



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y CLÍNICO DEL POTENCIAL IXODICIDA DEL
EXTRACTO DE LA *Eysendarthia polystachya*”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

P R E S E N T A:

Claudia Ledesma Carrasco

TUTOR:

**MVZ M EN C DR C LILIA GUTIÉRREZ OLVERA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
COMITÉ TUTOR:**

**MVZ M EN C PHD YAZMIN ALCALÁ CANTO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
QFB M EN C DR C JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ
FACULTAD DE QUÍMICA**

MÉXICO DF, MAYO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

A la Dra Lilia Gutiérrez Olvera por todo el apoyo y atención que me ha brindado para poder realizar exitosamente este proyecto de investigación como mi tutor principal.

A los departamentos de Parasitología y Farmacología Veterinaria por permitirme trabajar en sus instalaciones a lo largo del desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Dra Yazmín Alcalá por toda su ayuda brindada durante esta investigación.

Al Dr José Fausto Rivero por sus enseñanzas en el área de fitoquímica.

A Itzcoatl Aquino por siempre apoyarme.

Dedicatoria:

A mis padres, hermanos y amigos, por su gran apoyo y cariño que me ha brindado a lo largo de toda mi vida.

A todos mis gatitos que me han inspirado a estudiar Medicina Veterinaria.

A mí por todo el esfuerzo que he puesto durante mis estudios.

Índice:

Resumen.....	5
Introducción.....	6
Justificación.....	29
Objetivo general.....	30
Objetivos específicos.....	30
Hipótesis.....	31
Material y métodos.....	31
Resultados.....	40
Discusión.....	58
Conclusiones.....	65
Referencias.....	66

Resumen:

LEDESMA CARRASCO CLAUDIA. "ESTUDIO FITOQUÍMICO Y CLÍNICO DEL POTENCIAL IXODICIDA DEL EXTRACTO DE LA *Eysendarthia polystachya*". (bajo la dirección de: MVZ M en C Dr C Lilia Gutiérrez Olvera, MVZ M en C PhD Yazmín Alcalá Canto y QFB M en C Dr C José Fausto Rivero Cruz).

Las garrapatas del género *Rhipicephalus microplus* son consideradas como uno de los grandes problemas zoonosarios a nivel mundial. El uso inadecuado de los ixodicidas ha ocasionado la generación de cepas de garrapatas resistentes. En la búsqueda de nuevos agentes ixodicidas, los extractos vegetales brindan una buena opción; en el presente trabajo de investigación se propuso evaluar la actividad ixodicida del arbusto *E. polystachya*. Se evaluaron diferentes tipos de extractos de *E. polistachya* (hexánico, etílico, metílico y acuoso) de diferentes partes del arbusto (hojas y tronco) *in vitro* sobre larvas y adultas de *R. microplus* obteniéndose como resultado: un 100% de mortalidad con el extracto acuoso del tronco en las pruebas de paquete larvario e inmersión de larvas. Se observó en la prueba de inmersión de adultas: 99.8% de mortalidad, 52.4% de eclosión, 60.41% de inhibición de la ovoposición en adultas susceptibles y 4.8% de mortalidad, 55.3% de eclosión, 64.58% de inhibición de la ovoposición en adultas de una cepa de campo (resistente al amitraz). También, se estudió el efecto de la infusión sobre adultas susceptibles en la prueba de establo obteniéndose: 57.5% de eficacia el primer día postratamiento, 38.63% de inhibición de la ovoposición, 59.99% de eclosión. Finalmente, los resultados en la prueba de campo para la evaluación del extracto por aspersión vs garrapata *Rhipicephalus sp* fueron: 35.4% de eficacia el primer día postratamiento, 7.70% de inhibición de la ovoposición, 63.41% de eclosión. Por lo que se puede concluir que el extracto de *Eysenhardtia polystachya* obtenido por la técnica de infusión del tronco fue el extracto con mayor efecto ixodicida sobre *R. microplus*, mientras que los demás extractos no mostraron un efecto ixodicida relevante.

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y CLÍNICO DEL POTENCIAL IXODICIDA DEL EXTRACTO DE LA *Eysendarthia polystachya*

Introducción:

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados de un gran número de vertebrados incluidos los reptiles, las aves y los mamíferos. Son capaces de transmitir microorganismos ya que juegan un papel importante como reservorios y vectores de importantes patógenos que incluyen géneros de protozoarios (*Babesia spp* y *Theileria spp*), rickettsias (*Ehrlichia spp* y *Anaplasma spp*), virus (Nairovirus, Flavivirus y Asfavirus) y nematodos (*Acanthocheilonema*).¹

Las garrapatas transmiten dichos agentes patógenos utilizando distintas rutas que incluyen las secreciones salivales, los fluidos coxales, la regurgitación y a través de las heces.² Las garrapatas son consideradas como el segundo grupo de vectores de enfermedades que afectan a los humanos, solo después de los mosquitos y el más importante grupo vector de enfermedades que afectan a los animales salvajes y domésticos.¹

Las garrapatas se han adaptado a la mayoría de los hábitats del planeta. Pueden vivir desde el nivel del mar hasta los 2600 metros sobre éste y con fluctuaciones de lluvia de 400 a 2800 mm³ anuales.³ La distribución geográfica de muchas especies de garrapatas está condicionada a factores ambientales como la temperatura, humedad, tipo de vegetación y disponibilidad de hospederos.⁴ La adaptación evolutiva de las garrapatas a la hematofagia (alimentarse de sangre) es la principal razón por la que originan grandes pérdidas económicas; sin embargo, su mayor impacto sobre los animales y el hombre es a través de los patógenos que transmiten.¹

Existen 899 nombres válidos que integran la lista de los géneros y especies de garrapatas identificadas en el mundo y que han sido clasificadas por sus características morfológicas en tres familias:

- La familia Ixodidae o garrapatas duras.

- La familia Argasidae o garrapatas blandas.
- La familia Nuttalliellidae, representada por la única especie *Nuttalliella namaqua* que posee características intermedias de las primeras dos familias.^{5,6}

En la familia Ixodidae se incluyen 717 especies, en la familia Argasidae existen 189 especies y por último en la familia Nuttalliellidae 1 especie.^{6,8}

Rhipicephalus microplus (*R. microplus*) anteriormente conocida como *Boophilus microplus* es considerada la garrapata más importante del ganado bovino a nivel mundial. El impacto económico global en el sector pecuario debido al género *R. microplus* ha sido estimado en 8 billones de dólares anuales.⁸ En 1991 en México se estimó que las pérdidas producidas en la ganadería bovina por garrapatas y las enfermedades que transmiten son de aproximadamente 48 millones de dólares (USD) anuales.⁹ Treviño¹⁰ documentó que en infestaciones altas hay una disminución de 0,0045 g/día/garrapata, para infestaciones medias 0,0038 g/día/garrapatas y para infestaciones bajas 0,0022 g/día/garrapata. Tapia¹¹ señala que las pérdidas de peso vivo son del orden de 0,28 a 0,8 kg por garrapata al año. En particular, *R. microplus* ocasiona daño directo a la piel de los animales por acción de las picaduras, pérdida de sangre y disminución de parámetros productivos tanto por el estrés que representan las cargas parasitarias altas así como por la transmisión de enfermedades.¹²⁻¹⁶

Rhipicephalus microplus.⁸

Anatomía externa:

El cuerpo de una garrapata se divide en una región anterior llamada gnatosoma (capitulum) y una región posterior llamada idiosoma. En la familia *Ixodidae* existe una capa esclerotizada llamada escudo (scutum) que cubre la superficie dorsal. Sin embargo, en las larvas hembra y ninfas sólo cubre la región anterior.

El gnatosoma tiene una base hexagonal y presenta áreas porosas en el caso de las hembras y en los machos dichas áreas están ausentes. En el gnatosoma también existe una proyección llamada hipostoma sobre la que se encuentran dorsalmente un par de quelíceros, que utilizan para la perforación. El hipostoma posee 4 filas de dientes curvados y los palpos se presentan a los lados del hipostoma y se componen de 4 segmentos (véase figura 1).

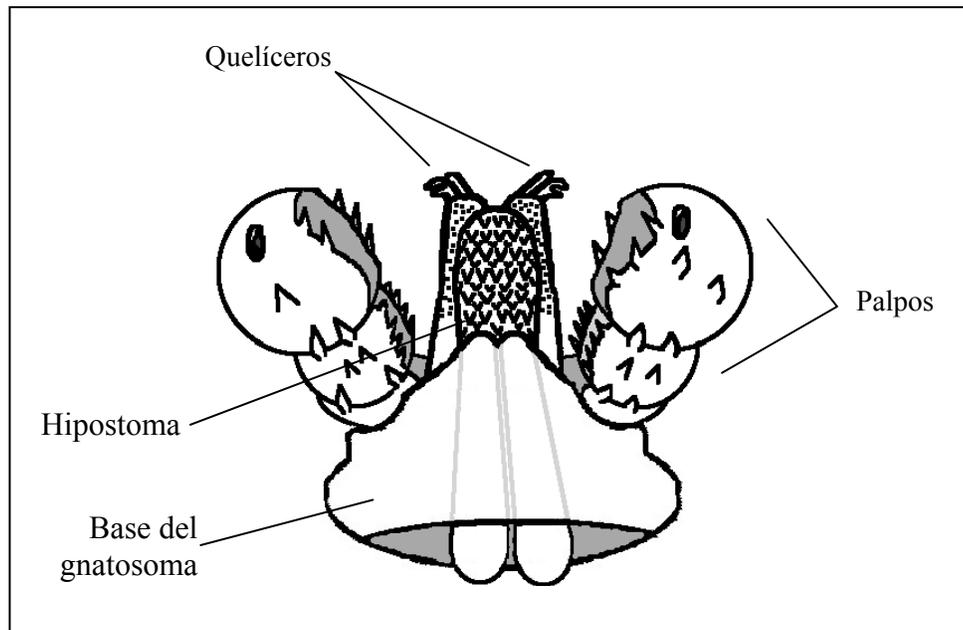


Figura 1: Anatomía del gnatosoma o capitulum de *Rhipicephalus microplus*.

En la superficie ventral de las garrapatas se sitúan importantes estructuras: las placas ventrales, el orificio genital, el ano y espiráculos. Los machos tienen placas adanales y accesorias. El surco anal está ausente o poco definido en las hembras y levemente visible en los machos. En *R. microplus* están ausentes los festones. En la figura 2 se detallan los rasgos más importantes de la anatomía de la garrapata *R. microplus*.

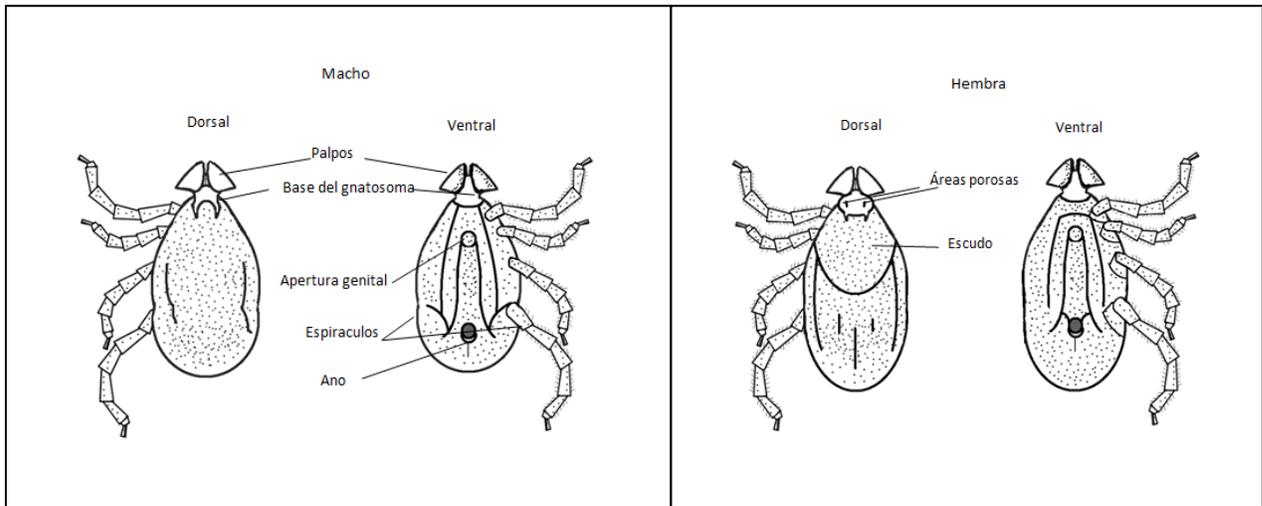


Figura 2: Anatomía externa del macho y hembra de *Rhipicephalus microplus*.

Ciclo biológico:

Tiene 4 estadios evolutivos: huevo, larva, ninfa y adultos macho y hembra. Las garrapatas *R. microplus* son de un hospedero y necesitan cursar 3 fases: no parasítica, de encuentro y parasítica.

Fase no parasítica: también llamada de vida libre y comprende desde que la garrapata repleta se desprende del hospedero hasta la aparición de larvas en la vegetación. Esta fase se divide en 5 etapas:

- Preoviposición: abarca desde el desprendimiento de la garrapata repleta hasta la postura del primer huevo.
- Oviposición: se considera así al tiempo que transcurre desde el inicio de la postura de los primeros huevos hasta los últimos.
- Postoviposición: período desde que la garrapata pone el último huevo hasta su muerte.

- Incubación: período comprendido desde que inicia la oviposición hasta que emergen las larvas.
- Eclosión: dentro de este período las larvas emergen de los huevos.

Fase de encuentro: se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación al hospedero.

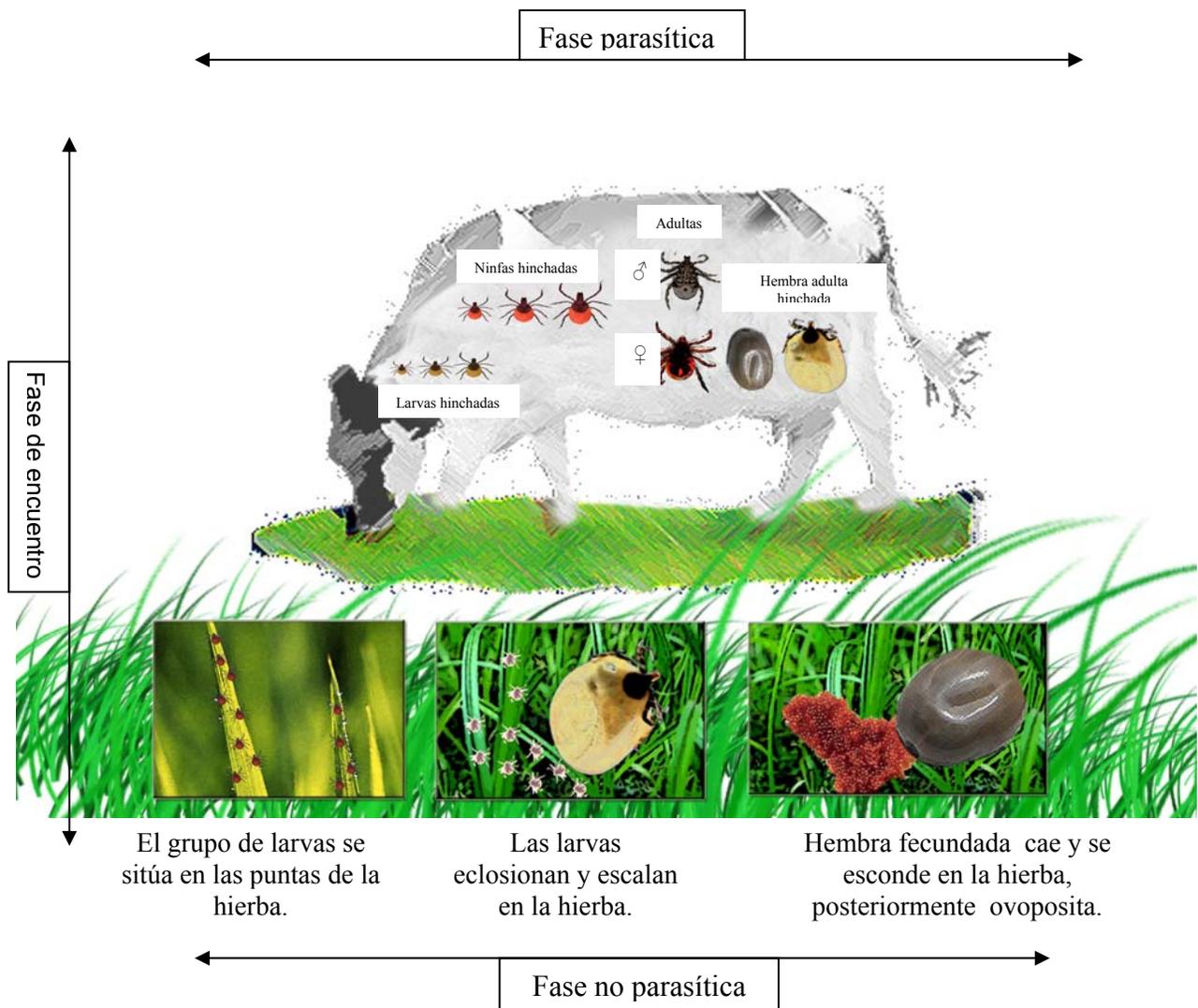


Figura 3: Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*.

Fase parasítica: período en el que se completa el ciclo biológico, siendo superada la implantación y donde se desarrollan algunos sucesos patológicos sobre el hospedero.⁹

El ciclo se caracteriza por el uso de un solo hospedero, sobre el cual ocurre la fase parasítica (larva, ninfa y adultos). Asimismo, se lleva a cabo la cópula de los adultos. Posteriormente, la hembra fecundada se desprende y cae al suelo, iniciando la fase no parasítica y de encuentro. En general, esta etapa del ciclo dura de 19 a 21 días en circunstancias óptimas.⁹ Estas fases se representan en la figura 3.

Situación actual de la garrapata R. microplus en México.

La fase libre de este parásito ocupa una porción importante del norte del país, así como áreas del centro; comprende 94.4 millones de hectáreas, las cuales equivalen al 47.88% del territorio nacional.

Las zonas en fase de erradicación cuentan con 1.1 millones de hectáreas que se ubican en las áreas en las cuales el parásito ha sido eliminado por efectos de la Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus sp*¹⁷ y representan un 0.57%. Las áreas en fase de control en este momento alcanzan una superficie total de 101.6 millones de hectáreas y representan el 51.5% del país. En la figura 4 se presenta un mapa que refleja la situación actual de la garrapata *R. microplus* en México.

Control de las garrapatas.

El control de las garrapatas consiste en romper su ciclo biológico y puede efectuarse biológica, cultural y químicamente. Sin embargo, se ha privilegiado al control químico (ixodicidas) sobre

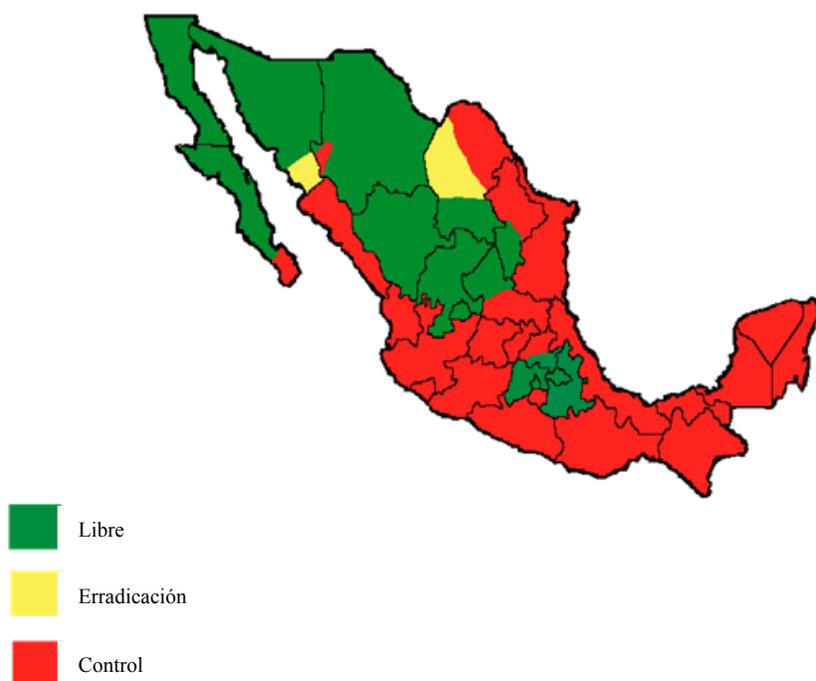


Figura 4: Situación actual de *Rhipicephalus microplus* en México*

cualquiera otro debido, entre otras cosas, a la facilidad para aplicarlo, al aumento en la densidad de población en las zonas ganaderas y a la excesiva publicidad alrededor de este método.¹⁸

Control biológico:

Algunas especies de hormigas, *Pheidole megacephala* tienen efecto depredador en la población de garrapatas. Además, el ácaro *Anystis baccarum* tiene algún efecto depredador sobre la población de garrapatas.^{19, 20} Los hongos entomopatógenos han demostrado poseer buena

*SENASICA, situación zoonosanitaria de la campaña contra la garrapata del género *Boophilus* spp (<http://www.senasica.gob.mx/?id=4393>).

eficacia para el control de las garrapatas *Rhipicephalus in vitro*. Existen experiencias positivas en diferentes países utilizando especímenes de hongos de los géneros *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillu Rhus*, *Fusarum* y *Metarhizium*.²⁰⁻²² En México existen algunas garzas y pájaros que se alimentan de garrapatas y tienen un papel importante en el control biológico. En los últimos años se ha demostrado que el control biológico podría ser una alternativa para el control de las garrapatas; sin embargo, es necesario realizar más estudios de validación a nivel de campo.²³

Control cultural:

Este tipo de control se lleva a cabo fuera del hospedero y está estrechamente relacionado con las prácticas culturales relacionadas con el mantenimiento de potreros que implican actividades que nos permiten manipular ó modificar el hábitat con la finalidad de afectar de manera adversa el desarrollo de la garrapata tales como: quema controlada, inundación, remoción de maleza, descanso y rotación de potreros. Estas actividades de forma aislada o en combinación tienen un efecto sobre el micro y el mesoclima lo que ocasiona desbalances en el microhábitat de la garrapata *R. microplus* y por ende un efecto negativo en su dinámica poblacional. Su mayor efecto es sobre la fase de vida libre y su valor radica en que es un método de control amigable con el ambiente, completamente ecológico y por lo tanto de gran ayuda para el ejercicio de una ganadería sustentable.²⁴

Control químico:

Se ha privilegiado al control químico sobre cualquier otro debido, entre otras cosas, a la facilidad para aplicarlo, al aumento en la densidad de población en las zonas ganaderas y a la excesiva publicidad alrededor de este método.¹⁸

Se le nombra ixodicida al fármaco garrapaticida que tiene efecto sobre los integrantes de la familia Ixodidae. Los ixodicidas químicos para el control de las garrapatas se aplican sobre el cuerpo del hospedero a diferentes intervalos determinados por la región ecológica, especie a la que se va a combatir y eficacia residual del ixodicida.²⁵ Existen diversas formas de aplicación como los baños de aspersión o inmersión, de aplicación por derrame dorsal o epicutáneo conocidos como “Pour on”, los cuales son ixodicidas concentrados que se aplican sobre el animal y actúan después de dispersarse sobre la superficie del bovino o después de absorberse a través de la piel o por ingestión del artrópodo.^{26,27} Las diferentes familias de productos que se han utilizado para el control de las garrapatas incluyen los arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas cíclicas, piretroides, ivermectinas, biorreguladores del crecimiento (IGR's) y fenilpirazolonas.²⁸

Organofosforados:

Son compuestos que poseen un átomo de fósforo en el centro de la molécula, son derivados del ácido fosfórico, cuyos grupos hidroxilos están sustituidos por elementos como flúor, azufre, cloro, grupos aminos y radicales orgánicos. Son lipofílicos, de rápida absorción por la piel y se acumulan en tejido graso, de donde se liberan lentamente al torrente sanguíneo y otros líquidos fisiológicos. Tienen una permanencia de 4 a 8 días. Los compuestos más usados de este grupo son: clorfenvinfos, clorpirifos, coumafos y diazinon.¹¹ Penetran rápidamente a través de la cutícula de la garrapata y se reconoce que el tipo de solvente utilizado es uno de los factores que pueden hacer variar la capacidad de penetración y la actividad del principio activo. Su modo de acción está basado en el bloqueo de la enzima acetilcolinesterasa mediante una fosforilación irreversible, la cual interviene en reacciones de impulsos nerviosos, impidiendo su transmisión normal. Aumenta el neurotransmisor acetilcolina que al ascender a niveles críticos origina una tetanización y finaliza con la muerte.²⁹

La toxicidad depende diversos factores, tales como: raza, edad, especie, estado nutricional y la administración simultánea de otros fármacos. Su manipulación conlleva cierto peligro para el manipulador, por lo que es indispensable utilizar medios de protección como mascarilla y guantes.³¹

Piretroides:

Debido a su alta efectividad, baja toxicidad en mamíferos y reducido impacto ambiental, se consideran los plaguicidas de elección en muchas partes del mundo, con mayores probabilidades de éxito a corto plazo sobre todo por su utilidad en el control de garrapatas que han desarrollado resistencia a otras familias de ixodícidas. Los piretroides tienen efecto residual de aproximadamente 15 días. Los fármacos más usados de este grupo son: cipermetrina, deltametrina y flumetrina.⁹

Las piretrinas naturales son extractos de las flores del crisantemo (*Chrysanthemum cineranaefolium*). Existen seis piretrinas naturales que son ésteres de tres alcoholes ciclopentanolones (piretrolona, cinerolona y jasmolona). Los análogos sintéticos “de primera generación” resultaron inestables a la luz. En la década de 1960 a 1970 se lograron piretroides fotoestables como la permetrina, cipermetrina y fenilvalerato, llamados “de segunda generación”. Posteriormente, se desarrollaron la deltametrina y flumetrina que son piretrinas logradas a partir de una sustitución en los componentes de la fórmula y teóricamente más potentes. La introducción del fenoxibencil (permetrina) o ciertos alcoholes halogenados (teflutrina) mejoraron la estabilidad química y permitieron el uso de los piretroides en el campo. Estos piretroides son más tóxicos a temperaturas menores, una propiedad única entre los acaricidas. Los piretroides tienen 2 tipos de efectos sobre los parásitos: un efecto inicial rápido de abatimiento o derribo conocido como “kd” (“*knockdown*”), pérdida de movimiento y un efecto letal subsecuente. Los piretroides son neurotoxinas, producen lesiones similares en las terminales de los nervios

motores de una variedad de insectos y pueden actuar tanto en los nervios periféricos como en el sistema nervioso central. Los piretroides que actúan preferentemente en los nervios periféricos se conocen como tipo I, mientras que aquellos con acción central (principalmente los piretroides con el grupo α -ciano) son conocidos como tipo II. A nivel molecular, los piretroides pueden interactuar con los canales de sodio.^{11,31} El mecanismo de acción de los piretroides consiste en cambiar la polaridad de la membrana nerviosa a nivel de la bomba de Na y K, con lo que activan a nivel de sistema nervioso central y periférico, generando primero una fase de intensa agitación, seguida de una inmediata parálisis general en el organismo blanco. Esto se manifiesta como choque o derribe, al que le sigue un efecto de mortalidad.⁹

Amidinas:

Debido a sus propiedades acaricidas se han usado varios compuestos clasificados como amidinas. El principal compuesto de esta serie era el clordimeformo, pero se ha limitado su uso por su oncogenicidad. Más recientemente se cuenta con el amitraz, el cual, además de tener una amplia acción residual, pasa por una conversión metabólica y se convierte en un metabolito activo llamado U-40481 o BTS-27271. El amitraz es ligeramente soluble al agua, pero soluble en solventes orgánicos. Este compuesto imita la acción del neurotransmisor octopamina, el cual regula el comportamiento de excitación dentro del SNC del parásito y también tiene acciones sobre los tejidos periféricos. La octopamina se liga a un receptor que eleva los niveles del segundo mensajero, el monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Entonces el AMPC inicia procesos que originan excitación de las neuronas.¹¹ Su modo de acción se basa en interferir con los procesos metabólicos de las garrapatas y se caracteriza por inhibición del sistema enzimático monoamino oxidasa (MAO). La inhibición de MAO provoca un estímulo tal que provoca la separación del aparato bucal del parásito y su desprendimiento del animal parasitado. Posteriormente, se presenta una rápida parálisis de la musculatura incapacidad para digerir

proteínas sanguíneas y bloqueo en el desarrollo de los ovarios. Todo esto acarrea la muerte de la garrapata.⁹

Macrólidos o Lactonas macrocíclicas:

Las avermectinas (avermectina, ivermectina, doramectina y eprinomectina) y las milbemicinas (moxidectina), son derivadas del actinomiceto *Streptomyces avermitilis* y de derivados de la fermentación de *S. higroscopicus aureolacrimosus*, respectivamente.^{29,30} Su acción ha sido determinada a nivel de ácido gama amino butírico (GABA), que es un neurotransmisor inhibitorio de los estímulos nerviosos en la placa neuromuscular. Esta inhibición provoca parálisis e incluso la muerte del parásito y puede afectar la producción de huevos.⁹

Inhibidores del desarrollo:

La sustancia más usada es el fluazurón. Interfieren específicamente con el sistema biosintético de la formación de quitina en garrapatas, que es requerida durante la alimentación, muda y embriogénesis.³² La limitante de este producto y otros similares es que no matan instantáneamente a las garrapatas, sino que reducen su capacidad reproductiva.⁹ Es persistente por aproximadamente doce semanas y sus residuos se almacenan en grasa.²⁹

Fenilpirazolonas:

Están relacionadas con las avermectinas por el modo de acción.⁹ Actúa a nivel de sistema nervioso central del parásito, interrumpiendo el paso de iones cloro a través del sistema receptor GABA (ácido gama amino butírico), cuando se bloquean los canales del sistema GABA,

el resultado es la excitación nerviosa y muerte del parásito.⁹ El fipronil es la sustancia más usada en presentación de “*pour on*”.⁹

Los ixodicidas químicos han jugado un papel importante en el control de las garrapatas. Sin embargo, entre sus desventajas se encuentran la contaminación del medio ambiente y alimentos y, como consecuencia del uso extensivo e indiscriminado de los acaricidas, *R. (Boophilus) microplus* ha desarrollado resistencia a la mayoría de los acaricidas en muchos países, lo que lo vuelve ineficaz este tipo de control, haciendo difícil el manejo de las poblaciones de garrapatas. En la mayoría de los casos, estos productos propiciaron alteraciones en las garrapatas que conducen a través del fenómeno de selección genética a una adaptación que les permite sobrevivir bajo las nuevas condiciones artificiales impuestas.^{9,33,34}

Resistencia hacia los ixodicidas.

Aunque es incuestionable el éxito de los ixodicidas para el control de la garrapata; se reconoce que su uso inadecuado ha ocasionado la generación de cepas de garrapatas resistentes. La resistencia se define como la capacidad adquirida por individuos de una población parásita que les permite sobrevivir a dosis de farmoquímicos que generalmente son letales para una población normal.^{9,35}

Mecanismo de resistencia.

Las garrapatas han desarrollado importantes mecanismos de defensa para contrarrestar el efecto tóxico de los productos químicos:

- Resistencia del comportamiento: es cuando el insecto modifica su conducta para evitar el contacto con el insecticida.³⁵
- Resistencia a la penetración: es una modificación del exoesqueleto del insecto para inhibir o retardar la penetración del químico y que en general tiene que ver con la concentración de lípidos que facilitan o retardan la penetración del pesticida a través de esta estructura. Este mecanismo solo ha sido reportado en *R. microplus*, en la cepa “Malchi” y en otras cepas resistentes al Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT) y piretroides sintéticos (PS).³⁶
- Resistencia metabólica: es la detoxificación del insecticida por procesos enzimáticos que radica en la modificación de las vías metabólicas del insecto. Las formas más importantes de resistencia metabólica involucran oxidasa multifuncionales, glutation-S-transferasa y esterasas; en el caso de los PS casi todas son esterasas.^{37,38} Posiblemente estos procesos también se generan en el cromosoma II. Este tipo de resistencia involucra a DDT y PS, lo cual puede evaluarse por medio de inhibidores o sinergias que pueden actuar para restituir alguno o la mayor eficacia del pesticida. Algunos investigadores mencionan que dentro de los mecanismos de resistencia metabólica, el más común incluye la detoxificación de PS por la sobreexpresión de enzimas citocromo P450 en el parasito.³⁹ Las enzimas P450 (mezcla funcional de oxidasa, citocromo P450 monooxigenasa) son una compleja familia de enzimas establecida en la mayoría de los organismos. Las enzimas P450 tienen un importante papel en la adaptación de insectos a compuestos tóxicos de su planta hospedadora y están involucradas en el metabolismo de todos los insecticidas comúnmente usados.⁴⁰
- Insensibilidad del sitio de acción: es la modificación del sitio de acción o diana del insecticida para disminuir la sensibilidad del químico. Cuando esta es la causa de resistencia, los niveles de resistencia regularmente son altos (1000x) comparados a la

detoxificación (50x). Con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre las causas de insensibilidad del sitio de acción como mecanismo de resistencia, se han utilizado técnicas de biología molecular. El principal sitio de acción para PS son los canales de sodio voltaje-dependientes en el sistema nervioso.^{39,41} El gene que codifica para el canal de sodio en insectos, se denomina “*para*” y fue identificado en *Drosophila* sp.⁴²

Distribución mundial de la resistencia a ixodicidas.

Oceanía:

Australia es posiblemente el país con mayor experiencia y documentación sobre el problema de resistencia a ixodicidas.^{43,44} En 1996 se documentó el desarrollo y la evolución de la resistencia a ixodicidas en Australia.⁴⁵ De acuerdo a los patrones de comportamiento en 1979 que de 64 explotaciones muestreadas en Sudáfrica, hubo cuatro tipos de resistencia: a arsénicales, organoclorados, dicloro difenil tricloroetano y a la mezcla de organofosforados y carbamatos (OF/Carbamatos), lo que constituyó el primer informe de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas en Africa. Después, Regassa y De Castro (1993), analizando la respuesta de garrapatas *B. decoloratus* a ixodicidas en el oeste de Etiopía (15% del territorio nacional), solamente informaron resistencia al toxafeno, un organoclorado en desuso.⁴⁵

América:

En 1999 en Costa Rica se describió la resistencia a PS en ranchos bovinos donde existía una prevalencia del 81%.⁴⁷ En Colombia, se reportaron cepas de garrapatas resistentes a cipermetrina.⁴⁸ Posteriormente, se evidenció resistencia a flumetrina, deltametrina, alfacipermetrina y lamdacialotrina.combinada tipo “Ulam” y “Parkhurst”, la cual fue designada como “Ultimo”.^{46,49}

En Brasil, el primer diagnóstico de resistencia a ixodicidas se realizó en 1953, al detectar una cepa resistente a arsenicales después de 40 años de uso y a los OC dos años después. Al inicio de los 70 y en los 80 surgieron los primeros casos de resistencia a OF y PS, respectivamente (dos años después de haber sido detectado en Australia).^{50,51}

Actualmente en Brasil existe una cepa resistente a amidinas (cepa “Alegrete” o “Cavalcanti”).

Se reportó que de 209 muestras colectadas de 1997 a 1999 y analizadas con la prueba de inmersión de adultas en el estado de Minas Gerais, hubo cepas de garrapatas *R. microplus* resistentes a OF, PS, amidinas y a mezclas de OF/PS.⁵² En Cuba se mencionó la existencia de cepas resistentes a OF y amidinas.⁵³

Caracterización y distribución de la resistencia a ixodicidas en México.

La cepa Tuxpan, fue la primera evidencia de resistencia a ixodicidas en México. Se aisló en 1981 en el Municipio de Tuxpan, Veracruz y presentó un patrón de resistencia a organofosforados.⁵⁴ Posteriormente, se utilizó la cepa para determinar el tipo de respuesta y las dosis discriminantes (DD) de varios principios activos de las familias organofosforados y organoclorados, con la finalidad de desarrollar una técnica diagnóstica capaz de evaluar una gran cantidad de muestras. Se caracterizó así a la cepa Tempoal, denominada así por su procedencia (Tempoal, Veracruz) con resistencia mixta (organoclorados y organofosforados).¹² Las cepas Tuxpan y Tempoal están ampliamente distribuidas en las Huastecas del país.⁵⁵

La cepa San Alfonso, originaria de la región de los Ríos en Tabasco, presenta una conducta de respuesta multiresistente a organofosforados, piretroides sintéticos y amidinas.⁵⁶ La conducta toxicológica es similar a la cepa australiana “Ultimo” y brasileña “Cavalcanti”.⁴⁴

De acuerdo al análisis toxicológico, tanto la amidina como los piretroides sintéticos tuvieron un 26% de eficacia sobre la cepa “San Alfonso”. Posterior al hallazgo señalado, se han analizado

muestras de varios Estados en México encontrándose garrapatas resistentes a amidinas y multirresistentes a organofosforados, piretroides sintéticos y amidinas en el sureste y zonas costeras del Pacífico y Golfo de México.^{53,56}

Contaminación ambiental por ixodicidas:

Además del surgimiento de resistencias a los ixodicidas es relevante mencionar la contaminación ambiental ya que uno de los mayores riesgos en los suelos es que presentan una gran afinidad por estos elementos, por lo que se espera que su ciclo ambiental esté diseminado por fases de acumulación y persistencia, teniendo una baja dispersión y remoción. El mayor riesgo ambiental se asocia a los organoclorados pues los factores de deterior, especificidad de acción, fuerte toxicidad para mamíferos superiores y prolongada persistencia ambiental, manifiestan una máxima expresión, lo que favorece su acumulación y un máximo potencial de biocontaminación (suelo, subsuelo, mantos acuáticos, flora y fauna nativa). El riesgo sigue la siguiente secuencia organoclorados> organofosforados> carbamatos y piretroides sintéticos que son en extremo tóxicos para peces.⁵⁷⁻⁶⁰

Alternativas para el control de *R. microplus*.

Ante el panorama antes descrito, la comunidad científica ha emprendido una búsqueda intensa de nuevas fuentes de ixodicidas; por ejemplo, en Estados Unidos de Norte América existen diversos centros a investigar e implementar nuevas alternativas ixodicidas, estudiando esta problemática desde una multitud de líneas de investigación.^{61,62}

A la fecha se han explorado hongos entomopatógenos, toxinas bacterianas, vacunas, plantas y sus extractos alcohólicos y acuosos.⁶³⁻⁶⁹ Como era de esperarse es esta última fuente la que ofrece uno de los mayores recursos para el control de plagas tanto por su gran diversidad como

por la gran gama de compuestos que se han aislado de ellas.⁷⁰ No obstante, para el uso de los extractos vegetales se requiere de múltiples estudios que demuestren su aplicación práctica y eficacia biológica.⁵⁶

Se conocen ya algunos ingredientes provenientes de plantas y sus extractos por sus propiedades acaricidas.⁷¹ Se encuentran disponibles investigaciones en las que se muestran las evaluaciones de las propiedades de algunos extractos herbales contra diferentes estadios de vida de *R. microplus* con resultados muy alentadores.^{72,73} Por ejemplo: el extracto de *Hypericum polyanthemum* ha resultado ser altamente tóxico contra las larvas de *R. microplus* en ensayos *in vitro*, así como los extractos de *Calea serrata* que tuvieron efecto sobre la oviposición y eclosión de sus huevos, aunque aún no se determina su potencial como ixodicidas en campo.⁷⁴ En otro estudio en Brasil reporta que 6 análogos de *Hyacinthanine spp* (Hiacintáceas= Jacinto entre otras) tuvieron efecto en la mortalidad de larvas de *R. microplus*, así como inhibición en la oviposición.⁷⁵ En un estudio *in vitro* en Irán, realizaron un amplio estudio con aceites esenciales de plantas y los resultados obtenidos con geranio (*Pelargonium roseum*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*), muestran que ambos aceites pueden ser candidatos potenciales para el control biológico de *Rhipicephalus* en campo.⁷⁶

En la India se realizaron estudios con extractos de etil acetato de *Achyranthes aspera* (malpica), metanólico de *Gloriosa superba* (gloriosa) y metanólico de *Ricinus communis* (ricino), y obtuvieron alta mortalidad contra las larvas de *R. microplus*. Asimismo, se sugiere que estos extractos tienen potencial para ser usadas como una alternativa benévola con el ambiente. También en la India, se utilizaron extractos de hojas, corteza y semillas de *Azadirachta indica* ("Neem" o nim) para evaluar su efecto contra garrapatas *R. microplus* y determinaron que los extractos de las semillas de *A. indica* tuvieron una eficacia notable (80%) después de 5 horas del tratamiento. Además de este efecto, se observó una reducción en la oviposición.⁷⁷

En México también se han usado extractos de hojas de plantas como alternativa de control de la garrapata *R. microplus*, y se obtuvieron resultados variables que van del 9 al 96%, siendo *Petiveria alliacea* (Anamú) y *Havardia albicans* (Chukum), las plantas que produjeron mortalidad larvaria superior al 90% en concentraciones del 10 % y bajo condiciones *in vitro*.⁷¹ Es evidente que resta completar la caracterización de los principios activos de estos extractos herbales. El potencial que tienen estas investigaciones para la comercialización es evidente y resulta claro que también tienen un enorme potencial para formar parte de un manejo integral de plagas.⁷⁸

A manera de resumen se presentan en el cuadro 1 una relación de los recursos herbolarios usados para fines ixodicidas.

Cuadro 1

PLANTAS QUE HAN DEMOSTRADO SU EFECTO IXODICIDA.

Nombre científico	Nombre común
<i>Azadirachta indica</i>	Neem
<i>Petiveria alliacea</i>	Anamú
<i>Havardia albicans</i>	Chukum
<i>Hypericum polyanthemum</i>	<i>Hypericum</i>
<i>Calea serrate</i>	Celea
<i>Hyacinthanine spp</i>	Jacinto
<i>Pelargonium roseum</i>	Geranio
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto
<i>Gloriosa superba</i>	Bandera Española
<i>Achyranthes aspera</i>	Malpica

***Eysenhardtia polystachya*.**

La *Eysenhardtia polystachya* es un arbusto que crece entre 3 y 6 metros, aunque puede llegar a crecer hasta los 9 metros, con un diámetro a la altura del pecho de 15 cm o más.⁷⁹ Tiene hojas pequeñas aromáticas de olor agradable, delgadas, con flores blancas agregadas en espigas. Sus frutos son en forma de vaina con semillas de color café amarillento. Su corteza es delgada, fisurada, y de color café grisáceo. Florece de mayo a mediados de septiembre y fructifica de septiembre a enero.⁷⁹

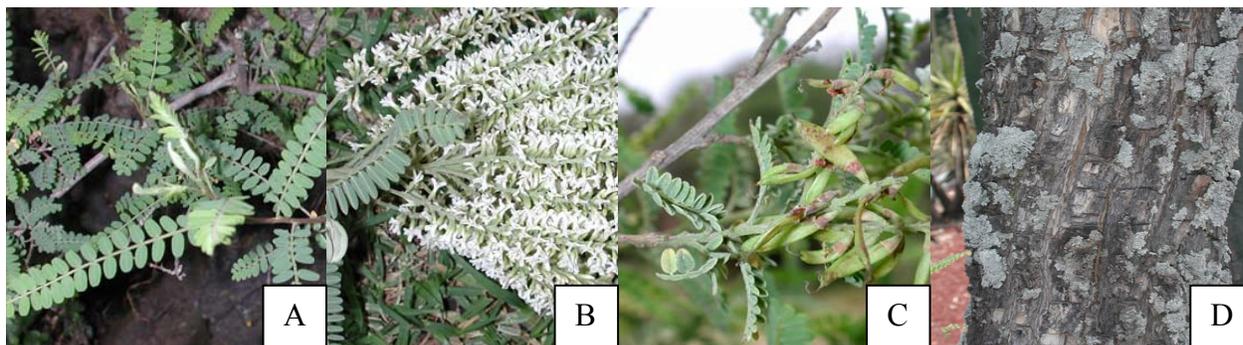


Figura 5.- Partes de *Eysenhardtia polystachya*: A.- hojas, B.- flores, C.-frutos y D.-corteza.

Es un arbusto que se puede encontrar desde el sureste de Arizona (Estados Unidos de América) hasta Oaxaca (México) (véase figura 6).

Esta planta ha tenido usos muy diversos Robert Boyle uso un extracto acuoso de esta planta como un indicador ácido-base en la década de los setentas y se identificaron unas isoflavonas como uno de los contribuyentes de la fluorescencia.⁸¹

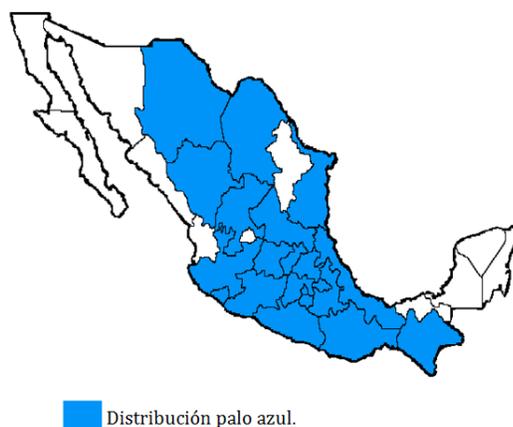


Figura 6.- Distribución geográfica de *E. polystachya* en la República Mexicana.

Desde tiempos prehispánicos se le ha empleado en la medicina alternativa como paliativo o cura para diferentes enfermedades que aquejan a los seres humanos (véase figura 7). Se le han adscrito múltiples propiedades terapéuticas, entre las cuales que destacan: eliminar el ácido úrico, es capaz disminuir el reumatismo, artritis, lumbago, ciática, prevenir los cólicos hepáticos; elimina problemas renales infecciosos, útil para suprimir diarreas de diverso origen y efecto diurético y antibacteriano. No obstante, es importante señalar que no existen estudios farmacológicos completos que confirmen la eficacia de la planta en todos estos casos.^{81, 82}



Figura 7.- Representación de la cosecha y uso de la *E. polystachya* en el códice Florentino.

Nombres comunes:

- Jalisco: Cuate
- Puebla: Coatillo, Palo dulce
- Lengua Náhuatl: *Coatl*
- Oaxaca: *Cohuatli*, *Cuatle*, *Lánae* (esta última en lengua chontalpa)
- Sinaloa: Rosilla, Palo cuate, Palo dulce
- Edo. De México: Palo dulce
- Hidalgo: Palo dulce, *Tlapahuazpatli*, *Ursa* (esta última en lengua otomí).
- Michoacán: Palo dulce
- Nuevo León: Taray
- Durango: Taray, Vara dulce, Varaduz ⁷⁹

Usos:

- Medicinal (madera). Desde la época prehispánica era muy apreciada esta especie. Se utiliza para el tratamiento de enfermedades en vías urinarias. ^{79, 83}
- Combustible (madera). Esta especie es muy usada para leña debido a sus buenas características energéticas. ⁷⁹
- Forrajero (tallo joven, hoja). Es altamente apetecida por el ganado bovino y caprino. ⁷⁹
- Uso doméstico (madera). Se elaboran con esta especie copas y vasijas. ⁷⁹

Composición química:

A partir de *E. polystachya* se han aislado distintos compuestos, como los flavonoides 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona, 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona, ⁸⁴ (3S)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavona, (3S)-3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxiisoflavona, estigmasterol,

cuneatina, 2',7-dihidroxi-3',4',8-trimetoxiisoflavona (isoduartina), 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona, 3,4-dimetoxi-8,9-(metilendioxi)ptecarpano,⁸⁵ (αR)- α ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona, (αR)-3'-C- β -D-xilopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentahidroxi dihidrochalcona, (αR)-3'-O- β -D-xilopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidro chalcona,⁸⁵ 3'-C- β -glucopiranosil- α ,2',4',4-tetrahidroxichalcona (Coatlina A) y (αR)-3'-C- β -D-glucopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona (Coatlina B).

Flavonoides:

Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales. Existen 13 subclases de flavonoides con un total de más de 5 000 compuestos.^{86, 88, 89}

Los flavonoides poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, inmunoestimulantes y antiasmáticas.^{86, 89, 90}

Estructuralmente, los flavonoides presentan el núcleo de difenil propano, compuesto por dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos por una cadena de tres carbonos (C₆-C₃-C₆), la cual normalmente forma un centro heterocíclico oxigenado (anillo C) (véase figura 8).^{92, 93, 94}

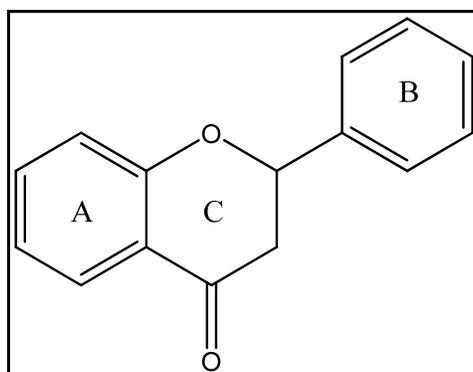


Figura 8.- Núcleo estructural de un flavonoide.

Dependiendo de su complejidad estructural y particularmente del estado de oxidación del anillo central C, los flavonoides son clasificados como flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles o flavan-3-oles, isoflavonas y antocianinas como se aprecia en la figura 9.^{94, 95}

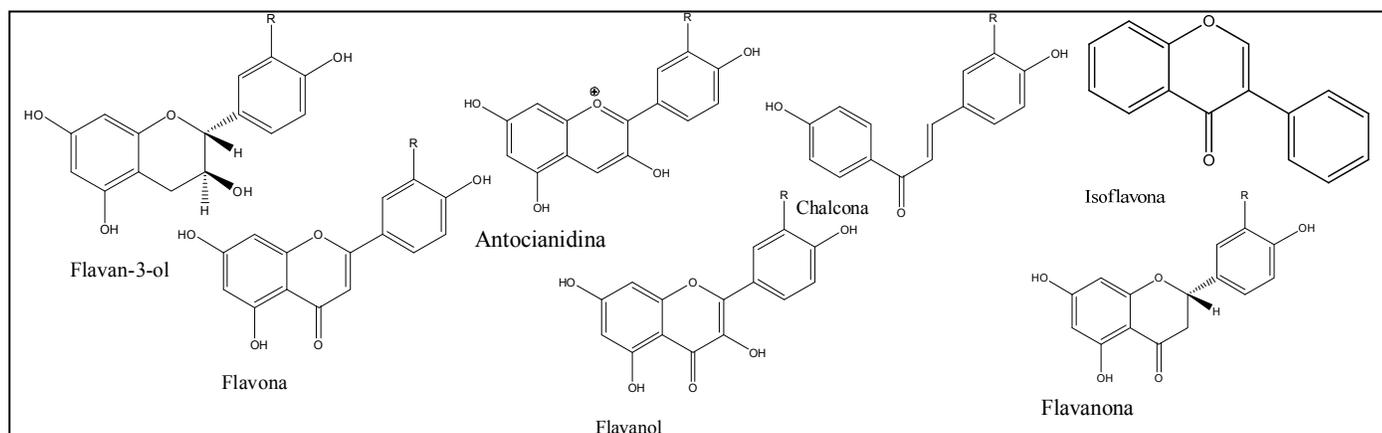


Figura 9.- Estructura común de los flavonoides y clasificación.

Justificación:

El sobreuso, en ocasiones las subdosificaciones y una terapéutica inadecuada son parte de los principales factores en el surgimiento de resistencia hacia los ixodicidas y con ello una pérdida notable de eficacia en campo con las pérdidas económicas consecuentes. Además la contaminación ambiental que generan añade un factor adicional a la problemática derivada de su uso si se considera que la resistencia se ha convertido en un obstáculo para el control de las garrapatas y de las enfermedades que estas transmiten y que este problema conlleva grandes pérdidas económicas al sector agropecuario, resulta de suma importancia desarrollar herramientas para el adecuado control de dichos parásitos. Una de las líneas de investigación más prometedoras para desarrollar nuevos ixodicidas es el acervo químico de las plantas,

evaluando en una primera instancia los extractos vegetales, mismos que presentan cientos de moléculas y que, si en teoría pueden albergar a nuevos fármacos ixodicidas, pudieran incorporarse eventualmente al control de garrapatas. En una primera y lógica secuencia para determinar dicho potencial de nuevos principios activos, resulta deseable determinar la actividad ixodicida de los extractos de la *Eysenhardtia polystachya* dados los antecedentes como insecticida que Álvarez y Delgado⁹⁶ demostraron y por el éxito ectoparasiticida anecdótico observado en el ejercicio clínico. **

Objetivos:

Objetivo general:

Evaluar el efecto ixodicida de extractos de la *E. polystachya* contra *R. microplus* para en un futuro elaborar un nuevo garrapaticida.

Objetivos específicos:

- I.- Evaluar el efecto ixodicida de diferentes extractos (de mayor a menor polaridad) de *E. polystachya* (hexánico, etílico, metílico y acuoso) *in vitro* sobre larvas y adultas de *R. microplus*.
- II.- Evaluar el efecto ixodicida del extracto de la *E. polystachya* que haya resultado más efectivo *in vitro* en animales infectados artificialmente con *R. microplus*.

** Dr Carlos Gutiérrez (1940-1996). Departamento de Virología de la FMVZ, UNAM.

III.- Evaluar el efecto ixodicida del extracto de la *E. polystachya* que haya resultado más efectivo en animales infectados artificialmente con *R. microplus* en animales infestados naturalmente.

Hipótesis:

Uno o varios extractos (de diferente polaridad) de la *Eysenhardtia polystachya* tienen efectos ixodicidas in vitro y/o in vivo vs *Rhipicephalus microplus*.

Material y Métodos:

Material vegetal:

Se realizó la identificación de la planta por un etnobotánico para cerciorarse que se trataba de *E. polystachya*. Las hojas y troncos se desecaron por separado en una estufa a 40°C durante 72 horas para posteriormente ser finamente molidos y almacenados en frascos ámbar con empaques de silica para evitar la humedad.

Extracción:

Se realizó la extracción de la planta utilizando diferentes técnicas y diferentes solventes: hexano, etanol, metanol y agua.

Extracción por Infusión: se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL 20g del tronco molido de *E. polystchya*, se le agrego 100 mL de agua destilada hirviendo, se tapó el matraz y se dejó reposar 15 minutos, posteriormente se filtró y vertió en frascos color ámbar. Este procedimiento se repitió con las hojas molidas.

Extracción por decocción: se depositó 20g del tronco finamente molido en un matraz de Erlenmeyer de 500 mL con 100mL de agua destilada y se hirvió durante 20 minutos, se dejó

kjgfmkjgfmnfriar, posteriormente se filtró y se vertió en un frasco color ambar. Este procedimiento se repitió con las hojas molidas.

La preparación de los extractos acuosos se realizó el mismo día que se requirieron para las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Extracción por maceración: se depositó 20g del tronco molido en un frasco de 500 mL y se le agregó 100mL del solvente a utilizar: hexano, etanol, metanol o agua. El recipiente permaneció cerrado a temperatura ambiente durante 20 días. Se agitó diariamente. Posterior a este tiempo la mezcla fue filtrada, el material insoluble fue lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclaron para concentrar el extracto, sin eliminar el solvente. El mismo procedimiento se repitió para las hojas molidas.

Obtención de material biológico:

Prueba de paquete larvario e inmersión de larvas: se utilizó una cepa susceptible a acaricidas. Se incluyeron larvas de 7-14 días post-eclosión en el estudio. Las larvas fueron obtenidas a partir de huevos ovipositados por hembras plétoras colectadas de becerros infestados artificialmente y mantenidos bajo condiciones controladas en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), ubicado en Jiutepec, Morelos. La cepa susceptible se ha mantenido durante varias generaciones en el Laboratorio de Parasitología de la FMVZ, UNAM.

Prueba de inmersión de adultas: para esta técnica se empleó una cepa susceptible y una de campo. La obtención de la cepa de campo se llevó a cabo mediante la recolección de *R. microplus* adultas plétoras de bovinos doble propósito del rancho "Uzeta", ubicado en la

localidad de Uzeta en el Estado de Nayarit, las cuales fueron depositadas en tubos de ensayo tapados con algodón. Parte de las garrapatas fueron transportadas al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) para su caracterización de resistencia.

Las garrapatas restantes se llevaron al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM para su procesamiento.

En cuanto a la cepa susceptible se obtuvo del Departamento de Parasitología de la FMVZ, UNAM.

Para cada extracto a evaluar y para el testigo, se necesitaron grupos de 30 especímenes divididos en tres lotes de 10 garrapatas cada uno.

Pruebas *in vitro*:

Prueba de paquete larvario: se desarrolló la metodología de la prueba del paquete larvario descrito por la FAO mediante el ensayo de Stone y Haydock.⁹⁷ Para cada uno de los diferentes extractos de *Eysendarthia polistachya* se realizó lo siguiente: al extracto se le adicionó una solución que contiene dos partes de tricloroetileno y una parte de aceite de oliva. Se realizaron diluciones seriales para hacer dosificaciones de prueba. Posteriormente, un papel filtro de 7.5 cm x 8.5 cm se impregno con 0.67 ml de cada solución de prueba y se permitió que el solvente se evaporará antes de doblarlo en un paquete dentro del cual se colocaron aproximadamente 100 larvas. Las larvas se incubaron por separado de aquéllas expuestas solamente al solvente sin acaricida (testigos). Los paquetes se incubaron a 27°C con más de 80% de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 luz: obscuridad durante 24 horas. Después de este periodo se contaron las larvas vivas y muertas utilizando un microscopio estereoscópico. Se realizaron 3 réplicas para cada uno de los extractos a probar y para el testigo.

Prueba de inmersión de larvas: se aplicó la técnica de inmersión de larvas propuesta por Shaw⁹⁸ para probar cada uno de los diferentes extractos. Se colocaron aproximadamente 100 larvas de 14-21 días de edad con un pincel sobre un papel filtro de 9 cm en una caja Petri. Se añadieron 5 ml del extracto y se colocó otro papel filtro del mismo diámetro sobre las larvas, así como 5 ml adicionales del extracto. Después de 10 minutos las larvas fueron colocadas dentro de un sobre de papel filtro de 7.5 x 8.5 cm y se cerraron con broches de presión. Los sobres o paquetes fueron incubados a 27-28° C con 75-85% de humedad relativa por 72 horas. Se realizaron 3 réplicas para cada uno de los extractos a probar y para el testigo. Se contaron las larvas vivas y muertas para estimar la letalidad.

Prueba de inmersión de adultas: se aplicó la técnica propuesta por Drummond⁹⁹, en donde las hembras se pesaron colectivamente y se seleccionaron las de pesos similares para formar los grupos. Las garrapatas se dividieron en muestras de 10 hembras para formar un lote, 3 lotes formaron un grupo experimental, al cual se le sumergió en alguno de los extractos. Los grupos se sumergieron durante 5 minutos en diluciones seriales en agua de los diferentes extractos a probar. Los testigos fueron sumergidos en agua. Las garrapatas adultas se removieron de las soluciones, se dejaron secar y se colocaron en cajas Petri de 9 cm de diámetro para incubarlas a 27±2°C, con humedad relativa superior a 80% durante un fotoperiodo 12:12 horas de luz: oscuridad. Se dejó que las hembras ovipositaran durante 21 días y los huevos se pesaron y transfirieron a viales de 24 mm x 95 mm para ser incubados. Después de transcurridos 21 días de haber pesado los huevos, se determinó el porcentaje de eclosión mediante la estimación visual de la proporción de larvas en relación con la proporción de huevos sin eclosionar presentes en el vial. Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de la oviposición:¹⁰⁰

$$\% \text{ I.O.} = \frac{P_{Lt} - P_{HLt}}{p_{LT} P_{HLT}} \times 100$$

En donde:

- P Lt = Peso de hembras del lote tratado.
- P LT = peso de hembras del lote testigo.
- PHLt = Peso de huevos del lote tratado.
- PHLT = Peso de huevos del lote testigo.

Finalmente se calculó el porcentaje de eclosión ¹⁰⁰:

$$\% \text{ de eclosión} = \frac{H}{C+H} \times 100$$

Donde:

- C = Cascarones
- H = Huevos

Pruebas *in vivo* (NOM-006-ZOO-1993):

Después de hacer las pruebas *in vitro* y determinar el extracto con mayor efecto ixodicida sobre larvas y adultas, se procedió a realizar la pruebas *in vivo* en donde se siguió analizando dicho extracto.

Prueba de establo con infestación libre:

Material biológico:

Bovinos:

Se formaron 2 grupos experimentales cada uno con 6 bovinos de razas europeas con un peso de 200-400 kg, los cuales fueron mantenidos durante la ejecución de la prueba en corrales especiales bajo condiciones y alimentación controladas. Cabe mencionar que los animales fueron de un rancho particular ubicado en el estado de Nayarit.

Larvas de R. microplus:

Para las infestaciones se utilizaron larvas de garrapatas derivadas de la cepa proveniente del CENAPA (descrita anteriormente) de entre 15 a 30 días de eclosionadas.

Infestaciones:

Una vez que se contó con el número adecuado de animales, se inició el programa de infestaciones que consistió en colocar sobre el dorso de los animales 1 g de larvas que equivalen a 20,000. Este sistema de infestación permitió tener garrapatas repletas unos 6 a 8 días antes de aplicar el extracto, que fueron necesarias como controles en los grupos testigo y tratado así como para el cálculo de los porcentajes de efectividad diario, por fase y global.

Con la finalidad de evitar diferencias significativas en cuanto a las condiciones y número de garrapatas por lote de trabajo, los bovinos sujetos a prueba se repartieron de acuerdo a la media de garrapatas obtenidas en el periodo pretratamiento, de tal forma que fueran lo más homogéneo posible.

Tratamiento:

A un grupo se le aplicó la infusión de *E. polystachya* por medio de un baño por aspersión el otro grupo fungió como testigo.

Seguimiento:

Se realizaron conteos en ambos grupos en los siguientes 5 días postratamiento, éstos conteos eran realizados por la mañana. Se compararon el número de garrapatas del grupo testigo y tratado (observando el derribo de garrapatas) para determinar el porcentaje de efectividad. Todos los especímenes producidos por el lote tratado, así como una alícuota significativa del testigo, se mantuvieron en condiciones óptimas de temperatura y humedad para permitir que continuaran su fase reproductiva.

Los datos derivados de las observaciones y colecta como: condiciones generales de salud de los bovinos; número y peso de garrapatas obtenidas; peso de la oviposición y porcentaje de eclosión por grupo de especímenes por día por animal, etc., fueron registrados en forma específica para el control adecuado de la información.

Seguimiento clínico:

Tomando en cuenta los riesgos que el tratamiento pudo implicar para los animales sometidos a la prueba, se realizaron observaciones clínicas para detectar posibles consecuencias tóxicas en el período crítico después del tratamiento; para lo cual fue necesario contar con los antídotos o tratamientos que permitieran contrarrestar los efectos adversos. Tales como: Adrenalina en solución de 1:1000 a una dosis de 10-20 µg/kg de peso IM o SC y Dexametasona (fosfato inyectable) a una dosis de 0.5 a 5 mg/kg de peso IM. ¹⁰¹

Calculo de parámetros fisiológicos de las garrapatas:

Se determinó la inhibición de la ovoposición y el porcentaje de eclosión con las formulas anteriormente descritas. El porcentaje de eficacia se calculó con la siguiente formula ¹⁰⁰:

$$\% \text{ eficacia} = ((C - T) / C) * 100$$

En donde:

C= grupo control o testigo.

T= grupo tratado

Evaluación de resultados:

Los datos obtenidos en los seguimientos de pre y pos-tratamiento en los grupos testigo y tratado, fueron utilizados para realizar comparaciones en:

- *Efecto sobre la repleción.*
- *Efecto sobre la oviposición.*

Análisis estadístico:

La información obtenida fue sometida a un Análisis de T de Student para conocer si había diferencias entre el grupo testigo y el grupo tratado, usando los datos del promedio de garrapatas por día post-tratamiento.

Prueba de campo para la evaluación del extracto por aspersión con garrapata Rhipicephalus sp:

El objetivo de esta metodología fue encontrar la concentración o dosis mínima que alcanza una efectividad igual o superior al 98%.

Bovinos: se utilizaron 2 grupos de 6 bovinos infestados con garrapatas *R. microplus* que no recibieron tratamientos acaricidas previamente. Un grupo fue el testigo y el otro el tratado. Estos bovinos fueron también de un rancho particular ubicado en el estado de Nayarit. Cuya caracterización de resistencia de las garrapatas se llevó a cabo en el CENAPA, teniendo como resultado que son resistentes al Amitraz (de 0 a 25% de mortalidad en la prueba de Stone & Haydoc y Shaw).

Muestreo piloto: se realizó un conteo inicial de ixódidos por bovino el día 0.

Tratamiento: al grupo testigo no se le aplicó ningún extracto. Al grupo a tratar se le aplicó el extracto por aspersion de acuerdo con los lineamientos mencionados en la Norma Oficial Mexicana NOM- 019-ZOO-1994, Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus sp.*

Seguimiento:

Con el fin de evaluar el efecto del extracto aplicado, se realizaron conteos diarios durante los 7 días posteriores en ambos grupos. Todas las hembras repletas que se encontraron durante estas prácticas fueron colectadas para llevar a cabo el seguimiento *in vitro* incluyendo a las hembras del grupo testigo.

Seguimiento clínico:

Tomando en cuenta los riesgos que el tratamiento pudo implicar para los animales sometidos a la prueba, se realizaron observaciones clínicas para detectar posibles consecuencias tóxicas en el período crítico después del tratamiento; para lo cual fue necesario contar con los antídotos para contrarrestar los efectos adversos.

Evaluación de resultados: Se aplicó la forma de evaluación descrita para la prueba de establo.

Resultados:

Prueba de paquete larvario:

En el cuadro 2 se muestran las diferentes concentraciones del extracto simple o primario (ExPr) obtenido de *E. polystachya* a través de distintas técnicas. Por referencia a dicho cuadro es factible destacar que con el extracto derivado del tronco y con la técnica de infusión, se logró el 100% de mortalidad de las larvas en todas las concentraciones que se evaluaron a partir del ExPr y considerando las 3 repeticiones del experimento. Evidentemente este 100% de eficacia con el extracto obtenido por infusión del tronco no se repitió con las otras metodologías de extracción. Por ejemplo: con el método de decocción del tronco se obtuvo a la concentración del 1% una eficacia media del 16.1%, al 0.5% de concentración se obtuvo 5.26% de eficacia y a la concentración de 0.25% solo se observó una eficacia del 0.43%, este último que se asemeja al grupo testigo. Con los demás extractos no se observó ningún efecto de mortalidad sobre las larvas.

De acuerdo con la prueba estadística de Dunnett existió diferencia significativa entre el extracto obtenido por infusión del tronco y el extracto obtenido por decocción del tronco con respecto al testigo, en tanto que los otros extractos no presentaron diferencia significativa con respecto al testigo (alfa 0.05).

Prueba de Inmersión de larvas:

En el cuadro 3 se muestran las diferentes concentraciones de los extractos de *E. polystachya* referidos en el cuadro 2. Nuevamente se observó que al igual que en la prueba de paquete larvario el extracto obtenido del tronco por la técnica de infusión fue la fracción y el método de

extracción que mejores resultados logró. Asimismo, el extracto obtenido por decocción del tronco obtuvo a la concentración del 1% una eficacia media del 6.56%, 0.5% de concentración obtuvo 1.6% de eficacia y los demás extractos no presentaron ninguna actividad ixodicida.

En la prueba de Dunnett existió diferencia significativa entre el extracto obtenido por infusión del tronco y el extracto obtenido por decocción del tronco con respecto al testigo, los otros tratamientos no presentaron diferencia significativa con respecto al testigo (alfa 0.05).

Prueba de inmersión de garrapatas adultas:

En ésta se observó nuevamente el efecto ixodicida que presento el extracto obtenido por medio de la técnica de infusión del tronco y los resultados en garrapatas *R. microplus* se presentan en el cuadro 4 tanto para garrapatas susceptibles como para cepa de campo. En el cuadro 6 se presenta lo correspondiente pero para el extracto obtenido por decocción del tronco. El resto de los extractos no mostró ningún efecto sobre las garrapatas adultas (véanse cuadros 5, 7-15).

En cuanto al análisis estadístico, en la prueba de Dunnett se demostró diferencia significativa del extracto del tronco obtenido por la técnica de difusión en todas sus diluciones y el extracto obtenido por decocción del tronco en sus 2 primeras diluciones con respecto al testigo. Los demás extractos no mostraron diferencia significativa con respecto al testigo (alfa 0.05).

Cuadros 4
PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE ADULTAS CON LA INFUSIÓN DEL TRONCO, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO

Garrapatas susceptibles.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	99.8 ± 5.8	60.41	52.4
0.50%	97.4 ± 1.9	52.08	67.1
0.25%	95.3 ± 8.1	47.91	69.7
0.13%	93.4 ± 7.8	41.66	73.1
0.06%	92.1 ± 6.5	37.5	72.4
Control	0	0	92.3

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% Inhibición ovoposición	% eclosión
1%	4.8 ± 2.3	64.58	55.3
0.50%	3.5 ± 0.6	60.41	65.9
0.25%	2.9 ± 0.7	56.25	67.1
0.13%	1.24 ± 0.4	52.08	74.3
0.06%	1.03 ± 0.2	33.33	74.8
Control	0	0	90.3

Cuadros 5
PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE ADULTAS CON LA INFUSIÓN DE LAS HOJAS, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO

Garrapatas susceptibles.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	91.4
0.50%	0	0	88.2
0.25%	0	0	93.8
0.13%	0	0	90.9
0.06%	0	0	91.1
Control	0	0	92.4

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	94.3
0.50%	0	0	90.7
0.25%	0	0	93.2
0.13%	0	0	95.1
0.06%	0	0	93.5
Control	0	0	94.2

Cuadros 6
PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR LA DECOCCIÓN DEL TRONCO, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO

Garrapatas susceptibles.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	60.2 ± 2.1	56.9	57.2
0.50%	58.1 ± 4.1	54.1	62.9
0.25%	56.8 ± 2.3	49.8	71.2
0.13%	49.7 ± 8.9	42.3	83.3
0.06%	51.6 ± 7.9	36.9	89.9
Control	0	0	92.6

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% Inhibición ovoposición	% eclosión
1%	2.8 ± 0.8	48.4	67.9
0.50%	2.5 ± 0.4	49.1	73.5
0.25%	2.0 ± 6.1	39.9	82.1
0.13%	1.98 ± 9.1	47.4	85.1
0.06%	2.8 ± 3.9	45.7	88.2
Control	0	0	90.4

Cuadros 7

PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR LA DECOCCIÓN DE LAS HOJAS, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO.

Garrapatas susceptibles.

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión	Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	94.1	1%	0	0	90.1
0.50%	0	0	93.9	0.50%	0	0	92.8
0.25%	0	0	92.7	0.25%	0	0	94.2
0.13%	0	0	90.8	0.13%	0	0	90.2
0.06%	0	0	93.7	0.06%	0	0	91.2
Control	0	0	93.2	Control	0	0	91.5

Cuadros 8

PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR MACERACIÓN CON HEXANO DEL TRONCO, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO.

Garrapatas susceptibles.

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión	Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	92.9	1%	0	0	93.7
0.50%	0	0	93.7	0.50%	0	0	92.8
0.25%	0	0	94.1	0.25%	0	0	92.4
0.13%	0	0	93.3	0.13%	0	0	93.1
0.06%	0	0	92.1	0.06%	0	0	93.4
Control	0	0	93.4	Control	0	0	92.9

Cuadros 9
PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR MACERACIÓN CON ETANOL DE LAS HOJAS, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO.

Garrapatas susceptibles.

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión	Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	91.8	1%	0	0	90.1
0.50%	0	0	92.5	0.50%	0	0	91.5
0.25%	0	0	91.9	0.25%	0	0	93.2
0.13%	0	0	92.8	0.13%	0	0	91.9
0.06%	0	0	93.1	0.06%	0	0	93.1
Control	0	0	92.8	Control	0	0	93.5

Cuadros 10
PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR MACERACIÓN CON METANOL, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO.

Garrapatas susceptibles.

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión	Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	93.1	1%	0	0	92.2
0.50%	0	0	92.8	0.50%	0	0	94.1
0.25%	0	0	91.7	0.25%	0	0	93.8
0.13%	0	0	92.8	0.13%	0	0	93.1
0.06%	0	0	92.5	0.06%	0	0	94.3
Control	0	0	91.9	Control	0	0	94.7

Cuadros 11
PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE
ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR MACERACIÓN CON AGUA DEL TROCO,
CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO.

Garrapatas susceptibles.

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión	Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	91.3	1%	0	0	89.8
0.50%	0	0	91.9	0.50%	0	0	90.2
0.25%	0	0	92.2	0.25%	0	0	91.9
0.13%	0	0	89.3	0.13%	0	0	91.6
0.06%	0	0	92.4	0.06%	0	0	92.4
Control	0	0	91.4	Control	0	0	90.7

Cuadros 12
PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE
ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR MACERACIÓN CON HEXANO DE LAS
HOJAS, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO.

Garrapatas susceptibles.

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión	Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	93.5	1%	0	0	93.8
0.50%	0	0	92.7	0.50%	0	0	92.9
0.25%	0	0	91.8	0.25%	0	0	93.6
0.13%	0	0	92.8	0.13%	0	0	93.1
0.06%	0	0	91.9	0.06%	0	0	93.1
Control	0	0	93.7	Control	0	0	93.2

Cuadros 13

PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR MACERACIÓN CON ETANOL DE LAS HOJAS, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO.

Garrapatas susceptibles.

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión	Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	91.5	1%	0	0	92.5
0.50%	0	0	90.6	0.50%	0	0	91.2
0.25%	0	0	91.3	0.25%	0	0	90.8
0.13%	0	0	91.9	0.13%	0	0	92.6
0.06%	0	0	92.1	0.06%	0	0	91.8
Control	0	0	91.4	Control	0	0	92.9

Cuadros 14

PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR MACERACIÓN CON METANOL DE LAS HOJAS, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO.

Garrapatas susceptibles.

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión	Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	92.8	1%	0	0	90.7
0.50%	0	0	91.3	0.50%	0	0	91.8
0.25%	0	0	91.8	0.25%	0	0	94.1
0.13%	0	0	94.2	0.13%	0	0	92.6
0.06%	0	0	93.4	0.06%	0	0	92.8
Control	0	0	92.3	Control	0	0	91.7

Cuadros 15
PARÁMETROS BIOLÓGICOS RESULTANTES DE LA PRUEBA DE INMERSIÓN DE
ADULTAS CON EL EXTRACTO OBTENIDO POR MACERACIÓN CON AGUA DE LAS
HOJAS, CEPA SUSCEPTIBLE Y CEPA DE CAMPO.

Garrapatas susceptibles.

Cepa de campo.

Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión	Concentración	% Mortalidad	% inhibición de la ovoposición.	% eclosión
1%	0	0	93.5	1%	0	0	92.3
0.50%	0	0	90.2	0.50%	0	0	91.9
0.25%	0	0	92.7	0.25%	0	0	94.2
0.13%	0	0	91.6	0.13%	0	0	93.1
0.06%	0	0	88.9	0.06%	0	0	93.4
Control	0	0	92.6	Control	0	0	93.1

Prueba de establo con infestación libre:

En el cuadro 16 se expone el número de garrapatas repletas contabilizadas por día, así como la sumatoria y la media de los grupos testigo y tratado respectivamente. En el cuadro 17 se señalan las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) al evaluar las poblaciones mediante un análisis de T de Student.

Cuadro 16
NÚMERO DE GARRAPATAS HEMBRAS REPLETAS *R. MICROPLUS* CEPA
“SUSCEPTIBLE” COLECTADAS POR DÍA (CON SUMATORIA Y MEDIA) EN BOVINOS
INFESTADOS ARTIFICIALMENTE EN EL GRUPO TESTIGO Y EN EL GRUPO TRATADO
CON INFUSION.

VALORES TESTIGO

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Bovino 1	116	147	72	40	28	14
Bovino 2	112	146	113	35	31	25
Bovino 3	105	90	110	66	32	17
Bovino 4	59	67	65	34	12	19
Bovino 5	79	62	69	38	16	15
Bovino 6	105	135	86	45	15	17
Sumatoria	576	647	515	258	134	107
Media ± DE	96.0± 22.5	107.8± 39.53	85.8± 21.12	43.0± 10.89	22.3± 8.95	17.8± 3.92
Mediana	105	112.5	79	39	22	17

VALORES EXPERIMENTALES CON LA INFUSIÓN DE *E. polystachya*

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Bovino 1	68	100	76	53	49	34
Bovino 2	70	50	26	4	13	11
Bovino 3	25	13	7	9	4	9
Bovino 4	38	41	34	14	15	5
Bovino 5	79	54	21	19	22	3
Bovino 6	44	17	30	24	9	15
Sumatoria	324	275	194	123	112	77
Media ±DE	54.0± 21.32	45.8±31.46	32.3±23.43	20.5±17.42	18.7±16.03	12.8±11.21
Mediana	56	45.5	28	16.5	14	10

Cuadro 17
PROMEDIO, VARIANZA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR OBTENIDOS DE LOS GRUPOS TESTIGO Y TRATADO EN LA PRUEBA DE ESTABLO.

Datos	Grupo Testigo	Grupo Tratado
Promedio	62.11	30.93
Varianza	1542.14	261.56
Desviación estándar (± 1 DE)	39.27	16.17

^{a,b} diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$)

A pesar de las diferencias en la carga de garrapatas entre grupo testigo y grupo tratado con el ExPr de *E. polystachya* (infusión), fue posible detectar que desde el primer día pos-tratamiento, el grupo testigo no manifestó una diferencia tangible en su carga ($X \pm DE = 107.8$ garrapatas adultas/bovino), mientras que el grupo tratado presentó una notable reducción que se definió más tarde como cercana al 50% (57.5 % de eficacia, o sea $X \pm DE = 45.8$ garrapatas adultas/bovino).

El porcentaje de eficacia de depleción de la carga de garrapatas *R. microplus* adultas, estimado según Amaral¹⁰⁰ se presenta en el cuadro 18 y se puede observar en el una reducción progresiva de la carga, logrando una eficacia del 57.5% el primer día post-tratamiento. En la figura 10 puede observarse la comparación de los promedios de garrapatas repletas en el grupo testigo y en el grupo tratado.

Cuadro 18
NÚMERO PROMEDIO DE GARRAPATAS CONTABILIZADAS EN LOS GRUPOS TESTIGO Y TRATADO Y PORCENTAJE DE EFICACIA

Día	Promedio de garrapatas del grupo Testigo	Promedio de garrapatas del grupo Tratado	Porcentaje de eficacia
Pretratamiento	96	54	
Postratamiento			
Día 1	107.8	45.8	57.5
Día 2	85.8	32.3	62.4
Día 3	43	20.5	52.3
Día 4	22.3	20.2	9.4
Día 5	17.8	12.8	28.1

^{a,b} diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$)

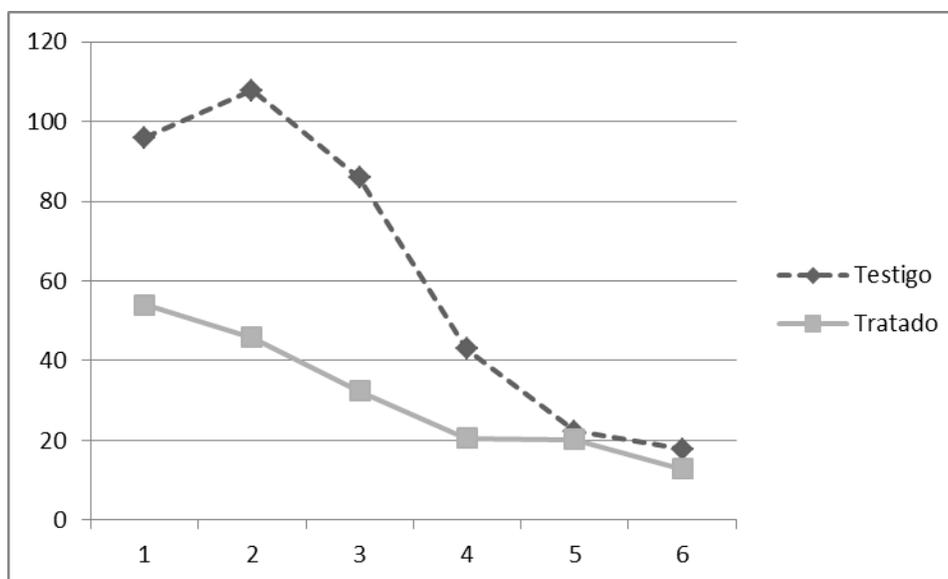


Figura 10.- Comparación de los promedios de garrapatas repletas en los grupos testigo y tratado con la infusión del tronco de la *E. polystachya* en la prueba de establo.

Medición de los parámetros reproductivos

Con la finalidad de dar seguimiento a los dichos parámetros *in vitro*, se llevó a cabo una colecta el día 1 pos-tratamiento de 40 garrapatas del grupo testigo y 40 garrapatas del grupo tratado. Los datos obtenidos de estos parámetros se encuentran disponibles en el cuadro 19, en el que se destacan las diferencias estadísticas.

Es evidente, con relación al cuadro 19, que el peso de las hembras del grupo testigo y el peso de la ovoposición fue mayor respecto a las del grupo tratado (13.11 g vs 10.92 g respectivamente para peso y 5.75 g vs. 2.92 g para ovoposición).

En cuanto al porcentaje de eclosión se encontró un 91.97 % en el grupo testigo, mientras que en el grupo tratado se obtuvo un 59.99%. Aunque los detalles estadísticos se presentan en el cuadro 17, de manera general se puede observar claramente que los parámetros evaluados del grupo tratado variaron considerablemente con respecto al grupo testigo.

Cuadro 19
COMPARACIÓN DE DIVERSOS PARÁMETROS BIOLÓGICOS OBTENIDOS DE LAS GARRAPATAS COLECTADAS DE LOS GRUPOS TESTIGO Y TRATADO.

Grupo	No. de hembras	Peso de hembras (g)	Peso huevos (g)	Índice de oviposición	% de inhibición de oviposición	% de eclosión
Testigo	40	13.11	5.75	0.43	Cero	91.97
Tratado	40	10.92	2.92	0.26	38.63	59.99

^{a,b} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05)

Prueba de campo para la evaluación del extracto por aspersion vs. garrapata
Rhipicephalus sp:

En el cuadro 20 se expone el número de garrapatas repletas contabilizadas por día, así como la sumatoria, la media y otras medidas de dispersión de los grupos testigo y tratado respectivamente. En el cuadro 21 se señalan las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) al evaluar las poblaciones mediante un análisis de T de Student.

Cuadro 20
NÚMERO DE GARRAPATAS HEMBRAS REPLETAS *R. MICROPLUS* CEPA
“SUSCEPTIBLE” COLECTADAS POR DÍA (CON SUMATORIA Y MEDIA) EN BOVINOS
INFESTADOS NATURALMENTE EN EL GRUPO TESTIGO.

VALORES TESTIGO

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Bovino 1	104	131	94	52	28	15
Bovino 2	98	90	80	49	25	12
Bovino 3	89	118	102	41	20	8
Bovino 4	121	89	65	54	42	35
Bovino 5	172	115	113	73	37	22
Bovino 6	101	132	109	39	29	31
Sumatoria	685	675	563	308	181	123
Media ± DE	114.2 ± 30.20	112.5 ± 19.06	93.8 ± 18.36	51.3 ± 12.17	30.2 ± 8.03	20.5 ± 10.78
Mediana	102.5	116.5	98	50.5	28.5	18.5

VALORES EXPERIMENTALES CON LA INFUSIÓN DE *E. polystachya*

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Bovino 1	130	86	42	28	12	21
Bovino 2	87	74	62	19	34	13
Bovino 3	91	59	39	12	9	4
Bovino 4	123	81	47	24	16	10
Bovino 5	173	41	51	32	27	18
Bovino 6	118	95	59	36	30	19
Sumatoria	722	436	300	151	128	85
Media ± DE	120.3 ± 31.14	72.7 ± 19.68	50.0 ± 9.16	25.2 ± 8.77	21.3 ± 10.34	14.2 ± 6.43
Mediana	120.5	77.5	49	26	21.5	15.5

Cuadro 21
PROMEDIO, VARIANZA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR OBTENIDOS DE LOS GRUPOS
TESTIGO Y TRATADO EN LA PRUEBA DE CAMPO.

Datos	Grupo Testigo	Grupo Tratado
Promedio	70.41	50.66
Varianza S	1741.85	1632.05
Desviación estándar	41.73	40.39

^{a,b} diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$)

Desde el primer día pos-tratamiento, el grupo testigo no manifestó una diferencia perceptible en su carga ($X \pm DE = 112.5$ garrapatas adultas/bovino), mientras que el grupo tratado presentó una notable reducción que se definió más tarde como cercana al 40% (35.4% de eficacia, o sea $X \pm DE = 72.7$ garrapatas adultas/bovino).

El porcentaje de eficacia de depleción de la carga de garrapatas *R. microplus* adultas, estimado según Amaral¹⁰⁰ se presenta en el cuadro 22 y se puede observar en el una reducción progresiva de la carga, logrando una eficacia del 35.4% el primer día pos-tratamiento. En la figura 11 puede observarse la comparación de los promedios de garrapatas repletas en el grupo testigo y en el grupo tratado.

Cuadro 22
NÚMERO PROMEDIO DE GARRAPATAS CONTABILIZADAS EN LOS GRUPOS TESTIGO Y TRATADO Y PORCENTAJE DE EFICACIA.

Día	Promedio de garrapatas del grupo Testigo	Promedio de garrapatas del grupo Tratado	Porcentaje de eficacia
Pretratamiento	114.2	120.3	
Postratamiento			
Día 1	112.5	72.7	35.4
Día 2	93.8	50	46.7
Día 3	51.3	25.5	50.3
Día 4	30.2	21.3	29.5
Día 5	20.5	14.2	30.7

^{a,b} diferentes literales indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$)

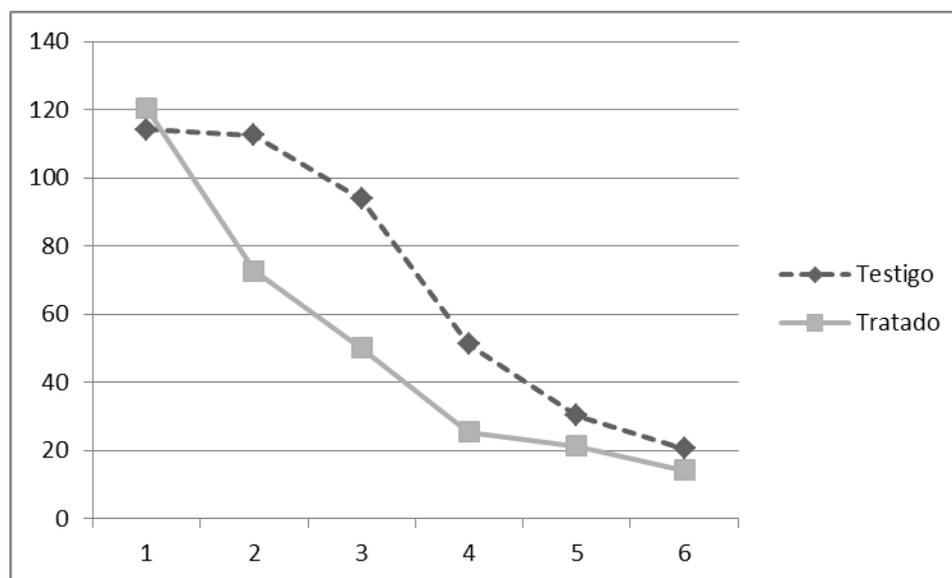


Figura 11.- Comparación de los promedios de garrapatas repletas en los grupos testigo y tratado con la infusión del tronco de la *E. polystachya* en la prueba de campo.

Medición de los parámetros reproductivos

Con la finalidad de dar seguimiento a los dichos parámetros *in vitro*, se llevó a cabo una colecta el día 1 pos-tratamiento de 40 garrapatas del grupo testigo y 40 garrapatas del grupo tratado. Los datos obtenidos de estos parámetros se encuentran disponibles en el cuadro 23, en el que se destacan las diferencias estadísticas.

Es evidente, con relación al cuadro 23, que el peso de las hembras del grupo testigo y el peso de la ovoposición fue mayor respecto a las del grupo tratado (14.07 g vs 12.91 g respectivamente para peso y 3.35 g vs. 2.84 g para ovoposición).

En cuanto al porcentaje de eclosión se encontró un 92.48 % en el grupo testigo, mientras que en el grupo tratado se obtuvo un 63.41%. Aunque los detalles estadísticos se presentan en el cuadro 21, de manera general se puede observar claramente que los parámetros evaluados del grupo tratado variaron considerablemente con respecto al grupo testigo.

Cuadro 23
COMPARACIÓN DE DIVERSOS PARÁMETROS BIOLÓGICOS OBTENIDOS DE LAS GARRAPATAS COLECTADAS DE LOS GRUPOS TESTIGO Y TRATADO.

Grupo	No. de hembras	Peso de hembras (g)	Peso huevos (g)	Índice de oviposición	% de inhibición de oviposición	% de eclosión
Testigo	40	14.07	3.35	0.23	cero	92.48
Tratado	40	12.91	2.84	0.22	7.70	63.41

^{a,b} Diferentes literales en cada columna indica diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$)

Discusión:

Se ha descrito que la secuencia lógica o más aceptable para los estudios encaminados a que un recurso biótico pudiera generar, finalmente, un preparado farmacéutico. La secuencia que presenta como más común y que de manera más eficiente evita gastos inadecuados en tiempo y/o forma es la siguiente:

1) Estudios etnobotánicos. Primeramente se obtiene de diversas fuentes, ya sea formales o informales, los detalles de uso de un remedio herbolario. La información mínima que se requiere incluye, la identificación de la planta, que tendrá que ser por dos partes, el o los que la usan de una manera determinada en campo y una vez recolectada a satisfacción del o los usuarios, se lleva completa a clasificación por un experto botánico, quien entre otros procedimientos ha de constatar en un herbario los rasgos morfológicos de la o las plantas en cuestión. En este caso, la

Eysendarthia polistachya fue identificada por sus rasgos distintivos de:

- a. **Forma.** Arbusto caducifolio, de 3 hasta 9 m de altura, con un diámetro de 15 cm o más.⁷⁹
- b. **Hojas.** Alternas, compuestas, pinnadas, 3 a 5 cm de largo, folíolos 10 a 15 pares por hoja, elípticos, 7 a 13 mm de largo por 3 a 5 mm de ancho, con glándulas resinosas aromáticas presentes.⁷⁹
- c. **Tronco.** Tallos ramificados color café oscuro. Corteza. Externa amarilla de textura ligeramente rugosa, escamosa, seca es desprendible en placas irregulares de color oscuro de 1 mm de grosor. Interior pardo rojizo.⁷⁹
- d. **Flor.** Inflorescencias dispuestas en racimos espigados terminales o subterminales, 5 a 7 cm de largo; cáliz campanulado, 2.5 a 3 mm de largo, 5 lobulos; corola blanca, formada por 5 pétalos libres, de 5 mm de largo por 1.3 a 2 mm de ancho, oblongos.⁷⁹
- e. **Fruto.** Vaina ligeramente curvada, atenuada en el ápice, pubescente o subglabra, de 7 a 9.5 mm de largo, con el estilo persistente, frágil e indehiscente, provista con glándulas; cada

vaina contiene una semilla.⁷⁹

Dentro de esta primera etapa se realiza una búsqueda de lo estudiado en el mundo de manera formal. Destaca para *Eysendarthia polistachya* los estudios sobre sus propiedades farmacológicas como efectos citotóxicos, antiinflamatorios, insecticidas, actividad antiurolitiásica, antimicrobiana, efecto diurético y antioxidante.^{96, 103-105} No obstante, no existen datos formales en la literatura sobre un posible efecto ixodicida de la *Eysendarthia polistachya*. De tal suerte que, una primicia de mayor formalidad de este ensayo es describir el efecto dicho. No obstante, las observaciones primarias se deben al finado Dr. Carlos Gutiérrez Martínez (1938 – 1992), miembro del personal académico de la FMVZ, UNAM en su tiempo. De manera pragmática, el Dr. Gutiérrez utilizaba extractos de esta planta para efectos ectoparasiticidas en sus pacientes veterinarios, principalmente pequeñas especies.

2) Estudios etnofarmacológicos. Antes de definir cuál o cuáles principios activos pudieran estar involucrados en la eficacia ixodicida, o hacer pruebas médicas de gran escala, se deben corroborar los efectos farmacológicos que se tienen como objetivo. Esto no solo evita que se gasten recursos económicos y humanos innecesariamente por un conocimiento etnobotánico que quizá no sea reproducible o la magnitud de su efecto sea fundamentalmente pobre. Es común que, bajo condiciones mejor controladas en ensayos farmacológicos que las observadas en la clínica, se descubra que una serie de remedios no son eficaces. Muchos de estos ensayos no son publicados, lo que a fin de cuentas representa un desperdicio de esfuerzos. En farmacología se reconoce a este fenómeno como “*accretion*” y que se refiere a la pérdida de principios activos durante el desarrollo de un medicamento por tener rasgos insalvables de toxicidad, solubilidad, efectos no deseados, etc. En la mayoría de los países este aspecto es cuidadosamente dirigido para optimizar recursos.¹⁰⁶

Durante el desarrollo de estos estudios es importante detallar la magnitud del o los efectos y hasta donde sea posible los rasgos colaterales como efectos adversos, estabilidad del

preparado, hallazgos colaterales no relacionados al estudio primario, etc. Es importante mantener la información lograda con el máximo de discreción para evitar una competencia desventajosa con otras instituciones de mayor capacidad y para evitar la devastación del recurso biótico, fenómeno éste muy recurrente en nuestra sociedad.¹⁰⁶

3) Estudios etnoquímicos. Si se tiene la fortuna de haber encontrado un preparado que con una mínima o nula toxicidad muestra una eficacia bien definida, se recurre a estudios fitoquímicos. En ellos las dosis previamente estandarizadas en los estudio etnofarmacológicos de los extractos primarios son rigurosamente sometidas a extracciones que usan diversos solventes, generalmente desde lo más polar a no polar (por ejemplo de agua a cloroformo). Se realizan entonces los extractos secundarios y de ahí los grupales (flavonoides, terpenos, quatlinas, etc), para finalmente definir el o los principios activos (PAs) que están involucrados en el efecto evaluado. Obviamente la interacción entre esta fase y la etnofarmacológica es estrecha pues se siguen realizando evaluaciones de eficacia comparativa con el extracto primario a fin de no perder eficacia o comprobar la ruta a seguir.¹⁰²

La fase química es la que requiere mayor tiempo e inversión pues una vez aislados los PAs, esencial caracterizarlos químicamente y posteriormente intentar su síntesis, con lo que se podrán hacer muchas pruebas médicas y farmacológicas, así como diseños farmacéuticos y se evitará la devastación del recurso herbolario.¹⁰²

Finalmente, dentro de la fase químico – farmacológica, se manipulará el o los PAs para obtener otras moléculas a fin de evaluar su eficacia en el efecto primariamente buscado o en otros que hayan surgido.¹⁰² Por ejemplo el sildenafil se investigó inicialmente para efectos antihipertensivos y vs. angina de pecho y ha sido por muchos años el fármaco más vendido en el mundo para efectos de estimulación de la erección en el hombre ***.

*** <http://www.about-ed.com/viagra-history>

4) Estudios etnomédicos. La complejidad de esta fase es evidente. Se requiere nuevamente vincularla a la farmacología y a la química para promover el desarrollo de todas las facetas de su desarrollo como un potencial medicamento. Así, se requerirá el estudio farmacocinético para definir dosis, intervalos y grado de penetración del PA. Se requieren estudios de farmacodinamia para realizar ensayos destinados a generar interacciones virtuosas y definir las peligrosas y dar apoyo a nuevos diseños en la fase química. Se evaluará la posible toxicidad y los límites de su eficacia y se medirá comparativamente contra otros PAs para ubicar mejor su papel en el efecto médico requerido.¹⁰²

En esta fase se repiten estudios de eficacia y se realizan estudios de impacto medio-ambiental y otros estudios de farmacovigilancia y toxicidad de diversa naturaleza como mutagenicidad, embriotoxicidad, genotoxicidad-carcinogenicidad, reacciones e interacciones adversas, etc. Se realizarán estudios de residualidad y muchos más.¹⁰²

El orden sugerido por Labadie es evidentemente una directriz elástica y no necesariamente lineal que debe ajustarse al desarrollo individual. Por ejemplo, algunos remedios herbolarios se comercializan como tales sin terminar el desarrollo farmacológico clásico. No obstante, la lógica evolutiva en la investigación que presenta este autor resulta al menos estimulante para el análisis de los resultados propios. En este sentido, los resultados obtenidos llevan una secuencia ajustada en buena medida al pensamiento descrito. Primero se confirmaron los datos etnobotánicos en el Herbario Nacional de México del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, identificando a la *Eysendarthia polistachya* como la hierba utilizada por el Dr. Carlos Gutiérrez. Es importante distinguirla de otras plantas de la misma familia como *E. adenostylis*, *E. drummondii*, *E. officinalis*, *E. orthocarpa*, *E. parvifolia*, *E. peninsularis*, *E. platycarpa*, *E. punctata*, *E. schizocalyx*, *E. spinosa*, *E. subcoriacea* y *E. texana*.⁷⁹

A menudo se reconoce que no todas las partes de las plantas poseen la actividad farmacológica buscada.¹⁰⁷ En este caso el conocimiento etnobotánico que sólo el tronco poseía actividad parece confirmarse a través de pruebas *in vitro* con diferentes extractos obtenidos de las hojas que mostraron nula actividad ixodida. Este hallazgo resulta peligroso para la integridad del recurso biótico, ya que literalmente se requiere destruirlo para obtener la parte que es útil. En este sentido resalta la necesidad de realizar estudios etnoquímicos con la identificación a plenitud del o los PAs responsables del efecto ixodida mediante extracciones de grupos previamente y posteriormente de moléculas,¹⁰⁷ como se esquematiza en la figura 12.

El hecho de que el extracto acuoso de *E. polystachya* en la pruebas con adultas haya sido relativamente menor al efecto de mortalidad en larvas resulta de alguna manera predecible dado a que la extracción con agua tiende a obtener productos polares y a su vez estos predeciblemente tendrán poca penetración a través del exoesqueleto. Sin embargo, existen vehículos que pueden modificar la capacidad de penetración de los potenciales PAs. Por ejemplo: el sulfóxido de dimetilo es capaz de crear puentes hidrofóbicos para sustancia hidrofílicas, y es en lo que se basa algunos productos de aplicación percutánea.¹⁰¹ De tal suerte, en estudios posteriores deberán realizarse ensayos para ver si es posible mejorar el efecto del extracto acuoso y finalmente de los PAs responsables del efecto ixodida mediante la manipulación farmacéutica. De cualquier manera, el hecho de que se haya observado un efecto importante en la inhibición de la ovoposición y eclosión es indicativo indirecto de la penetración de los PAs y abre múltiples posibilidades de uso, dado que existen datos bibliográficos de que el extracto no es tóxico.¹⁰³ Esto es que los hábitos hematófagos de las garrapatas pueden ser utilizados como vehículos de entrada de los PAs de los extractos de la *E. polystachya*, con lo cual el control de la garrapata puede ser más eficiente y menos contaminante al ambiente, pues se podría optimizar su uso a través de su administración parenteral.

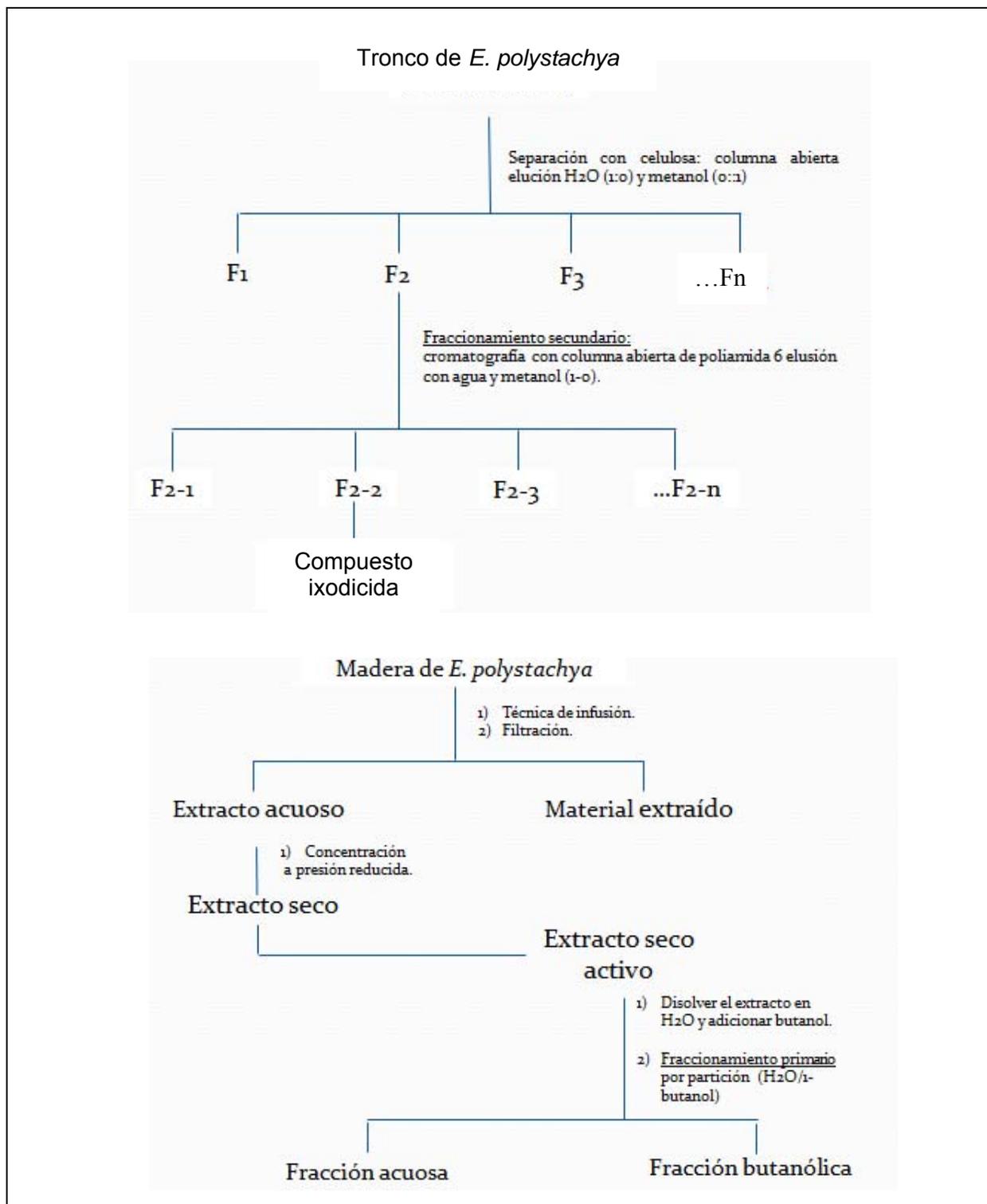


Figura 12.- Esquema del análisis fitoquímico del tronco de la *E. polystachya* para la identificación del compuesto o compuestos con actividad ixodicida.

Los resultados obtenidos con *E. polystachya* (100% de mortalidad en larvas susceptibles) se comparan a otros ensayos con extractos vegetales, tales como: *Hypericum polyanthemum*, *Achyranthes aspera*, *Gloriosa superba*, *Ricinus communis* en pruebas *in vitro* con larvas susceptibles,^{74,77} sin embargo no hicieron pruebas *in vivo* o utilizando adultas. Esto probablemente se deba a que los PAs no están diseñados para penetrar al exoesqueleto.

La literatura señala que la *E. polystachya* es una planta que tiene una notable cantidad de flavonoides como los flavonoides 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona, 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona,⁸⁴ (3S)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavona, (3S)-3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxiisoflavona, estigmasterol, cuneatina, 2',7-dihidroxi-3',4',8-trimetoxiisoflavona (isoduartina), 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavona, 3,4-dimetoxi-8,9-(metilendioxi)ptecarpano,⁸⁵ (αR)- $\alpha,3,4,2',4'$ -pentahidroxidihidrochalcona, (αR)-3'-C- β -D-xilopiranosil- $\alpha,3,4,2',4'$ -pentahidroxi dihidrochalcona, (αR)-3'-O- β -D-xilopiranosil- $\alpha,3,4,2',4'$ -pentahidroxidihidro chalcona,⁸⁵ 3'-C- β -glucopiranosil- $\alpha,2',4',4'$ -tetrahidroxichalcona (Coatlina A) y (αR)-3'-C- β -D-glucopiranosil- $\alpha,3,4,2',4'$ -pentahidroxidihidrochalcona (Coatlina B), entre otros componentes tales como ácidos fenólicos, taninos y estilbenos.¹⁰⁸ Estas observaciones deberán comprobarse mediante las extracciones sugeridas.

Es factible que el efecto ixodicida se extienda a otros géneros de garrapatas que causan problemas en México, por ejemplo; *B. anulatus*, *Amblyomma cajennense*, *A. imitator*, *A. maculatum*, *A. triste*, *A. americanum* y *Anocentor nitens*.⁹ Sin embargo, esto es materia de ensayos posteriores.

Conclusiones:

La *Eysendarthia polystachya* y en particular el tronco (corteza y tallo) tuvo efecto ixodicida cuando se le extrajo de manera acuosa.

Los efectos ixodicidas (vs *R. microplus*) fueron muy marcados en larvas susceptibles (100% mortalidad), eficaces en adultas susceptibles (99.8 ± 5.8% de mortalidad, 60.41% de inhibición de la ovoposición, 52.4% de eclosión) y sólo parcialmente eficaces en garrapatas adultas cepa de campo resistente al amitraz (4.8 ± 2.3% de mortalidad, 64.58% de inhibición de la ovoposición, 55.3% de eclosión).

Extractos con solventes no polares mostraron nula capacidad de extraer los PAs del efecto ixodicida.

Referencias:

- 1.- De la Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Hofle U, Villanahua D, Almazan C, *et al.* Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006; 5(4): 390-401.
- 2.- Márquez- Jiménez J, Hidalgo-Pontiverosa F, Contreras-Chovab F, Rodríguez- Liébana JJ y Muniain-Ezcurrac MA. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23(2):94-102.
- 3.- Lima WS, Ribeiro MF, Guimaraes MP. Seasonal Variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)(Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Trop Anim Health Pro* 2000; 32:375-380.
4. - Castro MB, Wright SA. Vertebrate hosts of (Acari: Ixodidae) in California. *J Vector Ecol* 2007; 32(1):140-9.
- 5.- Horak IG, Camicas JL, Keirans JE. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp App Acarol* 2002; 28: 27-54.
- 6.- Barker SC, Murrell A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 2004; 129:15-36.
- 7.- Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet Parasitol* 2008; 152:173-185.
- 8.- Rechav Y. Naturally acquired resistance to ticks – a global view. *Insect Sci Appl* 1992;13: 495-504
- 9.- Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arévalo F, Santamaría VM, Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol* 2006; 31 (3-4): 335-42.

- 10.- Treviño JB. Aspectos económicos del programa de erradicación de *Boophilus ssp* en México. La erradicación de las garrapatas. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 75. Actas de la Consulta de Expertos sobre la erradicación de las garrapatas con referencia especial a las Américas; 1987 Junio 22-26; México.1987: 96-97.
- 11.- Tapia PG. Un modelo para predecir el tiempo que tarda para desarrollarse la resistencia de las garrapatas *Boophilus microplus* a los acaricidas (tesis de doctorado). Coyoacán (DF) México: FMVZ, UNAM, 2004.
- 12.- Aguirre EJ, Santamaría VM. Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y Organoclorados. *Memorias de IV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria*; 1996 octubre 4-5; Cd. Victoria (Tamaulipas) México.
- 13.- Baker JA, Janet JO, Wendy DR. Ixodidical resistance in *Boophilus microplus* (Canestrini) en la república de Sudáfrica and Transkei. *J South African Vet Assoc* 1979; 50: 296- 301.
- 14.- Benavides OE, Romero NA, Rodríguez BJ. Situación actual de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas en Colombia. El diagnóstico de resistencia. *Carta Fedegan* 1989; 61: 13-18
15. Bourguet D, Genissel A, Baymond M. Insecticide resistance and dominance levels. *J Econ Entom* 2000; 93: 1588- 1595
- 16.- Cortesero A M, Stapel JO, Lewis WJ. Understanding and Manipulating Plant Attributes to Enhance Biological Control. *Biol Control* 2000; 17: 35–49
- 17.- Norma Oficial Mexicana NOM- 019-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus spp* [página de internet]. México: SENASICA [descargado el día 8 de abril de 2013; citado el 15 de abril de 2013]. Disponible en: <http://senasica.gob.mx/?doc=502>

- 18.- Andrew YL, Andrew CC, Robert JM, Ronald BD, John EG. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest Manag Sci* 2007; 63:882–889
- 19.- Samish M, Alekseev E, Glazer I. The effect of soil composition on anti-tick activity of entomopathogenic nematodes. *Ann NY Acad Sci* 1998; 849: 402-403.
- 20.-Castiñeiras A, Jimeno G, López M, Sosa L. Efecto de *Beuveria bassiana* *Metarhizium anisopliae* (Fungi imperfecti) y *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: formicidae) contra huevos de *Boophilus microplus* (Acarina Ixodidae) *Rev Salud Anim* 1987; 9: 288-293
- 21.- Fernández RM, Zhioua E, García VZ. Infectividad in vitro de *Metarhizium anisopliae* cepa ESCI contra *Boophilus microplus*. *Memorias del V Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria-AMPAVE*; 2001; Mazatlán (Sinaloa) México. 2001:34-35
- 22.- Guedes-Frazzona AP, Da Silva IV, Masuda A, Schrank A, Henning V. In vitro assesment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 2000; 94: 117-125.
- 23.- Paasch L, Schnippeoketter S. Sistema integral para el control de garrapatas en la ganadería bovina del trópico húmedo. *Memorias III Seminario Internacional de Parasitología Animal*; 1995 agosto 24-26; Acapulco (Guerrero) México. 1995:147-148.
- 24.- Barre N. Mesures agronomiques permettant une diminution des populations de la tique *Revue Elev. Med Vet Pays Trop* 1988; 41 (4): 387-393.
- 25.- Valencia AM. Comparación de los métodos de diagnóstico de resistencia en garrapatas por inmersión de hembras adultas e impregnación de larvas (Informe Final de Servicio Social Legal) México: UAM, 2004.
- 26.- George JE. Present and Future Technologies for Tick Control. *Ann NY Acad Sci* 2000; 916: 583-588

- 27.- Ortíz EM. Métodos de control en garrapatas. Memorias del curso de Identificación y Diagnóstico de enfermedades hemoparasitarias que transmiten. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Hidráulicos. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 1989: 45-49.
- 28.- Nolan J. Current developments on resistance to amidine and phytretoid tickicides in Australia. In: Whitehead, G.B., Gibson, J.D., Tick biology and control. Rhodes-Grahamstown University, South Africa 1982:109-114
- 29.- Prado OM. Evaluación *in vitro* de la eficacia de nuevos carbamatos en garrapatas *Boophilus microplus*. (Tesis de Maestría). Cuautitlán (Estado de México) México: FES – Cuautitlán, 2009.
- 30.- García PA, Barral M. Métodos de control de las garrapatas [página de internet]. México [descargado el 10 de noviembre de 2012 ; citado el 2 de abril de 2013]. Disponible en: <http://74.125.47.132/search?q=cache:rjTrxCKHabwJ:bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/S4aeb584f/d586473/M%C3%A9todos%20de%20control%20de%20las%20garrapatas.doc+cipermetrina+garrapatas&cd=44&hl=es&ct=clnk&gl=mx> 1999.
- 31.- Mejía EF, García VZ, Rosario CR. Control de garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a piretroides en el municipio de Pichucalco. [página de internet]. Chiapas. [descargado el 20 de noviembre de 2009; citado el 2 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.ammveb.net/XXVIII%20CNB/memorias/parasitarias/par02.doc>
- 32.- Neri OS, Martínez IF, Osorio MJ. Curso Importancia económica, biología, control, diagnóstico de resistencia en garrapata *Boophilus microplus*, mosca del cuerno *Haematobia irritans* y helmintos gastroentéricos en bovinos. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Dirección General de Salud Animal. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. 2001

- 33.- Bittencourt VR. Trials to Control South American Ticks with Entomopathogenic Fungi. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 916: 555-558
- 34.- Camillo G, Vogel FF, Sangioni LA, Cadres GC, Ferrari R. *In vitro* evaluation of acaricide efficacy against bovine ticks in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Cien Rur* 2009; 39 (2): 490-495
- 35.- Alonso DMA, Rodríguez VR, Fragoso SH, Rosario CR. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch Med Vet* 38 2006; 2: 105-113
- 36.- Sutherst RW. El manejo de resistencia a acaricidas en la garrapata del Ganado *B. microplus* (acari-ixodidae) en Australia. *B Entomol Res* 1979; 69: 519-537.
- 37.- Miller TA. Mechanism of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitol Today* 1998; 4: 8-12.
- 38.- Metcalf R L. Insect resistance to insecticides. *Pesticide Sci* 1989; 26, 333-358.
- 39.- Liu NJ, Scott G. Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochem Molec* 1998; 28, 531-535.
- 40.- He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW. Molecular cloning and nucleotide sequence of a new P450 gene, CYP319A1, from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Molec* 2002; 32, 303-309.
- 41.- Scott JG, DG Cochram, Siegfried BD. Insecticide toxicity, synergism and resistance in germma cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* 1990; 83, 1698-1703.
- 42.- Loughney KR, Kreber B, Ganetzky H. Molecular analysis of the *para* locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cellular* 1989; 58:1143-1148.
- 43.- Nolan J. Current developments on resistance to amidine and pyretroid tickicides in Australia In: Whitehead GB and Gibson JD, editors. *Tick biology and control*. South Africa: Univ. Rhodes-Grahamstown, 1981: 109-114.

- 44.- Kemp DH, Thulner F, Gale KR, Nari A, Sabatini GA. Acaricide resistance in the cattle ticks *Boophilus microplus* and *Boophilus decoloratus*. Report to the Animal Health Services: FAO 1998: 1-32.
- 45.- Angus BM. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int J Parasitol 1996; 26: 1341-1355.
- 46.- Kunz SE, Kemp DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Review Scientific Technology. OIE 1994;13:1249-1286.
- 47.- Álvarez V, Bonilla R, Chacón I. Situación de la resistencia de la garrapata *B. microplus* (Canestrini, 1887) a organofosforados y piretroides en Costa Rica. Rev Cien Vet 1999; 22: 41-60.
- 48.- Benavides OE, Romero NA, Rodríguez BJ. Situación actual de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas en Colombia. El diagnóstico de resistencia. Carta Fedegan 1989; 61:13-18.
- 49.- Betancourt E A. Susceptibilidad de varias cepas de la garrapata *Boophilus microplus* a diferentes acaricidas. Rev Cebú 1993; 22: 53-55.
- 50.- Farías NA. Situación de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* en la región sur de Río Grande del Sur de Brasil. Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal; 1999 septiembre 12-16 ; Puerto Vallarta (Jalisco) México. 1999: 25-30
- 51.- Gomes A, Hooper MR, Schenk MA, Curvo JM. Populations of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on purebred Nelore, Ibagá and Nelore x European crossbreds in the Brazilian savanna. Trop Anim Health Pro 1989; 21: 21-24.
- 52.- Furlong J. Diagnóstico de la susceptibilidad de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas en el estado de Minas Gerais, Brasil. Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Puerto Vallarta (Jalisco) México. 1999: 41-46.

- 53.- Rodríguez VM, Mellor ML, Guerra AA, Barrios PH, Salazar RI, Rodríguez LA. Situación de la resistencia de las garrapatas a los acaricidas en Cuba. Uso de la lucha integrada como estrategia. Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Puerto Vallarta (Jalisco) México. 1999: 57-63.
- 54.- Ortiz EM, Santamaría VM, Ortiz NA, Soberanes CN, Osorio MJ, Franco BR, Martínez IF, Quezada DR, Fragoso SH. Caracterización de la resistencia de *Boophilus microplus* a ixodicidas en México. Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal, Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria. Acapulco (Guerrero) México. 1995: 58-66.
- 55.- Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arévalo F, Fragoso-Sánchez H, Santamaría VM, R Rosario-Cruz. Prevalence and potential risk factors for organophosphates and pyrethroids resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol* 2005; 136: 335-338
- 56.- Fragoso SH, Soberanes CN. Control de la resistencia a los ixodicidas a la luz de los conocimientos actuales. Memorias de XXV Congreso Nacional de Buiatria. Veracruz (Veracruz) México. Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos, A.C. 2001:40-48.
- 57.- Goeters FR, Tabashnik BE. Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance. *J Econ Entomol* 2000; 93:1580-1587
- 58.- Jamroz RC, Guerrero FD, Pruett JH, Oehler DD, Miller RJ. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Insect Physiol* 2000; 46: 685-695
- 59.- Muro CF, Cruz-Vázquez C, Fernández-Ruvalcaba M, Molina TJ. Efecto repelente de *Melinis minutiflora* sobre larvas de la garrapata *Boophilus microplus*. *Vet Mex* 2004; 35 (2): 135-159

- 60.- Norma Oficial Mexicana NOM-006-ZOO-1993, requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y método de prueba [página de internet]. México: SENASICA [descargado el día 10 de abril de 2013; citado el 15 de abril de 2013]. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=532>
- 61.-Cen AJ, Rodríguez VR, Dominguez AJ, Wagner G. Studies on the effect on infection by *Babesia spp* on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 1998; 78: 253-257.
- 62.- Muro CF, Cruz-Vázquez C, Fernández-Ruvalcaba M, Molina TJ. Efecto repelente de *Melinis minutiflora* sobre larvas de la garrapata *Boophilus microplus*. *Vet Mex* 2004; 35 (2): 135-159
- 63.- Redondo M, Fragoso H, Ortiz M, Montero C, Lona J, Medellín JA, Frías R, Hernández V, Franco R, Machado H, Rodríguez M, De La Fuente J. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac, and amidine treatments. *Exp Applied Acarol* 1999; 23: 841-849.
- 64.-Regassa AJ, De Castro. Tick resistance to a acaricides in Western Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 1993; 25:69-74
- 65.-Riddles PW, Nolan J. Prospects for the management of arthropod resistance to pesticides. In: *Proceedings ICOPA*; 1986: 673-687.
- 66.- Rodríguez VM, Mellor ML, Guerra AA, Barrios PH, Salazar RI, Rodríguez LA. Situación de la resistencia de las garrapatas a los acaricidas en Cuba. Uso de la lucha integrada como estrategia. *Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal*; 1999 Octubre 20-22; Puerto Vallarta (Jalisco) México.1999: 57-63.
- 67.-Schmutter H. Properties and potencial of natural pesticides from neem tree, *Azadirachta indica*. *Annu Rev Entomol* 1990; 35: 2168-2174
- 68.- Stendel W. The relevance of different test methods for the evaluation of tick controlling substances. *J South African Vet Assoc* 1980; 51:147-152

- 69.- Wilson CS, Ricardo SM, Menezes SH, Cesio MV, Mato M, Albrecht F, Monteiro BN. Toxicity of *Piper aduncum* from the amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitology* 2009; 164:267- 274
- 70.- Burns DT, Dalgarno BG, Gargan PE, Grimshaw J. An isoflavone and a coumestan from *eysenhardtia polystachya* Robert Boyle's fluorescent acid-base indicator. *Phytochemistry* 2001;23: 167-169.
- 71.- Rosado AJ, Aguilar CA, Rodríguez VR, Borges A, García VG, Méndez GM, Cazares FM, Dorantes EA. Actividad ixodocida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Trop subtrop Agroecosyst* 2008; 8: 297-301
- 72.- Ghosh S, Azhahianambi P, Yadav MP. Upcoming and future strategies of tick control: a review. *J Vector Borne Dis* 2007; 44 (2): 79-89.
- 73.- Thakur GT, Chiguve GM, Shirsikav PM, Khillare BS, Jayrav AK. In vitro trial of chemical and herbal acaricides against *Boophilus microplus* ticks. *Roy Vet J Ind* 2007; 3 (2): 142-146
- 74.- Sardá-Ribeiro V, Toigo E, Bordignon S, Goncalvez C, Von Poser G. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 2007; 147: 199-203
- 75.- Duarte MO, Ferrarini SR, Pazinato M, Oliveira ER, Rolim V, Eifler-Lima VL, Ribeiro VL, Poser GV. Acaricidal activity of the hyacinthacine analogues derived from pyrrolizidine alkaloids on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* 2008; 103 (3): 723-726
- 76.- Pirali KK, Razzaghi AM, Halajian A. Acaricidal effect of the *Pelargonium roseum* and *Eucalyptus globulus* essential oils against adult stage of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* in vitro. *Vet Parasitol* 2009; 162 (3/4) : 346-349.

- 77.- Rahul S, Ghosh S, Mandal DB, Azhahianambi P, Singhal PS, Pandey NN, Swarup D. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. *Parasitol Res* 2008; 104 (1): 149-153
- 78.- Ghosh S, Azhahianambi P, Yadav MP. Upcoming and future strategies of tick control: a review. *J Vector Borne Dis* 2007; 44 (2): 79-89.
- 79.- *Eysenhardtia Polystachya*. México: CONABIO [descargado el 10 de diciembre de 2012; citado 20 de Abril de 2013]. Disponible en: www.conabio.gob.mx
- 80.- Burns DT, Dalgarno BG, Gargan PE, Grimshaw J. An isoflavone and a coumestan from *Eysenhardtia polystachya*—Robert Boyle's fluorescent acid—base indicator. *Phytochemistry* 2001(23):167-169
- 81.- Mier OE, *et tal.* Actividad antimicrobina de los extractos de *Eysenhardtia polystachya* texana. Memorias del congreso nacional de ciencias de los alimentos; 2006 junio 1-2; Monterrey N.L. México. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-14-2006/documentos/Art76.pdf>
- 82.- Palo Dulce. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana [página de internet]. México: Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana [descargado el día 16 de Agosto de 2010; citado el 10 de Noviembre de 2010]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7734>
- 83.- Acuña U, Amat F, Liras M, Rodríguez B. Structure and Formation of the Fluorescent Compound of *Lignum nephriticum*. *Org Lett* 2009; 11(14):3020-3023
- 84.-Pérez R, Vargas R, García L, Dávila B. Efecto de isoflavonas aisladas de la corteza de *Eysenhardtia polystachya* sobre el crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio urinario. *Bol Col Mex Urol* 2002; 17(3):167-74

- 85.- Álvarez L, Ríos Y, Esquivel C, Chávez I, Aguilar I, Navarro V. Cytotoxic Isoflavans from *Eysenhardtia polystachya*. J Nat Prod 1998; 61:767-70.
- 86.- Escamilla JCI, Cuevas MEY, Guevara FJ. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Rev Fac Med UNAM 2009; 52(2):73-75.
- 87.- Beltrami E, Bernardi M, Fronza G, Mellerio G, Vidari G, Vita P. Coatlina A and B, two C-glucosyl- α -hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. Phytochemistry 1982; 21(12): 2931-33.
- 88.- Pérez TG. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cubana Invest Bioméd. 2003; (22): 48-57.
- 89.- Pietta, PG. Flavonoids as Antioxidants. J Nat. Prod 2000; 63: 1035-1042.
- 90.- Hughes, D.A. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. P Nutr Soc 1999; 58: 79-84.
- 91.- Pérez TG. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. Rev Cubana Invest Bioméd 2003; (22): 48-57.
- 92.- Grassi D, Desideri G, Ferri C. Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. Nutrients 2010; 2: 889-902.
- 93.- Grotewold E. The science of flavonoids. Estados Unidos de América: Springer Science + Business Media, 2006: 1-4.
- 94.- Bruneton, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. Francia: Lavoisier Publishing, 1995: 266-296
- 95.- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remésy C. Dietary polyphenols and the protection of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr 2005; 45: 287-306.
- 96.- Alvarez L, Delgado G. C- and O-Glycosyl- α -hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. Phytochemistry 1999; 50:681-687.

- 97.- Stone B, Haydock K. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus*. *Entomol Res* 1972; 53:563-578.
- 98.-Shaw RD. Culture of an organophosphorus resistant strain of *B. microplus* and an assessment of its resistance spectrum. *B Entomol Res* 1966; 56: 389-405.
- 99.- Drummond O, Ernest E, Treviño L, Gladney J, Graham H. Test of acaricides for control of *Boophilus annulatus* y *Boophilus microplus*. *J Econ Entomol* 1976; 69: 37-40
- 100.- Amaral NK. Guideles for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1987) (Acari:Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet* 1991; 2:144-151
- 101.- Sumano LH. *Farmacología Veterinaria*. 3^{er} ed. México: Mc Graw Hill, 2006.
- 102.-Labadie RP. Problems and possibilities in the use of traditional drugs. *J Ethnopharmacol* 1986; 15:221-230.
- 103.- Pérez GRM, Vargas SR, Pérez GS, Zavala SM. Antirolithiatic activity of *Eysenhardtia polystachya* aqueous extract on rats. *Phytotherapy Research* 1998; 12: 144
- 104.- Zavala M A., Pérez GS, Pérez GR. Antimicrobial screening of some medicinal plants. *Phytotherapy Research* 1997; 11 (5): 368-371.
- 105.- Álvarez L, Ríos Y, Esquivel C, Chávez I, Aguilar I, Navarro V. *Cytotoxic Isoflavans from Eysenhardtia polystachya*. *J Nat Prod* 1998; 61:767-70.
- 106.- Avendaño C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid, 2001.
- 107.- Sharapin N. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. CYTED, Bogotá, 2000.
- 108.- López BFJ. *Desarrollo de un nuevo método de electroforesis capilar de zona para el análisis de extractos de Eysenhardtia polystachya* (tesis de licenciatura). Santo Domingo Tehuantepec (Oaxaca) México: Univ del Itsmo, 2009.