



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
TROPICAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CAMPUS II



Tesis para obtener el título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL

**“Evaluación ixodicidade *Acacia cornígera* sobre
larvas de *Rhipicephalus(Boophilus) microplus*
(*acari:ixodidae*)”**

Presenta

JULIA GUADALUPE GRAJALES RUIZ

Director de tesis

MC. Carlós Enrique Ibarra Martínez

Codirector de tesis

DR. Esaú Ruiz Sánchez

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

Febrero 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
TROPICAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CAMPUS II



Tesis para obtener el título de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL

**”Evaluación ixodícida de *Acacia cornígera* sobre
larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
(*acari:ixodidae*)”**

Presenta

JULIA GUADALUPE GRAJALES RUIZ

Director de tesis

MC. Carlós Enrique Ibarra Martínez

Codirector de tesis

DR. Esaú Ruiz Sánchez

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

Febrero 2019

*Una vez que entiendes lo compleja que puede llegar a ser la vida, y cada uno de los momentos que nos pueden abatir sin aviso, te das cuenta que, lo que realmente podemos aprender, es que las **únicas personas que están y permanecen en todo momento dentro de nuestras vidas es la familia**, a ellos que siempre me han apoyado y guiado les dedico esta tesis. Mis padres, Guillermo Cruz Grajales Castellanos y María Guadalupe Ruiz Guillen, Mi hermana Maricruz Grajales Ruiz y En memoria de Guillermo Grajales Solís † hasta siempre mi hermano.*

Agradecimientos

A **Dios**. *Por darme la oportunidad de vivir, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio*

Al **Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**. Por el apoyo financiero durante los estudios de maestría.

A **mis padres** por su apoyo incondicional para lograr cada uno de mis proyectos.

A la respetable **Universidad Autónoma de Chiapas**, que a través del programa de **Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical (MCPAT)**, encontré un lugar donde continuar mis estudios.

A todos los catedráticos que estuvieron durante mi formación académica, Dra. Pilar Ponce Díaz coordinadora de la MCPAT, así mismo un agradecimiento muy especial a los miembros de mi **comité tutorial** Director **MC. Carlos E. Ibarra Martínez** por su apoyo y tolerancia durante el proceso de realización de este proyecto, al Co-Director Dr. Esaú Ruiz Sánchez por su colaboración, apoyo y todas sus observaciones para finalizar este proyecto, a mis asesores **Dr. Benigno Ruiz Sesma, Dr. Gerardo Uriel Bautista Trujillo y la MB. María Ángela Oliva Llaven**.

Al Mc Herbey Ruiz Sesma Encargado del Laboratorio de Biotecnología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su invaluable apoyo.

Al Dr. Federico Gutiérrez Miceli por su autorización para poder ingresar al laboratorio del Instituto Tecnológico Regional, y a la Mc Maritza por su apoyo durante todo el proceso.

Al **Centro de Investigación científica de Yucatán (CICY)**, en coordinación con la Dra. Marcela Gamboa por el espacio brindado, además de su apoyo y enseñanzas durante mi estancia.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN
AGROPECUARIA TROPICAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CAMPUS II**



Esta tesis titulada "**EVALUACIÓN IXODICIDA DE *ACACIA CORNÍGERA* SOBRE LARVAS DE *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS (ACARI:IXODIDAE)***", registrado en la Coordinación de Investigación y Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Se incluye en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: Caracterización y conservación de recursos genéticos, del cuerpo académico PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL SOSTENIBLE, UNACH-CA-128, perteneciente al programa de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN
AGROPECUARIA TROPICAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
CAMPUS II



Esta tesis titulada "EVALUACIÓN IXODICIDA DE ACACIA CORNÍGERA SOBRE LARVAS DE RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS ACARI:IXODIDAE", fue realizada por la MVZ JULIA GUADALUPE GRAJALES RUIZ, bajo la dirección y asesoría del Comité Tutorial indicado, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR



MC CARLOS ENRIQUE IBARRA MARTÍNEZ

CODIRECTOR

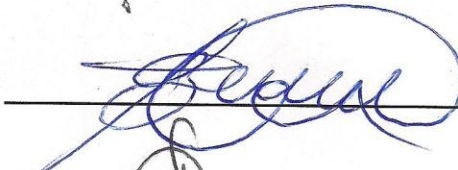

DR. ESAÚ RUIZ SÁNCHEZ (CONKAL)

ASESORES

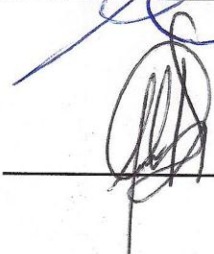
DR. BENIGNO RUIZ SESMA



DR. GERARDO URIEL BAUTISTA
TRUJILLO

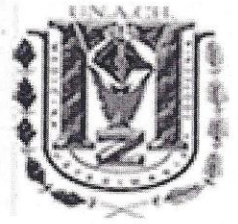


MB. MARÍA ÁNGELA OLIVA LLAVEN





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN
AGROPECUARIA TROPICAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
CAMPUS II



Esta tesis titulada "EVALUACIÓN IXODICIDA DE ACACIA CORNÍGERA SOBRE LARVAS DE RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS ACARI:IXODIDAE", fue realizada por la MVZ JULIA GUADALUPE GRAJALES RUIZ, ha sido aprobada por la Comisión Revisora indicada, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMISIÓN REVISORA

MC. CARLOS ENRIQUE IBARRA
MARTÍNEZ

DR. ESAÚ RUIZ SÁNCHEZ (CONKAL)

DR. BENIGNO RUIZ SESMA

DR. GERARDO U. BAUTISTA TRUJILLO

MB. MA. ÁNGELA OLIVA LLAVEN

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivo general.....	2
1.1.1 Objetivos específicos.....	2
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.3 HIPÓTESIS.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Distribución en México de la garrapata de los géneros <i>Boophilus</i>	4
2.2. Importancia económica de las garrapatas en el ganado bovino.....	5
2.3 Familia ixodidae.....	5
2.3.1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	6
2.3.1.2 Ciclo biológico.....	7
2.4. Enfermedades transmitidas por la garrapata.....	10
2.5 Formas de control.....	11
2.5.1 Control químico.....	12
2.5.1.1 Ixodicidas utilizados para el control de las garrapatas.....	12
2.5.1.2 Métodos de aplicación de ixodicidas para el control de las garrapatas ..	13
2.5.1.3 Resistencia a plaguicidas.....	13
2.5.2 Control biológico.....	14
2.5.3. Plaguicidas botánicos.....	14
2.5.3.1 Metabólitos secundarios.....	15
2.6 Fundamentos de la separación de componentes.....	16
2.6.1 Tipos de Cromatografía Líquida.....	17
2.6.2 Cromatografía en capa fina/delgada (CCF).....	18

2.6.3 Cromatografía líquida al vacío (VLC)	18
2.7 Descripción del material vegetal	19
2.7.1 Género <i>Acacia Mill.</i>	19
2.7.1.1 <i>Acacia cornígera L.</i>	19
2.7.1.2 Descripción botánica.....	20
2.7.1.3. Distribución	20
2.7.1.4. Fitoquímica y acción farmacológica de las Acacias	20
III. METODOLOGÍA.....	22
3.1 Localización del área de estudios	22
3.2 Colecta de Garrapatas	22
3.3 Selección y procesamiento del material vegetal	23
3.4 Elaboración del extracto puro acuoso	23
3.5 Elaboración del extracto puro metanólico	23
3.6 Bioensayos	24
3.7 Separación del extracto con mayor ixodicida	24
3.7.1 Cromatografía de Capa Delgada (CCD):	24
3.7.2 Partición con Acetonitrilo	24
3.7.3 Cromatografía líquida al vacío (VLC)	24
3.8 Tratamientos evaluados.....	26
3.9 Diseño experimental y Análisis Estadístico.....	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
V. CONCLUSIÓN.....	31
VI. LITERATURA CITADA.....	32
VII. ANEXOS	40

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Situación actual del control de la garrapata <i>Boophilus</i> spp (SENASICA, 2018).....	4
Figura 2 Ubicación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia CII-UNACH22	4
Tabla 1 Taxonomía <i>Rhipicephalus microplus</i>	6
Tabla 2 Clasificación de metabolitos secundarios.....	16
Tabla 3 Descripción taxonómica <i>Acacia cornígera</i>	19
Tabla 4 Sistemas para VLC.....	25
Tabla 5 Extractos crudos y diluciones	26
Tabla 6 Efecto en la mortalidad de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> de extractos crudos de <i>Acacia cornígera</i>	27
Tabla 7 Concentración Letal Media de extractos metanólicos	28
Tabla 8 Efecto de fracciones en la mortalidad de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	29
Tabla 9 Efecto de fracciones con concentración <5mg/ml en la mortalidad de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	29
Cuadro A 1 Resultados de tratamientos acuosos	40
Cuadro A 2 Resultados de tratamientos metanólicos.....	41
Cuadro A 3 Rendimiento del extracto crudo metanólico	41

RESUMEN

La garrapata común *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es considerada el ectoparásito más importante en la ganadería bovina, ya que ha sido asociada con pérdidas económicas, desde sus efectos directos (estrés, anemia, daños en la piel) y la posibilidad de ser vector de múltiples agentes hemoparásitarios (*Anaplasma marginali*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*), que provocan enfermedades de importancia para la comercialización de los productos y subproductos de este sector pecuario. El uso repetitivo y tradicional de acaricidas comerciales se ha convertido en un serio problema en cuanto a la resistencia adquirida por esta garrapata. Por esta razón, las investigaciones de productos botánicos ha llamado mucho la atención como una alternativa prometedora en el control de este ectoparásito. En este estudio se determinó la eficacia ixodida de extractos crudos (Acuosos y Metanólicos) de *Acacia cornígera* L. en larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (acari:ixodidae). Si bien *Acacia cornígera* es considerado una maleza en los potreros, demostró tener un efecto en la mortalidad de larvas (14 días) de *R. microplus*, en cada uno de sus órganos (Hoja, Tallo, Raíz). Los tratamientos Tallo acuso, Raíz, Tallo y Hoja metanólicos, evidenciaron ser más activas a comparación de la actividad acaricida del ixodida sintético Amitraz 12.5 (67%), con 86%, 95%, 93% y 83% de mortalidad respectivamente. De las fracciones activas evaluadas, 3 demostraron una efectividad de 90-97% superior a lo establecido en la adaptación de la NOM-006-1993. Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANOVA ($p=0.05$) y una comparación de medias con la Prueba Tukey ($p=0.05$) en el Sistema de Análisis Estadístico (SAS versión 9.1). Se utilizó la Prueba de Inmersión Larval con 5 repeticiones para cada tratamiento incluyendo los controles positivo (Amitraz 12.5%) y negativos (agua destilada y Tween20 2%)

Palabras Claves: Garrapatas *R. microplus* *Acacia cornígera* ixodidas botánicos

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina en México fue introducida durante la época de la colonización. La actividad hace referencia a la domesticación de los animales, la cual está enfocada básicamente para la obtención de carne, con un volumen obtenido de 1.82 toneladas y leche donde el volumen obtenido fue de 10.88 toneladas, también se emplea como fuerza de trabajo y genera subproductos.

Chiapas es el tercer estado a nivel nacional en la producción de la ganadería bovina, aportando el 6.2 % de la producción total, según datos de INEGI (2010), Actualmente suman más de mil productores dedicados a esta actividad se ratifican el número de asociaciones en la entidad.

La ganadería bovina en el estado, es una actividad importante, que cuenta con deficiencias en producción de leche o carne, por la presencia de enfermedades e infestaciones por parásitos internos, y externos; las garrapatas del genero *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es una de las más importantes por su impacto sanitario y económico.

El impacto económico en la ganadería se debe a las pérdidas de millones de dólares que causan anualmente a los productores, debido a los daños ocasionados en las pieles por acción de las picaduras, anemia, transmisión de los patógenos *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* (Brown *et al.*, 2006) y *Anaplasma marginale* (De la Fuente *et al.*, 2006) así como en los tratamientos garrapaticidas (ixodicidas) y la mano de obra para su aplicación.

Las garrapatas son consideradas como el segundo grupo de vectores de enfermedades que afectan a los humanos solo después de los mosquitos y el más importante grupo vector de enfermedades que afectan a los animales salvajes y domésticos (de la Fuente *et al.* 2006)

El problema varía mucho dependiendo de la región, especies de garrapatas presentes, agentes transmisibles, población de hospederos involucrados, así como de la situación socioeconómica y el avance tecnológico en la aplicación de las medidas de control.

La estrategia más utilizada para su control consiste en la aplicación de baños de aspersión con bomba de mochila utilizando productos químicos sobre el cuerpo de los animales infestados a intervalos específicos, en la actualidad se llega a tratar en un lapso no mayor a 15 días entre tratamientos.

Sin embargo, el uso irracional ha ocasionado la generación de poblaciones resistentes a la acción de éstos, (Alonso-Díaz *et al.* 2006). Esta situación, implica que la disponibilidad actual de los ixodicidas se encuentre comprometida debido al progresivo incremento de resistencia y a los altos costos productivos.

Ante esta problemática, se han generado durante la última década investigaciones donde la evaluación de extractos de plantas con propiedades acaricidas que pueden ser usadas en sustitución de los productos sintéticos, las cuales son menos tóxicas a los animales, al ambiente y solubles en agua.

Especies de plantas del género de *Acacia* contienen en su estructura metabolitos secundarios que le dan propiedad biocida, sin embargo existe pocos estudios que aporten información sobre la actividad ixodida de estos biocomponentes contra la garrapata *R. (B) microplus*.

1.1 Objetivo general

Determinar la eficacia ixodida de extractos crudos de *Acacia cornígera L.* en larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (acari:ixodidae)

1.1.1 Objetivos específicos

- a) Evaluar *in vitro* el efecto de mortalidad que tienen los extractos (acuosos y metanólicos) en la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en su etapa larval.
- b) Fraccionar el extracto con mayor toxicidad sobre la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en su etapa larval.

1.2 Planteamiento del problema

Los ixodicidas de origen químico que se han utilizado para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* incluyen los grupos de las Amidinas (Am), Organofosforados (OP) y Piretroides (PS); sin embargo, su uso continuo e irracional ha ocasionado la generación de garrapatas resistentes a la acción de estos productos químicos (Rodríguez *et al.*, 2011). Incrementando un efecto negativo en el impacto ambiental debido a la contaminación que genera el efecto residual excretado en las heces. Además de generar pérdidas económicas, productivas y predisposición de enfermedades causadas por hemoparásitarios (Rodríguez *et al.*, 2005).

Ante esta problemática una de las alternativas es la investigación sobre extractos de planta con propiedades acaricidas, que pueden ser utilizadas en sustitución o

complemento de la rotación de los productos ixodicidas de mayor uso en las unidades de producción.

1.3 Hipótesis

Las fracciones obtenidas de extractos acuosos y/o metanólicos de *Acacia cornígera* potencian el efecto ixodicida sobre larvas de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari:ixodidae)*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Distribución en México de la garrapata de los géneros *Boophilus*

La distribución geográfica de las garrapatas en México obedece a factores ambientales, entre los que destacan la humedad relativa, temperatura, y la vegetación, que son determinantes en la distribución de las especies. Otros factores que intervienen en la distribución son la altitud, presencia y abundancia de hospederos y las prácticas de control o erradicación que el hombre ejerce sobre las poblaciones de garrapatas.



Figura 1 Situación actual del control de la garrapata *Boophilus* spp (SENASICA, 2018)

Rhipicephalus (B) microplus presenta en el país un área de distribución, que abarca zonas tropicales, templadas y áridas; en conjunto se considera que cubre 1,043,772 km², lo que representa el 53.0% del territorio nacional, la superficie en erradicación abarca 67,472.76 km², el 3.44% del territorio nacional. La superficie en control comprende 1, 292, 407.02 km², el 65.96% del territorio nacional. Se reconoce a los Estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur como libres del ectoparásito. En fase de erradicación se encuentran los Municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los

municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; los municipios de la zona Desierto del estado de Coahuila: Ocampo y Sierra Mojada (SENASICA, 2018).

2.2. Importancia económica de las garrapatas en el ganado bovino.

La garrapata *R. microplus* ha sido la especie principal bajo control en las campañas realizadas en México, debido a su importancia económica y sanitaria. A través de su acción directa o del efecto indirecto sobre la producción animal, las garrapatas causan las mayores pérdidas a la ganadería bovina. El daño de la piel que es causado por el piquete y los abscesos que se desarrollan producen apreciables pérdidas en el valor de las pieles. Además de la pérdida de sangre y un efecto por toxinas. En el caso de las vacas lecheras, estos abscesos frecuentemente están involucrados en el daño y la pérdida de uno o más cuartos de la glándula mamaria con la consecuente disminución de la producción láctea (Álvarez, 2008).

Las garrapatas tienen un efecto nocivo directo sobre la ganancia de peso de los animales. En el ganado de engorda cada garrapata adulta repleta de sangre ha demostrado reducir la ganancia de peso diaria en 0.6 g. La FAO menciona que las pérdidas económicas atribuidas a *R. (B) microplus* por disminución en la ganancia de peso se han estimado en 7.3 US dólares/animal/año. Asimismo, las garrapatas producen bajas en la fertilidad, mayor tiempo en la engorda y dificultan la importación de razas mejoradas para incrementar la calidad genética en áreas infestadas (Álvarez, 2008).

El efecto indirecto está dado por las enfermedades que transmiten y por problemas en la comercialización de animales infestados. Se estima que en México las garrapatas y enfermedades que transmiten producen pérdidas a la ganadería bovina de aproximadamente 48 millones de dólares (USD) anuales (Álvarez, 2008).

2.3 Familia ixodidae

La familia Ixodidae contiene las especies conocidas como garrapatas duras y de las cuales se conocen cerca de 863 especies (Barros *et al.* 2006), se encuentran ampliamente distribuidos en las aéreas tropicales y subtropicales, templadas del planeta, y representan un grave problema económico y de salud pública. Los miembros de esta especie son pequeños y carecen de ornamentación; dentro de esta familia destacan *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *R. annulatus* (Quiroz *et al.*, 2000).

2.3.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

La especie de garrapata más relevante para la ganadería bovina, en definición es un ectoparásito que se alimentan de la sangre de sus hospedadores (*hematófagos*). Durante la toma de sangre, y a través de varias vías como la saliva, el fluido coxal, la regurgitación del contenido intestinal o las heces, las garrapatas pueden transmitir a sus hospedadores un amplio y variado conjunto de patógenos causantes de graves enfermedades, algunas de ellas letales (Álvarez, 2008).

Fue introducida desde la india a muchas regiones de Asia tropical y subtropical, Nororiente de Australia, Madagascar, costas y tierras bajas de nororiente de África, y muchas regiones del sur y centro América, México y el Caribe (George, 1987)

2.3.1.1 Clasificación taxonómica

Las garrapatas son artrópodos de la clase arácnida, organismos muy adaptados a la vida parasitaria, ya que son chupadores de sangre que pueden llegar a pasar varios meses sin alimentarse si las condiciones climáticas no lo permiten. Poseen un exoesqueleto duro que recubre su cuerpo segmentado y todas en estado adulto poseen patas en número par (Rodríguez, 2008).

Son ácaros cosmopolitas y ectoparásitos temporales obligados de reptiles, anfibios, aves, mamíferos, incluyendo animales domésticos y silvestres. Por su tamaño resultan observables a simple vista.

Las garrapatas Taxonómicamente se pueden clasificar de la siguiente manera (Hoskins, 1991) (Tabla 1)

Tabla 1 Taxonomía *Rhipicephalus microplus*

Phylum:	<i>Arthropoda</i>
Subphylum	<i>Chelicerata</i>
Clase	<i>Arachnida</i>
Subclase	<i>Acari</i>
Orden	<i>Parasitiformes Acarina</i>
Suborden	<i>Ixodida</i>
Superfamilia	<i>Ixodoidea</i>
Familia	<i>Ixodidae – Argasidae</i>

2.3.1.2 Ciclo biológico.

Cada hembra pone unos 4500 huevos. Estos tardan entre 2 y 20 semanas en eclosionar, según las condiciones climáticas: el calor y la humedad aceleran el proceso. Las larvas apenas se desplazan del lugar donde nacieron. Pero pueden ser fácilmente transportadas a otros pastos por hospedadores alternativos o por inundaciones. En períodos secos y templados pueden sobrevivir hasta 4 meses sin encontrar un nuevo hospedador. En el suelo, las larvas se suben a las hierbas o arbustos esperando que pase un hospedador para adherirse a él. Una vez sobre el hospedador se fijan a él, comienzan a ingerir sangre y completan su desarrollo a adultos en unas 2 semanas. Las hembras repletas de sangre se dejan caer al suelo donde ponen los huevos y mueren (Cortés-Vecino, 2011).

2.3.1.2.1 Fase no parasítica.

Es llamada de vida libre y comprende desde que la garrapata hembra repleta se desprende de su hospedero, hasta la aparición de las larvas en la vegetación. Esta fase se divide en cinco períodos: a) preoviposición, b) oviposición, c) postoviposición, d) incubación y e) eclosión. (Cruz, 2007)

- a) **Preoviposición.** Comprende desde el desprendimiento de la garrapata repleta del hospedero hasta la postura del primer huevo. La garrapata *B. microplus* experimenta repleción final (un llenado de sangre), lo cual principalmente sucede durante la noche y se desprende al comienzo de la mañana. Al caer la garrapata al suelo busca lugares sombreados y protegido, para poder iniciar el proceso de oviposición.
- b) **Oviposición.** Es el tiempo considerado desde que se inicia la puesta de los primeros huevos hasta los últimos.
- c) **Postoviposición.** Es el periodo desde que la garrapata repleta pone el último huevo hasta su muerte.
- d) **Incubación.** Este período comprende desde que se inicia la oviposición hasta la emergencia de las larvas, pudiéndose ver afectado por factores ambientales como son la humedad y la temperatura, influyendo decisivamente en la evolución del embrión.
- e) **Eclosión.** Durante esta período la larva emerge del huevo, los mejores porcentajes de eclosión se obtienen en temporadas que tienen una temperatura óptima de 25-35°C y una humedad relativa del 95%.

2.3.1.2.2 Fase de encuentro.

La fase de encuentro se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación al hospedero y está influenciada por variables básicas como la distribución, longevidad, ritmos de actividad de las larvas, la estructura y tipo de vegetación, así como la densidad de bovinos y aspectos relacionados con su comportamiento en el pastizal (Cruz, 2007).

El encuentro de hospedero comprende dos períodos: **pasivo y búsqueda.**

a). Período pasivo. Este período corresponde al primer estímulo posterior a la eclosión de las larvas, requiriéndose de un período para que dichas larvas adquieran viabilidad necesaria para resistir los efectos del ambiente (Cruz, 2007).

b). Período de búsqueda. Es el tiempo que transcurre durante el período pasivo y el encuentro del hospedero, en este período las larvas utilizan su capacidad de sobrevivencia para resistir los efectos del medio ambiente, este evento está influenciado por diversos factores, considerándose de mayor importancia las condiciones ambientales, y sus reservas nutritivas las cuales afectan directamente a la longevidad, densidad y actividad de las larvas en los pastos y que al mismo tiempo influyen en forma directa en la cantidad y calidad de los mismos (Aguirre, 1986).

Este periodo es uno de los más críticos en la vida de las garrapatas ya que necesitan encontrar un hospedero adecuado, nutrirse y completar su ciclo; además cuentan únicamente con sus reservas para resistir períodos prolongados de inanición. Otro aspecto que influye es la densidad de hospederos, ya que es lógico que cuanto mayor sea el número de animales por unidad de superficie, más fácil resulta que la larva encuentre alguno (Aguirre, 1986).

Por otra parte es importante mencionar aspectos de comportamiento y fisiológicos de las larvas que les permite detectar movimientos de cuerpos en la cercanía cuando se encuentran en las partes superiores de los pastos agrupadas en grandes cantidades, los cuales hacen que estas incrementen su actividad cuando son estimulados por el desprendimiento de bioxido de carbono (CO₂) de la piel de los animales adoptando una posición particular al sostenerse en sus dos patas posteriores, extendiendo el par anterior, para tratar de adherirse al posible hospedero. La duración de la fase de encuentro varía de acuerdo a las condiciones climáticas, influyendo principalmente la temperatura y la humedad ambiental. La temperatura tiene una relación inversa con la duración de la sobrevivencia larval, es decir a medida que la temperatura aumenta, la duración de dicha fase disminuye (Cortés-Vecino, 2011).

2.3.1.2.3 Fase parasítica.

La etapa parasitaria comienza una vez que la larva ha preferido a un bovino como hospedero. Este ciclo se caracteriza por pequeñas variaciones en su duración. Al eclosionar las larvas, permanecen cerca del lugar en que eclosionan, luego suben al pasto y pequeños arbustos en espera de un hospedero susceptible, las larvas son estimuladas fuertemente por el bióxido de carbono (Cortés-Vecino, 2011).

Sobre el hospedero, las larvas se fijan de preferencia en zonas protegidas de la radiación solar, vientre, axila, parte interna de brazo y pierna, ubre, escroto e ingle, también se pueden encontrar en cuello, hombro, papada, etc.¹⁰ El ciclo parasítico puede ser dividido en tres fases principales: larva, ninfa y adulto (Cortés-Vecino, 2011).

Larva. Sus características morfológicas más importantes son: tres pares de patas y una dentadura en doble fila en el hipostoma. Una vez que la larva se adhiere al hospedero se desplaza libremente por el cuerpo del animal hasta alcanzar un sitio adecuado para adherirse, perforando la piel del hospedero con los quelíceros, fija el hipostoma y comienza a alimentarse, a las 72 horas el movimiento de las patas se debilita y gradualmente se minimizan en las articulaciones distales, únicamente persisten movimientos en las articulaciones coxofemorales (Cruz, 2007).

Una vez repleta la hembra mide aproximadamente 1.0 mm de largo, tiene el tegumento extendido y de un color blanco cremoso. Conforme el tiempo pasa y la muda se aproxima, el tamaño se incrementa hasta alcanzar 2.0 mm de largo. Por lo general se puede apreciar el mayor porcentaje de larvas repletas después del sexto día hasta el noveno día (Cruz, 2007).

Ninfa: Durante esta etapa ocurren los cambios morfológicos más significativos: aparecen cuatro pares de patas y una doble fila de dientes (3/3) en el hipostoma. Asimismo, se pueden apreciar espiráculos en ambos lados del cuerpo detrás del cuarto par de patas (Cruz, 2007).

La ninfa es el producto de la primera muda de la larva repleta; la cual se desprende del tegumento para adherirse cerca del tegumento residual de su anterior fase, y se mantiene adherido a la epidermis. Esta nueva fase parasitaria es más pequeña que su predecesora midiendo 1.0 mm de largo. Una vez adherida a la piel, sus patas pierden movilidad en el mismo orden que cuando era larva. Generalmente la primera ninfa aparece después del sexto día post-infección y ya para el noveno día, la gran mayoría puede ser apreciada (Cruz, 2007).

La ninfa repleta tiene forma oval y de color gris oscuro, mide aproximadamente 2.5 mm de largo al comienzo y cerca de 4 mm al final de la fase. El cuerpo se estrecha notablemente detrás del último par de patas. Al final de la etapa se puede notar el dimorfismo sexual, ya que las hembras son más grandes y de color claro en relación con los machos (Cruz, 2007).

Generalmente aparecen al día nueve post-infección, y la mayoría se observa alrededor del día 13, es posible que se observen hasta el día 28 post-infección, dependiendo en gran medida del lugar donde se localicen. El peso se incrementa notablemente, duplicándose alrededor del día 10 y alcanzando un máximo el día 14 post-infestación (Cruz, 2007).

Adulto. Los cambios morfológicos más sobresalientes de esta etapa son los cuatro pares de patas y una doble fila de dientes (4/4) en el hipostoma infestación (Cruz, 2007).

2.4. Enfermedades transmitidas por la garrapata

Babesia bovis, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, son los agentes causales de la fiebre debida a garrapatas en el ganado vacuno;

2.4.1 Babesiosis

La babesiosis bovina es una enfermedad infecciosa producida por protozoarios del género *Babesia*; se transmite en la naturaleza únicamente por la picadura de garrapatas afecta a una amplia gama de animales domésticos, salvajes e incluso seres humanos; sin embargo el impacto económico está dentro de las explotaciones de ganado bovino, las especies que están relacionadas con estos son *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Cruz, 2007).

Son transmitidas por la garrapata *Rhipicephalus (B.) microplus*. la transmisión se realiza en forma biológica a través del ovario de la garrapata ingurgitada, lo que origina larvas contaminadas. Cuando la larva pica al animal, transmite la *Babesia bovis*; la transmisión de *Babesia bigemina* sólo puede hacerse cuando la garrapata esté en estado de ninfa o de adulto (Cruz, 2007).

La sintomatología de *babesiosis* es muy parecida a la que presentan los animales con *anaplasmosis*, pero además, se presenta hemoglobinuria debido a la destrucción de los glóbulos parasitados en la sangre circulante, mientras que en *anaplasmosis* esa lisis se produce en los órganos hematopoyéticos como el bazo, medula ósea (Gasque, 2008).

Para el diagnóstico de campo se debe conocer si es una zona endémica de garrapatas sobre todo del Género *Rhipicephalus (B) microplus*, los signos clínicos sugestivos de babesiosis. Si estos signos están también ligados a esplenomegalia y a lesiones post mortem asociadas con destrucción eritrocítica, el diagnóstico positivo requiere la identificación de la Babesia en los frotis sanguíneos o pruebas serológicas (Gasque, 2008).

2.4.2 Anaplasmosis

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa que se presenta generalmente en forma aguda en animales adultos y en animales que nunca han estado en contacto con el microorganismo infectante, por bacterias intracelulares del orden rickettsiae del género de *Anaplasma* (Gasque, 2008).

La transmisión de *A. marginale* se realiza en forma biológica por la picadura de la garrapata *Rhipicephalus (B.) microplus*, aunque también puede transmitirse en forma mecánica por el uso de agujas u otros instrumentos quirúrgicos contaminados. Los animales jóvenes son menos susceptibles a esta enfermedad (Gasque, 2008).

La enfermedad cursa con una sintomatología clínica, donde se presenta un estado febril poco antes o simultáneamente con la presencia del parásito en los glóbulos rojos del animal, los cuales destruye y el animal muere por anemia. Otros síntomas diversos como ictericia, inapetencia, supresión de la producción de leche, parálisis del rumen, constipación y aborto, son también muy frecuentes en los casos de *anaplasmosis* (Gasque, 2008).

El tratamiento para esta enfermedad se basa en la administración inmediata en la primera etapa con antibióticos como tetraciclina y imidicarbamol (Gasque, 2008).

2.5 Formas de control

El control de la garrapata se orienta en el combate de sus formas parasitas (larvas, ninfas y adultas) con la finalidad de evitar que se originen nuevas generaciones (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Según FAO (2007), una vez que la infestación en las colonias se concreta, no existen medidas quimioterapéuticas fáciles o económicas. Sin embargo se han desarrollado diferentes métodos para su control.

2.5.1 Control químico

El tratamiento de los animales con acaricidas químicos es el método más utilizado para el control de las garrapatas. Se lleva a cabo utilizando baños, aerosoles de forma eficiente como tratamiento y prevención de las infestaciones por garrapatas; sin embargo en muchas ocasiones esta forma de control no se aplica correctamente por parte de los productores y puede ser necesaria la asistencia veterinaria de forma continua para conseguir tratamientos efectivos y evitar el problema de resistencias.

El tratamiento masivo con acaricidas puede ser la causa de envenenamientos de los animales, la carne y leche, los cuales no serían útiles para el consumo humano por los elevados riesgos sanitarios (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

2.5.1.1 Ixodicidas utilizados para el control de las garrapatas

Organofosforados: inhiben la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, produciendo un aumento de estímulos nerviosos de los insectos. Son lipofílicos y se absorben a través de la piel y se acumulan en tejido adiposo donde son liberados lentamente la sangre y otros fluidos fisiológicos. Tienen una permanencia de 4 a 8 días (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Amidinas: causan la muerte por inhibición de la monoaminoxidasas, aunque, no se ha dilucidado la posible partición de los receptores octopamina. (Amitraz) (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Piretroides: provocan un bloqueo de la actividad motriz o bien de la producción de excitabilidad, incoordinación de movimiento, irritabilidad, parálisis, letargo y muerte del insecto. El efecto residual es de aproximadamente 15 días (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Lactonasmacrolíticas o Endectocidas: su modo de acción es un incremento en la liberación del ácido gammaaminobutírico (GABA) del sistema nervioso, produciendo un estado irreversible de descanso, parálisis y muerte del parásito. En este grupo se encuentran ivermectina, avermectina, doramectina, etc (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Fenilpirazolonas: Están relacionadas con las avermectinas por el modo de acción, fipronil es la sustancia activa de este grupo (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Inhibidores de desarrollo: se caracterizan por interferir en la formación de la quitina, impidiendo la formación de la cutícula, una limitante de este tratamiento es

que las garrapatas no mueren al instante, pero tiene un impacto en la capacidad reproductiva (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

2.5.1.2 Métodos de aplicación de ixodicidas para el control de las garrapatas

Baños de inmersión: con este método se logra un completo mojado del cuerpo del animal, lo que permite que el producto este en contacto con los estados evolutivos de las garrapatas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Aspersión manual: es el método más simple de mojado y es utilizado cuando son pocos animales, el equipo primordial en una bomba de aspersión manual (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Tratamiento por derrame dorsal: “pour-on” y “spot-on”: el método “pour-on” consiste en aplicar el producto sobre la línea media dorsal del bovino, desde la cruz hasta la base de la cola. El método “spot-on” se aplica en una sola zona del dorso del animal (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Tratamiento parental: es la aplicación de los productos por vía intramuscular o subcutánea (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

Tratamiento con aretes y collares impregnados: son dispositivos elaborados de plástico que contienen el pesticida impregnado y su eliminación es paulatina por el lugar de aplicación hasta alcanzar a llenar todo el cuerpo del animal (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

2.5.1.3 Resistencia a plaguicidas

La consecuencia de un uso extensivo de los químicos muchas especies de garrapatas han desarrollado resistencia a muchos de las clases de acaricidas en varios países del mundo. Las pruebas con larvas son particularmente eficientes para medir niveles de resistencia de poblaciones de garrapatas. La detección de la resistencia además del registro de los acaricidas usados ofrecen una valiosa información para el manejo y control de garrapatas y el monitoreo de la resistencia en campo.

En México el primer caso de resistencia a organofosforados (OP) fue detectada en *R. (B.) microplus* en Veracruz en 1983. Hacia 1986, los acaricidas piretroides sintéticos (SP) fueron introducidos a México para aliviar el problema de Resistencia a los OP, sin embargo hacia 1993 se detectó la resistencia a SP (Fragoso *et al.*, 1995). Las amidinas (amitraz) fue introducida en 1986, su uso fue limitado por los altos costos,

sin embargo Rodríguez-Vivaz et al (2001) confirmaron el primer caso de resistencia a amitraz.

El desarrollo de la resistencia en una población de garrapatas depende de la frecuencia de los individuos resistentes en la población y la intensidad de la presión de selección realizada con químicos. Existen reportes de organofosforados (OP), Piretroides sintéticos (SP), amitraz, ivermectina y fipronil, los cuales representan la mayor parte de los acaricidas disponibles actualmente en el mercado (Furlong, 1999).

2.5.2 Control biológico.

Depredadores: entre los depredadores de la garrapatas se encuentran las hormigas (*Pachycondylaspp*), también existen alrededor de 50 especies de aves "garrapateras",
Bacterias: *Bacillusthuringienensis*, *Cedecealapagei* que han demostrado un alta mortalidad en condiciones de laboratorio (Fernandes y Bittencourt, 2008).

Nematodos entomopatògenos: *Heterorhabditidae* y *Steinernematidae*, tienen la capacidad de matar a hembras ingurgitadas (Fernandes y Bittencourt, 2008).

Parasitoides: se han de mostrado que los parasitoides del género *Ixodiphagusson* aislado llegan a parasitar a las garrapatas en su fase de larva (Fernandes y Bittencourt, 2008).

Hongos entomopatògenos: estos hongos poseen el potencial para el control de las garrapatas, existen 700 especies, de las cuales solo el 10 % se usan para el control los más importantes son *Metarhizium spp* y *Cordyceps bassiana* (Fernandes y Bittencourt, 2008).

2.5.3. Plaguicidas botánicos

Los plaguicidas botánicos son derivados de algunos órganos o ingredientes activos de las plantas. En los últimos años, la aplicación de productos botánicos ha llamado mucho la atención como alternativas efectivas a los pesticidas sintéticos. Estos productos vegetales son muy eficaces, menos costosos, biodegradables y más seguros que sus equivalentes sintéticos (Singh *et al.*, 1996).

Varias plantas que pertenecen a diferentes familias (*Meliaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Apiaceae*, *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*) contienen una serie de fitoquímicos tales como saponinas, taninos, alcaloides, di y triterpenoides, entre otros, los cuales presentan alta actividad insecticida (Villalobos,

1996). Los factores climáticos influyen en la acumulación de compuestos químicos en los árboles y sus estructuras morfológicas. Las regiones tropicales tienden a favorecer la acumulación de sustancias químicas en los vegetales, por lo que las concentraciones menores de un producto elaborado con material originario de esas zonas geográficas producen mejores resultados que los elaborados en otras latitudes (Fernandes, 2007).

Chungsamarnyart *et al.* (1992) lograron aislar la fracción activa ixodícida de la *Annona squamosa* L. contra *R. microplus* y encontraron que los compuestos activos constituyentes de dicha fracción eran estructuralmente similares a esquamosina, acetogenina y a un triterpenoide no identificado. Por otra parte Lyndon *et al.* (1999) aislaron de la raíz de *Petiveria alliacea* un compuesto activo puro llamado dibenciltrisulfido y lo evaluaron contra adultas *R. microplus* reportando eficacias de 50%. En estudios realizados en Turquía se evaluó la eficacia con extractos de *Micromeria fructicosa*, *Nepeta racemosa* y *Origanum vulgare* contra ninfas y adultos de *Tetranychus urticae* y se encontró que los compuestos encargados de la actividad ixodícida eran α -terpineno, γ -terpineno, timol, carvacrol, linalol, eugenol, metil-eugenol y metil chavicol (Onder *et al.*, 2006).

2.5.3.1 Metabólitos secundarios

Los metabólitos secundarios son sustancias químicas producidas por algunas especies de plantas para su defensa, comunicación y reproducción. Se han caracterizado cerca de 3,000 metabolitos secundarios de origen vegetal con actividad biológica sobre distintos organismos. Se le atribuye el efecto antigarrapata a las sustancias químicas o aceites esenciales, identificándose como metabolitos secundarios presentes en plantas, como una forma de defensa contra los depredadores. Le atribuyen al efecto aditivo de los compuestos su efecto repelente, ixodícida o disminución de la oviposición, entendiéndose como repelente el agente que resiste (Mareggian, 2001).

2.5.3.1.1 Modo de acción

El efecto nocivo de los extractos de plantas o sus compuestos puros contra los insectos se puede manifestar de diversas maneras, incluyendo la toxicidad, la mortalidad, inhiben el crecimiento, la supresión de comportamiento reproductivo y reducen la fertilidad y la fecundidad del insecto. La acción de los metabolitos secundarios depende de su clasificación, siendo los siguientes los más comunes (Fernandes, 2011).

**Tabla 2 Clasificación de metabolitos secundarios
Característica.**

Metabolito	
Terpenos.	Son los principales componentes de los aceites esenciales, provocan repelencia, inapetencia y evitan la ovoposición
Fenoles	Son compuestos hidroxilados que pueden actuar como antialimentarios; otros como los taninos actúan como barrera por su sabor amargo, y las cumarinas inhiben el crecimiento de hongos y son tóxicas para nematodos, ácaros e insectos.
Alcaloides	Son el grupo con mayor diversidad en cuanto a metabolitos secundarios, tiene una gran variedad de efectos tóxicos; un ejemplo de ellos es la nicotina.
Glicósidos cianogénicos	Liberan cianuro cuando se hidrolizan, por lo que son tóxicos y repelentes.
Compuestos azufrados	Los más importantes son los tiofenos, los cuales tiene acción insecticida y nematicida
Flavonoides	Son compuestos que proporcionan color a las plantas y flores, por ejemplo, la rotenona. Actúan como inhibidores enzimáticos y tienen actividad repelente

2.6 Fundamentos de la separación de componentes

La separación de los componentes de un extracto, tienen como objetivo potenciar el efecto que pueda obtener, también se utiliza para identificar sustancias específicas. Para llegar a estos resultados, existen técnicas cromatográficas basadas en la interacción de una fase móvil líquida y una fase estacionaria. Cinco aspectos fundamentales permiten distinguir las semejanzas y diferencias entre ellas:

El principio de separación que emplea cada una de ellas

- Las características de las matrices que utilizan
- La presión a la que se operan
- La relación de equilibrio del sistema cromatográfico.
- La cinética de la adsorción (Tejeda *et.al*, 2011).

2.6.1 Tipos de Cromatografía Líquida

De acuerdo al principio utilizado para la separación se pueden distinguir tres tipos básicos de cromatografía por elución: la cromatografía líquido-líquido, la cromatografía de filtración en gel o cromatografía por exclusión por tamaño (SEC) y la cromatografía por adsorción (Tejeda *et.al*, 2011).

- Cromatografía líquido-líquido: En la cromatografía líquido-líquido se utiliza un adsorbente sólido impregnado con un líquido que funciona como fase estacionaria. La separación de los solutos es resultado de las diferencias en los coeficientes de partición de cada uno de los solutos de la mezcla entre las fases líquidas (estacionaria y móvil)
- Cromatografía por filtración en gel: La cromatografía por filtración en gel utiliza partículas fabricadas de geles porosas que actúan como mallas moleculares que permiten separar moléculas en función de su tamaño. Este tipo de cromatografía es comúnmente empleada en las últimas etapas de los procesos de obtención de productos biotecnológicos
- Cromatografía por adsorción: La cromatografía por adsorción emplea adsorbentes en los que los solutos a separar presentan diferentes grados de retención. Existen varias modalidades caracterizadas básicamente por el tipo de adsorbente que emplean, llamadas cromatografía de adsorción: física, de intercambio iónico, de interacción hidrofóbica, de fase reversa y de afinidad
- Cromatografía de adsorción simple: La cromatografía por adsorción simple se caracteriza por la unión del soluto al adsorbente por fuerzas débiles del tipo de van Der Waals. Este tipo de cromatografía es poco selectiva entonces se utiliza poco a nivel analítico, pero por su bajo costo es utilizada a nivel industrial
- Cromatografía por intercambio iónico La cromatografía por intercambio iónico se basa en la interacción electrostática entre los grupos cargados del soluto y los grupos de carga contraria de los adsorbentes
- Cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de fase reversa: Tanto la cromatografía de interacción hidrofóbica como la de fase reversa, se basan en la interacción entre las regiones hidrofóbicas de las biomoléculas y los grupos hidrofóbicos de los adsorbentes empleados

- **Cromatografía por afinidad:** La cromatografía por afinidad está basada en interacciones altamente específicas entre el soluto de interés y el adsorbente. Este tipo de cromatografía es muy empleada en la purificación de proteínas. Los adsorbentes utilizados en esta cromatografía presentan grupos químicos llamados ligandos que son altamente específicos para la unión con los solutos (Tejeda *et.al*, 2011).

2.6.2 Cromatografía en capa fina/delgada (CCF)

Se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues, un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares (UNAM, 2007).

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos ya que es precisa y más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos (UNAM, 2007).

2.6.3 Cromatografía líquida al vacío (VLC)

Esta técnica se basa en la retención del analito en una columna sólida como granos de fibra o cualquier otro material inerte químicamente, sobre la cual hay distribuida una capa fina de un disolvente afín al analito; y una fase móvil líquida o gaseosa; cuando la fase móvil pasa a través de la columna, el equilibrio entre esta y la estacionaria está mediado por el analito, que se reparte entre ambas y queda al final disuelto en la fase estacionaria. Las moléculas del analito se equilibran entre la fase estacionaria y la móvil, a esto se le llama partición puesto que se distribuyen, o sea se reparten dependiendo de la fisicoquímica del sistema, entre las dos fases (UNAM, 2007).

Consta de un Soporte: cilíndrico de vidrio, metal o plástico. Fase estacionaria: sólida constituida por un adsorbente polar (silicogel, alúmina o ambas), también pueden ser

resinas por intercambio aniónico o catiónico, geles de cromatografía por filtración, etc. Fase móvil: líquida, la cual puede variar ampliamente durante el desarrollo, siempre en forma gradual, es decir de menor a mayor polaridad. Proceso: dependerá de la fase estacionaria, puede ser por adsorción, intercambio iónico, filtración, afinidad, o partición (Tejeda *et.al*, 2011).

2.7 Descripción del material vegetal

2.7.1 Género *Acacia* Mill.

El género *Acacia* es el segundo más grande en la familia *Leguminosae-Fabaceae*, con cerca de 1200 especies de distribución pantropical. Britton y Rose (1928) lo dividieron en 12 géneros diferentes, de los cuales tres son de distribución restringida en el Caribe. La mayoría de los taxónomos aceptan *Acacia* como un solo género. Vassal (1972) reconoce tres subgéneros *Acacia*, *Heterophyllum* y *Aculeiferum*. La mayoría de las especies (cerca de 840) son nativas de Australia y pertenecen al subgénero *Heterophyllum*. Muchas de ellas han sido llevadas a otras regiones como ornamentales y se han establecido exitosamente y, en algunos casos, se encuentran naturalizadas, por ejemplo *A. mearnsii* y *A. baileyana* en Europa. Los otros dos subgéneros juegan papeles ecológicos muy importantes y algunas especies tienen diversos usos en las zonas áridas de África y el Medio Oriente (con cerca de 130 especies), y en el continente americano (con 230 especies). En México existen aproximadamente 84 especies, de las cuales 34 son endémicas (Instituto Biología-UNAM, 1998).

2.7.1.1 *Acacia* cornígera L.

Tabla 3 Descripción taxonómica *Acacia* cornígera

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familia:	<i>Fabaceae</i>
Subfamilia:	<i>Mimosoideae</i>
Tribu:	<i>Acacieae</i>
Género:	<i>Acacia</i>
Especie:	<i>A. cornígera</i> (L.) Willd., 1806
Sinonimia.	<i>A. globulifera</i> , <i>A. jansenii</i> , <i>A. spadicigera</i> Schltld. & Cham, <i>A. campecheana</i> Schenck

2.7.1.2 Descripción botánica

Arbusto hasta de 3 m de alto, las ramas y tallos jóvenes glabros. Estípulas espinescentes de hasta 9 cm de largo, cilíndricas, de 7-10 mm de diámetro en la base, de color gris pardo o verdosas. *Hojas* de 10.5-15 cm de largo; pecíolo hasta de 1 cm de largo, acanalado, glabrescente; pinnas de 9-12 pares, de 2.8-5 cm de largo, acanaladas, con una glándula cilíndrica entre cada par, de 1-1.5 mm de largo; folíolos 12-21 pares por pinna, de 4-9 mm de largo, de 1.5-2.5 mm de ancho, angostamente oblongos, glabros, la base ligeramente oblicua, ápice redondeado, vena principal ligeramente excéntrica. Inflorescencias en fascículos de 2 espigas pedunculadas, sobre un eje central de hasta 15 cm de largo, glabro, con dos espinas pequeñas (1-1.5 mm de largo) en la base de cada pedúnculo, persistentes hasta cuando el fruto madura; los pedúnculos constan de dos porciones, la basal de 3-4 mm de largo, más gruesa, con un involucre de 5 brácteas en el ápice, de 1 mm de largo, desiguales; la parte superior de unos 6 mm de largo, más delgada, glabra; brácteas florales de dos tipos, unas en la base de la espiga, de 0.5 mm de largo, asimétricamente peltadas; las otras al lado de cada flor, de 1 mm de largo, peltadas; *Flores* amarillas, hermafroditas o masculinas; cáliz glabro, de 1 mm de largo, tubular, con 5 (-6) lóbulos desiguales, glabro; corola ligeramente más larga que el cáliz, de 1.2 mm de largo, tubular, 5-lobulada; ovario de 0.75 mm de largo, glabro, sésil, sin disco intraestaminal. *Fruto* de hasta 10 cm de largo, terete, indehiscente, los márgenes evidentes en la primera mitad, la segunda carente de ellos, ápice ligeramente apiculado, base aguda. Semillas rodeadas por un tejido esponjoso, amarillento, de 7-9 mm de largo, 4-6 mm de ancho, inmaduras, pleurograma evidente desde su desarrollo inicial (CONABIO, 2012).

2.7.1.3. Distribución

Es nativo del sur de México y Centroamérica. Se distribuye por Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Estados Unidos (*Op cit*)

2.7.1.4. Fitoquímica y acción farmacológica de las Acacias

Las especies del género *Acacia* presenta los siguientes grupos de metabolitos: aceites esenciales, agliconas flavonoides, alcaloides, antocianinas, antraquinonas, carotenoides, chalconas, compuestos reductores, cumarinas, flavonoides mucílagos, principios amargos, saponinas, taninos catéquicos (Villaseñor y Espinosa, 1998).

Las dos familias de metabolitos secundarios que se encontraron con mayor fuerza en las pruebas químicas fueron los carotenoides y los mucílagos (Barrera y Bautista 2008). En las hojas se han detectado los esteroides colesterol, estigmasterol y beta-

sitosterol, el alcaloide isoquinolínico tiramina y el flavonoide camferol. De las flores se han aislado los componentes fenólicos anizaldehído, alcohol y aldehído benzoico, para-cresol, el éster metílico del ácido salicílico y el eugenol. En el fruto se han encontrado los flavonoides glucósido y galoil-glucósido de camferol; en la semilla, los aminoácidos raros ácido djenkílico, sus acetilglutamil y acetilsulfóxido, ácido pipercolico y su derivado 4-hidroxilado (Villaseñor y Espinosa, 1998).

Alcaloides: Los alcaloides encontrados son dimetilriptamina, 5-metoxi-dimetilriptamina y N-metilriptamina. En la mitología Egipcia está asociado el árbol de la *Acacia* por sus características al árbol de la vida (Villaseñor y Espinosa, 1998).

Glucósidos cianogénicos: Diecinueve especies de *Acacia* en las Américas contienen glucósidos cianogénicos, que al ser expuestos a una enzima que escinde específicamente glucósidos, pueden liberar cianuro de hidrógeno en las hojas de la planta, lo que puede causar toxicidad se es consumido por el ganado (Banda, 2005). La actividad farmacológica de la planta se ha evaluado *in vitro* mostrando actividad fúngica contra *Candida albicans*. El extracto obtenido de las vainas presentó actividad antiinflamatoria en edema de la pata en roedores, inducida por la carragenina e histamina, otros efectos evaluados son la actividad vasodilatadora en perros, por vía intravenosa. El aceite esencial obtenido de los frutos y evaluado en intestino de conejos mostró una actividad relajante del músculo liso, y por vía intraperitoneal en ratas, mostró actividad potenciadora de barbitúricos. Este mismo aceite esencial, así como una mezcla de glucósidos extraída de la planta, mostró actividad cardiotónica, ejerciendo efecto inotrópico y cronotrópico positivo. El extracto acuoso de las semillas presentó actividad inhibidora de la tripsina (Villaseñor y Espinosa, 1998).

III. METODOLOGÍA

3.1 Localización del área de estudios

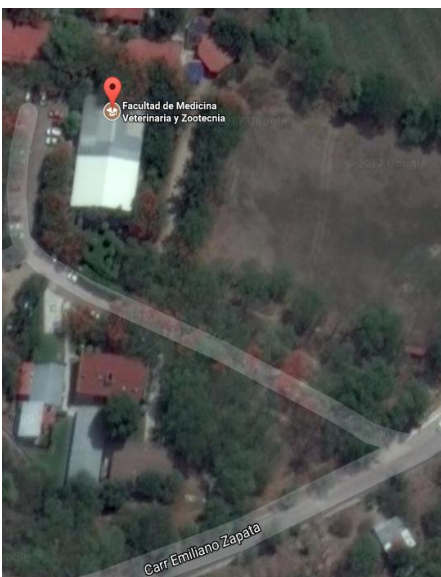


Figura 2 Ubicación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia CII-UNACH

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Chiapas, localizado en el rancho San Francisco Km. 8 de la carretera Terán al ejido Emiliano Zapata del municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

La separación en fracciones del extracto crudo con mayor efectividad se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán AC (CICY), ubicado en Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo; CP 97205, Mérida, Yucatán, México. Latitud: 20.97, Longitud: -89.62, 20° 58' 12" Norte, 89° 37' 12" Oeste.

3.2 Colecta de Garrapatas

Se colectaron garrapatas según protocolo de la FAO (2004), fueron hembras adultas ingurgitadas (teleoginas) con un período de 45 días sin tratamiento acaricida (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010), la colecta fue por la mañana, de forma manual, para no causarles daño, estas serán almacenadas en recipientes de plástico limpios, debidamente identificados, con orificios de ventilación y una gasa humedecida, para después ser transportadas al laboratorio de Biotecnología de la FMVZ-UNACH, ahí se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ con una humedad relativa de 80% por 15 días o hasta que termino el periodo de postura, posteriormente se

colectaron los huevos en viales de plástico con un tapón de algodón hasta la eclosión y de 7-14 días después fueron utilizados en los bioensayos.

3.3 Selección y procesamiento del material vegetal

La colecta de plantas se llevó a cabo en la depresión central del estado de Chiapas la ciudad de Tuxtla Gutiérrez. Se separaron los diferentes órganos de la planta (raíz, tallo, hojas), se procedió a deshidratar mediante estufa marca Imperial III® a temperatura de 48°C durante 72 horas, posteriormente fue pulverizado hasta obtener un cernido homogéneo en molino marca Ika Werker®, el material obtenido de cada planta fue empacado en bolsas de nylon, identificadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta su utilización para los extractos.

3.4 Elaboración del extracto puro acuoso

Para la preparación del extracto acuoso, se tomó una muestra (15 g) de material molido de cada órgano de la planta a evaluar y se colocó en un vaso precipitado, posteriormente se le adicionó 500 ml de agua destilada, se dejó hervir durante 20 minutos, reposó durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró con papel de filtro Whatman #1, los tratamientos se identificaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso, considerando un tiempo máximo de almacenamiento de 72 horas (Lannacone y Lamas, 2003).

Mediante este procedimiento se produjo una solución madre o extracto puro (EP) de cada órgano de las plantas a evaluar con una concentración de 3% w/v, concentraciones más bajas se obtendrán por adición de agua destilada en las siguientes proporciones 20%, 40%, 60% y 80% respectivamente (Tabla 5).

3.5 Elaboración del extracto puro metanólico

Se tomó una muestra de material molido de cada órgano de la planta a evaluar, se adicionó metanol (ver Anexo 3), se dejó macerar durante 48 horas a temperatura ambiente, posteriormente se filtraron y el metanol fue eliminado a baja presión a 45°C mediante un roto vapor. Con este procedimiento se obtuvo extracto puro con concentración 10 mg/ mL⁻¹.

Para efecto de los bioensayos se tomó 1 gr de extracto puro obtenido y fue diluido en 100 ml de solución a base de agua destilada:Tween 20, proporción 98:2 v/v, esta concentración fue considerada solución 100%, se obtuvieron concentraciones más bajas adicionando la solución de Tween20 2% en las siguientes proporciones de 20%, 40%, 60% y 80% respectivamente (Tabla 5).

3.6 Bioensayos

Para evaluar la mortalidad de las larvas de garrapata *Rhipicephalus (B) microplus* se utilizó la prueba de Paquete larval sugerida por la FAO (2004) con larvas de 7-21 días post-eclosión, con cinco repeticiones, incluyendo el Control positivo (Agua destilada para tratamientos acuosos y Tween20 2% para tratamientos metanólicos) y el Control negativo (Amitraz 12.5%) en la dosis más común utilizada.

3.7 Separación del extracto con mayor ixodicida

3.7.1 Cromatografía de Capa Delgada (CCD):

Es un proceso que se utilizó para realizar análisis cualitativo las muestras. Se emplearon cromatófolios con soporte de aluminio, impregnado de sílice 60 F₂₅₄ de 0.20 mm de espesor. El extracto fue disuelto en Metanol al 2% y se aplicaron a la placa con un capilar. Luego la placa es introducida a la cámara de vidrio con el sistema de disolventes empleado como fase móvil. Los sistemas evaluados fueron: Hx / Acetona 8:2, CH₂Cl / AeOEt 8:2, CH₂Cl / MeOH 8:2, AcOEt/Acetona/MeOH/H₂O 4:4:1,5:0,5

Las placas fueron observadas bajo luz Ultravioleta de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) Marca Analytikena, Finalmente la placa fue sumergida en una solución reveladora de ácido fosfomolibdico se secaron y calentaron con una pistola de aire caliente hasta la aparición de los componentes.

3.7.2 Partición con Acetonitrilo

Se agregó 100 ml de Acetonitrilo tratando de cubrir por completo el extracto crudo metanólico de raíz de *A. cornígera*, se zonificó por 2 minutos, se dejó macerar a temperatura ambiente, la parte líquida se concentró en un rotovapor a 40 °C con vacío, el producto obtenido de la evaporación se almacenó en un vial de vidrio, previamente pesado aquí se obtuvo la primera fracción (M2a), el Precipitado restante y se dejó macerar con metanol a temperatura ambiente durante 24 horas para continuar con la Cromatografía Líquida al Vacío (VLC).

3.7.3 Cromatografía líquida al vacío (VLC)

Es una cromatografía de partición en la que el lecho estacionario está contenido dentro de una columna. Las partículas de fase estacionaria sólida, o de soporte recubierto con una fase estacionaria líquida, dejando una ruta abierta, el paso de la

fase móvil por el centro del tubo o columna, que está conectado aun matraz Erlenmeyer y este se conecta a la bomba de vacío.

Se procedió a filtrar la muestra que se dejo en macerando con metanol (M2b), se agrego la muestra a 15g de Sílice gel Marca Sigma-Alorich, de alto grado de pureza (poro 60 A) y seco a temperatura ambiente.

Se utilizo una columna de 5 cm de diámetro, en la cual se agregaron los componentes en el siguiente orden:

1. papel filtro (5 cm de diámetro)
2. 5 g de Sílice gel Marca Sigma-Alorich de alto grado de pureza (poro 60_A)
3. Aforo a 5 cm con Sílice gel 60 GF₂₅₄ marca MERCK
4. Agrego los 15 gramos de sílice con muestra
5. Papel filtro
6. Algodón

Se usaron una secuencia de disolventes por polaridad creciente (Tabla 4), se colocaron por separado en la columna para obtener las fracciones, posteriormente fueron concentradas a presión reducida en un rotovapor a 40°C y almacenados en viales de vidrio, hasta secar por completo a temperatura ambiente, fueron pesadas almacenadas en refrigeración a 4°C, hasta su uso en los bioensayos.

Tabla 4 Sistemas para VLC

AcOEt	Acetona	MeOH	H₂Od	Etiqueta
5,5	4	0.5		M2b1
4,5	5	0.5		M2b2
	9	0.5	0.5	M2b3
	8	1.5	0.5	M2b4
	7.5	2	0.5	M2b5
		9.5	0.5	M2b6
Precipitado				M2c

Se realizó CCD en los sistemas AcOEt/Acetona/MeOH/H₂Od 4:4:1,5:0,5, AcOEt/Acetona/MeOH/H₂Od 4:4:1,5:0,5, AcOEt/Acetona/MeOH/H₂Od 4:5:0,5:0,5, Hx/Acetona 8:2, CH₂Cl₂/AcOEt 8,5:1,5, AcOEt/Acetona/MeOH/H₂O 4:4:1,5:0,5.

De acuerdo al plaquedo las fracciones M2b5 y M2b6 tenían los mismos componentes por lo que se decidió unir en una sola etiquetada como M2b5.

3.8 Tratamientos evaluados

En la tabla siguiente se muestran los extractos crudos acuosos y metanólicos en las diferentes concentraciones evaluadas para filtrar los extractos con un alto porcentaje de mortalidad según a la adaptación de la **NOM-ZOO-006-1993**.

Tabla 5 Extractos crudos y diluciones

<i>Acacia cornígera</i>	Tratamientos acuosos		Tratamientos metanólicos	
Hoja	100	Extracto puro (100%)	100	Extracto puro (100%)
	80	Extracto + 20% agua destilada	80	Extracto + 20% Tween20 2%
	60	Extracto + 40% agua destilada	60	Extracto + 40% Tween20 2%
	40	Extracto + 60% agua destilada	40	Extracto + 60% Tween20 2%
	20	Extracto + 80% agua destilada	20	Extracto + 80% Tween20 2%
Tallo	100	Extracto puro (100%)	100	Extracto puro (100%)
	80	Extracto + 20% agua destilada	80	Extracto + 20% Tween20 2%
	60	Extracto + 40% agua destilada	60	Extracto + 40% Tween20 2%
	40	Extracto + 60% agua destilada	40	Extracto + 60% Tween20 2%
	20	Extracto + 80% agua destilada	20	Extracto + 80% Tween20 2%
Raíz	100	Extracto puro (100%)	100	Extracto puro (100%)
	80	Extracto + 20% agua destilada	80	Extracto + 20% Tween20 2%
	60	Extracto + 40% agua destilada	60	Extracto + 40% Tween20 2%
	40	Extracto + 60% agua destilada	40	Extracto + 60% Tween20 2%
	20	Extracto + 80% agua destilada	20	Extracto + 80% Tween20 2%
Control	+	Amitraz		
	-	Agua destilada	Tween20 2% (agua destilada:Tween 20 (98:2 v/v))	

3.9 Diseño experimental y Análisis Estadístico

El diseño experimental aplicado en el estudio fue completamente al azar, con cinco repeticiones, incluyendo los dos grupos de control, el análisis de los datos de estudio se hizo mediante ANOVA, la comparación múltiple de medias se hizo mediante la prueba de Tukey con el software SAS (siglas en inglés) (Herrera y Barreras. 2005). La concentración letal media (CL₅₀) se analizó mediante análisis Probit, Polo Plus software LeOra versión 1.0.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con base a la investigación bibliográfica realizada, se observó que existe poca información referente a la actividad ixodícida de *Acacia cornígera* sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; sin embargo los resultados obtenidos se discutieron con estudios de otros autores realizados con diferentes géneros y especies vegetales.

Los resultados preliminares obtenidos en este estudio se muestran en el cuadro A1 y A2 del anexo donde se demuestra el efecto dosis-respuesta en los bioensayos con larvas, para el análisis estadístico se consideraron los Tratamientos en su concentración 100% (extractos crudos), los cuales evidenciaron un efecto en la mortalidad de la larva de la garrapata *R. microplus* entre 50-86% para los extractos acuosos y 83-95% para los extractos metanólicos (Tabla 6).

Tabla 6 Efecto en la mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* de extractos crudos de *Acacia cornígera*

Órgano, Concentración				
Tratamiento	Metanólicos	Acuosos	P	N
Raíz 100	95 ±5.61 a	62 ±4.45 abc	<.0001	5
Tallo 100	93 ±3.00 a	86 ±3.67 a	<.0001	5
Hoja 100	83 ±2.73 ab	50 ±12.94 bc	<.0001	5
Control +	67 ±7.84 b	67 ±7.84 ab	<.0001	5
Control -	24 ±2.91 c	28 ±5.14 c	<.0001	5

Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes; analizado por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad ($p < 0.05$)

De acuerdo con el análisis estadístico de los datos obtenidos, el tratamiento Tallo100 acuoso exhibió una mortalidad de 86% (± 3.67) sobre larvas de *R. microplus*, mayor a lo reportado por Ruiz (2013) en su estudio donde evaluó el efecto larvícida del extracto acuoso de tallo de *Acacia farneciana* sobre *R. microplus* con un 60% de mortalidad.

La eficacia de mortalidad que demostraron los tratamientos metanólicos fueron; Hoja100 83% (± 2.73), inferior a lo que reporta Souza *et al.* (2017) en su estudio, donde evaluaron el extracto etanólico de hoja de *Ocotea aciphylla* (laurel fofo) con un 90% de mortalidad, pero superior a lo descrito por Heimerdinger *et al.*, (2006) con extracto etanólico de *Cymbopogon citratus* (te de limón) con 46.6% a las 72 horas

post tratamiento; dado que el tratamiento Tallo100 expuso una eficacia de 93% (± 3.0), este resultado fue superior a lo reportado por Rosado-Aguilar *et al.*, (2010a) quienes evaluaron extractos de tallo de *Parthenium hysterophorus* (Altamisa) con un 15.2% de mortalidad.

El extracto metanólico que evidenció un efecto elevado sobre la mortalidad de larvas de *R. microplus*, que según lo establecido en la modificación a la **NOM-ZOO-006-1993** puede ser considerado efectivo, fue el tratamiento Raíz100 con un 95% (± 4.86), similar a lo reportado por Rosado-Aguilar *et al.*, (2010b) donde reportan un 95% de mortalidad de larvas usando extractos de *Petiveria alliace* (uña de gato), pero superior a lo reportado por Rodríguez, *et al.*, (2015) con extracto puro de *Morus alba* (morera) 73.3% de mortalidad y a lo reportado por Dantas, *et al.*, (2016) con el extracto etanólico de *Amburana cearensis* (roble criollo) con 66.88%,

De acuerdo con la determinación de la Concentración Letal media (CL₅₀) de los órganos de la planta evaluada, se evidenció el efecto toxico que ejercen sobre el 50% de la población de larvas de *R. microplus* es altamente eficaz, pero la dosis más baja expuesta es la estructura Raíz con un valor CL₅₀ de 2.12 g/L (Tabla 7); por ello fue el extracto seleccionado para fraccionar.

Tabla 7 Concentración Letal Media de extractos metanólicos

<i>Acacia cornígera</i>	Pendiente	r ²	EE	CL ₅₀ (IC) g/L	CL ₉₀ (IC) g/L
Hoja	0.652	0.145	0.28	4.39 (1.24-15.58)	379.13 (106.94 – 1344.10)
Tallo	1.435	0.89	0.143	4.1 (2.15 – 7.81)	31.77 (16.67 – 60.55)
Raíz	1.043	0.563	0.198	2.12 (0.87 -5.17)	41.93 (17.18 – 102.34)

Concentración Letal media CL₅₀ y CL₉₀ de extracto metanólico de *A. cornígera* sobre *R. (B.) microplus* e intervalos de confianza respectivos, calculados a partir de la prueba probit.* g/L

El efecto obtenido de las fracciones con una concentración de 5 mg/ml sobre larvas con una edad promedio de 14 días de *R. microplus* evidencian mortalidades de 69.8-97.14% (Tabla 8)

Tabla 8 Efecto de fracciones en la mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus*

Tratamiento	Concentración	Mortalidad	P	N
M2b1	5 mg/ml	97.14 ±1.01 a	<.0001	7
Control +	2 ml/L	93 ±2.54 a	<.0001	5
M2b5	5 mg/ml	90.71 ±3.84 a	<.0001	7
M2b4	5 mg/ml	90 ±5.11 a	<.0001	7
M2b3	5 mg/ml	82.85 ±7.22 a	<.0001	7
M2b2	5 mg/ml	78.57 ±6.14 a	<.0001	7
M2c	5 mg/ml	69.57 ±9.09 a	<.0001	7
M2a	5 mg/ml	69.28 ±11.56 a	<.0001	7
Control -	98:2 ml	35 ±3.53 b	<.0001	5

Los valores con diferentes literales son significativamente diferentes; analizado por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad (p <0.05)

Las fracciones M2b1, M2b5 y M2b4 fueron los tratamientos que tuvieron actividad ixodocida más alta, por lo que fueron analizadas a diferentes concentraciones (≤5 mg/ml); sin embargo se demostró que la concentración más efectiva fue 5 mg/ml (Tabla 9).

Tabla 9 Efecto de fracciones con concentración <5mg/ml en la mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus*

Tratamiento	Concentración	% Mortalidad	P	N
M2b1	5 mg/ml	97.14 ± 1.0101 a	<.0001	7
M2b5	5 mg/ml	90.71 ± 3.8465 ab	<.0001	7
M2b4	5 mg/ml	90 ± 5.1176 ab	<.0001	7
Amitraz	12.5/100 ml	90 ± 4.1833 ab	<.0001	5
M2b1:10	0.5 mg/ml	90 ± 2.8867 ab	<.0001	3
M2b1:20	1 mg/ml	88.33 ± 6.6666 abc	<.0001	3
M2b1:60	3 mg/ml	80 ± 13.2287 abc	<.0001	3
M2b1:40	2 mg/ml	73.33 ± 13.6422 abcd	<.0001	3
M2b4:60	3 mg/ml	64 ± 12.2882 abcd	<.0001	5
m2b5:20	1 mg/ml	59 ± 9.2736 abcd	<.0001	5
m2b5:40	2 mg/ml	59 ± 9,4074 abcd	<.0001	5
m2b4:80	4 mg/ml	56 ± 7,4833 abcd	<.0001	5
m2b4:20	1 mg/ml	55 ± 10,3682 abcd	<.0001	5
m2b5:60	3 mg/ml	54 ± 15,2807 abcd	<.0001	5
m2b4:40	2 mg/ml	50 ± 7.9056 bcd	<.0001	5
m2b5:80	4 mg/ml	46 ± 4.8476 cd	<.0001	5
Tween20 2%	2 ml/98ml	34 ± 6.2048 d	<.0001	5

Los valores con diferentes literales son significativamente diferentes; analizado por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad (p <0.05)

Según el análisis estadístico ($P < 0.05$), dictamina el comportamiento de los tratamientos evaluados con actividad ixodicida, M2b1 demostró mayor actividad con un 97.14% de mortalidad, algo similar a las fracciones que obtuvieron Kumar *et al.*, (2016) de *Ageratum conyzoides* reportando una mortalidad de 96.2–97.5%, Souza *et al.*, (2017) con fracciones de *Ocotea aciphylla* 84.2% y 100% con una dosis de 50 mg/ml; también lo reportado por Rosado-Aguilar *et al.*, (2010b) evaluó particiones a partir del extracto hexánico de *Petiveria alliaceae* con eficacia de 93.6%, y lo reportado por Sarda *et al.* (2007) con mortalidad de larvas de 100%, 96.7% con particiones del extracto crudo metanólico de *Hypericum polyanthemum* con concentraciones de 50, 25 mg/ml respectivamente.

Mayor a lo reportado por Sardá-Ribeiro *et al.* (2008) con particiones del extracto hexánico de *Calea serrata* (Jaral de castilla) con un 52.7% de mortalidad en concentración de 6.25 mg/ml, posteriormente a 48 horas de exposición; por Dantas *et al.*, (2016) con la partición a base de hexano del extracto etílico de *Amburana cearensis* con una mortalidad de 67% con una dosis de 25 mg/ml, por Ferraz *et al.*, (2010) con extracto hexanico, etanólico y acetato de etilo de *Piper aduncum* (Piperaceae) con diferente concentraciones entre 1 y 20 mg/mL con mortalidades de 17.2, 40.5 y 70.42% respectivamente.

V. CONCLUSIÓN

Si bien esta planta no se ha reportado como ixodicida, con estos resultados se puede corroborar que tiene un efecto favorable sobre la mortalidad de las larvas de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

El efecto ixodicida de los extractos crudos de *Acacia Cornígera* en las larvas de *R. microplus* evidenciaron ser efectivos para la mayoría de tratamientos con relación al control positivo; sin embargo el tratamiento Raíz 100 metanólico demostró una mortalidad del 95% (± 6.8), y CL_{50} de 2.12 g/Litro.

De las 7 fracciones separadas del extracto crudo metanólico de raíz se puede mencionar que todas tienen un efecto positivo sobre la mortalidad de larvas de garrapata *R. microplus*; sin embargo M2b1 con una mortalidad de 97.14% demostró ser más eficiente con dosis de 5 mg/ml.

Sugerencia

Con base a la investigación bibliográfica realizada, se puede considerar que este trabajo puede ser pionero en demostrar la eficacia de *Acacia cornígera* sobre la mortalidad de larvas de *R. microplus*; por lo que es posible que los productos botánicos, no solo pudieran ser útiles en la ganadería orgánica, sino también en la ganadería convencional, como una alternativa para el control de la garrapata *R. microplus*, sin menos daño del medio ambiente y la salud de la humanidad, lo cual es una demanda mundial. Por lo tanto, es esencial invertir en el desarrollo de una industria fitoterapéutica, con enfoques interdisciplinarios hacia la búsqueda de soluciones a este importante tema.

VI. LITERATURA CITADA

- Abott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economy Entomology*, 18: 265-267.
- Aguirre, J., Sobrino, L., Santamaria, M., Aburto, S., Román, E., Hernández, M., Ortiz, M., Ortiz, Y.A. 1986. Resistencia de garrapatas en México. In Seminario Internacional de Parasitología Animal, Memorias (ed. Cavazzani, A. H., Garcia, Z.), 282–306. Cuernavaca, Morelos, México.
- Alonso-Díaz, M A, Rodríguez-Vivas, R I, Fragoso-Sánchez, H, Rosario-Cruz, R, Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas Archivos de Medicina Veterinaria [en línea] 2006, 38 (Sin mes) : [Fecha de consulta: 3 de agosto de 2017] Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173013748003> ISSN 0301-732X.
- Álvarez, V, Loaiza, J, Bonilla, R y Mariano Barrios, M. 2008. Control *in vitro* de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. *Rev. Biol. Trop.* Vol. 56 (1): 291-302, March 2008. Consultado el 03 de Julio de 2017. Disponible en : http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442008000100021.
- Anton R, Jiang Y, Weniger B, Beck JP, Rivier L. (1993) Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *J. Ethnopharmacol.* Mar; 38(2-3):153-157.
- Borges L. M. F; Dias de Souza L. A.; da Silva Barbosa C. (2011). Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20 pp 89-96.
- Borges, Lígia Miranda Ferreira; Silva, Andréa Caetano Da; Neves, Belmiro Pereira Das. Teste "In Vtiro" De Eficácia Do Cinamomo (*Melia Azedarch*, L.) Sobre Fêmeas Ingurgitadas Do *Boophilus Microplus*, Can. (Acari:Ixodidae). *Revista de Patologia Tropical*, [S.l.], v. 23, n. 2
- Brown, W.C., Normine, J., Goff, W.L., Suarez, C.E. y McElwain, T.F. (2006). Las perspectivas para las vacunas recombinantes contra *Babesia bovis* y parásitos relacionados. *Parasite Immunol.* Vol. I PP- 45-53

- Cen, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Domínguez, A.J.L., Wagner, G., (1998). Studies on the effect on infection by *Babesia* sp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 78:253–257.
- Chagas, A.C.S.; Passos, W.M.; Prates, H.T.; Leite, R.C.; Furlong, J.; Fortes, I.C.P. (2002) Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v.39, n.5:247-253.
- Chungsamarnyart, N.; Jiwajinda S.; Jansawan,W. (1988). Effective plant crude extracts on the tick (*B. microplus*) I larvicidal action.. *Kasetsart Journal Nature Science Supplement*, 22: 37-41
- Chungsamarnyart, N.; Jiwajinda S.; Jansawan,W. 1990. Effect of plant crude extracts on cattle ticks (*B. microplus*) Insecticidal action I. *Kasetsart Journal Nature Science Supplement*, 24: 28-31
- Chungsamarnyart, N.; Jiwajinda S.; Jansawan,W. (1991). Larvicidal effect of plant crude-extracts on the tropical cattle tick (*B. microplus*). Thailand. *Kasetsart Journal Nature Science Supplement*, 25: 80-89.
- Chungsamarnyart, N.; Jiwajinda S. (1992). Acaricidal Activity of volatile oil from lemon and citronella grasses on tropical cattle ticks. Thailand. *Kasetsart Journal (Nature Science Supplement)* 26:46-51
- CONABIO 2012. Malezas de Mexico. Consultado el 17 de Julio de 2017. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/home-malezas-mexico.html>
- Cortés-Vecino J. A. Garrapatas: estado actual y perspectivas, Grupo de Parasitología Veterinaria, Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia. *Biomédica* 2011;31(sup.3):3-315
- Cruz C. F. Garrapatas, Universidad Nacional Autónoma De México, Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Clínica De Los Bovino 1. 2007.
- Dantas, Anne Caroline dos Santos, Araujo, Andreina de Carvalho, Pacheco, Alessandra Gomes Marques, Branco, Alexsandro, Sangioni, Luis Antônio, Almeida, Jackson Roberto Guedes da Silva y Horta, Mauricio

- Claudio. (2016). Actividad acaricida de *Amburana cearensis* en la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciência Rural* , 46 (3), 536-541. Epub 27 de noviembre de 2015. <https://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150334>.
- De Freitas Fernandes F y Souza Freitas E.P. (2007). Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* Volume 147, Issues 1–2:150–154.
- De La Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Hofle, U., Villanahua, D., Almazan, C., Torina, A., Caracappa, S., Kocan, K.M. y Gortazar, C. (2006). Potencial de reservorios vertebrados y vectores invertebrados de *Anaplasma marginale* y *Anaplasma phagocytophilum* en el centro de España. *Vector Borne Zoonotic* Volumen 2. Pp 234-244 .
- Diario Oficial de la Federación. NOM-006-ZOO-(1993)., de fecha Miércoles 21 de septiembre de 1994. Requisitos de efectividad biológica para los ixodídeos de uso en bovinos y método de prueba. NORMA OFICIAL MEXICANA.
- Ellse, L. y Wall, R. (2014). The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. *Medical and Veterinary Entomology* (2014) 28: 233–243.
- FAO (1983) Animal Production and Health paper 36. Ticks and tick-borne diseases: selected articles from the world animal review. <http://www.fao.org/docrep/004/x6538e/x6538e00.htm#toc>. Consultado junio 2017.
- FAO (2003) Resistencia a los antiparasitarios; Estado actual con énfasis en América Latina. Roma. 59 pp.
- FAO (2004) Guideline resistance management and integrated parasite control in ruminants. Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention Agr. Dept. Animal Production and Health Division. Roma, Italia p 25-77
- Fernandes F. 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern

cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 147: 150–154.

Fernandes, E. D., Bittencourt. V. R. E. P. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. Consultado el 5 de agosto del 2018. *Exp. Appl. Acarol.* Disponible en: [Doi10.1007/s10493-008-9161-y](https://doi.org/10.1007/s10493-008-9161-y).

Fernández-Salas, M.A. Alonso-Díaz, R. Acosta-Rodríguez, J.F.J. Torres-Acosta, C.A. Sandoval-Castro, R.I. Rodríguez-Vivas. (2011) *In vitro* acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, Volume 175, Issues 1–2,:113–118

Ferraz, A. de B.F., Zini, J.M., Zini, C.A., Sardá-Ribeiro, V.L., Bordignon, S.A.L., von Poser, G., 2010. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three Piper species. *Parasitol. Res.* 107, 243–248.

Gandhiraja N, Sriram S, Meena V, Srilakshmi K, Sasikumar C, Rajeshwari R (2009). Phytochemical Screening And Antimicrobial Activity of the Plant Extracts of *Mimosa pudica* L. Against Selected Microbes. *Ethnobotanical Leaflets.* 2009; 13:618–624.

Góes, T.S., Góes, V. S., Ribeiro, M. F. B., & Gontijo, C. M.(2008). Bovine Babesiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.12.011>

Hannachi H, Elfalleh W, Ennajeh E, Laajel M, Mohamed-Larbi Khouja, Ali Ferchichi y Nizar Nasri (2011) Chemicals profiling and antioxidants activities of Acacia seeds *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(31): 6869-6875, 23. Disponible en <http://www.academicjournals.org/JMPR> consultado Junio 2015

Heimerdinger, A., & Olivo, C., & Molento, M., & Agnolin, C., & Ziech, M., & Scaravelli, L., & Skonieski, F., & Both, J., & Charão, P. (2006). Extrato Alcoólico De Capim-Cidreira (*Cymbopogon Citratus*) No Controle Do *Boophilus Microplus* Em Bovinos. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*, 15 (1), 37-39.

Herrera, H. J. G., y Barreras, S. A. (2005). Análisis estadístico de experimentos pecuarios. Manual de Procedimientos (Aplicaciones del Programa SAS).

Colegio de Postgraduados, México, 113-118. Disponible en <http://revistas.jatai.ufg.br/index.php/iptsp/article/view/20020/11592>

Hüe, T., Cauquil, L., Fokou, J. B I. Bakarnga-Via, Menut C.. "Actividad acaricida de cinco aceites esenciales de especies *Ocimum* en larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* (2015) 114: 91. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4164-6>

Jiang YL, Massiot G, Lavaud C, Teulon JM, Guéchet C, Haag-Berrurier M, Anton R. (1991) Triterpenoid glycosides from the bark of *Mimosa tenuiflora*. *Phytochemistry*. 1991; 30(7):2357-2360.

Kumar K. S., Tayade A. B., Kumar R., Gupta S., Kumar S. A., Nagar G., Tewari B., Kumar S., Srivastava S., Kumar S., Ghosh S., Chemo-profiling and bioassay of phytoextracts from *Ageratum conyzoides* for acaricidal properties against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) infesting cattle and buffaloes in India. *Ticks and Tick-borne Diseases*, Volume 7, Issue 2, March 2016, Marzo 2016, Pages 342-349. Consultado el 24 de septiembre de 2018. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.12.005>.

Lannacone, J., Lamas, G., (2003), Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. *Entomotropica*, Vol. 18(2): 95-105.

Lyndon, J.; Lawrence, A.D.; Earle. V.R. (1999) An Insecticidal and Acaricidal Polysulfide Metabolite from the Roots of *Petiveria alliacea*. *Pesticide Science*. 50 (3): 228– 232.

Mareggian G. 2001. Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Rev. Manejo Integrado de Plagas*. Volumen 60. PP. 22 – 30.

Martínez-Bernal A, Grether R. y González-Amaro R. M. (2008). Flora de Veracruz. LEGUMINOSAE I: Mimosoideae:Mimosa. Fascículo 147: 1-127

Onder, C.; Irfan, A.; Fikretin, S. (2006). Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against *Teranychus urticae* Koch and *Hemisia tabaco* Genn. *Turkía. Industrial Crops and Products*. 23:140-146.

- Pawaskar, S. M. y Kale, K. U., (2006) Antibacterial activity of successive extracts of *Mimosa pudica*. *Indian Drugs.* ;43:476–480.
- Pulido Suarez N J y Cruz Carrillo A. (2013) Eficacia de los extractos hidroalcoholicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu* 14(1) 91-97.
- QUIROZ R.H. 2000 Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domesticos. 5ta ed. Editorial LIMUSA, S.A.- de C.V. Mexico, D.F. 694 – 697 p
- Rivera-Arce E, Gattuso M, Alvarado R, Zárate E, Agüero J, Feria I, Lozoya X (2007). Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosae tenuiflorae* cortex. *J Ethnopharmacology.* 25;113(3):400-408.
- Rodríguez V. R. I, Rodríguez A. F, Alonso D. M. A, Fragoso S. H, Santamaria V. M, Rosario C. R. (2006). Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state Yucatan, Mexico, prevalence and potential risk factors. *Prev. Vet Med;* 75:280-286.
- Rodríguez V. R.I, Rosado Aguilar A, Basto Estrella G, García Vázquez Z S, Rosario Cruz R, Fragoso Sánchez H. 2008. Manual Técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. CENID-PAVET, FMVZ-UADY.
- Rodríguez V. R. I., Ojeda Chi M. M., Pérez Cogollo L. C., Rosado Aguilar J. A., **Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos.** Capítulo 33. Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. (2011) *Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Km. 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil. CP. 97100. Mérida, Yucatán, México. Pp 477-504.*
- Rodríguez Molano, Carlos Eduardo, & Pulido Suárez, Néstor Julián. (2015). Eficacia de extractos vegetales sobre la garrapata adulta *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y su oviposición. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(4) Recuperado en 04 de octubre de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000400002&lng=es&tlng=es.

- Rosado-Aguilar J.A., Aguilar-Caballero A, Rodríguez-Vivas R.I., Borges-Argaez R, García-Vázquez Z., Méndez-González M. (2010a). Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology* Volume 168, Issues 3–4, 25:299–303
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., García Vázquez, Z., Méndez-González, M., 2010b. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Vet. Parasitol.* 168, 299–303.
- Rosado-Aguilar, J.A., Arjona-Cambranes, K., Torres-Acosta, J.F.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Bolio-González, M.E., Ortega-Pacheco, A., Alzina-López, A., Gutiérrez-Ruiz, E.J., Gutiérrez-Blanco, E., Aguilar-Caballero A.J. (2017). Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against Ticks. *Veterinary Parasitology*, Volume 238, Pages 66-76. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401717301280>
- Samish, M., H. Ginsberg, and I. Glazer. 2004. Biological Control of Ticks. *Parasitologi.* 129:S389–S403.
- Santamaría, V.M., Soberanes, C.N. (2001). Memorias del Curso-Taller sobre diagnóstico de resistencia a ixodidas en garrapatas *Boophilus microplus*. Del 26 al 28 de septiembre de 2001, Jiutepec, Morelos, México.
- Sardá, R.V.L., Toigo, E., Bordignon, A.L., Goncalves, K., von Poser, G., 2007. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 147, 199–203.
- Sardá, R.V.L., Avancini, C., Goncalves, K., Toigo, E., von Poser, G., 2008. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* 151, 351–354.
- SENASICA. (SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA). Situación actual del control de la garrapata *boophilus spp* 2018. Consultado el 20 de mayo de 2018. Disponible

en:<https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>

- Singh, B.; Bhat, T. K.; Singh, B. 2003. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5579-5597.
- Soberanes. C. N., Santamaría, V. M., Fragoso, S. H. y García, V. Z. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Tec. Pec. Mex.* 40 G 1: 81-92.
- Souza C. R., Carneiroalsabella M. M., Brancoalvo A., Curcino V. J., Braz-Filhobc R., Borges B. M. In vitro acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. *Ticks and Tick-borne Diseases*, Volume 8, Issue 2, February 2017, Pages 275-282. Consultado en 5 de octubre 2018, Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.013>.
- Villaseñor-R. J.L. y Espinosa-G. F.J. 1998. Catálogo de Malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Vizcaíno, O. 1980. Anaplasmosis y babesiosis en el ganado bovino. Control de garrapatas. *Rev ICA Volumen 39: PP. 59-79*

VII. ANEXOS

Cuadro A 1 Resultados de tratamientos acuosos

Tratamientos acuosos <i>Acacia cornígera</i>		
Órgano, Concentración		
Tratamiento	% Mortalidad	P
Tallo 100	86 ± 8,83 a	<.0001
Tallo 20	83 ± 8,83 a	<.0001
Raíz 40	81 ± 8,83 a	<.0001
Tallo80	79 ± 8,83 a	<.0001
Tallo 40	73 ± 8,83 a	<.0001
Raíz 80	73 ± 8,83 a	<.0001
Tallo 60	73 ± 8,83 a	<.0001
Raíz 20	72 ± 8,83 ab	<.0001
Raíz 60	70 ± 8,83 ab	<.0001
Control +	67 ± 8,83 ab	<.0001
Hoja 20	65 ± 8,83 ab	<.0001
Raíz 100	62 ± 8,83 ab	<.0001
Hoja 40	59 ± 8,83 ab	<.0001
Hoja 100	50 ± 8,83 ab	<.0001
Hoja 60	47 ± 8,83 ab	<.0001
Hoja 80	47 ± 8,83 ab	<.0001
Control -	28 ± 8,83 b	0.0023

Los valores en la tabla 3 con diferentes letras son significativamente diferentes; analizado por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad ($p < 0.05$)

Cuadro A 2 Resultados de tratamientos metanólicos

Órgano, Concentración		
Tratamiento	% Mortalidad	P
Raíz 100	95 ± 6,8 a	<.0001
Tallo 100	93 ± 6,8 a	<.0001
Tallo 80	90 ± 6,8 a	<.0001
Tallo 60	87 ± 6,8 a	<.0001
Raíz 60	86 ± 6,8 a	<.0001
Raíz 80	85 ± 6,8 ab	<.0001
Hoja 100	83 ± 6,8 ab	<.0001
Hoja 80	83 ± 6,8 ab	<.0001
Raíz 20	80 ± 6,8 ab	<.0001
Raíz 40	77 ± 6,8 ab	<.0001
Hoja 20	77 ± 6,8 ab	<.0001
Tallo 40	75 ± 6,8 ab	<.0001
Tallo 20	73 ± 6,8 ab	<.0001
Hoja 60	69 ± 6,8 ab	<.0001
Control +	67 ± 6,8 ab	<.0001
Hoja 40	51 ± 6,8 bc	<.0001
Control -	24 ± 6,8 c	.0007

Los valores en la tabla 3 con diferentes letras son significativamente diferentes; analizado por la prueba de Tukey al 5% de probabilidad ($p < 0.05$)

Cuadro A 3 Rendimiento del extracto crudo metanólico

Órgano	Muestra molida (g)	Metanol (ml)	Rendimiento (g)
Hoja	100	600	6,0264
Tallo	100	600	3,0519
Raíz	100	600	4,0341