*, siendo los resultados: 255.03 ± 330.92 , 230.05 ± 261.77 , 280.28 ± 375.21 y 85.31 ± 205.42 , con su (D.E.), respectivamente (Fernández *et al.*, 2004b), corroborado el efecto

antigarrapata en las leguminosas, aunque Fernández *et al.* (1999b) no hayan encontrado el resultado repelente en las leguminosas *S. humilis* y *S. hamata* al año de establecidas.

Se manifiesta que en *M. minutiflora*, *A. gayanus* y *B. brizantha* se mostró el efecto contra larvas de *A. cajenense*, sobresaliendo la mayor respuesta en *M. minutiflora*, por su parte la respuesta antigarrapata se atribuye a las propiedades de los pastos, donde podría emplear como parte de un programa de manejo integral contra la garrapata.

5.2. Etapa experimental 2. Composición química e identificación de aceites esenciales por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) en *M. minutiflora*

Los resultados de componentes químicos de *M. minutiflora* identificados por CG-EM, a partir del extracto de tallo fueron identificados 12 compuestos y para el extracto de hoja 7 sustancias químicas se presentan en cuadro 3.

Los compuestos orgánicos identificados en extractos de *M. minutiflora* constaron para tallo 12 componentes, conformando al aceite esencial sobresalen Dibutil ftalato (34.45%), en seguida Acido 1,2-Bencenedicaboxílico, mono (2-etilhexil) éster (33.42%) y Acido hexadecanóico (6.96%), para extracto de hoja se obtuvo similar resultado que en tallo, los compuestos mayores fueron Dibutil ftalato (25.23%), Acido 1,2-Bencenedicaboxílico, mono (2-etilhexil) éster (59.44%) y heneicosano (3.19%).

Cuadro 3. Compuestos químicos identificados por CG-EM, a partir de extracto de tallo y hoja de *Melinis minutiflora*

Comp. No	Tallo			Hoja		
	Tiempo retención	Compuesto	% de Abundancia Relativa	Tiempo retención	Compuesto	% de Abundancia Relativa
1	7.13	Acido propánico, 2-metil-(1,1-dimetil-1,3-propanedi) ester)	4.33	7.01	Acido propánico, 2-metil-(1,1-dimetil-1,3-propanedi) ester)	5.67
2	11.91	Propil miristato	1.06	15.30	Dibutyl ftalato	25.23
3	15.22	Butil ftalato	34.45	18.00	Hexacosano	3.19
4	15.50	Acido ftalico undecil ester	5.62	19.58	Acido 17-Octadecenoico	1.19
5	15.72	Acido hexadecanoico, etil ester	6.96	20.14	Acetato ol 7-Metil-Z-tetradecano-1	1.09
6	16.40	Isopropil palmitato	0.81	27.37	Acido 1,2-Benzenedicarboxilico, mono(2-etilhexil) ester	59.44
7	19.29	Acido 9,12-Octadecadienoico (Z,Z)	1.49	29.96	Heptacosano	0.44
8	24.93	Acetato ol 7-Metil-Z-tetradecano-1	1.00			
9	27.34	Acido 1,2-Benzenedicarboxilico, mono (2-etilhexil) ester	33.42			
10	32.24	Squaleno	1.34			
11	42.36	α -Amirin	2.88			
12	46.03	Lanosterol	5.51			

Nota: Resultados por triplicado, seleccionados de acuerdo a su repetitividad en cromatograma.

Muro *et al.* (2004), identifica en *M. minutiflora* 12 compuestos químicos por CG-EM, observando la mayor abundancia relativa en Eicosano 18.53%, Acido linolénico metil ester 16.08%, Acido Hexadecanoico 14.20%; encontrando que uno de ellos se manifiesta en el resultado de esta investigación, el Acido Hexadecanoico 6.96% del

extracto de tallo, probablemente la causa de estos compuestos distintos sea el Método del CG-EM, el solvente empleado, la columna de CG y las condiciones ambientales durante el desarrollo del proceso experimental.

De igual forma Prates *et al.* (1998), encontró en *M. minutiflora* a través de CG-EM, resultados similares al de esta investigación, los compuestos Acido propanoico 43%, 1-8, cineol 10.6%, Hexanol 5%, Pheniletil alcohol 4%, 9-E -eicosano 8%, en pruebas acaricidas obteniendo hasta un 100% a los 10 minutos de exposición de larvas *R. microplus*, esta acción a través del aceite esencial de *M. minutiflora*. Se evidencia la obtención de dos compuestos en este estudio iguales a los obtenidos por Prates, que son el Acido propanoico al 4.33% y 6.67% en tallo y hoja, respectivamente, además de heneicosano al 3.19% en el extracto de hoja.

Los componentes químicos reportados por Magano *et al.* (2008), en extractos de *Senna italica* en la subespecie *Arachoides* se encontraron el Acido 2-Benzenedicarboxílico, dibutyl ester al 2.32%, 1,8-dihidroxi-3-metilntraquinona al 76.41%, ácido 1,2 -Benzenedicarboxílico, bis (2-etilhexil) éster al 20.19%, Acido hexadecanoico al 51.55%, Acido 9-hexadecanoico al 11.84%, compuestos potencialmente responsables del efecto antigarrapata de *Hyalomma marginatum rufipes*, y dos de ellos fueron identificados en los dos extractos de *M. minutiflora* de esta investigación, que son Acido 2-Benzenedicarboxílico mono (2-etilhexil) y Acido hexadecanoico.

De igual manera Lwande *et al.* (1999), reportan 29 compuestos en la forrajera *Gynandropsis gynandra* por CG-EM, siendo los de mayor abundancia el Carvacol con 29.2%, *trans*-fitol 24%, linalol 13.3%, *trans*-2-metilciclopentanol 7.2%, y β -cariofileno 4.4%, manifestando *m*-Cimeno, nonanal, 1- α -terpineol, β -ciclocitrol, nerol, *trans*-geraniol, carvacrol, β -ionona, *trans*-geraniol acetona y nerolidol, los de mayor repencia en *R. appendiculatus*, sin embargo no se encontró ninguno de estos compuestos en *M. minutiflora* del estudio.

Por su parte Muro *et al.* (2003), encontraron en las leguminosas *Stylosanthes humilis* y *S. hamata* 16 y 17 compuestos, respectivamente, existiendo los mayoritarios en *S. humilis* (Ferroceno 18.3% y β - sitosterol 14%) y en *S. hamata* (Acido linolénico 17.6%), donde se registra la repelencia en *S. humilis* (68 a 92%) y en *S. hamata* (70 a 82%).

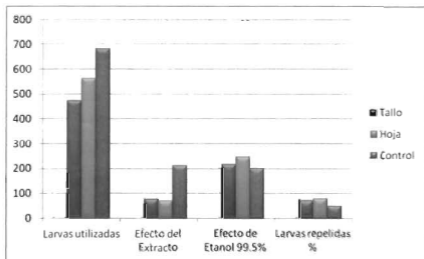
En otro vegetal *Tagetes minuta* a través de la CG-EM, Nchu *et al.* (2012), identificaron la presencia de 14 compuestos, los mayoritarios fueron: cis-ocimeno (28.5%), β -ocimeno (16.83%) y 3-metil-2-(2-metil-2-butenil)-furan (11.94%); además ratifican la repelencia en ninfas de *Hyalomma rufipes* expuestas al aceite esencial de *T. minuta* hasta 93.61% a la concentración de 0.107 mL/mL, resultado distinto a esta investigación

Así mismo Leyva *et al.* (2009), confirman el efecto acaricida de aceites esenciales en otras plantas, los componentes químicos en *Pimenta racemosa* fueron: (4-terpineol 20.7%, 1,8-cineol 20.4%, Eugenol 10.7%, α -terpineol 10.0%), *Piper auritum* (Safrol 93.24%, Miristicina 4.34%), *Piper aduncum* (Dilapiol 82.0%), y *Chenopodium ambrosioides* (Carvacrol 24.0%, α -terpineol 73.9%, p-cimeno 4.3%); el de mayor acción acaricida fue *P. auritum*; de la misma manera el compuesto 1,8-cineol obtenido en *P. racemosa* fue reportado en extractos de tallo y hoja al 10.6% en *M. minutiflora* por Prates *et al.* (1998). Por su parte Bissinger (2010), aislando el compuesto 2-undecanona (metil-nonil) a partir de tricomas glandulares de tomate silvestre *Lycopersicon hirsutum* y al realizar la prueba con papel filtro ante *Amblyomma* sp obtuvo un 98.1% de repelencia, dato superior (72 a 78%) al logrado en *M. minutiflora* del estudio.

5.3. Etapa experimental 3, repelencia en larvas *A. cajennense* de aceites esenciales de *M. minutiflora*

Los extractos de *M. minutiflora* mostraron efecto repelente ante *A. cajennense* en bioensayo efectuado, los resultados se presentan en cuadro 4, indicándose el porcentaje correspondiente en cada extracto del pasto.

Figura 13. Bioensayo de repelencia de larvas *Amblyomma cajennense* con extractos de tallo y hoja de *M. minutiflora* en solvente etanol a 99.5%



Nota: En tratamiento control, se utilizó solo etanol al 99.5% en ambos brazos del tubo olfatómetro (midiendo solo el efecto de solvente).

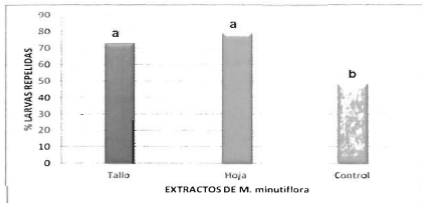
Asimismo los resultados de repelencia para los extractos de *M. minutiflora* en *A. cajennense* (cuadro 5), manifestaron respuesta significativa ($P < 0.05$) de 72 a 78% de y respecto al tratamiento control, dándose una media de 48% de larvas (Figura 13 y 14).

Cuadro 4. Medias de repelencia de larvas de *Amblyomma cajennense* con extracto etanólico en *Melinis minutiflora*

Extractos	Media \pm E. E. de larvas
Tallo	72.59 \pm 2.38 ^a
Hoja	78.63 \pm 2.16 ^a
Control (Etanol 99.5%)	48.04 \pm 2.55 ^b

Letras diferentes entre la columna son diferentes $P < 0.05$. Los datos fueron transformados por Arco seno, de acuerdo a Herrera (2011)

Figura 14. Media de larvas repelidas con tubo-Y Olfactómetro, utilizando extractos de órganos de pasto *M. minutiflora*.



Letras diferentes en las barras presentan diferencia $P < 0.05$

El resultado obtenido de este ensayo muestra la aportación antigarrapata del pasto gordura que coincide con Mwangi *et al.* (1995), en prueba de repelencia con larvas

de *R. appendiculatus* fue de (79.2±2.9%); también un efecto similar al encontrado por Muro *et al.* (2004), resultado en tallo de *M. minutiflora* de 67-84% y hoja de 50-80%, aunque se hayan utilizado distintos solventes en los extractos y consecuencia equivalente al de esta investigación. De igual forma Muro *et al.* (2003), encontraron en *S. humilis* y *S. hamata* en *R. (B.) microplus* la repelencia de 70 a 92% y 70 a 87%, respectivamente. efecto similar al de *Melinis* de este estudio con el solvente etanol.

Estudio con larvas de *Hyalomma rufipes* de Nchu *et al.* (2012), manifestaron la repelencia de hasta 93% con el aceite esencial *Togetes minuta*, en tanto Carroll *et al.* (2010), reportan el resultado de 55 a 80% con aceite de elemol y amiris, lo cual manifiesta un efecto ligeramente mayor que en *M. minutiflora* del estudio.

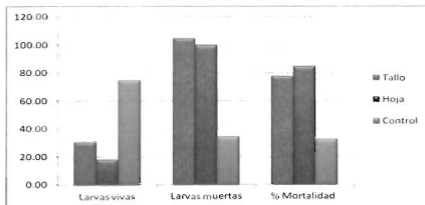
De igual forma Fernandes *et al.* (2010), en prueba con ninfas de *A. cajennense* al evaluar en extractos de *Melia azedarach*, *Cymbopogon nardus*, *Spiranthera odoratissima*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ageratum conyzoides*, *Mentha pulegium*, *Ruta graveolens* y *Memora nodos*, destacaron un mayor resultado que el de este bioensayo, el más alto efecto de 90% fue para *C. nardus* y una media de 66% para el resto de materiales. A este tenor el estudio de Ferreira (2011), también mostró un efecto similar al de esta investigación, expresando un 86% de repelencia en garrapata *Ixodes ricinus* con extractos de coco y almendra, donde el compuesto identificado fue el ácido dodecanóico.

Por su parte Semmler *et al.* (2011), citan a otros autores que obtienen otros compuestos químicos con actividad antigarrapata, como son: piperidina, Icaridin, saltidin (ácido 1-piperidina-carboxílico, 2-2 hidroxietil, 1-metilester), lactona (CIC-4), N,N-dietil-fenil-acetamida (DEPA), p-Mentano-3,8-diol, Merck 3,535 (3-N-acetil-N-butil amino propiónico etil éster), aceite de *Ocimum suave*, extracto de *Vitex agnus castus*; componentes no localizados en *M. minutiflora* de la investigación.

5.4. Etapa experimental 4, actividad ixodicida en larvas de *A. cajennense* con extractos de *M. minutiflora*

Los extractos de tallo y hoja de *M. minutiflora* mostraron la mayor actividad ixodicida ante larvas *A. cajennense* como muestran los resultados en el cuadro 5, e indicándose el porcentaje por componente del pasto y la respuesta ($P < 0.05$) entre tratamientos (Figura 15), dándose el menor efecto para el tratamiento control con 32%, respecto a los extractos y mayormente en hoja.

Figura 15. Porcentaje de mortalidad de larvas *A. cajennense* relacionadas al extracto de tallo y hoja de *M. minutiflora*



Nota: En el tratamiento de control se utilizó el solvente etanol 99.5%.

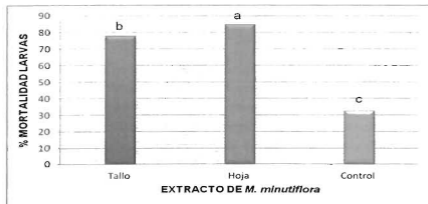
Cuadro 5. Medias de mortalidad de larvas *Amblyomma cajennense* referidas a extractos de tallo y hoja de *M. minutiflora* y el testigo

Extracto de planta	Media \pm Error Estándar
Tallo	77.46 \pm 0.56 ^b
Hoja	84.63 \pm 1.46 ^a
Control (Etanol 99.5%)	32.16 \pm 3.19 ^c

Letras diferentes entre la columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Los datos fueron transformados por Arco seno, de acuerdo a Herrera (2011)

Otra forma de resaltar el efecto de la prueba ixodicida es por medio de la Figura 16, donde se explica la tendencia de mortalidad de larvas de 77 a 84% con diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los extractos de tallo y hoja y el testigo.

Figura 16. Media de larvas muertas, utilizando extractos de tallo y hoja de *M. minutiflora*



Literales diferentes en las barras presentan diferencia $P < 0.05$.

La acción acaricida mostrada por aceites esenciales en pasto *Melinis* ha sido reportada por Prates *et al.* (1998), mostrándose al 100% en *R. microplus*, resultado mayor al obtenido en este estudio, en cambio la aplicación del aceite timol a larvas *A. cajennense* lograron una mortalidad de 18 a 94% (Silva *et al.*, 2011), efecto similar al de este bioensayo.

Por su parte Rodríguez *et al.* (2009), en otros vegetales: *Brugmasia arborea* (borrachero), *Sambucus nigra* (sauco), *Ambrosia cumanenses* (altamisa), *Bidens pilosa* (chipaca) y *Nicotiana tabacum* (tabaco), se mostró el resultado ixodicida de 60 a 85% en *R. microplus*, lo cual demuestra similar respuesta que en esta investigación; consecuencia similar a la lograda por Annan *et al.* (2011), que declaran una acción ixodicida de la planta *Hoslundia opposita* hacia *Amblyomma variegatum*, donde se atribuye la sinergia de los compuestos, como los responsables de la mortalidad de larvas

Otra prueba acaricida por Silveira *et al.* (2007), al emplear timol, mentol, ácido salicílico y salicilato de metilo en *R. (B.) microplus* a las concentraciones de (0.25, 0.5, y 1.0%) en prueba de paquete de larvas, se obtuvo para timol la tasa de mortalidad de 100%, en los demás compuestos de 0.52 a 9.76%, resultado comparable al de esta investigación en extractos de tallo y hoja del gordura.

Indistintamente Elanco (2011), obtuvo la mortalidad del 100% con extractos metanólicos en diferentes vegetales: *A. marmelos*, *A. lineata*, *A. paniculata*, *C. hirsutus*, *E. próstata* en *R. microplus*. En misma especie de garrapata Apel *et al.* (2009), reportaron igual porcentaje de mortalidad. Simultáneamente Aparecido *et al.* (2010), lograron que el aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* y *Cymbopogon nardus* tuviera una concentración del 50% y resultado acaricida en larvas *A. cajennense* de 53.1% y 61.1%, respectivamente, en cada arborea, consecuencia menor que la lograda con extractos de *M. minutiflora* de esta investigación.

En prueba larvica semejante con *R. microplus* y *Rhipicephalus sanguineus*, Sardá *et al.* (2006), obtienen con hidrodestilado de *Drimys brasiliensis* en dosis de 3.125 μ l/ml una mortalidad de 95 a 98% y 100% en las concentraciones de 25, 12.5 y 6.25 μ l/ml, efecto mayor que en el presente estudio; de igual forma, pero en *A. cajenense* Souza *et al.* (2011), reportan similar mortalidad de larvas, empleando diferentes solventes orgánicos en los extractos manejados.

6. CONCLUSIONES

El pasto *Melinis minutiflora*, además de *Andropogon gayanus* y *Brachiaria brizantha* mostraron repelencia contra larvas de *A. cajennense*, sobresale la mayor respuesta en *M. minutiflora*.

Por la CG-EM permitió la identificación de 12 y 7 componentes químicos en extractos tallo y hoja, respectivamente, los compuestos seleccionados fueron de acuerdo al criterio de repetitividad de los cromatogramas.

La actividad antigarrapata fue evidente en *M. minutiflora* contra larvas de *A. cajennense*, manifestándose el efecto repelente e ixodicida, consecuencia atribuible a la sinergia de los componentes identificados.

7. REFERENCIAS

1. Abbot, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economy Entomology*, 18: 265-267.
2. Acosta, P.D., Patricia Gómez, A.P., Hernández, V.V. y Escobar, A. E. 2007. Métodos de control biológico para *Boophilus microplus* (CAN). Investigación Agropecuaria. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol. 4. 155-166.
3. Alonso, D.M., Rodríguez, V.R., Fragoso, S.H. y Rosario, C.R. 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch. Med. Vet.* 38(2): 105-113.
4. Álvarez, C.V. y Bonilla, M. R. 2008. Control in vivo de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.* Vol. 56 (1): 291-302.
5. Álvarez, C.V. y Bonilla, M.R. 2007. Adultos y ninfas de la garrapata *Amblyomma cajennense* fabricius (Acari: Ixodidae) en equinos y bovinos. *Rev. Agronomía Costarricense* 31 (1): 61-69.
6. Álvarez, C.V., Bonilla, M.R. y Chacón, G.I. 2000. Distribución de la garrapata *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) sobre *Bos taurus* y *Bos indicus* en Costa Rica. *Rev. Bio. Trop.* 48(1): 129-135.
7. Álvarez, C.V., Bonilla, M.R., y Chacón, G.I. 2003. Abundancia relativa de *Amblyomma* spp. (Acari: Ixodidae) en bovinos (*Bos taurus* y *B. indicus*) de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 51(2) 435-444.

8. Annan, C., Jackson, N., Dickson, R.A., Sam, G.H. and Komlaga, G. 2011. Acaricidal effect of an isolate from *Hoslundia opposita* vahl against *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). Rev. Pharmacognosy, 3 (3):185-8.
9. Aparecido, C.M., Oliveira, M.C., Goldner, S.M., Teixeira, G.F., Azevedo P.M., and Daemon, E. 2010. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 107: 987–992.
10. Apel, M.A., Sardá R.V., Bordignon, S.A., Henriques, A.T. and Poser, G. 2009. Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasitol Res.105:863–868.
11. Ávalos, G.A. y Pérez, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Rev. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
12. Bissinger, B. and W. Roe, R. M. 2010. Tick repellents: Past, present and future. Pesticide Biochemistry and Physiology. 96: 63-79.
13. Bravo, M.J., Coronado, A. y Henríquez, H. 2008. Susceptibilidad de larvas y adultos de *Boophilus microplus* al ixodicida Coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. Zootecnia Trop., 26(1): 41-46.
14. Calle, A.J. 1983. Aislamiento e Identificación de algunos Compuestos del Aceite del pasto *Melinis minutiflora*. Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Villavicencio. 83-85.

15. Carroll, J. F., Paluch, G., Coats, J. and M. Kramer, M. 2010. Elemol and amyris oil repel the ticks *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in laboratory bioassays. *Exp. Appl. Acarol.* 51:383-392
16. Carroll, J. F., Cantrell, C. L., Klun, J. A., and Kramer, M. 2007. Repellency of two terpenoid compounds isolated from *Callicarpa americana* (Lamiaceae) against *Ixodes scapularis* and *Amblyom americanum* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 41:215-224.
17. Castelblanco, S.L., Sanabria, R.O., Cruz, C.A., y Rodríguez, M.C. 2013. Reporte preliminar del efecto ixodicida de extractos de algunas plantas sobre garrapatas *Boophilus microplus*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 18 (1):118-130.
18. Cruz, V. C. y Fernández, R.M. 2000. Anti-garrapata efecto repelente de pasto *Adropogon gayanus* en parcelas de diferentes edades experimentales infestadas con larvas de *Boophilus microplus*. *Parasitología al día*, 24(3-4): 88-91.
19. De Souza, C.A., Cerqueira, L.R., Furlong, J., Teixeira P.H. y Mascarenhas, P.W. 2003. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciência Rural*, Santa Maria. 3(1): 109-114.
20. Elango, B.G. and Rahuman, A.A. 2011. Evaluation of medicinal plant extracts against ticks and fluke. *Parasitol. Res.*108:513-519.
21. Fernandes, S.S., Ferreira, B.L., Sousa, B.R., Lopes, F.R., Braz, L.C., Faustino, T.L., Realino, P.J. and Henrique, F.P. 2010. Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) nymphs. 167: 67-73.
22. Fernández, E.K. and Bettencourt, V.R. 2008. Entomopatogenic fungi against South american tick species. *J. Exp. Appl. Acarol.* 46(1-4) 71-93.

23. Fernández, R., Cruz, V., Solano, V. and García, V. 1999b. Anti-tick effects of *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes hamata* on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae in Morelos, Mexico. *Experimental & Applied Acarology* 23: 171-175.
24. Fernández, R.M. 1996. Comparación de cuatro técnicas de colecta de larvas de *Boophilus microplus* bajo condiciones de campo en infestación controlada. *Técnica Pecuaria México*. 34(3): 175-182.
25. Fernández, R.M. y García, V.Z. 1999a. Algunas estrategias ecológicas para el combate de la garrapata del ganado. Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria de Parasitología Veterinaria. Folleto divulgativo 5: 1-9.
26. Fernández, R.M., Preciado, T.F., Cruz, V.C and García, V.Z. 2004a. Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. *Experimental and Applied Acarology* 32: 293-299.
27. Fernández, R.M., Preciado, T.J., García, V.Z., Cruz, V.C. y Saltijeral, O.J. 2004b. Evaluación estacional de la recuperación de larvas de *Boophilus microplus* en cuatro leguminosas forrajeras en parcelas experimentales infestadas. *Rev. Técnica Pecuaria México*. 42(1):97-104.
28. Ferreira, M.M., and More, S.J. 2011. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Maia and Moore Malaria Journal*. 10(Suppl. 1):S11.

29. Frish, E.J. 1999. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *Int. J. Parasitol.* 29:57-71.
30. Gohole, L.G., Overholt, W.A., Khan, Z.R., Pickett, J. A. and Vet, L.E. 2003. Effects of molasses grass, *Melinis minutiflora* volatiles on the foraging behavior of the cereal stemborer parasitoid, *Cotesia sesamiae*. *Journal of Chemical Ecology* 29(3): 735-745.
31. Goncalves, K., Toigo, E., Ascoli, B., Poser, G. and Sardá, R. 2007. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitol. Res.* 100(6):1267-1270.
32. Hernández, E.L., Parra, G.D. y Ahumada, A. 1989. Actividad repelente y acaricida del aceite y algunas fracciones cromatográficas del pasto *Melinis minutiflora* frente al *Boophilus microplus*. *Rev. Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* No.17. Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Villavicencio. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-farmacéuticas*, 17:45-50.
33. Hernández, E.L., Parra, G.D. y Castañeda, M.N.1982. Acción repelente y acaricida del *Melinis minutiflora* sobre el *Boophilus microplus*. Centro Diagnostico, Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Villavicencio. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-farmacéuticas*, 17:17-21
34. Herrera, H.J. y Garcia, A.C. 2011. Análisis de varianza. *Bioestadísticas en Ciencias Veterinarias. Procedimiento de análisis de datos.* Ed. Universidad Complutense de Madrid, Área de Ciencias de la Salud. Pp. 61-71.
35. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). [Consultado el 10 de marzo de 2010]. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/topografia.html>.

36. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). [Consultado el 11 de marzo de 2013]. Disponible en <http://www.clima.inifap.gob.mx/redclima/rednacional.html>.
37. Iriarte, H.P., Martínez, G.S., Aguirre, O.J., Barajas, C.R., Romo, R.J., Loya, O.L. y Molina, T.J. 2012 Repelencia de algunas plantas forrajeras a la garrapata. *Abanico Vet.* 2(3):47-57.
38. Kaaya, G.P. 2000. The potential for anti-tick plants as component of an integrated tick control strategy. *Ann NY Acad. Sci.* 916 576-582.
39. Leyva, M., Carmen Marquetti, M.C., Tacoronte, J.E., Scull, R., Tiomno, O., Mesa, A., Montada, D. 2009 Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev. Biomed.* 20:5-13.
40. Linares, V.S. 2008. Manejo integral de las garrapatas, una propuesta eficiente y sostenible con el medio ambiente. *Agron.* 16(2): 13 - 21.
41. Littell, R.C., Henry, P.R., Amernan, C.B. 1996. Statistical analysis of repeated measure data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76, 1216 - 1231.
42. Lwande, W., Ndakala, A.J., Hassanali, A., Mbreka, L., Nyandat, E., Ndungu, M., Amiani, H., Gitu, P.M., Malonza, M.M. y Punyua, D.K. 1999. Aceite esencial de *Gynandropsis ginandra* y sus componentes como repelente de garrapata (*Rhipicephalus appendiculatus*). *Rev. Phytochemistry*, 50:401-405.
43. Magano S.R., Thembo K.M., Ndlovu S.M. and Makhubela N. F. 2008. The anti-tick properties of the root extracts of *Senna italica* subsp. *Arachoides*. *African Journal of Biotechnology.* 7 (4):476-481.

44. Mareggian, G. 2001. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. Rev. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 60:22 - 30.
45. Moissant, R.E., Klober, R., y Manzanilla, J. 2002. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) en los Estados Aragua y Cojedes, Venezuela. FCV-LUZ. XII (2):94-96.
46. Murgueitio, R.E., Uribe, T.F., Zulvaga, S.A., Galindo S.W., Valencia, C.L., Giraldo, E.C. y Soto, B.R. 2010. Reconversión Ganadera con Sistemas Silvopastoriles en la Provincia de Chiriquí, Panamá. Ed. Feriva S.A. Panamá. Pp. 94-98.
47. Muro, C.M., Cruz, V.C., Fernández, R.M., Soria, C.J. y Ramos, M.P. 2003. Repelencia de larvas de *Boophilus microplus* en plantas *Stylosanthes humilis* y *Stylosanthes hamata*. Rev. Parasitología Latinoamericana. 58:3-4.
48. Muro, F.J., Cruz, V.C., Fernández, R.M. y Molina, T.J. 2004. Efecto repelente de extractos de *Melinis minutiflora* sobre larvas de la *Boophilus microplus*. Vet. Méx. 35 (2):153-159.
49. Mwangi, N.E., Essuman, S., Kaaya, P.G., Nyandat, E., Munyinyin, D. and Kimondo, G.M.1995. Repellence of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* by the grass *Melinis minutiflora*. Trop. Anim. Hlth. Prod. 27:211-216.
50. Nchu, F., Magano, S.R., and Eloff, J.N. 2012. *In vitro* anti-tick properties of the essential oil of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) on *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae). Onderstepoort. Journal of Veterinary Research 79(1):5.

51. Ndungu, M., Lwande, W., Hassanali, A., Moreka, L. and Chander, C. 1995. *Cleome monophylla* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) and maize weevil (*Sitophilus zeamais*) repellents. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 76: 217-222.
52. Osorio, M.J., Fragoso, S.H., Torres, C.F. y Chavarria, M.B. 2012. Evaluación biológica del Amitraz (Taktic®) sobre ganado bovino infestado naturalmente con *Amblyomma cajennense* en el estado de Tamaulipas. México. <http://ammvbe.net/XXV%20CNB/buiatria/conferencias/e parasitarias/e parasitariascart5.htm>. Citado 03/09/12, 15:47 hr.
53. Pérez, S.M. y Patiño, T.F. 2009. Validación en Campo del Efecto de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuilleim y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin como Agentes Reguladores Biológicos sobre *Boophilus microplus* Canestreni y *Amblyomma cajennense* Fabricius (*Arachnida: Ixodidae*) p.351-465. In: Murgueitio, R.E., Cuartas, C.C. y Naranjo, R.J. (Editor). Ganadería del futuro, Investigación para el desarrollo. Segunda edición. Fundación CIPAV. Cali, Colombia.
54. Prates, H.T., Leite, R.C., Craveiro, A.A. and Oliveira, A.B. 1998. Identification of Some Chemical Components of the Essential Oil from Molasses Grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their Activity Against Cattle-Tick (*Boophilus microplus*). *J. Braz. Chem. Soc.* 9(2): 193-197.
55. Quijada, T., Jiménez, M., Marchán, V. y Araque, C. 2005. Comportamiento poblacional de la garrapata *Amblyomma cajennense* f. (*Acarina: ixodidae*), según época y manejo garrapaticida en fincas de bovinos doble propósito de las Yaguas, Estado Lara, Venezuela. *Veterinaria Tropical*. 29-30(1 y 2):7-22.

56. Quiroz, H. 1994. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Eds N, Utera. 5 ed. México D.F. MX. p. 768-802.
57. Quiroz, R.H. 2000. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos, editorial LIMUSA, México, DF. Pp. 177- 195.
58. Rodríguez, S. A., Rodríguez. M. C. y Cruz, C. A. 2009. Efecto ixodicida de extractos alcohólicos de cinco plantas encontradas en el Pantano de Vargas (Paipa, Boyacá), obtenidos por diferente método de extracción, sobre garrapata adulta *Rhipicephalus (Boophilus)*. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 22:3.
59. Rodríguez, V.R., Torres, A.J., Ramírez, C.G., Rosado, A.J., Aguilar, C.A., Ojeda, C.M. y Bolio, G.M. 2011. Garrapatas que afectan al ganado bovino. Control de parásitos internos y externos que afectan al ganado bovino en Yucatán, México. Proyecto financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Fondos Mixtos Yucatán (Registro 108773) Pp. 12-29.
60. Rodríguez, V.R.I. 2005. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas en el sureste de México. Folleto técnico No.1. CONACYT-SAGARPA-CO1-1754. México, DF. Pp. 1-11.
61. Rodríguez, V.R.I. 2006. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria. Publicación Técnica Numero 4. Jiutepec; Morelos, México. Pp. 1-30.
62. Rodríguez, V.R.I. Vivas, J. L. y Domínguez, A. 2005. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. Enfermedades de importancia económica en

producción animal, Interamericana, Universidad Autónoma de Yucatán, México. Pp. 1-12.

63. Rosado, J. A., Aguilar, A.J., Aguilar, C., Rodriguez, V. R., Borges, A. R., García, V.Z., Méndez, G.M., Cáceres, F.M. y Dorantes, E. A. 2008. Actividad ixodocida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acarí: ixodidae). Rev. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 8: 297 – 301.

64. Semmler, M., Ghaffar, F.A., Khaled, A.S., Rasheid, A. and Mehlhorn, H. 2011. Comparison of the tick repellent efficacy of chemical and biological products originating from Europe and the USA. Parasitol Res. 108:899-904.

65. Sardá R.V., Rolim, V., Bordignon, S., Amélia T.H., Dorneles, G.G., Renata P., Limberger, R.P. and Poser, G. 2008. Chemical composition and larvicidal properties of the essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*. Parasitol Res. 102:531-535.

66. Saueressig, T.M. 2002. Control racional de las parasitosis bovina con bajo impacto ambiental. XI Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, Brasil.

67. Silva, M.A., Daemon, E., Oliveira, M.C., Maturano, M., Calmon, B.F. and Massoni, T. 2011. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acarí: Ixodidae). Vet. Parasitol. 29; 183 (1-2):136-9.

68. Silveira, N.A., Daemon, E. and Gonzalves, S. G. 2007. Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) larvae. Parasitol. Res. 101: 809-811.
69. Souza, F.E., Garcia, Z.M. and Freitas, F.F. 2011. Monitoring of resistance or susceptibility of adults and larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) Exp. Appl. Acarol. 53:189-202.
70. Stone, B.F. and Haydock, 1962. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.) Bull. Ent. Res. 53:56-78.
71. Sutherst, W.R., Jones, J.R. and Schnitzerling, J.H. 1982. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle tick. Rev. Nature. 295: 320-321.
72. Thompson, C.K., Roa, E.J. and Romero, N.T. 1978. Anti-tick grass as the basis for developing practical tropical tick control packages. Trop. Anim. Hlth. Prod. 10(3): 179-182.
73. Tobón, A.F. 2011. Insecticidal activity of a *Melinis minutiflora* grass extract on *Stomoxys calcitrans* flies. Rev. Colomb. Cienc. Pecu. 24:123-130.
74. Velázquez, M.M., Castillo, H.G., Rosario, C.R., Flores, F.J., López, R.J., Hernández, G.R. and Lugo, C.E. 2011. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol. Res. 108(2):481-487.
75. Vivanco, J.M, Cosio, C., Loyola, V.V. y Flores, H.E. 2005. Mecanismos químicos de defensa en plantas. Investigación y ciencia.

<http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/Investigacion2005.pdf> Citada el 14 de junio de 2011.

76. Waladde, S.M. 1982. Tip-Recording from Ixodid Tick Olfactory Sensilla: Responses to Tick Related Odours. *J. Comp. Physiol.* 148:411-418.

77. Wang, Z. y Goonewardena, L.A. 2004. The use of MIXED model in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Can. J. Anim. Sci.*, 64, 1 – 11.

78. Williams, L.A. y Mansingh, A. 1996. Las acciones insecticidas y acaricidas de los compuestos de *Azadirachta indica* (A. juss.) y su utilización en el manejo de las plagas tropicales. *Revista de Manejo de Pesticidas Integrados*. 1: 133-145.