

Potencial ixodicida de los extractos del pasto *Melinis minutiflora* P. Beauv bajo distintas edades de corte

Adriana Lucia Gutiérrez Villamarin

Trabajo de grado para optar por el Título de Zootecnista

Directora:
Erika M. Celis Celis
Química

Co-Director:
Carlos E. Rondón Flórez
Químico
Julián Mauricio Botero Londoño
PhD., Zootecnista

Universidad Industrial de Santander
Instituto de Proyección regional y Educación a Distancia
Programa de Zootecnia
Bucaramanga

2022

Dedicatoria

Dedico este proyecto a Dios primeramente, por darme la vida, la sabiduría y todo cuanto me ha hecho feliz, por las alegrías y las dificultades, las cuales me han hecho ser quien soy; a mi madre, Luz Dary y a mi papa José Edil, por haberme formado con muchos valores y principios, por darme una carrera y siempre consentirme, a mi hermano Fernando, por ser mi ejemplo, mi guía, mi compañero de aventuras y mi confidente, a mis bendiciones de cuatro patas, los cuales me han hecho reír y llorar, pero sobre todo me han mostrado el amor incondicional y me inspiraron para estudiar esta carrera, finalmente, a todos mis compañeros y amigos de la universidad, con quienes pasé muchos momentos agradables y de los cuales aprendí el valor del trabajo duro y a no rendirme jamás, de igual manera, agradezco a los amigos que hice en mi pasantía, Leidy, Andrés, Jessica, Jhoan y de manera muy especial a Daniel, siempre los recordare con una sonrisa por los buenos momentos y el aprendizaje de esa bonita experiencia.

“Sin importar lo que suceda mañana, prométeme una cosa. Que serás siempre quien eres.

No un soldado perfecto, sino un buen hombre”

(Abraham Eskirne)

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios y a mis padres, por darme la oportunidad de estudiar y apoyarme incondicionalmente.

A mi directora de tesis, Erika Celis, por el apoyo que siempre me brindó, sus conocimientos y su paciencia, a mis codirectores Julián Botero y Carlos Rondón, por estar al pendiente de las revisiones, ensayos y material necesario para la ejecución del proyecto, ya que sin ellos hubiera sido imposible de seguir esta idea.

Al laboratorio de Reconversión ganadera y Agroforestal, en cabeza de Laura Yiceth Zambrano y Camilo Otero, ya que ellos fueron indispensables en los aspectos técnicos del cumplimiento de los objetivos del proyecto, además de haber encontrado en ellos, unos grandes amigos y colegas.

Al laboratorio de Entomología y parasitología, dirigido por el profesor Daniel Felipe Torres, quien proporcionó el lugar y los insumos para llevar a cabo uno de los objetivos del proyecto.

A los profesores de la carrera, quienes me proporcionaron los conocimientos que poseo, a los que fueron una mano amiga cuando dudé de elegir la zootecnia como mi forma de vida y a los que siempre tenían la disposición de ser formarnos idóneamente. A mis compañeros y amigos que hicieron de éste un hermoso transitar por la vida; y finalmente a mi alma mater, la UIS, por formarme no solo profesionalmente sino también como una persona que lucha por hacer de este un mejor país.

Con mucho cariño:

Adriana G.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	11
1. Objetivos.....	14
1.1 Objetivo General	14
1.2 Objetivos Específicos	14
2 Marco Teórico.....	15
2.1 Pasto Yaragua (Melinis Minutiflora P.Beauv).....	15
2.1.1 Informacion taxonomica	15
2.2.2 Caracteristicas:	15
2.2 Metabolitos Secundarios.....	16
2.2.1 Clasificación:	17
2.2.1.1 Fenoles	17
2.2.1.2 Terpenoides	18
2.2.1.3 Alcaloides:	18
2.3 Garrapatas	19
2.3.1 Clasificación:	19
2.3.3 Familia Ixodidae o garrapatas duras:.....	20
2.3.4. Ciclo de vida:	20
2.3.5. Transmisión de enfermedades:.....	21
2.4. Acaricidas:	21

2.4.1 Estado actual de la resistencia a acaricidas:	22
2.4.2 Bioensayos realizados para la evaluación de acaricidas	23
2.4.2.1 Prueba del paquete Larval	23
2.4.2.2 Prueba de inmersión de adultas:	23
2.5 Repelentes de ectoparásitos	24
2.5.1 Métodos de evaluación de repelencia de garrapatas:	24
2.5.1.1 Bioensayos realizados con huéspedes vivos	24
2.5.1.2 Bioensayos realizados bajo ausencia de estímulos del huésped	25
2.5.1.3 Bioensayos realizados en hospederos vivos	25
2.6 Métodos de extracción de productos naturales:	25
2.6.1 Método de extracción Soxhlet.....	27
3. Marco Conceptual	27
4. Marco Legal.....	33
5. Metodología	35
5.1 Fase de campo	35
5.1.1 Localización	35
5.2 Fase de Laboratorio	36
5.2.1 Diseño experimental.....	36
5.2.3 Obtención de los extractos etanólicos	36
5.2.4 Obtención de las garrapatas:	36
5.2.5 Ensayo de inmersión de garrapatas adultas:	37
5.2.6 Análisis de datos.....	38
5.2.6 Caracterización de los extractos etanólicos	39

6. Resultados y Discusión.....	39
6.1 Rendimiento de los extractos	39
6.2 Mortalidad de las garrapatas <i>R. microplus</i>	41
6.3 Inhibición de la ovoposición.....	43
6.3 Índice de producción de huevo (IPH), eclosión larval (EL) e índice de eficiencia en la reproducción (IER).....	44
6.4 Caracterización química mediante Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (GC-MS).....	47
7. Conclusiones	53
8. Recomendaciones.....	54
Bibliografía	55
Apéndices	69

Lista de tablas

Tabla 1. <i>Tipos de solventes utilizados para la extracción de compuestos bioactivos</i>	26
Tabla 2. <i>Porcentaje de rendimiento de los extractos de <i>M. minutiflora</i> a diferentes edades de corte</i>	39
Tabla 3 <i>Estimación de los porcentajes de rendimiento del pasto <i>M. minutiflora</i> con base en la cantidad de biomasa Ha/año</i>	40
Tabla 4. <i>Efecto en la mortalidad para <i>R. Microplus</i> bajo distintas edades de corte de <i>M. Minutiflora</i></i>	42
Tabla 5. <i>Efecto en la inhibición de la ovoposición en las diferentes edades de corte de <i>M. Minutiflora</i></i>	43
Tabla 6. <i>Efecto del índice de producción de huevo, eclosión larval e índice de la eficiencia de la reproducción en los tratamientos de <i>M. Minutiflora</i></i>	45
Tabla 7 <i>Composición química de los extractos de <i>M. minutiflora</i> a distintas edades de corte.</i> ...	48

Lista de Apéndices

Apéndice a. Almacenamiento de las muestras	69
Apéndice b. Extractos de <i>M. Minutiflora</i> en distintas edades de corte (nótese un color más oscuro en los extractos 4 y 5, de edad de corte a 120 días)	69
Apéndice c. Almacenamiento de los extractos crudos y secos	70
Apéndice d. Identificación de las garrapatas <i>R. microplus</i> por medio del estereoscopio	70
Apéndice e. Inmersión de las garrapatas en los extractos de <i>M. Minutiflora</i>	71

Resumen

Título: Potencial ixodicida de los extractos del pasto *Melinis minutiflora* P. Beauv bajo distintas edades de corte*

Autor: Adriana Lucia Gutiérrez Villamarin**

Palabras Clave: *Rhipicephalus microplus*, acaricidas, bioixodicidas, extractos vegetales, metabolitos secundarios.

Descripción:

La garrapata del ganado (*Rhipicephalus microplus*), es uno de los principales vectores de enfermedades hemoparasitarias que ocasionan importantes pérdidas económicas en la ganadería. El control de este parásito se ha enfrentado a diversas dificultades, como el desarrollo de resistencia a los principios activos de acaricidas sintéticos y los efectos nocivos sobre la salud humana y el medio ambiente que origina la frecuente aplicación de los mismos. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad acaricida de los extractos etanólicos del pasto *Melinis minutiflora* con distintas edades de corte frente a *R. microplus* y caracterizar los extractos etanólicos provenientes de este. Para lo anterior, el pasto previamente establecido se cortó a los 60, 90 y 120 días, se secó, se trituro y se sometió a extracción empleando la técnica Soxhlet. La evaluación de la actividad ixodicida se realizó por medio de la prueba de inmersión de adultas propuesta por Drummond et., al (1973) a 50000 mg/L. Los resultados mostraron mortalidades de teleoginas entre el 33 y el 70%, siendo mayor para el extracto del pasto a 120 días de corte; asimismo, se observaron reducciones significativas en los índices de eclosión larval, eficiencia de la reproducción e índice de producción de huevo en la mayor edad de corte. De igual manera, en la caracterización de los componentes por medio de CG-MS se lograron identificar principalmente compuestos de naturaleza lipofílica como Vitamina E, fitoesteros y triterpenos pentacíclicos, acumulados en mayor proporción en el extracto más activo y asociados con su actividad. Se concluye que el pasto *M. minutiflora* presenta potencial ixodicida frente a *R. microplus* y que la edad de corte influencia significativamente la actividad, catalogándose como una planta promisoría para la formulación de bioixodicidas.

* Trabajo de Grado

** Instituto de Proyección Regional y a Distancia IPRED. Facultad de Zootecnia. Directora: Erika Mayerly Celis Celis. Química. Codirectores: Julián Mauricio Botero Londoño. PhD en Ciencias agrarias con énfasis en manejo de suelos y aguas y Carlos Eduardo Rondón Flórez. Químico

Abstract

Title: Ixodicidal potential of *Melinis minutiflora* P. Beauv grass extracts under different mowing ages.*

Author(s): Adriana Lucia Gutierrez Villamarin**

Key Words: *Rhipicephalus Microplus*, acaricides, bioixodicides, plant extracts, secondary metabolites

Description: The cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) is one of the main vectors of hemoparasitic diseases that cause important economic losses in livestock farming. The control of this parasite has faced several difficulties, such as the development of resistance to the active principles of synthetic acaricides and the harmful effects on human health and the environment caused by their frequent application. The objective of this study was to evaluate the acaricidal activity of ethanolic extracts of *Melinis minutiflora* grass at different cutting ages against *R. microplus* and to determine the chemical composition of these extracts. For this purpose, the previously established grass was cut at 60, 90 and 120 days, dried, crushed and subjected to extraction using the Soxhlet technique. The evaluation of the ixodicidal activity was carried out by the adult immersion test proposed by Drummond et., al (1973), at 50000 mg/L. The results showed teleogin mortalities between 33 and 70%, being higher for the grass extract at 120 days of cutting; likewise, significant reductions were observed in the oviposition inhibition indexes, larval hatching, reproduction efficiency and egg production index at the highest cutting age. Similarly, in the analysis of the components by GC-MS, it was possible to identify mainly lipophilic compounds such as vitamin E, phytosterols and pentacyclic triterpenes, accumulated in greater proportion in the most active extract and associated with its activity. It is concluded that *M. minutiflora* grass has ixodicidal potential against *R. microplus* and that the age of cutting significantly influences its activity, making it a promising plant for the formulation of bioixodicides.

* Undergraduate Work

**Institute of Regional projection and Distance Education IPRED.animal science program. Director: Erika M. Celis Celis. Chemistry. codirector:Julian Mauricio Botero Londoño. PhD in agricultural sciences with emphasis on soil and wáter management. Codirector: Carlos Eduardo Rondón Florez. Chemistry

Introducción

La garrapata común del ganado (*Rhipicephalus microplus*) se considera como el ectoparásito de mayor interés agropecuario, ya que es responsable de la transmisión de enfermedades zoonóticas como *Babesiosis* y *Anaplasmosis*, cuyos agentes patógenos afectan tanto a seres humanos como animales, siendo los bovinos su huésped preferido (Graf et al., 2004). Entre los principales efectos directos e indirectos que causa la infestación de este parásito se encuentran: la inflamación de la piel, estrés y pérdida de bienestar, respuestas alérgicas a causa de los antígenos presentes en la saliva de las garrapatas, pérdida de sangre por altas cargas parasitarias y pérdida de energía asociada al movimiento constante como respuesta a la infestación; todo lo anterior, afecta de manera significativa el sector ganadero, ya que impide a los animales expresar todo su potencial productivo, además de implicar pérdidas económicas significativas por la disminución de la producción cárnica o láctea, poca ganancia de peso, lento desarrollo muscular y depreciación de sub productos como las pieles, y dificultar la adaptación de razas especializadas por la predisposición a adquirir enfermedades (Tirosh-Levy et al., 2018; Grisi et al., 2014).

Las afectaciones económicas causadas por las infestaciones con *R. microplus* suponen un riesgo para la seguridad económica del sector ganadero en muchos países, principalmente tropicales y sub tropicales; este es el caso de Brasil, país con mayor inventario ganadero a nivel global, que reporta pérdidas de más de 3.4 billones de dólares a causa de este parásito, siendo el mayor problema que afecta a sus ganaderos (Grisi et al., 2014). Colombia, por su parte, también proporciona un ambiente ideal para la proliferación de la garrapata del ganado en gran parte de su territorio y debido al creciente cambio climático, se ha encontrado presencia de este ácaro en zonas no endémicas y de condiciones desfavorables para su proliferación (Acevedo et al., 2019); es así

como se han encontrado poblaciones de *R. Microplus* tanto en departamentos de la región andina (Antioquia, Boyacá, Caldas, Cundinamarca, Huila, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander y Tolima) como en las regiones de la costa Caribe, los llanos orientales (Casanare, Arauca, Meta, Caquetá y Putumayo) y la Amazonía (Acevedo et al., 2019). Lo anterior, incide en la marcadas pérdidas económicas asociadas a este parásito, que a lo largo del país rondan los 5 mil millones de pesos (Polanco & Rios, 2016; Cortéz, 2010).

Prácticas como la aplicación de vacunas para el control de estas infestaciones han resultado infructuosas, principalmente por la frecuencia de uso y el incremento de gastos por animal (De la Fuente & Kocan, 2007). Por esta razón, el uso de acaricidas comerciales se ha convertido en el método de mayor aceptación para minimizar el impacto negativo de *R. microplus* debido a su rápido efecto y factibilidad económica. No obstante, su uso indiscriminado ha creado poblaciones de garrapatas resistentes a muchos de sus principios activos (Araque et al., 2014), tales como piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazol, benzoilfenilureas y organofosforados (Gupta, 2018;Castro et al., 2010), y desencadenado innumerables efectos nocivos sobre el medio ambiente, entre ellos, la contaminación de los afluentes hídricos y la eliminación de fauna no específica, especialmente la encargada de la descomposición de la materia orgánica y la polinización, así como efectos nocivos sobre la salud humana (Muñoz et al., 2017;Cruz et al., 2012)

Durante muchos años los ganaderos han utilizado su conocimiento empírico para prevenir las infestaciones de ectoparásitos con el fin de disminuir los índices de morbilidad de sus animales, empleando diversos tipos de plantas y forrajes en sus pasturas, que se cree, tienen un efecto repelente o acaricida sobre garrapatas y algunas especies de mosquitos (Ghosh et al., 2006). En algunos casos, la implementación de dichos forrajes se realizaba a través de decocciones o

extractos acuosos que se aplicaban al animal vía oral o tópica (Tamiru et al., 2013). Dichos antecedentes, además de ser opciones económicas y asequibles para los productores, sentaron la base para establecer la búsqueda de alternativas ecológicas para el control de plagas como la garrapata, entre las cuales se encuentran los extractos de plantas tanto nativas como exóticas, cuyos componentes presentan propiedades repelentes y acaricidas (Salman et al., 2020; Malik, 2019; Kaur et al., 2016). El territorio colombiano cuenta con las condiciones climáticas y agrológicas adecuadas para el desarrollo de todo tipo especies forrajeras, entre ellas, las que se cree tienen efecto repelente contra diversas plagas (Habeeb, 2010) como el pasto *Melinis minutiflora*, gramínea introducida de África occidental que se ha extendido por gran parte del país, debido a su capacidad de adaptarse a suelos deficientes de nutrientes (Robayo, 2018; Martins et al., 2009); diversos estudios han encontrado en este pasto componentes químicos con capacidad de repelencia hacia algunas plagas que afectan los cultivos, además de presentar actividad repelente frente a algunas especies de garrapatas (Prates et al., 1998; Castrejon et al., 2004; Peters et al., 2011; Iriarte et al., 2018).

Dado que la ganadería es una de las principales actividades económicas del sector agropecuario en el país (FEDEGAN, 2020) se hace necesario la continua búsqueda de alternativas naturales que logren disminuir los índices de morbilidad que causan las infestaciones con garrapata y asimismo, tengan un mínimo impacto negativo en el ambiente (Salman et al., 2020), a la par que contribuyan a la reducción del uso de productos sintéticos que también acrecientan los tiempos de retiro en las producciones de carne y leche (Balandrin et al., 1985; Graf et al., 2004). Es por esto que este estudio busca evaluar el potencial acaricida del pasto *M. minutiflora* con distintas edades de corte para definir su viabilidad como componente natural de futuros acaricidas.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar el potencial biológico del pasto *Melinis minutiflora* con distintas edades de corte, por medio de ensayos acaricidas *in vitro* sobre garrapatas adultas.

1.2 Objetivos Específicos

- Determinar el porcentaje de rendimiento de los extractos obtenidos del pasto *Melinis Minutiflora* bajos distintas edades de corte.
- Caracterizar los extractos obtenidos del pasto *Melinis Minutiflora* bajo distintas edades de corte mediante métodos cromatográficos y espectrométricos.
- Comparar el efecto acaricida de los extractos obtenidos del pasto *Melinis minutiflora* con distintas edades de corte, sobre la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

2 Marco Teórico

2.1 Pasto Yaragua (*Melinis minutiflora* P.Beauv)

2.1.1 *Informacion taxonomica:* (Martínez, 2019)

Reino: Plantae

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia: Panicoideae

Tribu: Paniceae

Género: *Melinis*

Especie: *M. minutiflora*.

2.2.2 *Características:*

El pasto Yaragua, conocido también como chopín, chopimelao, yaragua peluda y yerba melao, es una especie nativa de la región tropical de África, la cual se ha introducido a muchos países, principalmente para forraje de alimentación animal (CABI, 2019). Es una gramínea monocotiledónea perenne, sus tallos pueden medir hasta 1.5 m de largo, formando colonias densas. Sus hojas son lineales y pubescentes (posee vellosidades) y poseen tricomas que segregan un aceite viscoso muy aromático; el fruto es de forma cariósida fusiforme. Su medio de propagación es a través de semillas, aunque también lo hace por medio de material vegetativo, presentando un

crecimiento rápido con una alta tasa de germinación (55%). Se adapta muy bien en altitudes desde los 200 y los 3000 msnm (Cárdenas et al., 2017).

Este forraje produce de 10 a 13 toneladas de MS/ha/año, posee un contenido de proteína aproximado de 6 a 10% y una digestibilidad del 60% dependiendo de la edad de la planta, la cual mejora al asociarse con leguminosas (CONABIO, 2015). Si se desea implementar en un sistema de pastoreo, este debe ser de periodos cortos de ocupación y tiempos de descanso adecuados (Peters et al., 2011).

Este forraje fue introducido a América a finales del siglo XVII y se extendió a muchos países de manera intencional y accidentada debido a su potencial forrajero y las grandes densidades que forma. (Robayo 2018).

2.2 Metabolitos Secundarios

Las plantas producen una gran variedad de compuestos orgánicos que no necesariamente participan directamente en los procesos vitales como crecimiento, respiración y desarrollo, si no que se encargan de la protección de la misma frente a factores de estrés biótico y abiótico, proporcionando, entre otras cosas defensa contra patógenos y plagas. Dichos compuestos fitoquímicos llamados metabolitos secundarios o productos naturales se distribuyen diferencialmente en todos los grupos taxonómicos dependiendo de su especie o *phylum*. Esta variedad estructural está dada por las modificaciones químicas originadas por las reacciones bioquímicas como hidroxilación, metilación, esterificación, entre otras. Así mismo, su variabilidad representa una especie de adaptación al ambiente y defensa contra depredadores, los cuales se alimentan de una variedad heterogénea de metabolitos secundarios (Sepúlveda, 2003;Croteau et al., 2000).

El creciente interés por el estudio de estos productos naturales no ha sido exclusivamente académico, sino que está siendo impulsado por la gran utilidad que estos poseen en la elaboración de colorantes, aceites, ceras y aromatizantes. Asimismo, la evaluación de sus propiedades biológicas se ha enfocado en su utilidad como compuesto bioactivo de medicamentos, antibióticos, herbicidas y repelentes (Agostini et al., 2011; Thacheril et al., 2020).

2.2.1 Clasificación:

Existen diversas formas de clasificar los metabolitos secundarios, sin embargo, una de las más aceptadas por la comunidad científica es con base en la presencia o no de nitrógeno, clasificándose así en compuestos nitrogenado y no nitrogenados. Entre los metabolitos secundarios nitrogenados están los alcaloides, aminas, compuestos cianogénicos, glucósidos y glucosinolatos nitrogenados. Por otro lado, los metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. Sin embargo, debido a la cantidad de metabolitos secundarios existentes en la naturaleza, su estudio se enfoca en los tres grupos más abundantes y de mayor investigación: fenoles, terpenoides y alcaloides.

2.2.1.1 Fenoles: Son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos de hidroxilo sustituidos o libres. La mayor parte de las estructuras de las plantas están compuestas por polifenoles, de los cuales se conocen cerca de 8.000 estructuras, entre ellas figuran quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos, los estilbenos y los flavonoides. Además de las estructuras monoméricas y diméricas, existen importantes grupos de polímeros fenólicos, como las ligninas y los taninos (Sierra et al., 2018), los cuales además de cumplir funciones esenciales en las plantas como crecimiento y reproducción, también tienen acción como antibióticos, agentes protectores contra rayos UV, pesticidas naturales y aislantes en las paredes celulares (Shahidi & Ho, 2005).

2.2.1.2 Terpenoides: Los terpenoides son quizá el grupo más numeroso y variado de productos naturales con más de 40.000 moléculas diferentes, que va desde pequeñas unidades estructurales, hasta productos que se componen de miles de carbonos estructurales. Todos los terpenoides e isoterpenoides se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos (isoprenos) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isoprenos presentes en la estructura del núcleo. Existe una amplia variedad de bioactivos compuestos de monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) y diterpenos (C20), como el mentol, citronelal, linalol, cariofileno, los cuales son utilizados en la medicina tradicional y farmacéutica, debido a que se les confieren propiedades antimicrobianas, cicatrizantes, repelentes de insectos y, combinadas con otros compuestos alcaloides, forman mezclas volátiles con diversas funciones, entre ellas, repeler por medio de señales químicas a enemigos naturales como insectos.(Sepúlveda-Jiménez, 2003; Croteau et al., 2000; Sierra et al., 2018).

2.2.1.3 Alcaloides: Los alcaloides son un grupo integrado por más de 12.000 estructuras conocidas que se componen principalmente de átomos de nitrógeno heterocíclicos, los cuales son de naturaleza alcalina (Sierra et al., 2018). La evidencia arqueológica ha mostrado el uso de los alcaloides desde el año 4000 A.C y han tomado suma importancia en la industria farmacológica desde el descubrimiento de la morfina, obtenida del látex de la amapola y el opio en el antiguo Egipto (Agostini et al., 2011). Asimismo, los alcaloides desempeñan un papel fundamental en la defensa química de las plantas, empleando acciones tóxicas y desencadenando efectos dañinos en el sistema nervioso de los depredadores, es así como algunos de ellos logran bloquear los neuro receptores y canales iónicos de los animales, mientras que otros se intercalan el ADN para detener

la síntesis de proteínas y de carbohidratos, llevando a la apoptosis y posterior muerte del animal (Sepúlveda-Jiménez, 2003).

2.3 Garrapatas

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos pertenecientes al Phylum Arthropoda, Clase Arachnida, Subclase Acari, Orden Parasitiformes, Suborden Ixodida. Estos parásitos son reconocidos por infestar vertebrados terrestres tanto domésticos como silvestres.

Su importancia sanitaria radica en su capacidad para provocar trastornos como toxicosis, anemia y dermatosis en sus hospedadores, así mismo, su capacidad de transmitir agentes patógenos como virus, bacterias, nematodos y protozoos que son perjudiciales para el hospedador, hasta el punto de provocar la muerte. (Nava & Atilio, 2019)

2.3.1 Clasificación:

Existen dos grandes familias de garrapatas, *Argasidae* o garrapatas blandas, e *Ixodidae* o garrapatas duras; sin embargo, hay una tercera familia llamada Nuttalliellidae, representada por un único género, *Nuttalliella*, del cual se tiene poca información y solamente es de importancia para los aracnólogos. A pesar de la notable diferencia que existe en cuanto a su morfología. Las garrapatas pueden diferenciarse según sus características morfológicas, también su conducta difiere notablemente. La familia *Argasidae*, los individuos tienden a ocultarse en madrigueras de las cuales salen únicamente a alimentarse de hospedadores desprevenidos. Por otro lado, las garrapatas del género *Ixodidae* pasan la mayor parte de su vida en pasturas o matorrales esperando a que pase algún hospedador, a los cuales se fijan durante varios días antes de desprenderse y caer al suelo. (Murphy & Spray, 2016; Bowman, 2011)

2.3.2 Información Taxonómica: Tomada de Polanco & Rios, 2016:

Phylum: *Artropoda*

Clase: *Arachnida*

Orden: *Acarina*

Suborden: *Ixodoidea*

Familia: *Ixodidae – Argasidae – Nuttalliellidae*

2.3.3 Familia *Ixodidae* o garrapatas duras:

Las garrapatas de la familia *Ixodidae* poseen un escudo, el cual cubre toda la superficie dorsal del macho y parte de la superficie dorsal de la hembra mientras esta se alimenta de sangre. A la altura de la segunda coxa, se encuentran los ojos, observados como pequeñas áreas redondas. Las aperturas respiratorias unidas al sistema traqueal se llaman estigmas y se encuentran detrás del último par de patas a los lados del cuerpo. El sistema digestivo se compone de la base del capítulo, adyacente al cuerpo, sobre la porción anterior del cuerpo se encuentran los palpos, uno a cada lado de los quelíceros, los cuales penetran la dermis y epidermis de su hospedero. Además, poseen el hipostoma conformado por pequeños dentículos que succionan la sangre de la cual se va a alimentar, aumentando su volumen casi 100 veces del original (ingurgitación) por un determinado periodo de tiempo (Mullen & Lance A, 2018; Bowman, 2011).

2.3.4. Ciclo de vida:

El ciclo de vida de *R. microplus* consta de 4 estadios: Huevo, larva, ninfa y adulto, necesitando de un solo huésped para desarrollar su ciclo de vida, la especificidad del hospedero es muy marcada en la familia del *R. microplus* (garrapata del ganado) aunque también se puede encontrar en otras especies domésticas y algunos mamíferos silvestres. Los huevos eclosionan en el medio ambiente, por lo que las larvas se movilizan por el suelo o son arrastradas por el viento

hasta encontrar un huésped del cual se adhieren a zonas blandas y difíciles de llegar, como la cara anterior de los muslos, pecho y patas traseras, de donde se alimentan hasta alcanzar su madurez sexual. Al aparearse, se desprenden del huésped para depositar los huevos en el suelo, por lo general entre las grietas y así completar su ciclo (The Center For Food Security And Public Health & Institute International Cooperation in Animal Biologics, 2007; Nava & Atilio, 2019)

2.3.5. Transmisión de enfermedades:

La importancia económica de la especie *R. microplus* radica en su potencial de transmisión de agentes patógenos, debido a la alta capacidad de adaptación a diversos ambientes y hospedadores de los cuales se alimenta; esta puede ocurrir de dos maneras: transestádica; en la que una infección adquirida por una larva puede transmitirse a través de la muda al estado de ninfa y posteriormente al hospedador del cual se alimente la ninfa, o bien, una ninfa infectada puede transmitir el agente patógeno a través de la muda a garrapata adulta al hospedador del cual se esté alimentando, y transovárica, en la cual una garrapata adulta infectada transmite la infección a su progenie a través de los huevos por varias generaciones (Jalovecka et al., 2019).

2.4. Acaricidas:

Un acaricida es un pesticida encargado de la eliminación de ácaros y garrapatas (ixodicida) (Muyobela et al., 2016; Adenubi et al., 2018) Estos productos se pueden encontrar en diferentes presentaciones como polvos, collares, tabletas, aerosoles y soluciones de inmersión, dependiendo de su formulación y su especificidad de especie: plantas, humanos o animales (Pfister & Armstrong, 2016). Con base en la naturaleza de su principio activo, los acaricidas pueden tener varios modos de acción combinados o por separado: Interrupción del ciclo de vida del parásito dejando infértiles los huevos, evitando el contacto de la garrapata con el hospedador o evitando la alimentación del parásito, provocando la muerte de éste.

Los acaricidas comerciales contienen principios activos como: fenilpirazoles, organoclorados, organofosforados, carbamatos, arsenicales, formamidinas, piretroides, lactonas macrocíclicas y más recientemente, espinosinas, compuestos reguladores del crecimiento de algunos insectos (Mctier et al., 2016).

2.4.1 Estado actual de la resistencia a acaricidas:

Aunque el control dominante de las garrapatas se basa en el uso de acaricidas sintéticos, el sostenimiento de este método está en riesgo, debido a la resistencia que se ha generado debido al uso irracional de los acaricidas existentes (concentraciones insuficientes por animal, realización de baños muy seguidos, planes sanitarios deficientes, niveles de infestación perjudicialmente altos), así como de la inestabilidad de la frecuencia de los ciclos de vida de las plagas. La resistencia de *R. microplus* a organofosforados, piretroides sintéticos, ivermectina y amitraz se ha documentado en América Latina (Rodríguez-Vivas et al., 2006; Rodríguez-Vivas et al., 2007; Torrents et al., 2020)

Desde años atrás, la evolución progresiva de la resistencia de las garrapatas a los acaricidas comerciales ha ido en aumento, frustrando los esfuerzos de los productores para controlar las enfermedades que afectan a los animales. Esta resistencia se define como la capacidad de soportar dosis mayores de una sustancia toxica que normalmente sería letal para los individuos de una misma especie, la cual es una característica heredable por medio de cambios del ADN, generada por mutaciones del sitio blanco de los pesticidas (Díaz Rivera, 2012). Los mecanismos de resistencia de la mayoría de especies de garrapatas pueden dividirse en dos grupos: insensibilidad del sitio del destino y aumento de las vías metabólicas (Chen et al., 2007).

Con el objetivo de mitigar el daño ambiental que causan estos componentes sintéticos, se han realizado estudios acerca de los posibles efectos acaricidas de algunos compuestos de plantas que se usaban empíricamente como control de estos ectoparásitos.

2.4.2 Bioensayos realizados para la evaluación de acaricidas

A continuación, se enuncian los principales bioensayos usados para evaluar material biológico en la creación de acaricidas, debido a su fácil ejecución y utilización a nivel universal.

2.4.2.1 Prueba del paquete Larval: La organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura acogió este ensayo como el referente para evaluar los efectos acaricidas y las poblaciones resistentes de garrapatas. Los ensayos consisten en insertar de 30 a 40 larvas previamente expuestas a una solución a evaluar en sobres sellados que posteriormente se llevan a incubar a 27-28 °C y 85-95% de humedad relativa durante 24 h a 48 horas, para por medio de un estereoscopio (Adenubi et al., 2016).

2.4.2.2 Prueba de inmersión de adultas: Este ensayo ha sido descrito por varios autores, pero el protocolo realizado por Drummond et al., (1973) es el más utilizado, ya que se considera el ensayo ideal para determinar las propiedades acaricidas en las especies vegetales. Una ventaja que posee este bioensayo, es que se pueden realizar tanto con garrapatas criadas en condiciones de laboratorio como con material biológico recolectado en condiciones de campo; las teleoginas se sumergen en una solución a evaluar por tiempos establecidos (de 1 a 30 minutos) y luego se llevan a incubación a 27-28 °C y 85-95% de humedad relativa, variables como la mortalidad, la inhibición de la oviposición o la inhibición de la ovoposición se evalúan después de diferentes tiempos (24-72 h), los huevos producidos por cada grupo de ensayo se pesan y se comparan con el tratamiento control (O. T. Adenubi et al., 2016)

2.5 Repelentes de ectoparásitos

Los repelentes de garrapatas son sustancias químicas cuyos efectos hacen que la garrapata se aleje del huésped después de hacer contacto con su pelaje o bien interrumpen los mecanismos de apego y desprendan las garrapatas ya adheridas al animal (Halos et al., 2012). Para evaluar la eficacia de un repelente se debe observar la velocidad en la que los ectoparásitos se desprenden del huésped y la interrupción del apego a este, además de brindar protección por al menos 8 horas, que no irrite la piel y sea indoloro; influyendo en la gran mayoría de aspectos mencionados anteriormente (Halos et al., 2012; Adenubi et al., 2018)

Se han desarrollado repelentes a base de extractos de plantas de manera experimental, pues los extractos de plantas no han encontrado un espacio en el uso industrializado a pesar de su eficiencia, ni un método estandarizado para su experimentación. Hasta la fecha, las severidades económicas y los pocos estudios en campo al respecto han limitado uso de aceites esenciales en los repelentes comerciales. Asimismo, la elevada demanda de plaguicidas en contraste con la población de plantas con efecto análogo y las leyes de aprobación regulatoria cada vez más estrictas, constituyen una gran barrera para el desarrollo de productos naturales (Isman, 2020).

2.5.1 Métodos de evaluación de repelencia de garrapatas:

Dautel (2004), catalogó los métodos de evaluación de repelencia de garrapatas en tres: Bioensayos *in vitro* elaborados en presencia de estímulos del huésped, Bioensayos *in vitro* realizados bajo ausencia de estímulos del huésped y bioensayos realizados en hospederos vivos.

2.5.1.1 Bioensayos realizados con huéspedes vivos: Los animales que generalmente se usan para ensayos de laboratorio son conejos, cobayas o ratones, ya que son más fáciles de manejar en ambientes controlados, no obstante, al no ser estas especies los hospederos específicos de las garrapatas los resultados pueden tener una inexactitud considerable; lo mismo ocurre con las

garrapatas criadas en laboratorio, ya que este ambiente altera su estado fisiológico, en especial su comportamiento al alimentarse. Además de ello, se debe tener en cuenta que no todas las especies y familias de garrapatas responden de igual manera con los distintos compuestos de los repelentes, por lo tanto, se aconseja evaluar un tipo en específico para que se compruebe la eficacia de los repelentes (Dautel, 2004).

2.5.1.2 Bioensayos realizados bajo ausencia de estímulos del huésped: Se determina por un número significativo de repelencia de garrapatas bajo un número de garrapatas de control. Tales tipos de ensayos tienen la ventaja de ser fáciles de realizar, económicos y pueden proporcionar condiciones controladas que permitan la comparación de sustancias. Además, se pueden utilizar todas las especies de garrapatas. Sin embargo, las demandas de un repelente en tal ensayo no son muy altas (Dautel, 2004).

2.5.1.3 Bioensayos realizados en hospederos vivos: Este tipo de estudio prueba el repelente directamente sobre el huésped, bien sea animales domésticos o silvestres en condiciones que se asemejan a uso práctico. Sin embargo, tales pruebas son difíciles de realizar por la cantidad de individuos necesarios para obtener resultados confiables y el tiempo necesario para la realización del ensayo. Asimismo, los ensayos realizados a hospederos vivos pueden poner en potencial riesgo de contraer enfermedades tanto a animales como a seres humanos, si las colonias de garrapatas a utilizar son obtenidas de manera silvestre; por lo tanto, requieren de la aprobación de instituciones gubernamentales que reglamenten su uso.

2.6 Métodos de extracción de productos naturales:

La extracción es la fase inicial para el aislamiento y la posterior caracterización de bioactivos de interés en los materiales vegetales. Los pasos principales son: recolección de las plantas, lavado, secado y triturado para obtener una mezcla homogénea, este último paso es muy

importante, debido a que la disminución del material vegetal aumenta la superficie de contacto con el disolvente, por ende, mejora la cinética de la extracción.

Existe una gran variedad de métodos empleados para realizar la obtención e identificación de metabolitos secundarios en las plantas; sin embargo, para seleccionar el método apropiado se debe observar la naturaleza química de la molécula objetivo y la consistencia del material vegetal a procesar ya que parámetros como alcalinidad, peso molecular, densidad y polaridad influyen en la separación de estos compuestos.

Varios de estos métodos de extracción implican el calentamiento de la muestra, con el fin de liberar fácilmente ciertos componentes de dicho material sólido, sin embargo, estos métodos necesitan una elevada cantidad de tiempo y de solvente. Se pueden emplear na gran variedad de solventes para separar los compuestos, los cuales son de varias fuentes naturales, dependiendo de la naturaleza del material que se desea estudiar. Es así como solventes como el etanol, metanol o acetato de etilo se usan para la extracción de compuestos hidrófilos, mientras que el diclorometano se usa para compuestos hidrófobos. (Goyal et al., 2019)

Tabla 1.

Tipos de solventes utilizados para la extracción de compuestos bioactivos

Tipo de Solvente	Compuesto Bioactivo
Acetona	Flavonoides, Terpenoides, Flavonoides
Diclorometanol	Terpenoides
Etanol	Taninos, polifenoles, flavonol, terpenoides, alcaloides
Éter	Alcaloides, terpenoides
Metanol	Antocianinas, terpenoides, Saponinas, Taninos, polifenoles. Antocianinas, taninos, Saponinas, Terpenoides.

Nota: Tomado de *Metabolitos secundarios vegetales para la salud humana: Extracción de Compuestos Bioactivos. En Potencial de África para la intensificación ecológica de la agricultura.*

2.6.1 Método de extracción Soxhlet

Es un proceso de extracción en caliente que se realiza empleando un equipo denominado extractor Soxhlet. En este procedimiento estándar se coloca la muestra finamente molida en un dedal de celulosa, que se inserta en el aparato Soxhlet y posteriormente, se adiciona el disolvente de la extracción y se calienta. El solvente líquido se convierte lentamente en vapor, estos vapores ingresan a un condensador a través de un tubo adyacente y se condensan en un líquido caliente que cae y extrae el contenido del dedal; este proceso se realiza de forma continua hasta que no se generen residuos. El beneficio de este método es que se puede extraer gran cantidad de muestra con una menor cantidad de disolvente, además de que se usa a pequeña y a gran escala, pues un método económico y viable (Goyal et al., 2019).

3. Marco Conceptual

Mwangi et al., (1995) desarrollaron un estudio en el que evaluaron el efecto repelente del pasto *Melinis Minutiflora* sobre garrapatas de la especie *Rhipicephalus appendiculatus*. Se realizaron estudios del tallo secado a la sombra, secado al sol, lavado con disolvente y pasto en crecimiento en parcelas de estudio y se observó que el mayor número de garrapatas treparon sobre los tallos secados al sol, en comparación con las que treparon a los tallos secados a la sombra. Asimismo, encontraron que, de los 5 solventes utilizados, la acetona fue el solvente más eficiente

para extraer los compuestos repelentes del *M. minutiflora*, definiéndose la posibilidad de usar este pasto como parte de un paquete integrado del control de garrapatas a nivel industrial.

Por otro lado, Castrejon et al., (2004) investigaron acerca de la repelencia del extracto de *Melinis minutiflora* sobre larvas de *R. microplus*, mediante el bioensayo de repelencia por olfactómetro. Para la extracción, se usaron extractos de tallo, hojas y la planta completa, tratados con diferentes solventes (metanol, cloroformo, hexano y acetona). Los resultados arrojaron un efecto de repelencia entre el 43 al 90%, siendo los extractos en acetona los que presentaron mayores porcentajes de repelencia. Además, se identificaron 12 compuestos en los extractos: en mayor proporción el eicosano, (18.53%), ácido linolenico (16.08%) y el ácido hexadecanoico (14.20%). Se concluyó que posiblemente el efecto conjunto de todos los compuestos identificados influyó en el efecto de repelencia.

De igual manera, Fernández Ruvalcaba et al., (2004), investigaron el efecto anti- garrapata de los pastos *Melinis minutiflora* y *Andropogon gayanus* en diferentes épocas del año; el experimento se llevó a cabo en la ciudad de Morelos, México, durante un periodo de 3 años, en los cuales se sembraron parcelas experimentales (3 tratamientos para cada forraje), con el fin de evaluarlas en cada una de las 4 estaciones. Una vez establecidas las parcelas, se infestaron con larvas de *R. microplus*, que posteriormente fueron muestreadas arrastrando paños de franela para medir el número de garrapatas extraídas en cada una de estas al final de la temporada. De las dos gramíneas, *M. minutiflora* tuvo el mayor efecto a lo largo de las estaciones estudiadas.

Fernandes & Freitas, (2007), investigaron la actividad acaricida del extracto oleorresinoso del árbol de *Copaifera reticulata*, sobre *R. microplus*, con el objetivo de determinar la concentraciones letales, encontrando que la dosis letal mínima fue de 1579 ppm. Los resultados de este estudio recalcaron la importancia de la preservación del *Copaifera reticulata* en su

ambiente natural como un recurso natural propio de la selva amazónica, con compuestos activos frente al control de ácaros.

Álvarez et al., (2008) realizaron un estudio acerca de la eficacia de los extractos de diez plantas tropicales frente a garrapatas *R. microplus*: Pimienta negra (*Piper nigrum*), Clavo de olor (*Zizygium aromaticum*), Zorrillo o anamú (*Petiveria aliaceae*), angustifolia (*Echinacea echinacea*), (*Piper aduncum*), Chile picante (*Capsicum sp.*), Madero negro (*Gliricidia sepium*), Chile perro (*Poligonum punctatum*), Morera, (*Morus alba*), Ajo x clavo de olor (*Allium sativum* – *Z. aromaticum*) en proporción 50:50 y un producto comercial a base de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) mediante el método de inmersión. La evaluación biológica se llevó a cabo *in vitro*, utilizando como solvente etanol al 95%, posteriormente, dichos extractos fueron fraccionados en sus partes polares y apolares usando diclorometano (solvente de polaridad media). Las especies que produjeron mayor mortalidad fueron *Zizygium aromaticum*, *Morus alba*, *Piper nigrum* y la mezcla de *Allium sativum*-*Z. aromaticum* (todas no polares), el mayor porcentaje de inhibición de la eclosión lo obtuvieron *P. nigrum*, *Z. aromaticum*, *Echinacea angustifolia*, *Poligonum punctatum*, *M. alba* y la mezcla de *A. sativum*- *Z. aromaticum* y en el porcentaje de inhibición de la ovoposición *P. nigrum*, *E. angustifolia*, *P. punctatum*, *Gliricidia sepium* y *M. alba*. las principales moléculas con una actividad promisorio sobre la mortalidad, están presentes en la parte no polar de los extractos vegetales probados, debido a un posible desenmascaramiento de los metabolitos secundarios presentes al momento de realizar el fraccionamiento de los extractos.

Rodríguez et al., (2010); desarrollaron una investigación para evaluar el efecto del extracto de cinco plantas: *Brugmasia arborea*, *Sambucus nigra*, *Nicotiana tabacum*, *Bidens pilosa* y *Ambrosia cumanenses* sobre garrapatas *R. microplus*. El extracto de cada planta fue obtenido por la técnica de lixiviación, al realizar las pruebas biológicas se usaron garrapatas adultas pequeñas y

medianas las cuales fueron expuestas a los diferentes extractos por medio de la prueba de inmersión de garrapatas adultas. Se tomó un mínimo porcentaje de eficacia del 60% a las 24 horas de exposición. Inicialmente se realizaron las pruebas con los extractos puros, luego de demostrar su eficacia, se procedió a realizar ensayos con diferentes concentraciones hasta encontrar la concentración mínima eficaz. El extracto de *N. tabacum*, mostró efectividad en garrapata pequeña, hasta las diluciones 0.5:10 y 1:10 en clima frío y cálido, respectivamente y con 2.5:10 y 5:10 sobre garrapata mediana en clima frío y cálido, respectivamente; *B. arborea*, mostró eficacia sobre garrapata pequeña hasta la dilución 7.5:10 en ambos climas; *S. nigra* y *B. pilosa* solo fueron eficaces en clima cálido sobre garrapatas pequeñas empleando extracto puro. *A. cumanenses* no fue eficaz en ninguna de las pruebas por lo que se concluye que los mejores resultados se obtuvieron con *N. tabacum*.

Buscando otras alternativas de control con productos biológicos se han realizado estudios como el de da Silva et al., (2012), en el cual se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del nematodo entomopatógeno (EPN) *Heterorhabditis indica*, sobre la reproducción de *R. microplus*. Para tal fin se dividieron 240 hembras en 8 grupos y 6 subgrupos distribuidos en placas de Petri, expuestas a concentraciones de 0, 375, 750, 1500, 3000, 6000, 12.000 y 24.000 EPN por placa, posteriormente se evaluaron parámetros reproductivos como peso de la masa del huevo, índice de producción de huevos, porcentaje de eclosión y porcentaje de control. Las acciones de los nematodos tuvieron una acción significativa en los parámetros de masa del huevo, porcentaje de eclosión y porcentaje de control en porcentajes de control se alcanzaron concentraciones de 3000 y 12000 EPN/ hembra. Al comparar otros resultados con otros reportados en artículos que evalúan la patogenicidad *in vitro* de otras especies de entomopatógenos, se concluye que *Heterorhabditis indica* es una de las especies más virulentas.

Por otro lado, Ghosh et al., (2013), evaluaron la eficacia del extracto de las hojas de *Ricinus communis* en pruebas *in vitro* e *in vivo* sobre larvas de *R. microplus*, hallando una eficiencia del 58 y 60% respectivamente; además identificaron la presencia de polifenoles con actividad antioxidante en el extracto obtenido a partir de las hojas, responsables de las altas propiedades acaricidas de la planta.

Štefanidesová et al., (2017), probaron el efecto repelente de once aceites esenciales en concentraciones del 1% y 3% p/p extraídos de las plantas de: albahaca (*Ocimum basilicum*), bergamota (*Citrus bergamia*), yema de clavo (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), tomillo rastrero (*Thymus serpyllum*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), mejorana (*Origanum majorana*), menta piperita (*Mentha piperita*), menta verde (*Mentha spicata*) y el tomillo rojo (*Thymus vulgaris*) sobre las garrapatas *Dermacentor reticulatus*. Se observó que la mayor eficiencia se logró en concentraciones del 3% de extractos de especies de capullo de clavo, tomillo rastrero y tomillo rojo con porcentajes de repelencia del 83, 82 y 68% respectivamente. Al realizar la mezcla de los aceites esenciales de tomillo y citronela en concentraciones individuales de 1.5 % p/p se demostró un efecto repelente mayor que al usar los aceites esenciales individuales (91%).

Avinash et al., (2017), investigaron la actividad acaricida *in vitro* de nanopartículas de plata recubiertas con el extracto de la planta Queloides de Neem (*Azadirachta indica*) sobre *R. microplus*, por medio de la prueba de paquetes de larvas (LPT). La mortalidad más alta se obtuvo a una concentración de 50 ppm de las nanopartículas recubiertas, cuyo mecanismo de acción se adjudicó a la capacidad inhibidora de la ovoposición de las hembras adultas.

Iriarte et al., (2018), identificaron los compuestos químicos de tallo, hojas y tallo/hojas de *Melinis minutiflora* y su efecto repelente sobre garrapatas de *Amblyomma cajennense*. Los

extractos fueron obtenidos mediante extracción Soxhlet con etanol al 96% y se realizó la identificación de los compuestos por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Los ensayos para evaluar la repelencia se realizaron por medio de la prueba del olfactómetro y de inmersión de larvas. Se lograron identificar 11, 6 y 8 compuestos en hojas, tallos y tallo/hojas respectivamente. Se determinó que el extracto de tallo/hojas de *M. minutiflora* posee un marcado efecto repelente e ixodicida sobre las larvas de *A. cajennense*.

Singh et al., (2018) evaluaron la eficacia de un producto a base de extractos naturales de romero (10%), geranio (5%) y aceite de menta (2%) sobre las larvas de *R. microplus* Canestrini (cepa específica), mediante la prueba de paquete larvario con larvas de 14 a 21 días de edad. Usando concentraciones letales de 50% y 95% se evaluó la mortalidad de las larvas. Los valores del acaricida Essentria IC-3 oscilaron entre 0,647 y 1,033% para la cepa estudiada y niveles de susceptibilidad mas bajos para otras cepas (cepa de las palmas); dicho resultado se asocia con el potencial acaricida del geranio, reportandose un bajo nivel de resistencia de las cepas existentes a este acaricida, que puede estar asociado con el hecho de que no ha sido cruzado con los químicos comunes usados en los productos comerciales.

De igual manera, Marchesini et al., (2020) realizaron una evaluación del efecto de *Acmella oleracea* sobre *R. microplus*. Obteniendo el compuesto espilantol a partir del extracto etanólico de la planta y de su fraccionamiento bio dirigido. Los ensayos de actividad biológica de este compuesto dieron como resultados una mortalidad mayor al 84%, lo que permitió concluir que la presencia de espilantol es un factor importante en la actividad acaricida del extracto de esta planta.

Salman et al., (2020), realizaron una revisión sobre el efecto repelente que poseen los extractos de algunas plantas sobre diferentes tipos de garrapatas, llegando a la conclusión de que el creciente interés por la investigación de los extractos y aceites esenciales puede llegar a ser una

estrategia muy eficaz de control de parásitos externos como la garrapata, que no fomentan el daño ambiental ni resistencia a los productos comerciales.

Castro et al., (2019) investigaron el efecto acaricida de los aceites esenciales de tres especies de *Croton euphorbiaceae* sobre la garrapata del ganado *R. microplus*. Mediante la técnica de hidrodestilación se obtuvieron las muestras de los aceites volátiles, que posteriormente fueron analizadas mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID). La actividad acaricida fue evaluada con la prueba de inmersión de adultos para garrapatas ingurgitadas, y con la prueba del paquete de larvas para las larvas de *R. microplus*. Los aceites volátiles analizados por GC-MS identificaron compuestos como *eucaliptol* (24,09 %), *p-cimeno* (23,13 %) y *Metil chavicol* (83,59 % y 95,38 %) como los compuestos mayoritarios. Todos los aceites esenciales de *Croton* que se probaron en este estudio mostraron un marcado efecto acaricida, por lo que su uso para posteriores formulaciones de acaricidas comerciales sería efectivo en ambas etapas del ciclo de la garrapata.

4. Marco Legal

Se pueden destacar las siguientes leyes y resoluciones con relación al contexto del proyecto:

LEY 1764 DEL 2016: La cual regula las pautas del bienestar animal. Los animales como seres sintientes no son cosas, recibirán especial protección contra el sufrimiento y el dolor, en especial, el causado directa o indirectamente por los humanos, por lo cual en la presente ley se tipifican como punibles algunas conductas relacionadas con el maltrato a los animales, y se establece un procedimiento sancionatorio de carácter policivo y judicial.

RESOLUCIÓN 8430 DE 1993: Norma científico-técnica para la investigación en salud

• Título IV: DE LA INVESTIGACIÓN CON MICROORGANISMOS PATÓGENOS O MATERIAL BIOLÓGICO QUE PUEDA CONTENERLOS. Las instituciones investigadoras en las que se realice investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos deberá:

- a) Contar con las instalaciones y equipo de laboratorio de acuerdo con las normas técnicas, que al efecto emita este Ministerio, que garanticen el manejo seguro de tales gérmenes.
- b) Elaborar un manual de procedimientos para los laboratorios de microbiología y ponerlo a disposición del personal profesional, técnico, de servicios y de mantenimiento.
- c) Adiestrar al personal sobre la manipulación, transporte, utilización, descontaminación y eliminación de desechos.
- d) Determinar la necesidad de vigilancia médica del personal que participa en las investigaciones y en su caso, implementarla.
- e) Establecer un programa de supervisión y seguimiento de seguridad en los laboratorios de microbiología.
- f) Disponer de bibliografía actualizada y un archivo sobre la seguridad de los equipos, la disponibilidad de sistemas de contención, normas y reglamentos, riesgos involucrados y otros aspectos relacionados.

DECRETO 1843 DE 1991: El control y la vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas, deberá efectuarse con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro del ambiente.

- Reglamenta el control y vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas, con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro en el ambiente. Igualmente, se establecen controles para las diferentes actividades relacionadas con los plaguicidas y se precisa el concepto toxicológico como una condición previa de los requisitos para la licencia de venta establecida por el ICA.

5. Metodología

5.1 Fase de campo

5.1.1 Localización

La fase de campo se realizó en la finca El Pino, ubicada en la vereda Potrero grande del municipio de Molagavita, Santander, con coordenadas 01°22'29.51"N; 01°14' 39.80"E y altitud de 2202 msnm.

5.1.2 Recolección del material vegetal

Dadas las condiciones agrológicas iniciales, se estableció el pasto *Melinis minutiflora* y se cosechó a diferentes edades de corte (60 días, 90 días y 120 días). Posteriormente se procedió a tomar una muestra al azar de la planta (tallos y hojas), que fue almacenada en sacos de fibra para su posterior secado y para evitar la proliferación de micotoxinas que alteraran la composición química de sus extractos; asimismo, estos sacos provistos del material vegetal se ubicaron en zonas de alta aireación y en sombra con el fin de limitar posibles cambios fotooxidativos (Eloff, 2006).

5.2 Fase de Laboratorio

5.2.1 Diseño experimental

El experimento se desarrolló empleando un diseño completamente al azar, en donde se definieron 3 tratamientos correspondientes a cada edad de corte (T1= 60 días; T2= 90 días y T3= 120 días) y 4 réplicas por cada uno de estos tratamientos. En total se tuvieron 12 unidades experimentales o muestras de *M. minutiflora*.

5.2.3 Obtención de los extractos etanólicos

Para obtener los extractos, el material vegetal seco se trituró con ayuda de un molino, con el fin de obtener un tamaño de partícula adecuado; de este material se pesaron entre de 55 a 57 gramos por muestra y se emplearon 300 mL de etanol al 96% por cada una de ellas. El proceso de extracción se llevó a cabo por medio del método Soxhlet en continuo y el extracto crudo obtenido se almacenó en frascos de vidrio a la sombra y se dejó evaporar el exceso de etanol; a continuación, se pesó el extracto crudo y seco y se guardó en una nevera a una temperatura de 4°C hasta su uso.

5.2.3 Determinación del porcentaje de rendimiento:

Para calcular el porcentaje de rendimiento de cada extracto se empleó la siguiente fórmula presentada por Acevedo et al., (2019):

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{masa del extracto seco (g)}}{\text{masa del material vegetal seco (g)}} \times 100$$

5.2.4 Obtención de las garrapatas:

Se trabajó con garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* en estado adulto, las cuales se obtuvieron de animales con alto nivel de infestación, arrancándolas de la piel del animal en las áreas corporales de mayor incidencia en zonas geográficas distintas de la provincia de García

Rovira. Posteriormente, las garrapatas se transportaron en recipientes húmedos que permitían una adecuada ventilación. A continuación, se observaron en el estereoscopio para identificar y seleccionar solamente las hembras ingurgitadas (teleoginas).

5.2.5 Preparación de las diluciones:

Se preparó la solución a 50000 ppm, para lo cual se pesaron 1250 mg de extracto crudo y seco que se mezclaron con 25 mL de agua destilada; esta mezcla se agitó por un periodo de 30 minutos hasta manera obtener una apariencia homogénea.

5.2.5 Ensayo de inmersión de garrapatas adultas:

El test de inmersión de adultas se realizó siguiendo la metodología propuesta por Drummond et al., (1973). Cada ensayo se realizó por triplicado, manejándose también un control negativo (agua destilada) y un control positivo (acaricida comercial a base de Etión al 83%).

Se formaron grupos de 10 teleoginas con un peso uniforme; cada grupo se depositó en un tubo falcon que contenía 14 mL de la solución acuosa del extracto de cada una de las muestras de *M. minutiflora* y se sumergieron por 5 minutos, a continuación, las garrapatas se secaron en papel filtro y se introdujeron en cajas de Petri previamente esterilizadas, a una temperatura de $27 \pm 28^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa 80-90% (condiciones ideales) hasta que concluyó la ovoposición.

Se determinó el porcentaje de mortalidad de hembras adultas desde el día cero hasta el día que finalizó la ovoposición, de igual manera se determinó el porcentaje de inhibición de la ovoposición (%IO) pesando los huevos provenientes de cada réplica en cada tratamiento y los controles.

Para determinar el porcentaje de inhibición de la ovoposición (% IO) se usaron las siguientes formulas empeladas por Monteiro et al., (2017):

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{\text{Garrapatas muertas}}{\text{garrapatas totales}} * 100$$

$$\text{Índice de producción de huevo (IPH)} = \frac{\text{Masa de los huevos}}{\text{masa de las garrapatas adultas}} * 100$$

$$\%IO = \frac{IPH \text{ del control negativo} - IPH \text{ del tratamiento}}{IPH \text{ del control negativo}} * 100$$

Finalizado el proceso de ovoposición, se tomaron 50 huevos por cada tratamiento y control, se colocaron en viales de vidrio con tapa de algodón y fueron llevados a incubación en condiciones que simulaban su ambiente natural (temperatura de $27 \pm 28^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa 80-90%), se observaron hasta el momento de la eclosión con el fin de determinar el porcentaje de eclosión larval (%EL) contando los huevos eclosionados y sin eclosionar, además del índice de eficiencia de la reproducción (IER) por medio de las siguientes fórmulas:

$$\%EL = \frac{\text{huevos eclosionados}}{\text{huevos sin eclosionar} + \text{huevos eclosionados}} * 100$$

$$IER = \frac{\text{Masa de los huevos} * \%EL}{\text{masa de garrapatas adultas}}$$

5.2.6 Análisis de datos

El análisis de los datos sobre las variables estudiadas (% de mortalidad, índice de producción de huevo, inhibición de la ovoposición, eclosión larval e índice de la eficiencia de la reproducción) fue realizado con un análisis de varianza (ANOVA) por medio del paquete estadístico SAS, en donde se determinó si existen diferencias significativas entre los grupos de

garrapatas sometidas a los extractos de las distintas edades de corte por medio de la prueba de Duncan, las diferencias entre las medias fueron consideradas estadísticamente significativas con un P valor de <0.05 .

5.2.6 Caracterización de los extractos etanólicos

Con el fin de conocer los compuestos activos presentes en los extractos procedentes del pasto *Melinis minutiflora*, dichos componentes fueron caracterizados por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) usando un Cromatografo de gases Thermo Trace 1310, con detector de masas cuadrupolo simple (ISQ), utilizando una rampa de temperatura de 80 a 330 °C, mediante inyección Splitless, con columna Rxi-5MS 30mX 0.25 mm ID x 0.25 μm .

6. Resultados y Discusión

6.1 Rendimiento de los extractos

Los porcentajes de rendimiento en la extracción de los metabolitos secundarios de la gramínea oscilaron entre 15,98 y 9,76%, presentando diferencias estadísticamente ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos 1 y 2 con respecto al tratamiento 3, observando un descenso en los rendimientos con la edad al corte (Tabla 2). Rendimientos superiores a los reportados por Garcia et al., (2016) en *Ricinus communis* y similares o superiores a los encontrados por Rodrigues et al., (2012) en *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium Guajava*

Tabla 2.

Porcentaje de rendimiento de los extractos de M. Minutiflora a diferentes edades de corte

Tratamiento	% Rendimiento
T1	15,98 ^a
T2	11.31 ^a
T3	9,76 ^b
CV	22.18

Nota: Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$); Donde: T1=60 días de corte, T2= 90 días y T3= 120 días. CV: Coeficiente de variación

En un modelo productivo enfocado en la edad de corte que presenta mayor actividad acaricida (corte a 120 días) se podrían llegar a producir 119,69 kg de extracto/corte (Tabla 3), lo que supone que esta gramínea presenta un alto potencial para la obtención de extractos crudos activos, teniendo en cuenta que la planta se adapta bien a suelos secos y contiene un mayor porcentaje de materia seca en comparación con otras especies forrajeras como *Brachiaria mutica* y *Setaria sphacelata* como lo describe López et al.,(2018); por lo que la implementación de cultivos con base en el potencial ixodicida de este pasto, constituye una alternativa favorable para su posible aprovechamiento a nivel industrial.

Tabla 3

Estimación de los porcentajes de rendimiento del pasto M. minutiflora con base en la cantidad de biomasa Ha/año

MS	g m ² MS	Días al corte	kg ha corte de MS	Cortes al año	kg ha año MS	% de rendimiento	Extracto producido kg edad de corte	Extracto producido kg ha año
22,50	58,05	60,00	580,50	6,08	3531,38	13,91	80,75	491,21
23,40	89,39	90,00	893,88	4,06	3625,18	13,72	122,64	497,37
25,60	118,27	120,00	1182,72	3,04	3597,44	10,12	119,69	364,06

Nota. MS: Materia seca.

6.2 Mortalidad de las garrapatas *R. microplus*

El extracto obtenido a partir de *M. minutiflora* con edad de corte de 120 días (T3) ocasionó un porcentaje de mortalidad de las garrapatas significativamente mayor con respecto a los demás tratamientos ($p \leq 0,05$), con un valor cercano al doble del tratamiento con edad de corte más baja (Tabla 4). Los extractos con menores edades de corte presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí, aunque el tratamiento 1 presentó un valor similar al del tratamiento control, lo que indica que el pasto solo presenta efecto letal en las garrapatas adultas de *R. microplus* cuando los días al corte son mayores y, bajo estas condiciones, podría ser un candidato promisorio como biocontrolador de este parásito.

Debido a que las garrapatas provinieron de distintos lugares de muestreo y no se pudo realizar la estandarización en el proceso de recolección de las mismas, no es posible asegurar que en su totalidad provinieran de animales que no hayan sido bañados previamente con acaricidas o repelentes sintéticos y esto se ve reflejado en los coeficientes de variación expresados en el análisis estadístico y en los valores obtenidos para control negativo.

Tabla 4.*Efecto en la mortalidad para R. microplus bajo distintas edades de corte de M. Minutiflora*

Tratamiento	Mortalidad (%)
Control Positivo	100.00 ^a
Control Negativo	32.22 ^d
T1	36.66 ^d
T2	41.11 ^c
T3	69.00 ^b
CV	15.01

Nota: Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$); donde: T1=60 días de corte, T2= 90 días de corte y T3= 120 días de corte. CV: Coeficiente de variación.

Se presume que una alta incidencia de metabolitos secundarios de tipo graso podría aumentar la actividad del pasto, ya que en campo se observa que la abundancia del líquido oleorresinoso que desprende la planta aumenta en sus mayor madurez de la planta.

Se ha comprobado que los acaricidas elaborados a partir de aceites esenciales obtenidos de plantas como *Calea serrata*, *Brunfelsia uniflora* y *Croton euphorbiaceae* sobre, poseen un efecto mortal sobre las garrapatas adultas de la especie *R. Microplus* (Ribeiro et al., 2011; Singh et al., 2018; Castro et al., 2019), no obstante, también se han reportado estudios en los que se ha encontrado actividad ixodocida para extractos obtenidos con solventes como el etanol. Ghosh et al., (2013); registraron mortalidades máximas de *R. microplus* con valores de 59,9 % y 48,5 % para el extracto de *Ricinus communis*, a concentraciones del 6 y 10%, respectivamente; estos valores son

ligeramente menores que los obtenidos en este estudio para el T3. Asimismo, Iriarte et al., (2018) obtuvieron para el extracto de tallos y hojas de *M. minutiflora* valores de mortalidad de garrapatas de la especie *Amblyomma cajennense* alrededor 75% a una concentración de 30 mg/mL, valor más alto que los encontrados para este estudio con *R. microplus*.

6.3 Inhibición de la ovoposición

Se observan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre todos los tratamientos, siendo los extractos etanólicos obtenidos del pasto *M. minutiflora* a edad de corte de 120 días los que presentaron el mayor porcentaje de inhibición de la ovoposición. De igual manera, los tratamientos T2 y T3 fueron estadísticamente diferentes con respecto a los controles (Tabla 5), lo que permite apreciar que en edades de corte de 90 días, el extracto de dicha gramínea tiene mayor efecto sobre el ciclo reproductivo de la garrapata del ganado que sobre la mortalidad de las mismas en su estadio adulto; mientras que a una mayor edad de corte la actividad incrementa para las dos variables.

Tabla 5.

Efecto en la inhibición de la ovoposición en las diferentes edades de corte de M. Minutiflora

Tratamiento	Inhibición de la ovoposición (%)
Control Positivo	100.00 ^a
Control Negativo	30,989 ^c
T1	32.97 ^c
T2	45.93 ^d
T3	74.12 ^b
CV	12.86

Nota: Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$); donde: T1=60 días de corte, T2= 90 días de corte y T3= 120 días de corte.

CV: Coeficiente de variación.

Valores similares a los obtenidos en el presente estudio para T3 se encontraron en los ensayos realizados por Molano & Rodriguez; (2015) con extractos hidroalcohólicos de Morera (*Morus alba*) y Matarraton (*Gliricidia sepium*) sobre *R. Microplus*, en donde el extracto crudo de *M. alba* mostró un 73,01 % de inhibición de la ovoposición y el extracto crudo de *Gliricidia sepium* un 58% en la inhibición; de igual manera, en el estudio llevado a cabo por Jaramillo et al., (2020), se encontró inhibición en la ovoposición de garrapatas de la especie *R. microplus* a concentraciones de 160 mg/ml cercana a las observadas en este estudio para los extractos acetónicos de *Megaskepasma erythrochlamys*, pero inferiores a los encontrados en extractos etanólicos de *Momordica charantia*, afirmando que el solvente de extracción influye en la desenmascaración de los compuestos ixodicidas de las plantas. Asimismo, Jaramillo et al., (2020) encontraron una inhibición del 46,9% en extractos etanólicos a una concentración de 160 mg/L, obteniendo resultados similares a los encontrados en este estudio una concentración menor (50 mg/mL) en el tratamiento 2.

6.3 Índice de producción de huevo (IPH), eclosión larval (EL) e índice de eficiencia en la reproducción (IER)

Los extractos de *M. minutiflora* con menor edad de corte mostraron porcentajes similares desde el punto de vista estadístico para las variables eclosión larval (EL) y eficiencia reproductiva (IER), con valores de 78,66 y 78,00 % para EL, respectivamente y entre 31,16 y 34,78% para IER, respectivamente. En el parámetro de índice de producción de huevo (IPH) los valores obtenidos

para T1 y T2 fueron 39.66 y 44,68% y, a diferencia de los otros índices, se presentaron diferencias significativas entre todos los tratamientos, incluidos los controles positivos y negativos. T3 se destaca como el tratamiento de mayor actividad sobre el ciclo reproductivo de la garrapata del ganado, al presentar los menores valores en las variables evaluadas (17,42 % IPH, 37,80 % EL y 6.61 % IER).

Tabla 6.

Efecto del índice de producción de huevo, eclosión larval e índice de la eficiencia de la reproducción en los tratamientos de M. Minutiflora

Tratamiento	IPH (%)	Eclosión larval (%)	Índice de la eficiencia en la reproducción (%)
Control positivo	0,000 ^e	0,000 ^c	0,000 ^d
Control negativo	70.19 ^a	88,67 ^a	67.86 ^a
T1	39.66 ^c	78.66 ^a	31.16 ^b
T2	44.68 ^b	78.00 ^a	34.78 ^b
T3	17.42 ^d	37.80 ^b	6.61 ^c
CV	9.50	16.28	11,34

Nota: Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$); donde: T1=60 días de corte, T2= 90 días de corte y T3= 120 días de corte. CV: Coeficiente de variación.

El estudio de variables como la eficiencia reproductiva (IER) permite analizar la capacidad que tienen las garrapatas de procrear una nueva generación de larvas con capacidad de infestar un potencial hospedero; es decir que a medida que este parámetro disminuye, la continuidad del ciclo

se ve afectada, habiendo menos probabilidad de éxito reproductivo y por ende, de cepas potencialmente perjudiciales capaces de crear una infestación masiva. Aunque se observa que el control positivo tiene un efecto significativamente mayor sobre todos los índices en comparación con el extracto de *M. minutiflora* más activo (T3), los valores encontrados para este tratamiento indican que posee potencial para controlar el ciclo de vida de la garrapata. Además, al ser el control positivo un acaricida sintético que puede generar afectaciones en la salud de los animales y de las personas, si no se emplea siguiendo las indicaciones del fabricante (Araque et al., 2014) y traer consecuencias nocivas en las fuentes hídricas y las poblaciones existentes el suelo (Muñoz et al., 2017), el extracto de *M. minutiflora* con corte a 120 días se constituye como una alternativa promisorio para estudios futuros, que no representa un peligro para la salud humana y animal.

Al comparar con los estudios reportados, para la variable de índice de producción de huevo (IPH), se han registrado valores distintos a los encontrados en este estudio, como es el caso del realizado por Zaman et al., (2012) cuyos resultados estuvieron cercanos al 37,14% para extractos acuosos combinados de *Azadirachta indica*, hojas de *Nicotiana tabacum*, flores de *Calotropis procera* y semillas de *Trachyspermum ammi* a concentraciones de 40000 mg/L; este resultado fue ligeramente menor frente a T1 y T2, pero mayor que T3, permitiendo suponer que el pasto *M. minutiflora* con cortes a los 120 días representa una alternativa similar o mejor a otras especies como *A. indica* o *N. tabacum* que han sido ampliamente estudiadas escaladas a nivel comercial para la elaboración de plaguicidas.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio para la eclosión larval (EL) de los ensayos realizados con los extractos a menores edades al corte se ubican en un rango de más baja actividad que los hallados por Alvarez et al., (2017), quienes probaron extractos hidroalcohólicos de plantas como *Morus alba*, *Piper nigrum* y la mezcla de las fracciones polares de *Allium sativum*

y *Z. aromaticum* y obtuvieron valores de EL de 74%, 57 % y 66 % respectivamente, mientras que en la investigación adelantada (Nasreen et al., (2020) con extractos acuosos de *Allium sativum* y *Cannabis sativa*; los valores para EL fueron de 33,5 37,1%, mucho menores que T1 y T2, pero muy similares a los encontrados en el T3, de edad de corte a 120 días.

El índice de eficiencia de la reproducción (IER), exhibió mejores resultados en el presente estudio con *M. minutiflora* a las distintas edades de corte que el estudio de Bravo et al., (2020) llevado a cabo con ácido acético y ácido cítrico en garrapatas *R. Microplus* encontrándose una eficiencia de la reproducción cercanos al 50% en la mayor concentración evaluada 40000 mg/l (40000 ppm).

6.4 Caracterización química mediante Cromatografía de gases acoplada a

Espectrometría de masas (GC-MS)

Se encontraron cerca de 44 compuestos entre los extractos de *M. Minutiflora* a los 60, 90 y 120 días de corte (Tabla 7); estos compuestos se catalogan en su mayoría como compuestos de naturaleza liposoluble (fitoesteroles, triterpenos pentacíclicos y vitaminas liposolubles) y explican la apariencia física grasosa de los extractos obtenidos y la presencia de un material viscoso en las hojas de la gramínea. Entre los tres extractos analizados se destacan 9 componentes químicos comunes a los tres crudos: Vitamina E, β -Amirina, α -Amirina, Campesterol, Estigmasterol, γ -Tocoferol, γ -Sitosterol, Urs-12-en-3-ona y alcohol sinapílico, siendo los compuestos de naturaleza terpénica los más abundantes en la planta en todos tratamientos. Los extractos procedentes de la planta con menores y mayores días al corte presentaron el perfil con más compuestos detectados (17), seguidos por el extracto de edad de corte intermedia, en el que se lograron detectar 10 compuestos.

Los perfiles de los extractos de los tratamientos con cortes a 60 y 120 días (T1 y T3) se diferencian por la presencia de distintos tipos de metabolitos secundarios entre sus componentes minoritarios; T1 presenta fenilpropanoides, sesquiterpenos oxigenados, monotrpenos y una metilpirazina, mientras que en T3 los compuestos diferenciadores se agrupan en los mismos tipos de metabolitos de los compuestos mayoritarios y comunes a los otros extractos (triterpenos pentacíclicos, vitaminas liposolubles y sus derivados y fitoesteroles). T2 tiene un perfil similar a los de los demás tratamientos.

Asimismo, se resalta que el extracto más activo (T3) presenta una mayor cantidad relativa de Vitamina E y derivados, así como más fitoesteroles y derivados.

Tabla 7

*Composición química de los extractos de *M. minutiflora* a distintas edades de corte.*

Compuesto	T1	T2	T3
Cantidad Relativa (%)			
Vitamina E	40,17	51,92	93,50
β -Amirina	16	86,66	78,73
Campesterol	12,3	100	43,09
Estigmasterol	9,9	62,51	73,26
α -Amirina	6,4	60,27	19,17

γ -Tocoferol	1,4	6,52	38,87
γ -Sitosterol	14,0	57,16	10,19
trans-Sinapil alcohol	6,55	8,52	1,3
2-etenil-6-metilpirazina	2,1	-	-
1-(3,6,6-trimetil-1,6,7,7a-tetrahidrociclopenta [c] piranilo)etanona	1,8	-	-
Acetato de 1,5,5-trimetil-6-[(E)-3-oxobutenil]-7- oxabiccilo[4.1.0] heptan-2-ilo	0,8	-	-
Coniferol	7,0	-	-
4-hidroxi-3,5,5-trimetil-4-[(E)-3- oxobutenil]ciclohex-2-enona	2,5	-	-
3 α , 4 β -dihidroxi-1,5,7 α H guaia-9 (10), 11 (13)- dien-6,12-olido	2,4	-	-
Alcohol sinapílico	1,0	-	-

Acetato de α -tocoferilo	2,7	-	4,5
Urs-12-en-3-ona		6,0	4,2
O-metil-(+)-Tocoferol		3,2	2,33
1-(2,4,6-trihidroxi-3-metilfenil)butanona	-	-	3,4
(3 β ,22E)-Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	-	-	5,0
Estigmasta-3,5-dien-7-ona	-	-	4,7

Nota: T1: 60 días de corte; T2: 90 días de corte y T3: 120 días de corte

Diversos autores sostienen que la producción de metabolitos secundarios por parte de las plantas, particularmente del tipo fenólico y terpénico, está relacionada con su capacidad para realizar el control de algunas plagas y enfermedades, atribuyéndoles características antimicrobianas, repelentes y acaricidas (Nava-pérez et al., 2012).

En los extractos de *M. minutiflora* se observa la presencia de varios fitoesteres, que varían en cantidad entre los tratamientos y toman mayor relevancia en el extracto de la gramínea cortada a 120 días. Las garrapatas necesitan altas cantidades de colesterol y sus ésteres para el desarrollo de los lípidos de la cutícula de las hembras en su estadio adulto y en la producción de huevos, sin

embargo, son incapaces de realizar su síntesis *de novo* (Cherry, 1976). Es por esto que las garrapatas ingurgitadas absorben el colesterol cuando se alimentan de la sangre de sus huéspedes y a partir de esta fuente lo transfieren a sus huevos y por ende, a su siguiente generación. Los fitoesteroles, al tener una similitud estructural con el colesterol pueden interferir en su absorción y transferencia por parte de las garrapatas (Moawad et al., 2017), generando modificaciones en su fisiología e interrupción en su ciclo reproductivo. Además, la presencia de fitoesteroles como estigmasterol en los extractos vegetales está directamente relacionada con la síntesis de otras hormonas que inhiben la segregación hepática e intestinal en plagas que afectan ciertos mamíferos y también pueden afectar el sistema nervioso simpático en ácaros (D. Duan et al., 2012). La presencia de distintos tipos de fitoesteroles en extractos de la familia Apiaceae, evidenciaron una significativa mortalidad en el estadio adulto de la cucaracha alemana (*Blattella germanica*), efecto posiblemente atribuido a un principio de acción neurotóxico (Yeom et al., 2012).

En el estudio de actividad larvicida del extracto etanólico de *Brunfelsia uniflora* realizado por Sugauara et al., (2019) sobre larvas de *R. microplus*, se identificaron 17 compuestos, de los cuales 3 de ellos coinciden con los encontrados en este estudio (Estigmasterol, β - sitosterol y Vitamina E), con variaciones en la cantidad relativa.

La presencia de triterpenos pentacíclicos en las plantas se ha correlacionado con su capacidad para el control de plagas debido a los efectos tóxicos que se ha encontrado para estos compuestos, de forma individual y en acción conjunta con otros componentes; en el estudio realizados por Moawad et al., (2017), se observó la acción acaricida contra *R. Annalatus*, de productos naturales como las β - Amirinas y otros compuestos fenólicos aislados de *M. forsskaolii*, demostrando una posible alteración nerviosa sobre dichos parásitos y corroborando los efectos reportados para triterpenos pentacíclicos, que también componen los extractos de *M. minutiflora*

analizados en este estudio. Asimismo, en los extractos en éter de petróleo de *Inula japonica*, que exhibieron actividad acaricida sobre *Tetranychus cinnabarinus*, se lograron identificar fitoesteroles como sitosterol, estigmasterol y además, triterpenos cíclicos como la amirina y el lupeol, este último con el menor efecto tóxico sobre las larvas de *T. cinnabarinus* (Duan et al., 2011). Otros autores como Villarreal et al., (2017) encontraron una marcada acción acaricida y disminución de los parámetros reproductivos sobre *R. microplus* en el aislamiento de componentes químicos de naturaleza terpénica en los aceites esenciales de *Cuminum cyminum*.

Al observar los resultados del estudio de actividad larvicida sobre garrapatas de la especie *Amblyomma cajennense* llevado a cabo por Iriarte et al., (2018) con extractos de *M. minutiflora*, se evidencian algunos compuestos similares a los encontrados en el presente estudio con variaciones en las cantidades relativas como la α -Amirina cuya cantidad en los tallos de *M. minutiflora* estuvo bajo; de igual manera, se encontraron algunos compuestos de naturaleza lipofílica en los extractos provenientes de la mezcla de tallo y hojas con más altas cantidades relativas. Al asociar los resultados de la actividad biológica con la composición de los extractos se concluyó que el efecto conjunto de los componentes químicos encontrados en *M. minutiflora* es el responsable del potencial acaricida de dicha planta sobre *A. cajennense*.

Ya que varios de los compuestos mayoritarios encontrados en este estudio fueron comunes entre los tratamientos evaluados y la mayoría son de naturaleza terpénica, se sugiere que la acción sinérgica entre estos compuestos y su lipofilicidad, generan la actividad observada sobre las garrapatas y su ciclo reproductivo; siguiendo este mismo planteamiento, el hecho de que el tratamiento a mayor edad de corte presente un perfil con mayor proporción y variedad de estos compuestos, en especial en relación a fitoesteroles, podrían ser lo que le confiere una mayor efecto ixodicida. Adicionalmente, en T3 la Vitamina E se encuentra como el componente con mayor

cantidad relativa y con según lo indicado por Nasreen et al., (2020) este es un compuesto reconocido como inhibidor de acetilcolinesterasa, que puede incrementar los niveles de acumulación de acetilcolina y ocasionar la muerte de las garrapatas por una conducción excesiva de impulsos nerviosos. Estos autores observaron altos efectos letales sobre *R. microplus* y su ciclo reproductivo en los ensayos realizados con *Allium sativum* y *Cannabis sativa*, donde los compuestos mayoritarios de los extractos fueron Vitamina E y Canabidiol, respectivamente; concluyendo que estos fueron los compuestos asociados con la alta actividad acaricida.

Finalmente, los metabolitos detectados en el extracto acetónico de *M. minutiflora* sobre garrapatas *R. microplus* con 90% de actividad repelente, encontrados por Castrejon et al., (2004), indican que esta gramínea produce extractos de naturaleza grasa o lipofílica, compuesta por derivados de ácidos grasos y precursores de triterpenos que se acumulan en los tallos y hojas de la planta y generan una acción tanto mecánica como molecular que evita que las larvas de *R. microplus* desarrollen adecuadamente su proceso de crecimiento. Estos resultados se asemejan con los de este estudio y permiten suponer que los componentes liposolubles de *M. minutiflora* influyen sobre la mortalidad y los índices reproductivos y además se acumulan en mayor proporción a mayor madurez de la planta.

7. Conclusiones

El *M. Minutiflora* es una gramínea de gran plasticidad ecológica que presenta rendimientos favorables para la producción de extractos, lo que la convierte en un material promisorio para el estudio y aprovechamiento de estos.

Los extractos del pasto *M. Minutiflora* de mayor edad se evidencian como una alternativa natural con alto potencial para el desarrollo de productos con actividad ixodocida frente a *R. microplus*, que pudieran tener tanto efectos letales sobre garrapatas en estadio adulto, como alteraciones en su etapa productiva.

Los estudios de caracterización de los extractos mostraron que la actividad acaricida está directamente relacionada con la presencia de compuestos de naturaleza terpenica como Vitamina E, fitoesteroles y triterpenos pentacíclicos; asimismo, una mayor acumulación de Vitamina E y fitoesteroles en los extractos de la gramínea con mayores días al corte, incrementan la actividad biológica.

8. Recomendaciones

Se deben realizar ensayos *in vivo*, en condiciones de campo, donde se evalúe el efecto acaricida de plantas con un promisorio potencial bioixodocida y de este modo obtener datos concretos de su efectividad en el ganado, ya sea por aplicación de manera tópica o por aspersión.

Llevar a cabo ensayos en los que se evidencie la actividad acaricida del pasto *M. Minutiflora* en todo el ciclo de la garrapata, usando tanto la metodología de inmersión de adultas como la prueba del paquete larval.

Realizar estudios con diferentes concentraciones de los extractos etanólicos, así como utilizar otros métodos de obtención del material vegetal a evaluar como es el caso de los aceites esenciales, con el fin de determinar las concentraciones letales y los mejores rendimientos.

Realiza la evaluación del efecto de la aplicación de los bioxicidas en diferentes áreas de producción, dados los coeficientes de variación encontrados en este estudio.

Bibliografía

- Acevedo, L. Y., Paternina, L. E., Pérez-pérez, J. C., & Londoño, A. F. (2019). GARRAPATAS DURAS (ACARI: IXODIDAE) DE COLOMBIA, UNA REVISIÓN A SU CONOCIMIENTO EN EL PAÍS. *ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA*, 25(1), 126–139.
- Adenubi, O. T., Fasina, F. O., McGaw, L. J., Eloff, J. N., & Naidoo, V. (2016). Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. *South African Journal of Botany*, 105, 178–193. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.010>
- Adenubi, Olubukola Tolulope, McGaw, L. J., Eloff, J. N., & Naidoo, V. (2018). In vitro bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. *Veterinary Parasitology*, 254(May 2017), 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.008>
- Agostini, T. da, Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D., & Gimenes, M. A. (2011). Secondary Metabolites. *Health Sciences Quality, University of Brasilia, Brasília, Brazil*, 8, 155–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00018-0>
- Álvarez, V., Loaiza, J., Bonilla, R., & Barrios, M. (2008). Control in vitro de garrapatas (Boophilus microplus; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. *Revista de Biología Tropical*, 56(1), 291–302. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i1.5525>
- Alvarez, V., Vélez, L., Hernández, G. L., & Guzmán, P. A. (2017). Effect of plant extracts of jatropha curcas and Annona muricata on engorged females of common cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus under laboratory conditions Efecto de los extractos vegetales de Jatropha curcas y Annona muricata sobre teleog. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 12(1), 21–32.
- Araque, A., Ujueta, S., Bonilla, R., Gomez, D., & Rivera, J. (2014). RESISTENCIA A

- ACARICIDAS EN *Rhipicephalus* GANADERAS DE COLOMBIA ACARICIDAL RESISTANCE OF *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* IN SOME COLOMBIAN CATTLE FARMS. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 17, 161–170.
- Avinash, B., Venu, R., Alpha Raj, M., Srinivasa Rao, K., Srilatha, C., & Prasad, T. N. V. K. V. (2017). In vitro evaluation of acaricidal activity of novel green silver nanoparticles against deltamethrin resistance *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Veterinary Parasitology*, 237, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.017>
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S., & Bollinger, W. H. (1985). Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*, 228(4704), 1154–1160. <https://doi.org/10.1126/science.3890182>
- Bowman, D. D. (2011). *PARASITOLOGIA PARA VETERINARIOS* (Elsevier E).
- Bravo, M., Henríquez, H., Mora, E., & Pinto, A. (2020). Efecto in vitro del ácido acético y ácido cítrico sobre adultos y larvas de la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Del Colegio de Médicos Veterinarios Del Estado Lara, January 2016*, 0–86. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8118334>
- Cárdenas, D., Baptiste, M. P., & Castaño, N. (2017). Plantas exóticas con alto potencial de invasión en Colombia. In *Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt*. <http://repository.humboldt.org.co/bitstream/handle/20.500.11761/32935/557.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castrejon, F. J. M., Cruz-Vazquez, C., Fernandez-Ruvalcaba, M., & Torres, J. M. (2004). Repellent effect of *Melinis minutiflora* extract on *Boophilus microplus* tick larvae. *Veterinaria Mexico*, 35(2), 153–159.
- Castro-Janer, E., Martins, J. R., Mendes, M. C., Namindome, A., Klafke, G. M., & Schumaker, T.

- T. S. (2010). Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) using in vitro larval bioassays. *Veterinary Parasitology*, 173(3–4), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.036>
- Castro, K. N. de C., Chagas, A. C. de S., Costa-Júnior, L. M., Canuto, K. M., Brito, E. S. de, Rodrigues, T. H. S., & de Andrade, I. M. (2019). Acaricidal potential of volatile oils from *Croton* species on *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(6), 811–815. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.09.001>
- Centre for Agricultural Bioscience International, C. (2019). *Melinis minutiflora* (molasses grass). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/32983#totaxonomicTree>
- Chen, A. C., He, H., & Davey, R. B. (2007). Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Veterinary Parasitology*, 148(3–4), 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.026>
- Cherry, L. M. (1976). Utilization of cholesterol by the cattle tick *Boophilus microplus*: Cholesterol economy in the engorged female adult. *Insect Biochemistry*, 6(6), 587–594. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(76\)90005-6](https://doi.org/10.1016/0020-1790(76)90005-6)
- CONABIO. (2015). *Método de Evaluación Rápida de Invasividad (MERI) para especies exóticas en México Melinis minutiflora P. Beauv., 1812.* 8. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/221051/Melinis_minutiflora.pdf
- Cortéz, J. A. (2010). Cambios en la distribución y abundancia de las garrapatas y su relación con el calentamiento global. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 57(1), 65–75.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Secondary metabolites - Chap 24 (Buchanan, Biochem & Mol Biol of Plants 2000). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 1250–

1318.

Cruz, M. R., Martínez, I. M., José, L. C., Monica, V.-M., Hector, G.-H., & Diego E, Platas-Rosado, . (2012). Degradación del estiércol vacuno por escarabajos estercoleros en un pastizal tropical de veracruz, México. *Revista Colombiana de Entomologia*, 38(1), 148–155.

da Silva, E. R., Monteiro, C. M. de O., Reis-Menini, C., Prata, M. C. de A., Dolinski, C., & Furlong, J. (2012). Action of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) strain LPP1 on the reproductive biology of engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Biological Control*, 62(3), 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.05.007>

Dautel, H. (2004). Test systems for tick repellents. *International Journal of Medical Microbiology, Supplement*, 293(37), 182–188. [https://doi.org/10.1016/S1433-1128\(04\)80037-8](https://doi.org/10.1016/S1433-1128(04)80037-8)

decreto N° 1843 de 1991. Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII y XI de la Ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas. 22 de julio de 1991.

De la Fuente, J. ., & Kocan, K. M. (2007). *Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species*. September 2005, 275–283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00828.x>

Díaz Rivera, E. (2012). Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 72–81.

Drummond, R. O., Ernst, S. E., Trevino, J. L., Gladney, W. J., & Graham, O. H. (1973). *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 66(1), 130–133. <https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130>

Duan, D., Bu, C., Cheng, J., Ma, L., & Liu, Y. (2012). Effects of Stigmasterol to Activities of

- Several Enzymes of *Tetranychus cinnabarinus*. *Key Laboratory of Urban Agriculture (North) of Ministry of Agriculture, P.R. China Beijing University of Agriculture*, 721–729.
- Duan, D. D., Bu, C. Y., Cheng, J., Wang, Y. N., & Shi, G. L. (2011). Isolation and identification of acaricidal compounds in *Inula japonica* (Asteraceae). *Journal of Economic Entomology*, 104(2), 375–378. <https://doi.org/10.1603/EC10129>
- Eloff, J. N. (2006). *Modern Phytomedicine Turning Medicinal Plants into Drugs* (and M. O. Iqbal Ahmad, Farrukh Aqil (ed.); Department).
- FEDEGAN. (2020, September). *El enorme aporte de la ganadería a la economía de Colombia - Agricultura de las Americas*. <http://agriculturadelasamericas.com/pecuaria/productores-ganaderos-y-seguridad-alimentaria-mundial/>
- Fernandes, F. de F., & Freitas, E. de P. S. (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(1–2), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.035>
- Fernandez Ruvalcaba, M., Preciado-De-La Torre, F., Cruz-Vazquez, C., & Garcia-Vazquez, Z. (2004). Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. *Experimental and Applied Acarology*, 32(4), 293–299. <https://doi.org/10.1023/B:APPA.0000023233.63268.cc>
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., & De La Fuente, J. (2006). Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: Present and future possibilities for integrated control - A review. *Experimental and Applied Acarology*, 40(1), 49–66. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9022-5>
- Ghosh, Srikanta, Tiwari, S. S., Srivastava, S., Sharma, A. K., Kumar, S., Ray, D. D., & Rawat, A.

- K. S. (2013). Acaricidal properties of *Ricinus communis* leaf extracts against organophosphate and pyrethroids resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 192(1–3), 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.031>
- Goyal, M. R., Hafiz, J., & Suleria, R. (2019). Plant Secondary Metabolites for Human Health : Extraction of Bioactive Compounds. In *In Africa's potential for the ecological intensification of agriculture*. <https://doi.org/10.1201/9780429425325>
- Graf, J. F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G. A., Molento, M. B., Bordin, E. L., & Arantes, G. J. (2004). Tick control: An industry point of view [Cambridge University Press]. In *Parasitology* (Vol. 129, Issue SUPPL.). <https://doi.org/10.1017/S0031182004006079>
- Grisi, L., Leite, R. C., Martins, J. R. de S., de Barros, A. T. M., Andreotti, R., Cançado, P. H. D., de León, A. A. P., Pereira, J. B., & Villela, H. S. (2014). Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 23(2), 150–156. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
- Gupta, S. (2018). Acaricide resistance mechanisms and monitoring tools available for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. ~ 398 ~ *The Pharma Innovation Journal*, 7(7), 398–405. www.thepharmajournal.com
- Habeeb, S. M. (2010). *Ethno-veterinary and medical knowledge of crude plant extracts and its methods of application (Traditional and modern ... January 2010*.
- Halos, L., Baneth, G., Beugnet, F., Bowman, A. S., Chomel, B., Farkas, R., Franc, M., Guillot, J., Inokuma, H., Kaufman, R., Jongejan, F., Joachim, A., Otranto, D., Pfister, K., Pollmeier, M., Sainz, A., & Wall, R. (2012). Defining the concept of “tick repellency” in veterinary medicine. *Parasitology*, 139(4), 419–423. <https://doi.org/10.1017/S0031182011002228>
- Iriarte, P., Loya, L., Gomez, A., Valdez, Y., Velásquez, B., & Martinez, S. (2018). CHEMICAL

COMPOSITION OF *Melinis minutiflora* EXTRACT AND ITS REPELLENT AND IXODICIDE EFFECT ON *Amblyomma cajennense* LARVAE. *Revista Científica, Universidad De Zulia, Venezuela.*, XXVIII(2), 11.

Isman, M. B. (2020). Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry Reviews*, 19(2), 235–241. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>

Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. In *Trends in Parasitology* (Vol. 35, Issue 5, pp. 356–368). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>

Jaramillo, D., Gonzalez, A., Pedraza, N., Garcia, G., & Jara, J. (2020). Evaluación del efecto acaricida de *Momordica charantia*, *Megaskepasma erythrochlamys* y *Gliricidia sepium* sobre *Rhipicephalus microplus*. *Revista MVZ Córdoba*, 25(1).

Kaur, D., Jaiswal, K., & Mishra, S. (2016). *EUROPEAN JOURNAL OF METHODS OF TICK CONTROL : CONVENTIONAL AND NOVEL APPROACHES*. 3(10), 110–115.

Ley 1764 de 2016. Por medio de la cual la nación se asocia a la exaltación de la obra artística, musical y literaria del Maestro Rafael Escalona y se honra su memoria por sus aportes a la música colombiana, y se dictan otras disposiciones 23 de julio de 2015. Diario Oficial No. 49.582.

López A., G., Nuñez D., J., Aguirre T., L., & Flores M., E. (2018). Dinámica de la producción primaria y valor nutritivo de tres gramíneas tropicales (*Melinis minutiflora*, *Setaria sphacelata* y *Brachiaria mutica*) en tres estados fenológicos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(2), 396–409. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14494>

Malik, S. (2019). Essential Oil Research. In *Exploratory Animal and Medical Research* (Springer

N). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16546-8>

- Marchesini, P., Barbosa, A. F., Gomes, M. N., Nascimento, R. M. do, Vale, F. L., Fabri, R. L., Maturano, R., Carvalho, M. G. de, & Monteiro, C. (2020). Acaricidal activity of *Acmella oleracea* (Asteraceae) extract against *Rhipicephalus microplus*: What is the influence of spilanthal? *Veterinary Parasitology*, 283(June), 109170. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109170>
- Martínez, F. (2019). *Pasto Gordura (Melinis minutiflora) - Informacion Completa*. <https://infopastosyforrajes.com/pasto-de-pastoreo/pasto-gordura/>
- Martins, C. R., Hay, J. du V., & Carmona, R. (2009). Invasion potential of two cultivars of *Melinis minutiflora* in the brazilian cerrado - Seed characteristics and seedling establishment. *Revista Arvore*, 33(4), 713–722. <https://doi.org/10.1590/s0100-67622009000400014>
- Mctier, T. L., Chubb, N., Curtis, M. P., Hedges, L., Inskeep, G. A., Knauer, C. S., Menon, S., Mills, B., Pullins, A., Zinser, E., Woods, D. J., & Meeus, P. (2016). Discovery of sarolaner : A novel , orally administered , broad-spectrum , isoxazoline ectoparasiticide for dogs. *Veterinary Parasitology*, 222, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.019>
- Moawad, A., Mohammed, R., Araafa, & Waleed. (2017). Biologically-guided Isolation of Acaricidal Phytosterols : An in vitro Study Biologically-guided Isolation of Acaricidal Phytosterols : An in vitro Study against *Rhipicephalus (B .) annulatus* Ticks Infesting Cattle in Egypt. *European Journal of Medicinal Plants*, January. <https://doi.org/10.9734/EJMP/2017/32702>
- Molano, C. E., & Rodriguez, N. J. (2015). Eficacia de extractos vegetales sobre la garrapata adulta *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y su oviposición. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(4), 375–388. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-

47962015000400002

- Monteiro, I. N., Monteiro, O. dos S., Costa-Junior, L. M., da Silva Lima, A., Andrade, E. H. de A., Maia, J. G. S., & Mouchrek Filho, V. E. (2017). Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 238, 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.016>
- Mullen, G. R., & Lance A, D. (2018). Medical and Veterinary Entomology. In Elsevier (Ed.), *The Journal of Parasitology* (Vol. 3, Issue 2). <https://doi.org/10.2307/3271006>
- Muñoz, M., Lucero, B., Iglesias, V., & Lucero, N. (2017). ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES AND CANCER IN LATIN AMERICA: EVIDENCE FOR A BIOETHICAL DISCUSSION. *UCMaule-Revista Académica*, 53, 19. <http://doi.org/10.29035/ucmaule.53.93>
- Murphy, M. O., & Spray, T. L. (2016). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species name. *Surgery of Conotruncal Anomalies*, 1998, 535–551. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23057-3_31
- Muyobela, J., Nkunya, P. O. Y., & Mwase, E. T. (2016). In vitro acaricidal activity of *Bobgunnia madagascariensis* Desv. against *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae). *Tropical Animal Health and Production*, 48(3), 625–631. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1009-6>
- Mwangi, E. N., Essuman, S., Kaaya, G. P., Nyandat, E., & Munyinyi, D. (1995). REPELLENCE OF THE TICK RHIPICEPHALUS APPENDICULATUS BY THE GRASS MELINIS MINUTIFLORA. *The International Centre of Insect Physiology and Ecology (ICIPE)*, 4(27), 211–216.
- Nasreen, N., Niaz, S., Khan, A., Zaman, M. A., Ayaz, S., Naeem, H., Khan, N., & Elgorban, A.

- M. (2020). The potential of *Allium sativum* and *Cannabis sativa* extracts for anti-tick activities against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, 82(2), 281–294. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00540-z>
- Nava-pérez, E., García-gutiérrez, C., Ricardo, J., Elva, C., Vázquez-montoya, L., & Ximhai, R. (2012). BIOPLAGUICIDAS: UNA OPCIÓN PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*, 8, 17–29.
- Nava, S., & Atilio, M. (2019). Guía para la identificación de las principales especies de garrapatas que parasitan a los bovinos en la provincia de Entre Ríos, Argentina. In *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Santa Fe, Argentina*.
- Peters, M., Franco, L. H., Schmidt, A., & Hincapie, B. (2011). Especies Forrajeras Multipropósito: Opciones para Productores del Trópico Americano. *CIAT, 132 LNEE(VOL. 1)*, 25–30. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25899-2_4
- Pfister, K., & Armstrong, R. (2016). Systemically and cutaneously distributed ectoparasitocides: A review of the efficacy against ticks and fleas on dogs. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1719-7>
- Polanco, D. N., & Rios, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81–95.
- Prates, H. T., Leite, R. C., Craveiro, A. A., & 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*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9(2), 193–197. <https://doi.org/10.1590/S0103-50531998000200013>
- Ribeiro, V. L. S., dos Santos, J. C., Martins, J. R., Schripsema, J., Siqueira, I. R., von Poser, G. L.,

- & Apel, M. A. (2011). Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea serrata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 179(1–3), 195–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.006>
- Robayo Faillace, M. (2018). Distribución actual y modelamiento de la distribución potencial del pasto Yaraguá (*Melinis minutiflora* P. Beauv.) en la cuenca del río Moniquirá (Boyacá, Colombia) [Universidad Pontificia Javeriana]. In *Ponificia Universidad Javeriana* (Vol. 10, Issue 1). <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.05.023%0Ahttps://doi.org/10.1016/j.gie.2018.04.013%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29451164%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5838726%250Ahttp://dx.doi.org/10.1016/j.gie.2013.07.022>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Arevalo, F., Fragoso-Sanchez, H., Santamaria, V. M., & Rosario-Cruz, R. (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136(3–4), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.069>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Rivas, A. L., Chowell, G., Fragoso, S. H., Rosario, C. R., García, Z., Smith, S. D., Williams, J. J., & Schwager, S. J. (2007). Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Veterinary Parasitology*, 146(1–2), 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.01.016>
- Rodríguez, A., Rodríguez, M. C., & Cruz, C. A. (2010). Efecto ixodicida de los extractos etanólicos de algunas plantas sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista*

- MVZ Cordoba, 15(3), 2175–2184. <https://doi.org/10.21897/rmvz.304>
- Salman, M., Abbas, R. Z., Israr, M., Abbas, A., Mehmood, K., Khan, M. K., Sindhu, Z. ud D., Hussain, R., Saleemi, M. K., & Shah, S. (2020). Repellent and acaricidal activity of essential oils and their components against Rhipicephalus ticks in cattle. *Veterinary Parasitology*, 283(June), 109178. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109178>
- Sepúlveda-Jiménez, G. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Rev Mex Fitopatol*, 21(3), 355–363. <http://redalyc.uaemex.mx>
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., & Suarez, D. (2018). Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. In *Uniagraria*. Fundación Universitaria Agraria de Colombia — UNIAGRARIA—. https://www.researchgate.net/publication/329197168_PRODUCTOS_NATURALES_METABOLITOS_SECUNDARIOS_Y_ACEITES_ESENCIALES
- Singh, N. K., Miller, R. J., Klafke, G. M., Goolsby, J. A., Thomas, D. B., & Leon, A. A. P. de. (2018). In-vitro efficacy of a botanical acaricide and its active ingredients against larvae of susceptible and acaricide-resistant strains of Rhipicephalus (Boophilus) microplus Canestrini (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(2), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.005>
- Štefanidesová, K., Škultéty, L., Sparagano, O. A. E., & Špitalská, E. (2017). The repellent efficacy of eleven essential oils against adult Dermacentor reticulatus ticks. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(5), 780–786. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.06.003>
- Sugauara, E. Y. Y., Sugauara, E. Y., Sugauara, R. R., Bortolucci, W. de C., de Oliveira, H. L. M., Silva, E. S., Campos, C. F. de A. A., Gonçalves, J. E., Colauto, N. B., Gazim, Z. C., & Linde, G. A. (2019). Control of bovine tick [Rhipicephalus (Boophilus) microplus] with Brunfelsia

- uniflora leaf extract. *Australian Journal of Crop Science*, 13(6), 903–910.
<https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.06.p1653>
- Tamiru, F., Terfa, W., Kebede, E., Dabessa, G., & Roy, R. K. (2013). Ethnoknowledge of plants used in veterinary practices in Dabo Hana District, West Ethiopia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(40), 2960–2971. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5225>
- Thacheril, S., Shiburaj, S., & Sabu, S. (2020). *Metabolites : Methods , Applications and Prospects* (Springer Nature Singapore (ed.)). <https://doi.org/10.100-978-981-15-5136-9>
- The Center For Food Security And Public Health, & Institute International Cooperation in Animal Biologics. (2007). Rhipicephalus (Boophilus) microplus Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino. *Febrero 2007*, 1–3.
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus_microplus-es.pdf
<http://www.cfsph.iastate.edu/?lang=es>
- Tirosh-Levy, S., Gottlieb, Y., Apanaskevich, D. A., Mumcuoglu, K. Y., & Steinman, A. (2018). Species distribution and seasonal dynamics of equine tick infestation in two Mediterranean climate niches in Israel 07 Agricultural and Veterinary Sciences 0707 Veterinary Sciences. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3093-0>
- Torrents, J., Sarli, M., Rossner, M. V., Toffaletti, J. R., Morel, N., Martínez, N. C., Webster, A., Mangold, A. J., Guglielmone, A. A., & Nava, S. (2020). Resistance of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus to ivermectin in Argentina. *Research in Veterinary Science*, 132(April), 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.012>
- Villarreal, J. P., dos Santos, P. R., & Machado, M. A. (2017). Evaluation of phytotherapy alternatives for controlling Rhipicephalus (Boophilus) microplus in vitro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*.

- Yeom, H., Kang, J. S., Kim, G., & Park, I. (2012). Insecticidal and Acetylcholine Esterase Inhibition Activity of Apiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents against Adults of German Cockroach (*Blattella germanica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Zaman, M. A., Iqbal, Z., Abbas, R. Z., Khan, M. N., Muhammad, G., Younus, M., & Ahmed, S. (2012). In vitro and in vivo acaricidal activity of a herbal extract. *Veterinary Parasitology*, 186(3–4), 431–436. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.018>

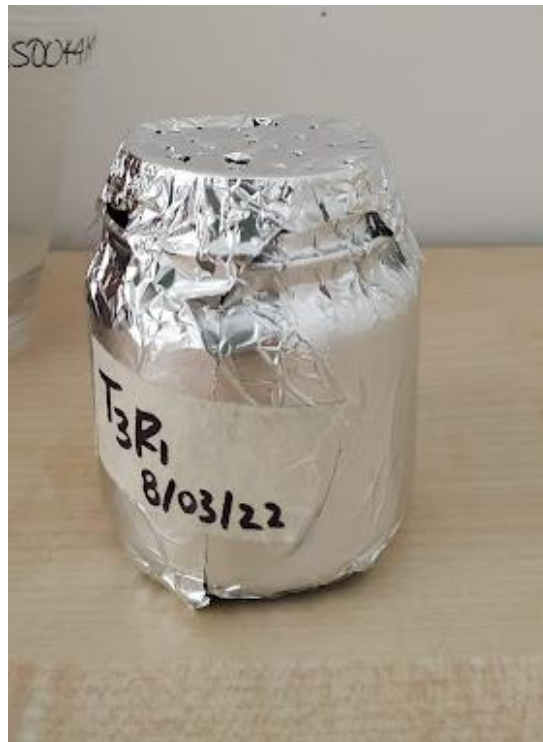
Apéndices



Apéndice a. Almacenamiento de las muestras



Apéndice b. Extractos de *M. Minutiflora* en distintas edades de corte (nótese un color más oscuro en los extractos 4 y 5, de edad de corte a 120 días)



Apéndice c. *Almacenamiento de los extractos crudos y secos*



Apéndice d. *Identificación de las garrapatas *R. microplus* por medio del estereoscopio*



Apéndice e. *Inmersión de las garrapatas en los extractos de M. Minutiflora*