



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación *in vitro* de la eficacia ixodocida del extracto
acuoso de palo azul (*Eysenhardtia polystachya*) y dos de sus
componentes (Coatlinas y Matlalinas) sobre larvas de
Rhipicephalus (Boophilus) microplus.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALEJANDRO CONTRERAS HERNÁNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. YAZMIN ALCALÁ CANTO
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1.-Datos del alumno

Contreras

Hernández

Alejandro

56813238

Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Ciencias.

Biología.

409081512

2.- Datos del tutor

Dra.

Yazmin

Alcalá

Canto

3 Datos del sinodal 1.

Dr.

Adolfo

Andrade

Cetto.

4 Datos del sinodal 2

Dr.

Juan Antonio

Castillo

Figuroa.

5 Datos del sinodal 3

Dra.

Irene

Cruz

Mendoza.

6 Datos del sinodal 4

M en C.

Ramiro

Cruz

Durán.

7.- Datos del trabajo escrito

Evaluación *in vitro* de la eficacia ixodicida del extracto acuoso de palo azul (*Eysenhardtia polystachya*) y dos de sus componentes (Coatlinas y Matlalinas) sobre larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

60 p

2015

Agradecimientos

A la Dra. Yazmin Alcalá Canto por brindarme la confianza y su apoyo en los momentos difíciles durante la realización de éste proyecto, el cual representa el esfuerzo de tutora-alumno. Gracias por caminar conmigo paso a paso, tenderme la mano y respaldarme.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto, al Dr. Juan Antonio Castillo F., a la Dra. Irene Cruz M. y al M en C. Ramiro Cruz Durán por las acertadas correcciones durante la revisión de éste trabajo.

Al Dr. Fausto Rivero Cruz por el material brindado para la realización del proyecto.

A la futura Dra. María Eugenia, conocida como Maru, gracias por todo tu apoyo brindado, no cabe duda que serás una buena investigadora.

Al futuro Dr. Ignacio por todo el apoyo brindado.

A la UNAM.

Dedicatoria

A mi madre por apoyarme desde aquel lugar a donde todos iremos algún día, aquel lugar del que solo se habla pero no se conoce.

A mi mamá-hermana-amiga-mi todo, Alma Contreras por creer y apoyarme en cada paso, cada etapa, no tengo como pagarte ni como agradecer todo lo que haces por mí.

A mi hermana Brenda por ser mi compañera de vida (faltan muchas cosas, siempre tendré a mi lado a mi “*botín de oro*”). A mis demás hermanos Abel, Octavio y Yeni, por esas alegrías, tristezas y enojos compartidos.

A mi sobrinito Demián, aunque grandote siempre será mi bebé.

A mi Amo por demostrar tanta valentía ante semejante enfermedad.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias (Iván, Monse...y demás compañeros de cuyo nombre no puedo acordarme).

A Natalia

Resumen

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* constituye un serio problema para la ganadería mundial debido a los efectos directos e indirectos que ocasiona. El control de éste ectoparásito se realiza mediante compuestos ixodicidas, el uso inadecuado de estos productos ha ocasionado la generación de cepas resistentes, por lo que es necesario que se busquen nuevos agentes ixodicidas, los extractos vegetales y sus compuestos bioactivos brindan nuevas posibilidades de control. En el presente trabajo de investigación se evaluó la actividad ixodicida del extracto acuoso de palo azul (*Eysenhardtia polystachya*) y dos de sus componentes Coatlinas y Matlalinas sobre larvas de *R. (B.) microplus* (resistentes a Amitraz) en condiciones *in vitro* mediante la prueba de paquete larvario, utilizando diluciones al 0.0625%, 0.125%, 0.25%, 0.5% y 1%, obteniendo como resultado mortalidades promedio que van de 39.33%, 48.33%, 56.63%, 85.32% y 93% con el extracto acuoso de palo azul; las Coatlinas arrojaron mortalidades promedio que van de 0%, 0.67%, 1.33%, 3.33% y 5.67%, mientras que las Matlalinas evidenciaron mortalidades promedio que van de 63%, 80.67%, 86.33%, 87.67% y 98.67%. Con las mortalidades obtenidas se realizó una ANOVA, posteriormente se realizó un análisis de comparación múltiple en donde las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se determinaron mediante la prueba de Tukey. Las mortalidades se compararon por medio del análisis Probit para determinar la CL_{50} de cada uno de los compuestos evaluados, las Matlalinas demostraron tener una CL_{50} de 630.28, la cual fue menor en comparación con las Coatlinas y el extracto acuoso de palo azul que mostraron CL_{50} de 1608.32 y 3173.71 respectivamente, con un límite de confianza de 95%. Por lo que se puede concluir que las Matlalinas son las que presentan un efecto ixodicida significativo en comparación con las Coatlinas y el extracto acuoso de palo azul.

Palabras clave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Eysenhardtia polystachya*, Coatlinas, Matlalinas, extracto, ixodicida.

Contenido

Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Resumen	iv
1 Introducción.....	1
1.1 Generalidades de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888). (Acari: Ixodidae).	2
1.1.1 <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888). (Acari: Ixodidae)...	2
1.1.2 Clasificación taxonómica.	2
1.1.3 Morfología.	3
1.1.4 Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	6
1.1.5 Control de garrapatas.	11
1.1.6 Control químico y no químico.	11
1.1.7 Resistencia.	15
1.1.8 Resistencia en México.	17
1.1.9 Ixodicidas empleados en México.	18
1.1.10 Amidinas.	18
1.1.11 Situación de la garrapata en México.	19
1.1.12 Daños directos e indirectos.	21
1.2 Generalidades de <i>Eysenhardtia polystachya</i> (Ortega) Sarg. (Leguminosae).	22
1.2.1 <i>Eysenhardtia polystachya</i>	22
1.2.2 Distribución de <i>Eysenhardtia polystachya</i>	24
1.2.3 Nombres comunes.	25
1.2.4 Usos de <i>Eysenhardtia polystachya</i>	25
1.3 Flavonoides.	27
1.3.1 Propiedades.	27
1.3.2 Composición química de <i>Eysenhardtia polystachya</i>	28
1.3.3 Chalconas.	28
1.3.4 Descomposición de Coatlina B a Matlalina.	29
2 Justificación.	30
3 Hipótesis.	31
4 Objetivos.	31
4.1 General.	31
4.2 Particulares.	31
5 Material biológico.	32

5.1	Vegetal.....	32
5.2	Animal.....	32
6	Metodología.....	33
6.1	Evaluación in vitro de los compuestos mediante la Prueba de paquete larvario (PPL). ...	33
6.2	Preparación de la concentración inicial o solución madre de los compuestos experimentales.....	34
6.3	Armado de paquetes.....	35
6.4	Impregnación de papeles filtro.....	35
6.5	Llenado de Paquetes.....	36
6.6	Incubación.....	37
7	Análisis de datos.....	37
8	Resultados.....	38
9	Discusión.....	44
10	Conclusión.....	46
11	Referencias.....	47
	Anexos.....	52
11.1	Pruebas post hoc.....	52

1 Introducción

Las garrapatas se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta y se han especializado en alimentarse de la sangre de mamíferos, aves y reptiles (Domínguez *et al.*, 2010); son los ectoparásitos hematófagos más importantes del ganado en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (Prado, 2013). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Murrell y Barker, 2003) es la especie de garrapata más importante en estas áreas ya que se le considera el ectoparásito más importante de los bovinos, debido a que causa grandes daños a la ganadería de pastoreo (Díaz, 2012), estos se dividen en directos e indirectos. En los efectos directos se encuentra el daño a las pieles por la acción de picaduras, pérdida de sangre y disminución de parámetros productivos (Alonso *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2006 a; Rodríguez *et al.*, 2011 b; Rodríguez *et al.*, 2012). El efecto indirecto está dado por la transmisión de agentes infecciosos como: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* (Rosado *et al.*, 2008 a; Domínguez *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2012).

En el ámbito mundial la estrategia para controlar a estos ectoparásitos ha sido a través de ixodicidas químicos (Rodríguez *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2010 a; Rodríguez *et al.*, 2012); sin embargo, su uso continuo e irracional está propiciando la generación de cepas de garrapatas resistentes (Rosado *et al.*, 2008 a). En México la resistencia de las garrapatas a los acaricidas es reconocida en varios estados, principalmente en el trópico mexicano (Rosado *et al.*, 2010 a).

Los acaricidas comerciales causan daños ecológicos y generalmente son tóxicos para los humanos (Rosado *et al.*, 2008 a). Sin embargo, los acaricidas a base de plantas suelen ser de baja toxicidad y no producen efectos residuales ya que son solubles en agua, además de que presentan una baja incidencia en desarrollar cepas resistentes (Rosado *et al.*, 2010 a). Debido a esto es necesario que se empleen productos de origen natural que mitiguen los efectos negativos en el animal y el medio ambiente.

Existen evidencias de la actividad ixodida de extractos de plantas a nivel mundial (Ibarra *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2011; Rosado *et al.*, 2008 a), esto ha provocado el interés por investigar la presencia de principios farmacológicos en aquellas plantas, que por tradición popular, son reconocidas en estudios de etnobotánica (Rodríguez *et al.*, 2010 b), tal es el caso de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg, (Leguminosae). El extracto de dicha planta presenta actividad ixodida sobre larvas de *R. (B.) microplus*, la actividad está relacionada con la fluorescencia azul que presenta el extracto acuoso (Alcalá *et al.*, 2015).

1.1 Generalidades de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888). (Acari: Ixodidae).

1.1.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888). (Acari: Ixodidae)

Debido a su gran capacidad de adaptación y propagación, las garrapatas se han podido extender en diversas áreas geográficas de todo el mundo (Ojeda *et al.*, 2011).

La garrapata *R. (B.) microplus*, es originaria del continente asiático y de la isla de Java, pudo ser introducida en la mayoría de los países tropicales y subtropicales a través de la importación del ganado. Su presencia ha sido descrita en varios continentes (Cortés *et al.*, 2010), tales como Oceanía, Este y Sur de África y América (Prado, 2013); en éste último se encuentra distribuida desde México hasta el norte de Argentina (Cortés *et al.*, 2010).

1.1.2 Clasificación taxonómica.

La clasificación taxonómica de las garrapatas tradicionalmente se ha hecho mediante el empleo de técnicas convencionales basadas en las características morfológicas, biológicas y ecológicas (Domínguez *et al.*, 2010). Las garrapatas se dividen, por sus características morfológicas, en tres familias: *Ixodidae*, conocidas como garrapatas duras, *Argasidae* o garrapatas blandas (Rodríguez *et al.*, 2014) y *Nuttalliellidae*, representada por el género

monoespecífico *Nuttalliella*, que posee características intermedias de las dos familias principales (Domínguez *et al.*, 2010, Rodríguez *et al.*, 2011 a; Vásquez *et al.*, 2011). Se reconoce la existencia de un total de 899 nombres que integran la lista de garrapatas identificadas a nivel mundial. En la familia *Ixodidae* con 713 especies, se encuentra el género *Rhipicephalus*, con 79 especies (incluidas las 5 de *Boophilus*) (Ojeda *et al.*, 2011; Domínguez *et al.*, 2010, Murrell y Barker, 2003). Entre las especies de mayor importancia se encuentra a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Vásquez *et al.*, 2011) (Figura 1).

Phylum: Arthropoda.
Clase: Arachnida.
Orden: Acarina.
Suborden: Metastigmata.
Familia: Ixodidae
Género: <i>Rhipicephalus</i>
Subgénero: <i>Boophilus</i>
Especie: <i>microplus</i> .

Figura 1. Clasificación taxonómica de *R. (B.) microplus* (tomado de Guglielmone *et al.*, 2014)

1.1.3 Morfología.

El cuerpo de la garrapata se divide en una región anterior llamada gnatosoma (capitulum) y una región posterior llamada idiosoma (Prado, 2013).

El gnatosoma presenta una base hexagonal en vista dorsal, no presenta ornamentaciones (Vásquez *et al.*, 2011), comprende las partes bucales de la garrapata (Prado, 2013). En el gnatosoma existe una proyección en la parte media llamada hipostoma sobre la que se encuentran dorsalmente un par de quelíceros esclerotizados y bisegmentados que se utilizan para la perforación. El hipostoma presenta una doble fila de dientes curvos (4/4), en posición dorsal y lateral se presentan los palpos los cuales son muy cortos y anillados, éstos se componen de 4 segmentos (Vásquez *et al.*, 2011; Prado, 2013). El gnatosoma en su porción dorsal presenta áreas porosas presentes en hembras y ausente en machos (Rodríguez *et al.*,

2011 a). Su cuerpo o idiosoma es de forma ovalada, presenta un escudo (scutum) con forma de lengüeta y es de color café, en larvas y hembras es corto mientras que en machos es largo. Es una característica taxonómica de la familia *Ixodidae* (Prado, 2013). En la superficie ventral de las garrapatas se localizan las placas ventrales, el orificio genital, el ano, espiráculos, surco anal; no distinguible o ausente en hembras y tenue en machos. Los machos presentan placas adanales y accesorias, pueden llegar a presentar estructuras caudales (Vásquez *et al.*, 2011) (Figura 2 y figura 3).

Las larvas de las garrapata de *R. (B.) microplus* se caracterizan porque poseen tres pares de patas (hexápodos), carecen de placas estigmas y orificio genital (Prado, 2013) (Figura 4).

Las garrapatas adultas presentan cuatro pares de patas que se articulan con el cuerpo mediante una estructura llamada coxa. Cada pata está dividida en seis segmentos (coxa, trocánter, fémur, patella, tibia y tarso). La coxa está insertada de forma vertical al cuerpo y permite rotación limitada. Cada tarso presenta un par de garras y una almohadilla (Schleske, 2011).

Es necesario señalar que esta especie presenta dimorfismo sexual en donde el macho es de menor tamaño que la hembra (Cupp, 1991).

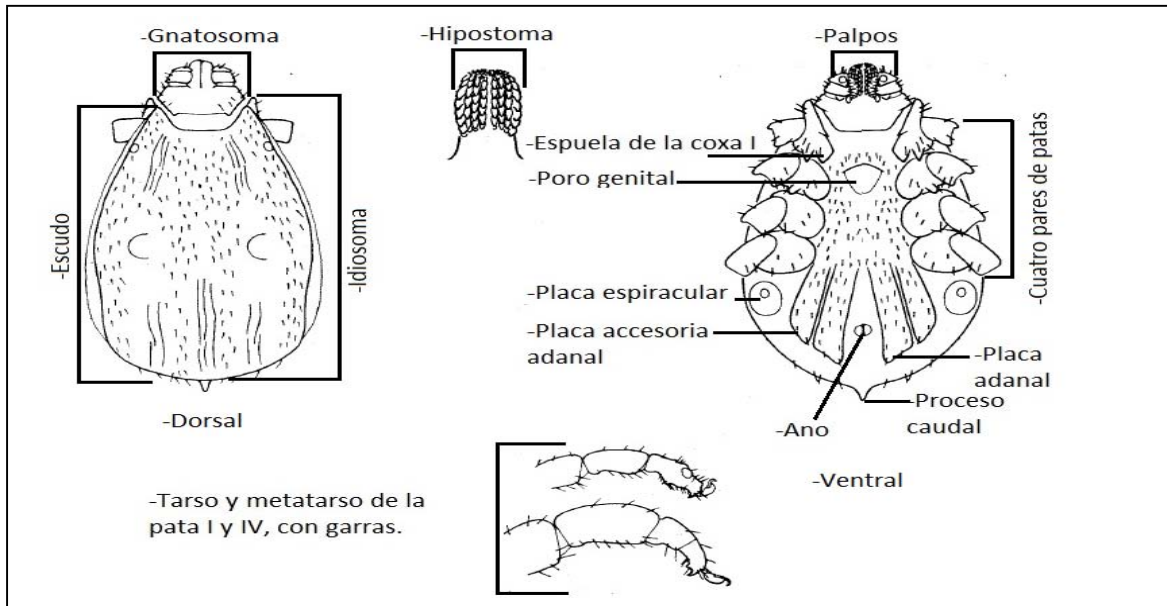


Figura 2. Vista dorsal y ventral de la morfología externa del macho de *R. (B.) microplus*. (Tomado de Cooley *et al.*, 1946).

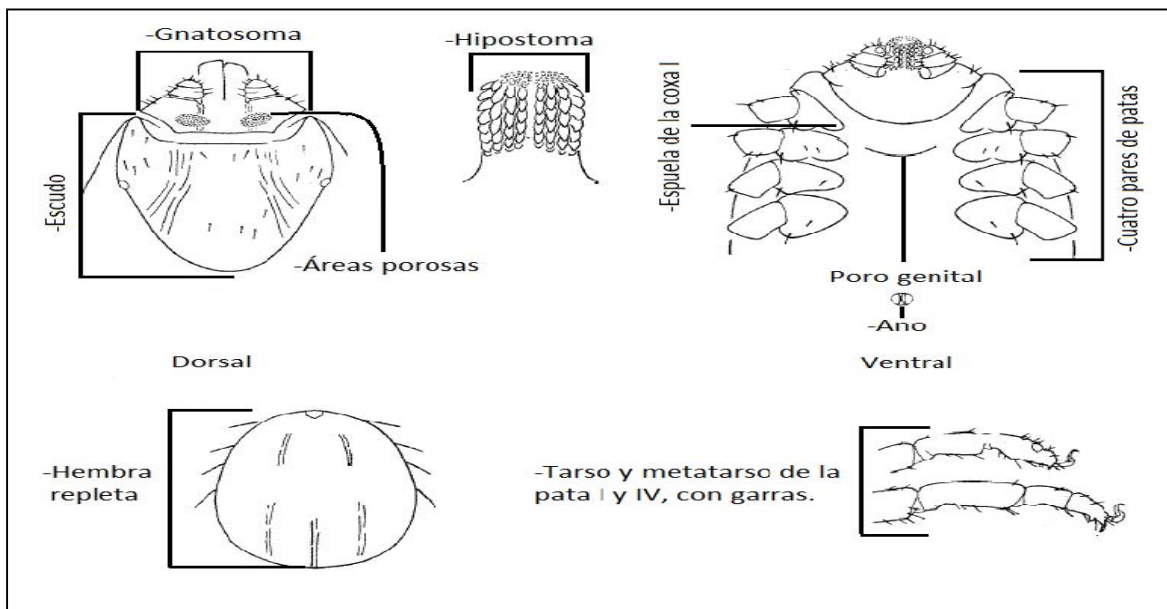


Figura 3. Vista dorsal y ventral morfología externa del hembra de *R. (B.) microplus*. (Tomado de Cooley *et al.*, 1946).

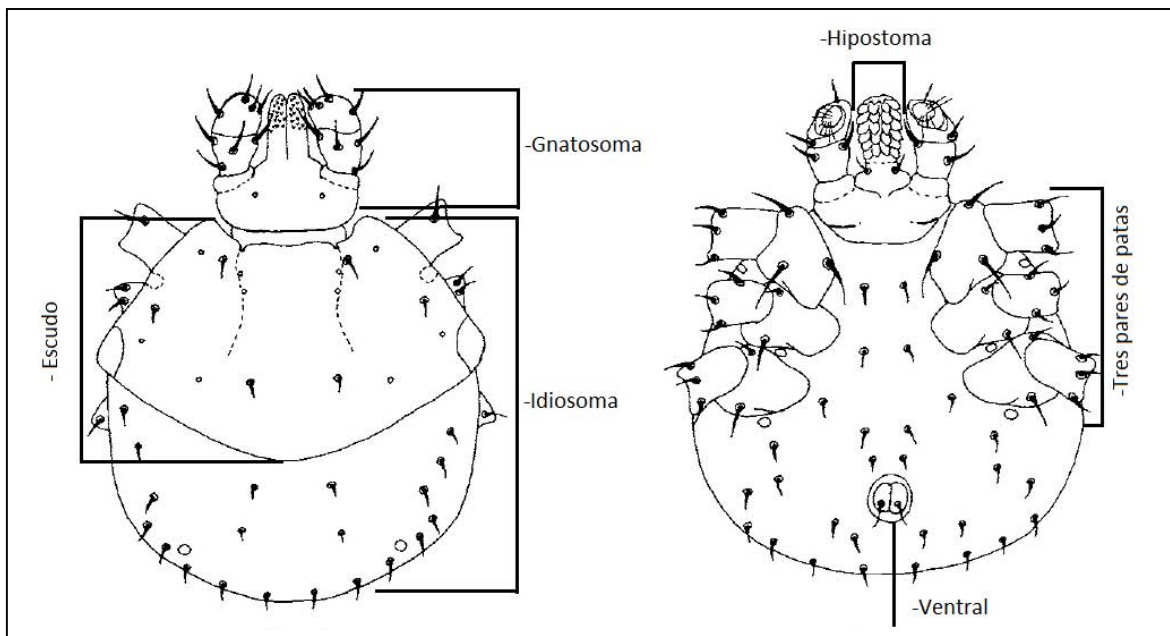


Figura 4. Vista dorsal y ventral de la morfología externa de la larva de *R. (B.) microplus*. (Tomado de Clifford, 1961).

1.1.4 Ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Los seres vivos adaptados a una asociación biológica como el parasitismo, cumplen su ciclo de vida en dos etapas: una fase de vida no parasítica o ciclo de vida libre que se completa en el suelo como forma larval y una fase parasítica sobre el hospedero (Gallardo y Morales, 1999).

A lo largo de su vida las garrapatas ixódidas pasan por diferentes estadios. Comienzan con el huevo, larva, ninfa y adulto, pasando la mayor parte de su tiempo alejadas de sus depredadores, refugiadas en las madrigueras/nidos de sus hospedadores o en el suelo y la vegetación, a la espera de alimentarse (Manzano *et al.*, 2012). El ciclo de *R. (B.) microplus* es monoxeno; se caracteriza por la utilización de un solo hospedero para completar su desarrollo (Prado, 2013) (Figura 5).

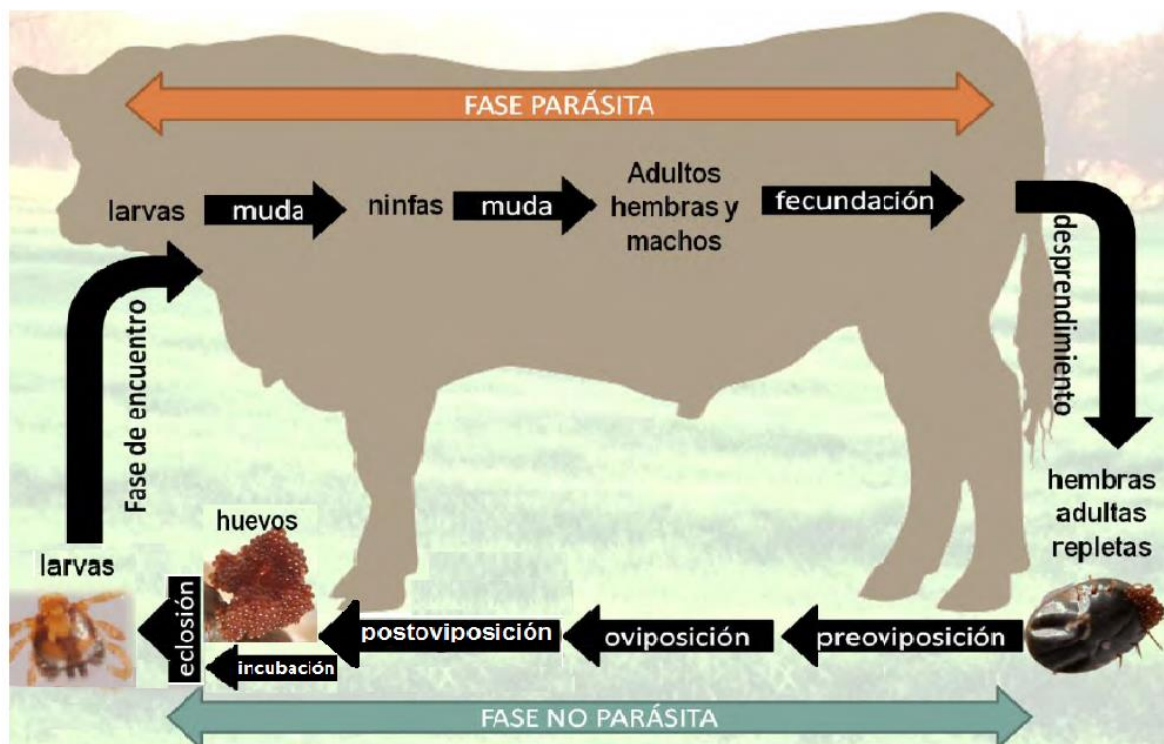


Figura 5. Ciclo biológico *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (Tomado de Prado, 2013).

- Fase no parásita

La fase no parásita abarca desde el desprendimiento de la hembra de su hospedero hasta la aparición de las larvas en la vegetación (Gaxiola, 2008)

Preoviposición: inicia en el momento en que la hembra repleta se desprende y cae al suelo, se mueve en busca de un lugar protegido y con sombra para poner huevos; esta etapa dura aproximadamente de 2 a 4 días en verano y de 20 a 23 días en invierno (Rodríguez *et al.*, 2011 a)

Oviposición: este periodo comienza con la puesta del primer huevo hasta el último por la hembra repleta. En cuanto al número de huevos, la media de la oviposición es de 2500-3000, con un rango de aproximado entre 1000 y 4500. La ovoposición dura en verano de 5 a 15 días, en invierno este período se duplica o triplica en condiciones externas. Este periodo

puede verse afectado por factores ambientales como la radiación solar directa, la cual puede destruir los huevos (Rodríguez *et al.*, 2011 a)

Postoviposición: Es el período desde la puesta del último huevo hasta la muerte de las hembras adultas repletas, después de haber llevado a cabo su función. La duración de este período varía de 5 a los 15 días (Rodríguez *et al.*, 2011 a)

Incubación: Es el período que abarca desde que los huevos han sido depositados en el ambiente hasta su eclosión. La evolución del embrión está influenciada por el ambiente, principalmente por la temperatura y la humedad; especialmente por la temperatura. El tiempo promedio de días para la incubación en verano va de los 26 a los 32 días, mientras que en invierno va de los 69 a 74 días. Las condiciones de incubación óptimas, donde se obtienen mejores porcentajes de eclosión están entre los rangos de 24.9 a 35° C a una humedad relativa de 80-90% (Rodríguez *et al.*, 2011 a).

Eclosión: En este período la larva emerge del huevo. La eclosión puede verse afectada por la radiación solar. Los mejores porcentajes de eclosión se obtienen en temporadas que tienen una temperatura óptima de 25-35 °C y una humedad relativa del 95%. El porcentaje de eclosión bajo condiciones de laboratorio es muy alto, casi siempre es superior al 80% (Rodríguez *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2011 a).

Larva de vida libre: De los huevos nacen larvas hexápodas de aproximadamente 0.50 mm de largo y 0.40 mm de ancho; tienen forma ligeramente oval. Al inicio son de color ámbar y con el paso del tiempo cambian a rojo oscuro (Rodríguez *et al.*, 2011 a). Las larvas se alimentan de la sustancia vitelina (Estrela *et al.*, 2007).

Después de haber eclosionado, la larva sube por la hierba hasta llegar al extremo superior de la misma (geotropismo negativo), en esa parte de las hierbas o pastos se localizan grandes cantidades de larvas, preferentemente en el lado sombreado de las hojas en espera de un hospedero susceptible (Rodríguez *et al.*, 2011 a). La búsqueda de huésped es característica de los estadios post-embrionarios de los ixódidos, a esta fase se le conoce como la fase de

encuentro. Las larvas se mueven durante el transcurso del día evadiendo, en lo posible, la radiación solar directa. En campo abierto, las larvas pueden distribuirse desde los 30 a 80 m, así como el transporte casual por otros huéspedes no adecuados puede abarcar desde los 30 m hasta los 0.8 km (Gaxiola, 2008).

- Fase parásita:

La fase parásita abarca desde la fijación al huésped como larva hasta el desprendimiento como hembra repleta; en esta fase se lleva a cabo el proceso de muda, alimentación y cópula (Gaxiola, 2008). El tiempo que dura el ciclo parasítico de la garrapata *R. (B.) microplus* tiene pequeñas variaciones, presenta un rango de 18 a 22 días (Rodríguez *et al.*, 2011 a; Ibarra *et al.*, 2012).

Las larvas de *R. (B.) microplus* detectan al huésped mediante quimiorreceptores, los cuales perciben el bióxido de carbono que expelen el vertebrado por medio de la respiración. Cuando las larvas detectan la presencia de un huésped adoptan una posición característica, deteniéndose sobre sus patas posteriores y extendiendo el par anterior tratando de adherirse al hospedero (Rodríguez *et al.*, 2006 a). Ya sobre el hospedero, las larvas se fijan de preferencia en zonas protegidas de la radiación solar, vientre, axila, parte interna de brazo y pierna, ubre, escroto e ingle, también se pueden encontrar en cuello, hombro, papada así como en otras regiones del cuerpo del bovino (Rodríguez *et al.*, 2011 a).

El ciclo parasítico puede ser dividido en los siguientes estadios: larva, ninfa y adulto.

Larva: una vez que la larva se adhiere al hospedero perfora la piel y se alimenta, se repleta llegando a medir aproximadamente 1.0 mm de largo (Rodríguez *et al.*, 2011 a); posteriormente hay una disminución gradual de sus movimientos de las extremidades hasta la total inmovilidad: en este momento se inicia la primera muda (metalarva), una vez producida la ecdisis surge la ninfa (Gaxiola, 2008).

Ninfa: Durante esta etapa ocurren cambios morfológicos significativos, aparecen cuatro pares de patas. La ninfa fija su hipostoma a la piel del animal y se alimenta de sangre hasta repletarse. La ninfa repleta tiene forma oval y es de color gris oscuro, mide aproximadamente de 2.5 mm de largo y cerca de 4 mm al final de esta etapa (Rodríguez *et al.*, 2011 a). La ninfa paulatinamente reduce sus movimientos generando una segunda muda (metaninfa), después de la ecdisis se da origen a machos y a hembras, los cuales poseen 4 pares de patas (Gaxiola, 2008).

Adulto: Los cambios morfológicos más sobresalientes de esta etapa son los cuatro pares de patas y una doble fila de dientes (Rodríguez *et al.*, 2011 a):

- Macho: las ninfas repletas más pequeñas y oscuras se abren longitudinalmente y emergen los machos, los cuales son de color oscuro con una longitud total de 2.0 a 25 mm de largo.
- Hembra plegada: las ninfas repletas de mayor tamaño, generalmente el 50%, se transforman en hembras pubescentes denominadas hembras plegadas. Tienen forma oval aplanada de color café claro con ocho patas largas y fuertes. Miden aproximadamente 2.0mm.
- Hembras semirepletas: son las hembras que comienzan a alimentarse hasta que se fertilizan y que al aumentar su tamaño, se desprenden del hospedero como hembras repletas. Su crecimiento es lento, pero al tercer o cuarto día después de ser hembras plegadas su cuerpo se incrementa en un 80%.
- Hembras repletas (Teleogina ingurgitada): Son las hembras que concluyen su desarrollo, se desprenden del hospedero y una vez que caen al suelo buscan un lugar para poder comenzar a poner sus huevos. Se ha observado que la hembra semirepleta incrementa su tamaño de 4.0 a 6.0 mm y espera hasta la cópula, para posteriormente alcanzar el estado final de la hembra repleta. Su forma es ovoide, grisácea y mide de 7.0 a 13.00 mm de longitud y de 4.0 a 8.00 mm de ancho.

La hembra emite feromonas que atraen al macho para llevar a cabo el apareamiento. Durante la cópula el macho transfiere a la hembra el espermatóforo que contiene los espermatozoides. Las hembras se repletan de sangre durante las últimas 24 horas de infestación; se desprenden del hospedero y en el suelo inician un nuevo ciclo (Gaxiola, 2008). Si las condiciones son favorables el ciclo puede completarse en 37 días, pero en condiciones de adversidad puede prolongarse hasta 281 días (Bazán, 2002).

1.1.5 Control de garrapatas.

El control de las garrapatas consiste en romper su ciclo biológico, puede efectuarse de manera biológica, cultural y químicamente (Rodríguez *et al.*, 2011 b; Rodríguez *et al.*, 2006 a). Los métodos actuales para el control de las garrapatas implican el uso de métodos químicos (ixodicidas o garrapaticidas) y no químicos (vacunas y control biológico), y la aplicación sistemática de dos o más métodos (manejo integrado de plagas) (Rodríguez *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2012).

1.1.6 Control químico y no químico.

- Control químico

En los métodos químicos utilizados encontramos el uso de los ixodicidas, entre los que se encuentran las familias de los organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS), amidinas (Am), fenipirazolonas (Fp) y lactonas macrocíclicas (LM) (Rodríguez *et al.*, 2010 a; Rodríguez *et al.*, 2010 b; Ojeda *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2012 a).

Actualmente el control de las garrapatas se basa principalmente en el uso de productos químicos mediante la aplicación de ixodicidas (Bravo *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2012, Rodríguez *et al.*, 2014). Se lleva a cabo utilizando baños, aerosoles o productos aplicados *pour-on* (Rodríguez *et al.*, 2014; Manzano *et al.*, 2012), aplicación del tratamiento parenteral así como el tratamiento con aretes y collares impregnados (Rodríguez *et al.*, 2011 b). Sin

embargo, el uso inadecuado de esta estrategia con altas tasas de aplicación, preparación incorrecta de los animales o uso de mezclas inapropiadas de plaguicidas, ha ocasionado el desarrollo de cepas de campo resistentes al efecto de estos compuestos químicos, configurando un fenómeno presente y creciente a escala mundial (Díaz y Vallejo, 2013). Otros aspectos que se cuestionan debido al uso indiscriminado de los productos químicos es el de la contaminación ambiental, que provoca efectos sobre las poblaciones no blanco, así como peligros en la salud pública (Álvarez *et al.*, 2007).

-Uso de químicos naturales de plantas

Este método de control químico natural se basa en el uso de extractos de plantas (Rodríguez *et al.*, 2014). Se ha estudiado la eficacia de extractos de *Calea serrata* Less. (Asteraceae) para el control de *R. (B.) microplus*, obteniendo una reducción del 11 al 14% en la oviposición y 100% de mortalidad en larvas de *R. (B.) microplus* (Sardá *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2011 a; Rodríguez *et al.*, 2011 b).

En México se han realizado diferentes estudios utilizando extractos de plantas sobre larvas y garrapatas adultas de *R. (B.) microplus*:

En un estudio se evaluaron 45 extractos metanólicos de plantas sobre larvas de garrapatas resistentes a OP, SP y Am, obteniendo eficacias de 5-99% (Rosado *et al.*, 2010a). En otro estudio utilizando *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) se reportó un 86% de eficacia y un 91% de reducción en el índice de eficiencia reproductiva en individuos adultos de *R. (B.) microplus* (Rosado *et al.*, 2010b). Otro estudio realizado con *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae) arrojó eficacias ixodicidas del 95% y 86% contra larvas y garrapatas adultas de *R. (B.) microplus* respectivamente (Rodríguez *et al.*, 2011 b). En un estudio con aceites esenciales extraídos de *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae) y *Pimenta dioica* (L) Merr. (Myrtaceae) se reportó 100% de eficacia ixodicida en larvas de *R. (B.) microplus* (Martínez *et al.*, 2011a). En otro estudio con aceites esenciales de hojas de orégano *Lippia graveolens* Kunth. (Verbenaceae), hojas de romero *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) y bulbos de ajo *Allium sativum* L. (Alliaceae) (Martínez *et al.*, 2011b). Recientemente el extracto de

Eysenhardtia polystachya (Ortega) Sarg. (Leguminosae) mostró una mortalidad significativa del 94.82% (Alcalá *et al.*, 2015).

Cabe considerar que otros extractos se han aplicado en garrapatas de la familia Ixodidae, tales como el de la tintura de tabaco *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), la cual se utilizó en el control de la garrapata de los caninos frente al tratamiento clásico con amitraz y los resultados obtenidos fueron de un 70% para larvas, 61.79% en ninfas y 64.9% para adultos a una concentración de 0.0117% de *N. tabacum* comparados con un 92% de efectividad del amitraz en los tres estados (Neira *et al.*, 2009). Otro caso es el extracto metanólico de las hojas y corteza de *Azadiractha indica* A.Juss. (Meliaceae) sobre larvas de *Amblyomma variegatum* y todos los estadios de *Hyalomma anatolicum excavatum* y *R. appendiculatus* (Rodríguez *et al.*, 2014).

- No químicos

El desarrollo de resistencia a los diferentes ixodicidas en conjunto con los efectos negativos de los ixodicidas sobre el medio ambiente, han propiciado la búsqueda de métodos alternativos de control no químico, los cuales se basan en el uso de prácticas zootécnicas como razas de bovinos resistentes, manejo de pastizales, uso de vacunas y control biológico (Ojeda *et al.*, 2011).

Manejo de pastizales, se lleva a cabo mediante la rotación, descanso y quema de praderas, esto con la finalidad de presionar a las garrapatas en su etapa de vida libre al impedir o retardar que encuentren a su hospedero y de esta manera mueran por hambre o por deshidratación (Rodríguez *et al.*, 2011 b).

Selección de razas de bovinos resistentes, debido a que *R. (B.) microplus* se originó en Asia, lugar por donde se desarrolló por miles de años en estrecho contacto con el ganado cebuino (*Bos indicus*). Debido a su coevolución, esta especie bovina desarrolló y ha mantenido cierto grado de resistencia, mientras que las razas de ganado continental son susceptibles a *R. (B.) microplus*, por ejemplo *Bos taurus* (Bravo *et al.*, 2008).

- Control biológico

El control biológico se define como el uso consciente de organismos vivos para reducir las poblaciones de organismos plaga o patógenos. Se consideran agentes de biocontrol a depredadores, parásitos, patógenos, competidores de las plagas, feromonas naturales y plantas resistentes (Ojeda *et al.*, 2011).

Los hongos que han sido evaluados para el control de *R. (B.) microplus* son *Lecanicillium lecanii*, *Cordyceps bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, los cuales han demostrado tener potencialidad para el control de distintas fases de desarrollo de la garrapata (huevo, larva, ninfa y adulto) (Ojeda *et al.*, 2011).

Entre los depredadores podemos encontrar al menos 50 especies de aves “garrapateras”. En áreas tropicales encontramos a las garzas garrapateras y a las gallinas domésticas que pueden ingerir garrapatas; el consumo de las garrapatas depende de la disponibilidad de alimentos alternativos y la densidad de garrapatas (Rodríguez *et al.*, 2011 b).

Algunas especies de hormigas del género *Pachycondyl* suelen alimentarse garrapatas adultas repletas, siendo el verano el periodo con mayor actividad (Rodríguez *et al.*, 2011 a). Otras hormigas que funcionan como reguladoras son *Solenopsis germinata*, *Solenopsis saevissima*, *Camponotus rengira* y *Ectatomma quadridens* (Rodríguez *et al.*, 2014).

Bacterias como *Bacillus thuringiensis* posee la capacidad de bioregular las poblaciones de garrapatas, del mismo modo lo hace *Cedecea lapagei*, la cual es patógena para *R. (B.) microplus*, llegando a producir 100% de mortalidad en condiciones de laboratorio (Rodríguez *et al.*, 2011 a, Rodríguez *et al.*, 2014).

- Manejo integral de plagas

Consiste en aplicar sistemáticamente dos o más métodos de control de plagas que afecten negativamente a una especie hospedadora disminuyendo el número de aplicaciones de productos químicos, de este modo se reducen los riesgos sobre la salud humana y ambiental (Rodríguez *et al.*, 2014).

- Vacunas

Los problemas de resistencia a los acaricidas hacen que sea necesario desarrollar métodos alternativos de control de las garrapatas, como puede ser el empleo de vacunas (Manzano *et al.*, 2012). Actualmente se comercializan dos vacunas contra *R. (B.) microplus* denominadas TickGARDPLUS® en Australia y Gavac™ en América Latina. Las vacunas contienen el antígeno Bm86 y han demostrado reducir el peso y la capacidad reproductiva de las garrapatas (Rodríguez *et al.*, 2011 a; Rodríguez *et al.*, 2014).

1.1.7 Resistencia.

La plasticidad del genoma de los insectos ha facilitado el desarrollo de resistencia hacia los insecticidas (Alonso *et al.*, 2006). La resistencia química que las garrapatas manifiestan a los ixodicidas, es un proceso evolutivo que aparece por selección genética (Rodríguez *et al.*, 2011 a). La resistencia es una respuesta genético evolutiva de las poblaciones de artrópodos expuestas a un estrés ambiental severo y continuo, como son las aplicaciones frecuentes de un acaricida en condiciones de una fuerte presión selectiva (Soberanes *et al.*, 2005). La velocidad con que se desarrolla la resistencia en una población depende principalmente de la frecuencia inicial de los genes que confieren resistencia, la intensidad de selección, el grado de dominancia del gen y la relativa capacidad del genotipo (Alonso *et al.*, 2006). La resistencia es el desarrollo de una condición de una población de insectos y otros artrópodos, que permite tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de los individuos de una población normal de la misma especie (Rodríguez *et al.*, 2011 a). El desarrollo de resistencia en artrópodos depende de la frecuencia de la aplicación de los insecticidas, así como de los ciclos de vida de los insectos (Rodríguez *et al.*, 2012).

El desarrollo de la resistencia a los acaricidas se da en tres fases (Alonso *et al.*, 2006):

- La fase de establecimiento, se refiere a la aparición de un alelo resistente en una población, habitualmente este proceso se efectúa por mutaciones naturales.
- La fase de desarrollo, es aquella que comprende el aumento del número de individuos resistentes y ocurre por la tasa de sobrevivencia preferencial sobre los individuos susceptibles después del uso de productos químicos (esta fase puede darse de forma rápida cuando el gen que confiere la resistencia es dominante; y lenta cuando los alelos son recesivos).
- La fase de emergencia, es una fase corta. Ocurre cuando hay una elevada tasa de presión de selección, el alelo resistente es lo suficientemente común en la población por lo que manifiesta una reducción de la efectividad del ixodicida.

De acuerdo al tipo de respuesta al plaguicida la resistencia ha sido agrupada en cuatro categorías: (Alonso *et al.*, 2006; Domínguez *et al.*, 2010; Díaz, 2012):

- Resistencia al comportamiento, es cuando el insecto modifica su conducta para evitar el contacto con el insecticida.
- Resistencia de la penetración, es una modificación del exoesqueleto del insecto para inhibir o retardar la penetración del químico, en general tiene que ver con la concentración de lípidos que facilitan o retardan la penetración del pesticida a través de esta estructura.
- Resistencia metabólica, es la detoxificación del insecticida por enzimáticos que radica en la modificación de las vías metabólicas del insecto.
- Insensibilidad al sitio de acción es la modificación del sitio de acción del insecticida para disminuir la sensibilidad del químico.

1.1.8 Resistencia en México.

En México la resistencia a los acaricidas se encuentra ampliamente distribuida (Temeyer *et al.*, 2012). Los OFs fueron los ixodicidas usados en el programa de erradicación nacional de la garrapata entre 1974-1984 (Rodríguez *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2011 a). El primer caso de resistencia en México en poblaciones de garrapatas *R. (B.) microplus*, se documentó por primera vez en 1981 a partir de fallas de control en la región de Tuxpan, Veracruz. Debido al desarrollo de las poblaciones resistentes a los organofosforados, a partir de 1986 se permitió la comercialización de nuevos ixodicidas como los piretroides y el amitraz. Sin embargo, en 1993, después de 8 años se detectaron los primeros casos de resistencia a piretroides en los estados de Tabasco, San Luis Potosí, Veracruz y Chiapas. Después del establecimiento de la resistencia a los organofosforados y piretroides, se incrementó el uso de amitraz (Domínguez *et al.*, 2010). A principios del 2001 se detectó en la región de los Ríos en el estado de Tabasco el primer caso de resistencia al amitraz (Am). El hallazgo de las poblaciones multirresistentes puso en relieve un problema aún más complejo ya que la cepa denominada “San Alfonso” fue diagnosticada con características toxicológicas de resistencia a amidinas, piretroides y organofosforados (Soberanes *et al.*, 2012). Sin embargo, la resistencia múltiple a los acaricidas en el territorio mexicano continua extendiéndose y actualmente se han diagnosticado poblaciones resistentes de garrapatas a organofosforados, piretroides y amidinas en todo el país (Domínguez *et al.*, 2010).

En México la resistencia a los acaricidas es reconocida en varios estados, mayormente en el trópico mexicano (Rosado *et al.*, 2010 a). Este problema ha incrementado debido a la presencia de poblaciones de garrapatas de la especie *R. (B.) microplus* resistentes a organofosforados (OP), piretroides sintéticos (PS) y amitraz (Am) por lo que se ha creado multi-resistencia hacia estos acaricidas (Fernández *et al.*, 2012 a). Las lactonas macrocíclicas (LM) las cuales son endectocidas son usadas como control de las garrapatas, pero también se han creado poblaciones resistentes hacia este químico (Rodríguez *et al.*, 2014).

1.1.9 Ixodicidas empleados en México.

En México existen más de 50 productos para el control de garrapatas que incluyen seis grupos distintos con diferencias en sus mecanismos de acción (OF, PS, Am, fenilpirazolonas, reguladores del crecimiento y LM) que se pueden aplicar por aspersión, inmersión, de forma epicutánea (*pour-on*) y por vía parenteral (inyectables) (Rodríguez *et al.*, 2010 a).

Los ixodicidas más empleados en México son: organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS) y amitraz (Am) y lactonas macrocíclicas (LM) (Rodríguez *et al.*, 2010 a; Rodríguez *et al.*, 2014). El uso de los ixodicidas y de las LM ha funcionado con éxito en el control de las garrapatas; sin embargo, su uso constante ha ocasionado la selección de poblaciones resistentes a la acción de los ixodicidas y LM (Rodríguez *et al.*, 2014).

1.1.10 Amidinas

Las amidinas o formamidinas son sustancias activas acaricidas sobre garrapatas, ácaros y piojos. Estos fármacos fueron desarrollados en 1970 (Prado, 2013).

El amitraz es una formamidina que ha sido utilizada en el control de la garrapata del ganado *R. (B.) microplus* (Rodríguez *et al.*, 2006 b). El amitraz pasa por una conversión metabólica y se convierte en un metabolito activo llamado U-40481 o BTS-27271. Es ligeramente soluble en agua, pero muy soluble en solventes orgánicos. El sitio de acción de amitraz no está completamente aclarado, se han propuesto varios sitios blanco, uno es el receptor del neurotransmisor de octopamina y el otro es el de la monoaminooxidasa (Díaz, 2012).

El amitraz imita la acción de la octopamina, neurotransmisor que regula el comportamiento de excitación del SNC, actuando también como neurohormona sobre tejidos periféricos que inducen la movilidad de lípidos y carbohidratos, y como neuromodulador central periférico que actúa sobre los muslos, la corpora cardíaca y la corpora allata en los artrópodos, mediando toda su actividad a través de tres clases de receptores acoplados a proteínas G vinculadas a la adenilato ciclasa. La sobreestimulación ejercida por el amitraz sobre estos receptores origina su efecto tóxico en el SNC, impidiendo la acción reguladora de la

octopamina. Todo esto genera sobreestimulación de la sinapsis octopaminérgicas dando lugar a temblores, convulsiones, anorexia, desprendimientos e interrupción de la reproducción en *R. (B.) microplus*. Es posible que las formamidinas también intervengan en la inhibición de monoaminooxidasas, que alteran el ciclo energético del artrópodo (Díaz, 2012).

1.1.11 Situación de la garrapata en México.

La distribución geográfica de las garrapatas en México obedece a factores ambientales, entre los que destacan la humedad relativa, la temperatura, vegetación. Otros factores que intervienen en la distribución de *R. (B.) microplus* son la altitud, presencia y abundancia de hospederos y las prácticas de control o erradicación que el hombre ejerce sobre las poblaciones de garrapatas (Rodríguez *et al.*, 2011 a).

Debido a la amplia distribución que presenta *R. (B.) microplus*, en México se ha implementado una Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* sp. Dicha campaña tiene como objetivo de controlar y erradicar a éste ectoparásito. Desde que se publicó en el diario Oficial de la Federación el 19 de mayo de 1995 se le ha dado un seguimiento mediante estudios epidemiológicos, logrando reconocer y determinar la condición zoonosanitaria de una o varias zonas, dependiendo del nivel de incidencia de la garrapata *R. (B.) microplus*. Las zonas que están sujetas a control se clasifican en: zona de control, zona de erradicación y zona libre.

La situación actual de la campaña zoonosanitaria de la campaña contra la garrapata *R. (B.) microplus*, actualmente está referida a cada una de las fases del programa:

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

- La zona en fase de erradicación cuenta 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 y representan un 0.57%.
- Las zona en fase de control hasta este momento alcanzan una superficie total de 101.6 millones de hectáreas y representan el 51.5% del país (Figura 6).

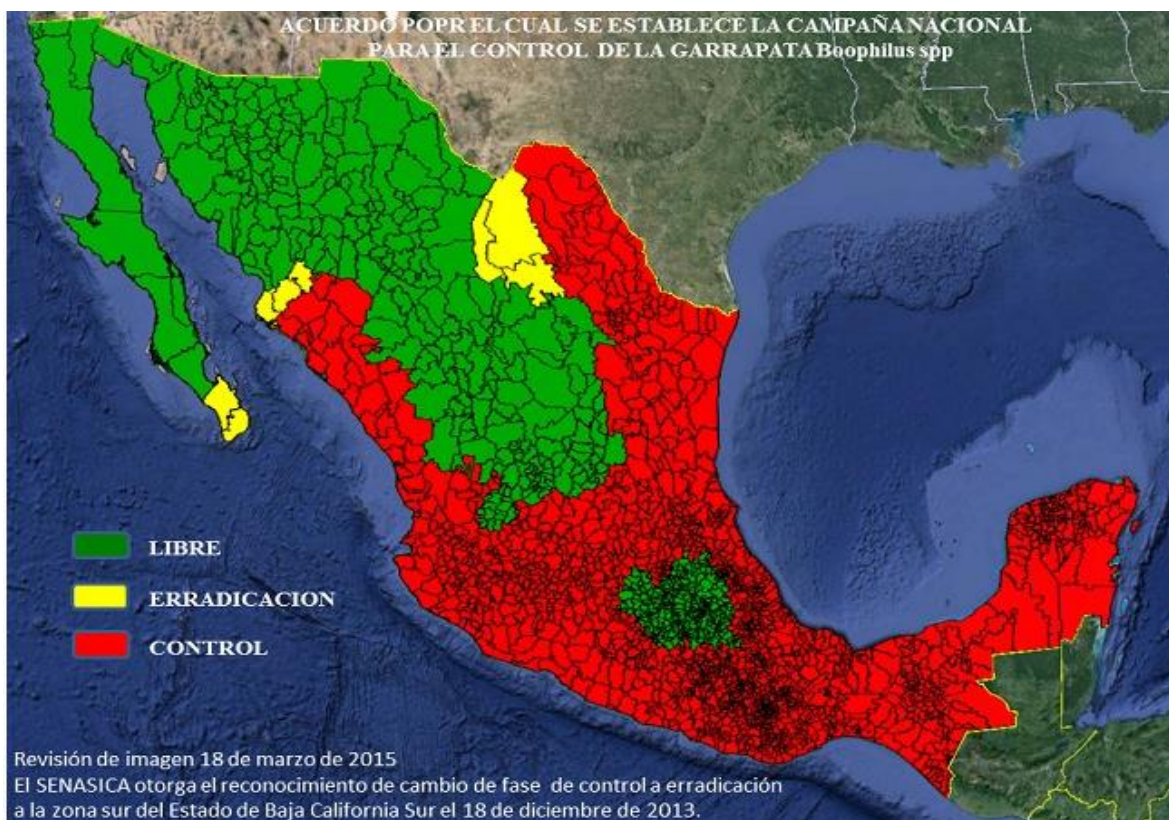


Fig. 6. Situación actual de *R. (B.) microplus* en México (tomado de <http://www.senasica.gob.mx/?id=4393>, 2015)

1.1.12 Daños directos e indirectos.

La garrapata *R. (B.) microplus* es uno de los principales ectoparásitos que causan pérdidas económicas en la ganadería bovina (Rosado *et al.*, 2008 a). El impacto económico negativo de *R. (B.) microplus* se debe a los efectos directos e indirectos en el ganado. (Rodríguez *et al.*, 2012).

- Efectos directos

R. (B.) microplus causa daños directos debido a la acción de picaduras las cuales causan irritación, inflamación e hipersensibilidad. (Rodríguez *et al.*, 2012; Domínguez *et al.*, 2010). A través de las picaduras se producen abscesos que se ocasionan apreciables pérdidas en el valor de las pieles, además de la pérdida de sangre. En el caso de las vacas lecheras, estos abscesos frecuentemente están involucrados en el daño y la pérdida de uno o más cuartos de la glándula mamaria con la consecuente disminución de la producción láctea (Rodríguez *et al.*, 2006 a).

Las garrapatas tienen un efecto nocivo directo sobre la ganancia de peso de los animales. En el ganado de engorda cada garrapata adulta ha demostrado reducir la ganancia de peso diaria en 0.6 g. (Rodríguez *et al.*, 2006 a). Al año se calcula en 0.26 kg por garrapata, lo que representa pérdida de varios miles de millones de dólares en la economía pecuaria (Ojeda *et al.*, 2011).

Cuando *R. (B.) microplus* se presenta en grandes cantidades provoca anemia y grandes pérdidas en la producción del ganado (Rodríguez *et al.*, 2012). Se ha demostrado que los animales infestados con garrapatas reducen su consumo de alimento (4.37 kg) en comparación con animales no expuestos a garrapatas (5.66 kg) (Ojeda *et al.*, 2011).

R. (B.) microplus crea alteraciones reproductivas en el ganado por lo que ocasiona un impacto negativo en la economía ganadera (Rosado *et al.*, 2008 a).

Se ha reportado que cuando los animales se encuentran infestados por garrapatas producen alteraciones en varios metabolitos entre los que se encuentran la hemoglobina, glóbulos blancos, colesterol, albúmina, globulina, amilasa, fosfatasa alcalina y también es posible que secreten compuestos hepatotóxicos (Ojeda *et al.*, 2011).

- Efectos indirectos.

Cuando *R. (B.) microplus* se adhiere y se alimenta es capaz de transmitir una serie de enfermedades virales, bacterianas, rickettsiales y protozoarios patógenos (Rodríguez *et al.*, 2012).

En los efectos indirectos encontramos aquellos en donde se encuentra la transmisión de agentes patógenos tales como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* (Rosado *et al.*, 2008 a; Domínguez *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2012).

Se estima que en México las enfermedades transmitidas por garrapatas a la ganadería bovina producen pérdidas de 48 millones de dólares anuales. Además, existen problemas con la comercialización de animales infestados o parasitados (Rodríguez *et al.*, 2006 a).

1.2 Generalidades de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. (Leguminosae).

1.2.1 *Eysenhardtia polystachya*.

El género *Eysenhardtia* Kunth (Leguminosae, Papilionideae) está conformado por 13 especies y 2 variedades. Se trata de un género restringido para México con excepción de *E. texana* Scheele, *E. orthocarpa* (A. Gray) S. Watson, *E. spinosa* A. Gray y *E. adenostylis* Baillon (Cruz y Sousa, 2013; 2005). *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg, conocida como “palo azul” pertenece a la familia Leguminosae (Pérez *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 1998) (Figura 7). Es un arbusto o árbol de 3 a 8 m de altura con un tronco de 10 a 30 cm de diámetro; corteza amarilla ligeramente rugosa, interna pardo rojiza; presenta hojas pinadas de 3 a 10 cm de largo, peciolo corto, foliolos numerosos, oblongos u ovales, de 3 a 12 mm

de largo por 1.5 a 5 mm de ancho, ápice redondeado, margen entero, base redondeada, glabros; flores de 5 a 7 mm de largo, pubescentes, dispuestas en racimos de 4 a 15 cm de largo; legumbre de 1 a 1.5 cm de largo por 3 a 5 mm de ancho, glabra, péndula; semilla de 4 a 5 mm de largo, café-amarillenta. Florece de mayo a septiembre y fructifica en los últimos meses del año (Rzedowski y Calderón, 2010; Vázquez *et al.*, 1999) (Figura 8).

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta.
Clase: Magnoliopsida
Orden: Fabales
Familia: Leguminosae.
Subfamilia: Papilionoideae.
Género: *Eysenhardtia*.
Especie: *polystachya*.

Figura 7. Clasificación taxonómica de *Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg. (Tomada de Cronquist, 1981)



Figura 8. Partes de *Eysenhardtia polystachya*. A. Árbol completo; B. Corteza; C. Madera; D. Hojas pinnadas; E. Flores en racimo; F. Fruto. (Tomado de CONABIO, 2014).

1.2.2 Distribución de *Eysenhardtia polystachya*.

Eysenhardtia polystachya se encuentra ampliamente distribuida en la parte central del país, en los estados de Aguascalientes, Colima, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Zacatecas (Figura 9). Habita en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados desde los 100 hasta los 2300 msnm (Vázquez *et al.*, 1999; Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Cruz, 2006).



Figura 9. Distribución de *Eysenhardtia polystachya* en México (tomado de Cruz, 2006).

1.2.3 Nombres comunes.

Se le conoce con los siguientes nombres comunes (Vázquez *et al.*, 1999):

- Jalisco: Cuate.
- Puebla: Coatl y Palo dulce.
- Oaxaca: Cuatle y Cohuatli.
- Hidalgo: Ursa y Palo dulce.
- Michoacán: Palo dulce.
- Nayarit: Biassa.
- San Luis Potosí: chilab te', tsakam wayal (tenek).

1.2.4 Usos de *Eysenhardtia polystachya*.

- Medicinal

Los primeros reportes del uso de *E. polystachya* corresponden a las culturas prehispánicas en el siglo XVI, éstas la utilizaban para enfermedades en vías urinarias (Acuña *et al.*, 2009). En el siglo XVI, Martín de la Cruz, la prescribe para el hipo; en el mismo siglo Fray Bernardino de Sahagún, en el Códice Florentino reporta el uso de la madera de *E. polystachya* reposada en agua para la tos, la orina, calentura y disuria; Nicolás Monardes en ése mismo siglo menciona que es útil para los que no orinan libremente, para dolor de riñones y de ijada. Posteriormente, contemporáneo a Monardes, Francisco Hernández señala que es una planta de naturaleza fría y húmeda, que ayuda a disminuir la acidez de la orina, extingue las fiebres y cura los cólicos. El cocimiento de la corteza evacúa la orina. Añade que alivia las inflamaciones de los ojos y los limpia de excrecencias (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

A principios del siglo XVII, Juan de Esteyneffer la recomienda como diurético y para enfermedades renales, así como para el dolor de piedra. En el siglo XIX, la Sociedad Mexicana de Historia Natural describe su uso como diurético y para las epizootias de las

gallinas. En el siglo XX, Maximino Martínez la refiere para las afecciones renales, antiespasmódica, antipirético, cicatricial regenerativo, diurético, enfermedades de los ojos y para lavar las vías urinarias (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). En estudios recientes se ha demostrado que el extracto acuoso de *E. polystachya* tiene propiedades diuréticas y antiurolitiásicas (Pérez *et al.*, 1998), también se ha evidenciado que las isoflavonas 7-hidroxi-2', 4', 5'-trimetoxiisoflavona y 7-hidroxi-4'-etoxiisoflavona, aisladas de la madera de *E. polystachya*, presentan actividad inhibitoria en el crecimiento de los cristales de oxalacetato y fosfato de calcio (Pérez *et al.*, 2002).

Actualmente se sigue utilizando en la medicina tradicional en el tratamiento de urolitiasis y una gran variedad de enfermedades urinarias, para este propósito la madera es hervida en agua para producir un líquido de color dorado, con una fluorescencia azul de la cual los enfermos se toman una taza diariamente (Pérez *et al.*, 2002), es importante mencionar que la formación de la fluorescencia se debe a la presencia de uno de los flavonoides mayoritarios de la *E. polystachya*, la Coatlina B, la cual es transformada en Matlalina. Esta fluorescencia fue reportada por primera vez en 1565 por Nicolás Monardes (Acuña *et al.*, 2009).

- Combustible (madera). Especie muy usada como leña ya que posee buenas características energéticas (Vázquez *et al.*, 1999).
- Forrajero (tallo joven y hojas). Proporciona forraje en abundancia. Las ramillas son ramoneadas por el ganado bovino y caprino (Vázquez *et al.*, 1999, Cruz, 2006).
- Uso doméstico (madera). Se elaboran copas y vasijas (Vázquez *et al.*, 1999).
- Construcción (ramas y troncos). Se emplean en la elaboración de viviendas rurales (Granados y Hernández, 1995).

1.3 Flavonoides.

El término flavonoide se refiere a un grupo aromático, son pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno, se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas (Escamilla *et al.*, 2009). Los flavonoides son un amplio grupo de Metabolitos secundarios -compuestos orgánicos que se sintetizan a partir de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos- (López *et al.*, 2008). Químicamente son sustancias de bajo peso molecular que se encuentran en las plantas vasculares (Estrada *et al.*, 2012; Havsteen, 2002). Estos cumplen un papel importante en la naturaleza que ha perdurado en las plantas vasculares a lo largo de su evolución, intervienen en el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas y actúan como atractivos de animales en la ovoposición, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos (Cartaya y Reynaldo, 2001). Esta asociación entre las plantas productoras de flavonoides y las diversas especies animales y otros organismos, puede explicar la gama extraordinaria de actividades bioquímicas y así como las propiedades farmacológicas que estos productos ejercen en el hombre (Estrada *et al.*, 2012).

1.3.1 Propiedades.

Se han descrito diversas propiedades en los flavonoides tales como antiinflamatorias, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitromboticas, antivirales, anticarcinogénicas, antibacteriales, antifúngicas, antiulcéricas, antialérgicas, antitumorales, antioxidantes e insecticidas (Cartaya y Reynaldo, 2001; López *et al.*, 2008; Escamilla *et al.*, 2009; Estrada *et al.*, 2012).

1.3.2 Composición química de *Eysenhardtia polystachya*.

E. polystachya ha sido objeto de varios estudios fitoquímicos, esto se debe a que esta especie es ampliamente usada en la medicina tradicional. Del tronco y la corteza de *E. polystachya* se han aislado e identificado distintos compuestos, entre ellos encontramos a los flavonoides (3S)-7-hidroxi-2',3',4',5',8-pentametoxiisoflavona, (3S)-3',7-dihidroxi-2',4',5',8-tetrametoxiisoflavona, estimasterol, cuneatina (Álvarez *et al.*, 1998), 7-hidroxi-2,4,5-trimetoxiisoflavona, 7-hidroxi-4-metoxiisoflavona (Pérez *et al.*, 2002), (α R)- α ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona, (α R)-3'-C- β -D-xilopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentadihidroxidihidrochalcona, (α R)-3'-O- β -xilopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentahidroxidihidrochalcona (Álvarez y Delgado, 1999), 3'-C- β -glucopiranosil- α ,2',4',4-tetrahidroxichalcona (Coatlina A) y 3-C- β -D-glucopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentadihidroxidihidrochalcona (Coatlina B) (Beltrami *et al.*, 1982. Álvarez y Delgado, 1999).

1.3.3 Chalconas.

Las Chalconas son productos naturales, llamados flavonoides menores. En este grupo se encuentran clasificados 5 tipos de chalconas, dentro de las cuales encontramos a las 2'-OH-dihidrochalconas (Grotewold, 2006). Dentro de las 2'-OH-dihidrochalconas se encuentra la Coatlina B (3-C- β -D-glucopiranosil- α ,3,4,2',4'-pentadihidroxidihidrochalcona) (Beltrami *et al.*, 1982; Álvarez y Delgado, 1999).

1.3.4 Descomposición de Coatlina B a Matlalina.

La Coatlina B fue reportada con actividad insecticida (Álvarez y Delgado, 1999), La Coatlina B es un flavonoide que a temperatura ambiente, en agua ligeramente alcalina (pH~7.5) y en presencia de Oxígeno sufre una reacción irreversible, transformándose en un flavonoide llamado Matlalina (figura 10), el cual presenta una fluorescencia azul muy característica a 365 nm. La Matlalina es el compuesto responsable de uno de los nombre comunes que recibe la *E. polystachya* “palo azul”, debido a que al colocar la madera de esta planta en agua, se forma un extracto con tonalidad azulada (Acuña *et al.*, 2009).

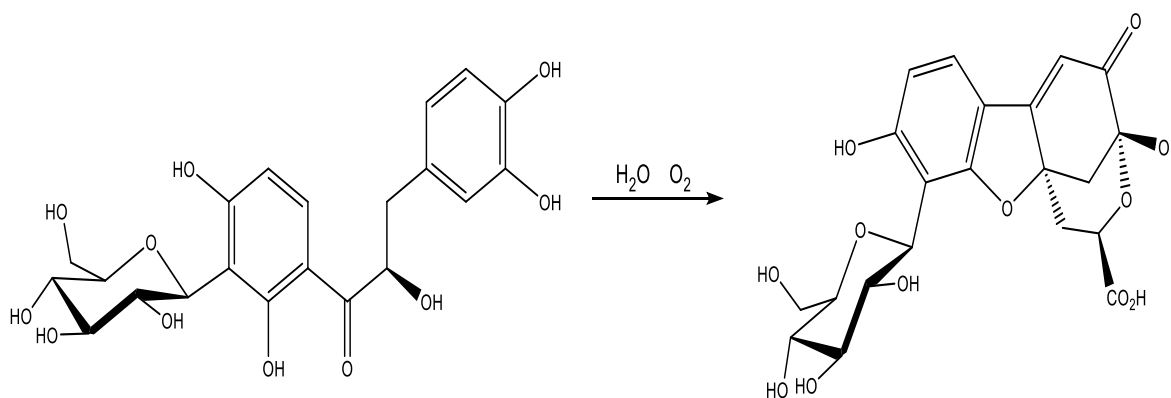


Figura 10. Conversión de Coatlina a Matlalina (Tomada de Acuña *et al* 2009).

2 Justificación.

R. (B.) microplus es la especie de mayor importancia en el ámbito veterinario por su impacto en la salud bovina (Cortés *et al.*, 2010). El control de *R. (B.) microplus* se basa principalmente en el uso de productos químicos (ixodicidas), los cuales durante mucho tiempo han sido una alternativa para el control de la garrapata (Rodríguez *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2010 a; Rodríguez *et al.*, 2012; Bravo *et al.*, 2008). Sin embargo, el uso inadecuado de estos productos con altas tasas de aplicación, preparación incorrecta y el uso de mezclas inapropiadas (Díaz y Vallejo, 2013), ha propiciado la aparición de garrapatas resistentes a las principales familias de ixodicidas (Rodríguez *et al.*, 2014), dando como resultado una eficacia acaricida limitada en la reducción de infestaciones (Domínguez *et al.*, 2010),

En México la resistencia a los acaricidas se encuentra ampliamente distribuida (Rosado *et al.*, 2010 a; Temeyer *et al.*, 2012). Debido a que la resistencia a ixodicidas es un problema creciente que necesita ser atendido es necesario que se diseñen nuevas estrategias de control basadas en el uso de nuevas moléculas químicas, pero también es necesario que se implementen y desarrollen alternativas de control que incluyan compuestos bioactivos de plantas (Fernández *et al.*, 2012 b), así como el uso extractos de plantas (Rodríguez *et al.*, 2014), tal es el caso de *Eysenhardtia polystachya* (Leguminosae) (Alcalá *et al.*, 2015). En respuesta a esta problemática, se ha despertado el interés por investigar la presencia de principios farmacológicos en aquellas plantas, que por tradición popular; son reconocidas en estudios de etnobotánica como antiparasitarias (Rodríguez *et al.*, 2010 b). Asimismo, varios investigadores han evaluado sustancias de origen vegetal y han encontrado actividad importante en el control de algunas de las especies de importancia pecuaria (Álvarez *et al.*, 2007). Los flavonoides son citotóxicos e interactúan con enzimas, influyendo en el comportamiento, crecimiento y desarrollo de los insectos (Mierziak *et al.*, 2014; Rashid *et al.*, 2012). Estos compuestos pueden ser considerados como posibles candidatos para el control alternativo de las garrapatas, reduciendo así la dependencia hacia los acaricidas comerciales (Fernández *et al.*, 2011).

Los acaricidas que están hechos de compuestos de plantas presentan una baja toxicidad hacia los mamíferos (ganado), son solubles en agua, no producen efectos residuales, por lo que no

dañan el medio ambiente. Además éstos acaricidas tienen una baja incidencia en el desarrollo de cepas resistentes (Rosado *et al.*, 2010 a).

3 Hipótesis.

Ho: El extracto acuoso de *Eysenhardtia polystachya* (Leguminosae), las Coatlinas y las Matlalinas no tendrán efecto ixodicida sobre una cepa de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), resistente a Amitraz, en condiciones *in vitro*.

Ha: El extracto acuoso de *Eysenhardtia polystachya* (Leguminosae), las Coatlinas y las Matlalinas tendrán efecto ixodicida sobre una cepa de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), resistente a Amitraz, en condiciones *in vitro*.

4 Objetivos.

4.1 General.

- Evaluar *in vitro* el efecto ixodicida del extracto acuoso de *Eysenhardtia polystachya* (Leguminosae), Coatlinas y Matlalinas, en una cepa de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, resistente a Amitraz.

4.2 Particulares.

- Comparar el efecto ixodicida del extracto acuoso de *Eysenhardtia polystachya* (Leguminosae), respecto a un ixodicida comercial que contiene Cipermetrina.
- Comparar el efecto ixodicida de las Matlalinas, respecto a un ixodicida comercial que contiene Cipermetrina.

5 Material biológico.

5.1 Vegetal.

La madera de *E. polystachya* que se utilizó, se encuentra almacenada en el laboratorio de Fisiología y Farmacología de la FMVZ-UNAM, fue colectada en el campus de Ciudad Universitaria (Latitud 19°18'30''N Longitud 99°10'28''W) el día 22 de enero del 2015 por la Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, del Departamento de Fisiología y Farmacología del FMVZ-UNAM e identificada por el M. en C. Ramiro Cruz Durán. El ejemplar se depositó en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM con el vaucher 151962.

El extracto acuoso de *E. polystachya* (EAPA), las Coatlinas y las Matlalinan fueron proporcionadas por el Dr. Fausto Rivero Cruz, y las obtuvo siguiendo la metodología de Acuña (2009), su estructura se determinó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) en el edificio B de la Facultad de Química

El extracto acuoso de *E. polystachya*, las Coatlinas y Matlalinan se mantuvieron en viales y en refrigeración a -4 °C, hasta su posterior evaluación ixodica, mediante la Prueba de Paquete larvario.

5.2 Animal.

La cepa de larvas de entre 14 y 21 días de edad de *R. (B.) microplus* fue proporcionada por el Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, la cual había sido caracterizada en el 2008 por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal de la SAGARPA (CENAPA) como resistente a Amitraz. Esta cepa se ha mantenido bajo condiciones controladas de bioseguridad en el laboratorio de Parasitología e infestaderos del CEPIPSA de la FMVZ de la UNAM, ubicado en Topilejo, D.F. Las larvas se mantuvieron en condiciones de temperatura, 27.28°C y 80-90% de

humedad relativa, en una estufa entomológica marca Binder, hasta su posterior utilización para el bioensayo.

6 Metodología.

6.1 Evaluación *in vitro* de los compuestos mediante la Prueba de paquete larvario (PPL).

Se desarrolló la metodología de la prueba del paquete larvario descrita por Stone y Haydocky (1962) estandarizada por la FAO (Cuore y Solari, 2014). Esta técnica consiste en la exposición de larvas de edad conocida (14-21 días) en papeles filtro impregnados con distintas concentraciones de los químicos a evaluar, con el objetivo de obtener porcentajes de mortalidad del orden de 0 a 100 en un lapso de 24 horas. Los bioensayos para esta prueba se realizan en condiciones de temperatura a 27.28°C y a 80-90% de humedad relativa (Stone *et al.*, 1962), en general se realiza por cada dosis un mínimo de tres replicas con 100 larvas, analizándose los resultados por ANOVA y metodología Probit (González *et al.*, 2012).

El extracto acuoso de Palo Azul (EAPA), los flavonoides Coatlinas y Matlalinan se obtuvieron de acuerdo con la metodología de Acuña (2009) y fueron proporcionados por el Dr. Fausto Rivero Cruz, su actividad ixodicida fue evaluada mediante la prueba de paquete larvario (PPL) descrita por Stone y Haydocky (1962) estandarizada por la FAO (Cuore y Solari, 2014).

Como testigo positivo se utilizó Cipermetrina, debido a que las garrapatas eran resistentes a Amitraz; como testigo negativo se utilizó el vehículo el cual está compuesto por aceite de oliva y Tricloroetileno.

6.2 Preparación de la concentración inicial o solución madre de los compuestos experimentales.

Como vehículo se utilizó la mezcla de aceite de oliva y Tricloroetileno, una parte de aceite de oliva por dos partes de Tricloroetileno, de acuerdo con Stone y Haydock (Stone y Haydock, 1962; Castro *et al.*, 2012). Es decir 60 ml de aceite de olivo por 120 ml de Tricloroetileno

La solución madre se preparó al 1% en una probeta de 25 ml con 0.0842 g de cada uno de los compuestos experimentales.

Para conocer los gramos de principio activo necesarios para preparar la solución madre se empleó la siguiente fórmula (Prado, 2013):

$$g \text{ de producto} = \frac{(\%Cl) (100\%)}{(f'''^3)(\%CFT)}$$

%Cl= Concentración (%) que se desea obtener.

f= valor fraccionario que se asigna al volumen que se desea preparar.

(3)= constante, valor fraccionario del aceite de oliva en la mezcla, considerando que el Tricloroetileno se evapora.

% CFT= Porcentaje de concentración de la forma técnica del químico a utilizar.

- Preparación de diluciones.

Preparación de dosis discriminantes en una probeta de 25 ml para la solución madre y posteriormente en probetas de 10 ml (Cuadro 1).

Cuadro 1. Preparación de las diluciones seriales.

	Dilución	Identificación
1%	A	9.8 ml solución madre + 0.2 ml vehículo
0.5%	B	5 ml solución A + 5 ml vehículo
0.25%	C	5 ml solución B + 5 ml vehículo
0.125%	D	5 ml solución C + 5 ml vehículo
0.0625%	E	5 ml solución D + 5 ml vehículo

Para la Cipermetrina se utilizó la concentración recomendada, ya que es un producto comercial (Alfadex, Novartis).

6.3 Armado de paquetes.

Los paquetes de larvas se armaron doblando los rectángulos de papel filtro 7.5 x 8.5 marca Wathman por la mitad los cuales se sujetaron por los extremos con prensapapeles, posteriormente fueron etiquetados de acuerdo con el nombre del compuesto experimental utilizado y el número de de la dilución correspondiente.

6.4 Impregnación de papeles filtro.

Los papeles se impregnaron con las diluciones de los compuestos experimentales a evaluar y se realizaron 3 repeticiones por cada dilución con sus correspondientes testigos negativos. La impregnación se realizó con la ayuda de una micropipeta con capacidad de 1000 μ l y se emplearon 670 μ l de la dilución correspondiente por papel filtro (Cuadro 2). El control (-) se impregnó con 670 μ l de vehículo (aceite de oliva y tricloroetileno), cabe mencionar que el control negativo no se sometió a diluciones seriales, porque al vehículo no se le adiciono ningún compuesto experimental.

Cuadro 2. μ l aplicados a cada papel filtro, por cada una de las diluciones con los compuestos experimentales a evaluar.

	1%	0.5%	0.25%	0.125%	0.0625%
EAPA		670 μ l	670 μ l	670 μ l	670 μ l
Coatlina		670 μ l	670 μ l	670 μ l	670 μ l
Matlalina		670 μ l	670 μ l	670 μ l	670 μ l
Cipermetrina (C +)		670 μ l	670 μ l	670 μ l	670 μ l

Una vez impregnados los papeles se sujetaron con prensapapeles y se colocaron en una rejilla. Se dejaron secar por 24 horas con la finalidad de que evaporara el Tricloroetileno y en la superficie del papel quedara sólo el aceite de oliva y el compuesto experimental a evaluar.

6.5 Llenado de Paquetes.

Para llenar los paquetes larvarios se armó una “trampa”, la cual consistió en poner en una charola de plástico con agua y detergente en polvo. Al centro de la charola se colocó una caja Petri con el fondo hacia arriba, un vaso de precipitados que contenía una aguja de disección y un pincel, y el vial que contenía las larvas.

El objetivo de la trampa era que si una larva escapara accidentalmente, esta quedará atrapada en la solución jabonosa, esto con la finalidad de no tener dispersión de larvas de garrapatas en el laboratorio.

Para esta técnica se utilizaron larvas de 14 a 21 días de edad. El llenado de paquetes se realizó colocando cada paquete impregnado con el compuesto sobre la caja Petri y con la ayuda del pincel y la aguja de disección se tomaron del vial o frasco aproximadamente 100 larvas y se dejaron caer dentro del paquete, posteriormente se cerró con un prensapapeles.

6.6 Incubación.

Los paquetes larvarios se colocaron en una charola y se introdujeron en una incubadora entomológica marca Binder, donde permanecieron 24 horas a una temperatura de 27-28 °C con un rango de 80% a 90% de humedad relativa. Las larvas que fueron utilizadas como testigo se incubaron por separado de aquellas que fueron expuestas al ixodicida y a los compuestos evaluados.

7 Análisis de datos.

El experimento se analizó empleando un diseño de un solo factor, con 5 grupos. La mortalidad fue comparada entre los grupos a través de un análisis de varianza (ANOVA de una vía), obteniendo diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, con una significancia < 0.05 , por lo que se procedió a realizar un análisis de comparación múltiple, empleando la prueba de Tukey, utilizando el programa SPSS, versión 21 del 2012. La significancia estadística se definió como $p < 0.05$.

Los datos de mortalidad obtenidos por medio de la técnica de Stone y Haydock se analizaron por medio de la metodología Probit (LeOra Software, *Polo-Plus*) con el que se determinó la concentración letal (CL_{50}) del extracto acuoso del palo azul, Coatlinas y Matlalinas con un límite de confianza del 95%.

8 Resultados.

Transcurrido el tiempo de incubación se contaron las larvas de los paquetes tratados así como de los paquetes testigo. Las larvas sobrevivientes fueron capturadas con cinta adhesiva y se contabilizaron tanto vivas como muertas. Todas las larvas con capacidad de caminar o deslizarse se consideraron como vivas. Posteriormente se calcularon porcentajes de mortalidad por dilución así como para cada una de sus réplicas, las cuales se muestran en la Tabla 1.

DILUCIÓN	IDENTIFICACIÓN	EAPA	COATL	MATL	CIPER	VEHÍCULO
1.0%	A1	95	6	99	100	0
1.0%	A2	94	6	99	100	0
1.0%	A3	90	5	98	100	0
0.5%	B1	87	4	93	100	0
0.5%	B2	83	2	86	100	0
0.5%	B3	85	4	84	100	0
0.25%	C1	65	1	89	100	0
0.25%	C2	56	2	86	100	0
0.25%	C3	48	1	84	100	0
0.125%	D1	47	1	86	100	0
0.125%	D2	52	1	74	100	0
0.125%	D3	46	0	82	100	0
0.0625%	E1	41	0	77	100	0
0.0625%	E2	39	0	67	100	0
0.0625%	E3	38	0	45	100	0

Tabla 1. Porcentajes de mortalidad producida por el extracto acuoso de Palo Azul (EAPA), Coatlinas (COATL) y Matlalinas (MATL). Cada dato representa el porcentaje de cada una de las tres repeticiones de la Técnica de Stone y Haydock. Se muestra la mortalidad obtenida con el testigo (+) Cipermetrina (CIPER) y el testigo (-) Vehículo.

Los resultados obtenidos con EAPA y Matlalinas, sobre larvas de *R. (B.) microplus*, mediante la Prueba de Paquete Larvario, arrojan mortalidades elevadas que van desde el 38% en su dilución más baja (0.0625%) hasta el 95% en su dilución más alta (1%); mientras que las Matlalinas presentan un 45% en su dilución más baja (0.0625%) y un 99% en su dilución más alta (1%), estas mortalidades son muy contrastantes respecto a las que exhiben las Coatlinas, por lo que éstas evidencian una eficacia ixodocida nula al presentar mortalidades muy bajas con respecto al EAPA y a las Matlalinas (Tabla1).

El extracto acuoso de Palo Azul tuvo una eficacia máxima de 93% con la dilución más elevada (1%). Mientras que las Coatlinas, no presentaron eficacia acaricida sobre larvas de *R. (B.) microplus* ya que en la dilución más elevada (1%) se obtuvo una mortalidad promedio del 5.67% (cuadro 3 y 4).

Cuadro 3. Porcentaje de mortalidad de larvas de *R. (B.) microplus* producida por el extracto acuoso de Palo Azul en 24 horas. Cada dato representa la media de tres repeticiones de la Prueba de Paquete Larvario, así como sus respectivos grupos testigos.

% de mortalidad de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> con Extracto de Palo Azul en 24 horas							
Dilución	0.0625	0.125	0.25	0.5	1.0	Testigo (+)	Testigo (-)
%.	39.33	48.33	56.63	85.32	93	100	0

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad de larvas de *R. (B.) microplus* producida por las Coatlinas en 24 horas. Cada dato representa la media de tres repeticiones de la Prueba de Paquete Larvario, así como sus respectivos grupos testigos.

% de mortalidad de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> con Coatlinas en 24 horas.							
Dilución	0.0625	0.125	0.25	0.5	1.0	Testigo (+)	Testigo (-)
%.	0	0.67	1.33	3.33	5.67	100	0

La mortalidad obtenida en 24 horas con las Matlalinas fue muy elevada respecto al extracto acuoso de Palo Azul y las Coatlinas, con la dilución más baja (0.0625%) se obtuvo una mortalidad promedio de 63% y con la más elevada (1%) una mortalidad promedio de 98.67 % (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de mortalidad de larvas de *R. (B.) microplus* producida por las Matlalinas en 24 horas. Cada dato representa la media de tres repeticiones de la Prueba de Paquete Larvario, así como sus respectivos grupos testigos.

% de mortalidad de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> con Matlalinas en 24 horas							
Dilución	0.0625	0.125	0.25	0.5	1.0	Testigo (+)	Testigo (-)
%.	63	80.67	86.33	87.67	98.67	100	0

Como consecuencia de la mortalidad obtenida, se realizó un ANOVA y las diferencias estadísticamente significativas $p < 0.05$, se determinaron mediante la prueba de Tukey. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los compuestos utilizados en la prueba de paquete larvario. A las 24 horas con el extracto de palo azul (EAPA) se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de la dilución

al 0.0625% respecto a las diluciones al 0.25%, 0.5% y 1%; de la dilución al 0.125% respecto a las diluciones al 0.5% y 1%; de la dilución al 0.25% respecto a las diluciones al 0.0625%, 0.5% y 1%; y de las diluciones al 0.5% y 1% respecto a las diluciones al 0.0625%, 0.125% y 0.25%. A las 24 horas con las Coatlinas se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de la dilución al 0.5% respecto a las diluciones al 0.0625%, 0.125%, 0.25% y 1%; de la dilución al 1% respecto a las diluciones al 0.0625%, 0.125%, 0.25 y 0.5%. A las 24 horas con Matlalinás se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de la dilución al 0.0625% respecto a las diluciones al 0.25%, 0.5% y 1%. Sus medias y sus errores estándar se muestran en los cuadros 6, 7 y 8, y su representación gráfica en la figura 11.

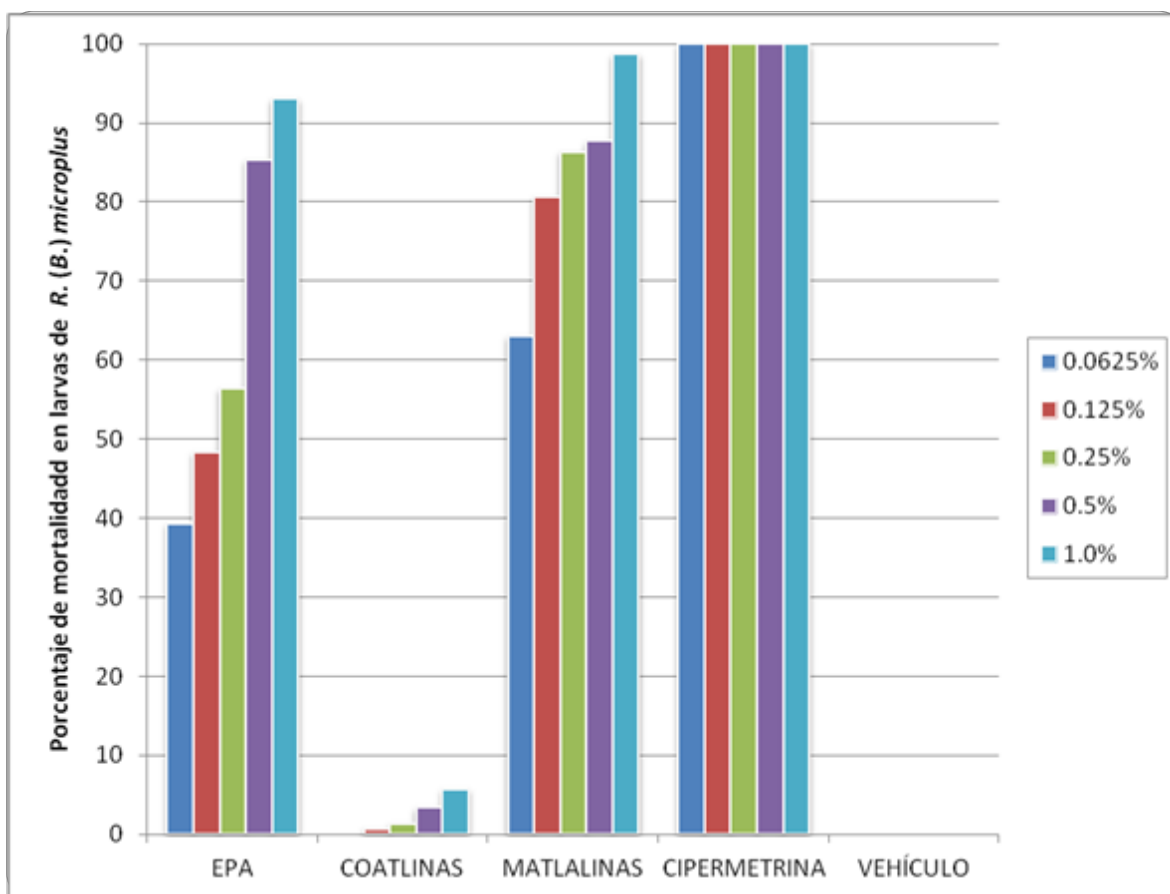


Figura 11. Porcentaje de mortalidad en larvas de *R. (B.) microplus* en 24 horas. Cada barra representa la media de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Prueba de Paquete Larvario.

Cuadro 6. Promedio del porcentaje de larvas muertas de *R. (B.) microplus*, con extracto acuoso de palo azul a las 24 horas con la Prueba de Paquete Larvario.

Dilución de Extracto acuoso de palo azul	Media±E.E.
0.0625	39.33±0.882 ^a
0.125	48.33 ±1.856 ^{ab}
0.25	56.33±4.750 ^b
0.5	85.32±1.151 ^c
1.0	93.00±1.633 ^c

Literales diferentes indican diferencias significativas (p< 0.05)

Cuadro 7. Promedio del porcentaje de larvas muertas de *R. (B.) microplus*, con Coatlinas a las 24 horas con la Prueba de Paquete Larvario.

Dilución con Coatlinas	Media±E.E.
0.0625	0.00±0.000 ^a
0.125	0.67±0.333 ^a
0.25	1.33±0.333 ^a
0.5	3.33±0.667 ^b
1.0	5.67±0.333 ^c

Literales diferentes indican diferencias significativas (p< 0.05)

Cuadro 8. Promedio del porcentaje de larvas muertas de *R. (B.) microplus*, con Matlalinas a las 24 horas con la Prueba de Paquete Larvario.

Dilución con Matlalinas	Media± E.E.
0.0625	63.00±16.371 ^a
0.125	80.67±6.110 ^{ab}
0.25	86.33±2.517 ^b
0.5	87.67±4.726 ^b
1.0	98.67±0.577 ^b

Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Se analizaron los datos de mortalidad en larvas de *R. (B.) microplus* de la cepa resistente a Amitraz mediante el análisis Probit y se determinó la CL_{50} del extracto acuoso de Palo Azul, Coatlinas y Matlalinas (cuadro 9). La CL_{50} más baja fue exhibida por las Matlalinas, ya que mostro una CL_{50} de 630.28 con un límite de confianza de 95%.

Cuadro 9. Concentraciones letales (CL_{50}) de extracto acuoso de Palo Azul, Coatlinas y Matlalinas sobre larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus*. Datos obtenidos del análisis Probit.

Compuesto	Pendiente ± E.E.	R ²	CL_{50}	95% límite de confianza
EAPA	1.98±0.122	0.92	1608.32 ^a	1528.57-1708.07
COATLINAS	2.08±0.386	0.93	3173.71 ^a	3015.34-3351.56
MATLALINAS	3.61±0.425	0.91	630.28 ^b	597.62-667.29

Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

9 Discusión.

De acuerdo a los resultados obtenidos con EAPA sobre larvas de *R. (B.) microplus*, mediante la Prueba de Paquete Larvario, arrojan eficacias del 38% y 99%, en su dilución más baja así como en la más elevada (0.0625%) y (1%) respectivamente (Tabla 1). El EAPA demostró una mortalidad promedio del 93%, con la dilución más elevada (1%) con una diferencia significativa $p < 0.05$ (cuadro 6). Lo anterior concuerda con el estudio realizado por Alcalá (2015), quienes evaluaron la infusión simple de palo azul *E. polystachya* (Leguminosae) sobre larvas de *R. (B.) microplus*, en donde se obtuvo una eficacia significativa del 94.82%, *in vitro*. Esto probablemente se debe a que la infusión simple de palo azul como el EAPA contiene un gran número de flavonoides, entre ellos las Matlalinas, ya que de acuerdo a Alcalá (2015), la actividad ixodocida está relacionada con el color azul, el cual es característico de la infusión simple (Acuña *et al.*, 2009; Álvarez *et al.*, 1998).

Álvarez y Delgado (1999), reportaron actividad insecticida con Coatlina B sobre larvas de *Epilachna varivestis*, pero en éste bioensayo las Coatlinas no presentan actividad ixodocida, ya que en la dilución más alta (1%) presentan una mortalidad promedio de 5.67%, con una significancia $p < 0.05$ (Cuadro 7). Tal vez el vehículo utilizado (Aceite de oliva y tricloroetileno) no fue el adecuado para éste flavonoide, ya que el hecho de que se utilice el mismo vehículo, éste no asegura el mismo comportamiento fármaco-cinético (FAO, 2003) en comparación con la Matlalina, lo cual se ve reflejado en las mortalidades tan bajas obtenidas.

Las Matlalinas demostraron ser altamente eficaces contra larvas de la cepa de *R. (B.) microplus* resistente a Amitraz, ya que en las diluciones 0.25%, 0.5% y 1%, mostraron mortalidades promedio que van desde 86.33%, 87.67% hasta 98.67% respectivamente, con diferencias significativas $p < 0.05$, respecto a la dilución 0.0625% y 0.125% las cuales no muestran diferencias significativas de acuerdo a la Prueba de Tukey (cuadro 8), lo cual evidenció que la eficacia fue inversamente proporcional a la dilución de la Matlalina, ya que entre más diluida se encontraba la Matlalina, menor era el porcentaje de mortalidad,

posiblemente por la relación dosis-respuesta en la cual la mayor concentración de compuestos químicos logra un efecto insecticida más notorio (Rodríguez *et al.*, 2010 b).

Al comparar el porcentaje de mortalidades promedio de los tres tratamientos sobre larvas de *R. (B.) microplus* susceptibles a Amitraz, el EAPA y las Matlalinas muestran un comportamiento similar (Figura 11). El hecho de que las Matlalinas hayan presentado una mortalidad muy elevada resulta de alguna manera predecible, ya que ésta es la responsable del color azul en la infusión de palo azul (Acuña *et al.*, 2009; Álvarez *et al.*, 1998), lo cual confirma el conocimiento popular de que las infusiones de palo azul funcionan mejor cuando el color azul es más visible (Alcalá *et al.*, 2015).

Los tres tratamientos utilizados evidenciaron tener un efecto tóxico en menor o mayor concentración sobre larvas de *R. (B.) microplus*. En el análisis Probit, el tratamiento con las Matlalinas arrojó una CL_{50} menor, con un cociente de 630.28. Lo que indica que para que se considere eficaz al compuesto evaluado, éste deberá de presentar un cociente menor, por lo que entre más pequeño sea éste resulta ser más eficaz (Flores *et al.*, 2007), lo cual demuestra una alta toxicidad de las Matlalinas sobre larvas de *R. (B.) microplus* con un límite de confianza del 95%; respecto al extracto acuoso de palo azul y a la Coatlina, ya que prácticamente no hubo diferencias en sus CL_{50} de ambos tratamientos y de manera conjunta mostraron concentraciones letales (CL_{50}) muy elevadas 1608.32 y 3173.71 respectivamente, con un límite de confianza del 95% (cuadro 9). Si bien la CL_{50} más baja es presentada por la Matlalinas, por lo tanto es necesario que se identifique el mecanismo de acción de las mismas, en futuros estudios, ya que si consideramos que el costo y desarrollo de un nuevo ixodicida requiere una inversión de 300 millones de dólares y que además éste proceso puede tardar más de 10 años y si a ésta problemática se le adhiere la resistencia genética (Cuore y Solari, 2014), resulta un problema muy costoso en donde la Matlalina podría ayudar a ésta problemática incorporándose como un posible nuevo ixodicida, ya que el éxito de algunos acaricidas experimentales obtenidos a partir de extractos naturales ha llevado a la investigación de compuestos fitoquímicos activos que podrían tener eficacia ixodicida contra garrapatas (Ibarra *et al.*, 2015).

Considerando que los resultados aquí obtenidos son alentadores, es razonable sugerir que se hagan trabajos adicionales para que se complete la definición de la estructura química, en particular de la Matlalina involucrada en el efecto ixodicida, así como el mecanismo de acción de la Matlalina sobre larvas de *R. (B.) microplus*

10 Conclusión.

Se han aislado y reportado distintos compuestos del tronco de *E. polystachya* (Leguminosae); con respecto a la Matlalina, se desconocía su actividad ixodicida contra larvas de *R. (B.) microplus*. En el presente estudio las Matlalininas presentan una CL_{50} 630.28, la cual es relativamente baja en comparación con Coatlinas (CL_{50} 3173.71) y EAPA (CL_{50} 1608.32) (Cuadro 9). Pero si se le compara con una cepa de *R. (B.) microplus*, susceptible a Cipermetrina la cual presenta una CL_{50} de 0.0123 (Mendes *et al.*, 2007) o con una cepa susceptible a Amitraz que presenta una CL_{50} de 0.001 (Rosado *et al.*, 2008 b), resulta una CL_{50} muy elevada, pero hay que tomar en cuenta que tanto la Cipermetrina y el Amitraz son productos comerciales, en los cuales se tiene identificado el mecanismo de acción además de que cuentan con un vehículo adecuado que permite la penetración de los mismos.

La eficacia ixodicida obtenida con las Matlalininas y el EAPA, pone de manifiesto el posible uso potencial de esta planta como biopesticida con una alternativa económica y ambientalmente sustentable. Sin embargo, es necesario evaluar su eficacia ixodicida contra garrapatas adultas y bajo condiciones *in vivo*.

11 Referencias.

- Acuña, U., Amat, F., Morcillo, P. & Liras, M. 2009. Structure and Formation of the Fluorescent Compound of *Lignum nephriticum*. ORGANIC LETTERS, 11 (14):3020-3023.
- Alcalá, Y., Rivero, F., Sumano, H. & Gutierrez, L. (2015). *Eysenhardtia polystachya* extract action against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Comparative Parasitology.
- Alonso, M., Rodríguez, R., Fragoso, H. & Rosario, C. 2006. Ixodicide resistance of the *Boophilus microplus* tick to ixodicides. Arch. Med. Vet, 38 (2): 105-113.
- Álvarez, L. & Delgado, G. 1999. C-and O-Glycosyl-?-hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. PERGAMON PHITOCHEMISTRY, 50: 681.687.
- Álvarez, L., Ríos, M., Esquivel, C., Delgado, G., Águilar, M., Villarreal, M. & Navarro, V. 1998. Cytotoxic Isoflavons from *Eysenhardtia polystachya*. Journal of Natural Products, 61 869: 767-770.
- Álvarez, V., Loaiza, J., Bonilla, R. & Barrios, M. 2007. Control in vitro de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. Revista de Biología Tropical, 56 (1): 291-302.
- Bazán, T. 2002.Efecto de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari:Ixodidae) en ganado bovino estabulado (tesis de maestria). Tecomán (Colima). México: Universidad de Colima.
- Beltrami, E., Bernardi, M., Fronza, G., Mellerio, G., Vidari, G. & Vita-Finzi, P. 1982. COATLINE A AND B, TWO C-GLUCOSYL-?-HYDROCYDIHYDROCHALCONES FROM *EYSENHARDTIA POLYSTACHYA*. PERGAMON PHITOCHEMISTRY, 21(12):2931-2933.
- Bravo, M., Coronado, A. & Hernández, H. 2008. Susceptibilidad de larvas y adultos de *Boophilus microplus* al ixodicida coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. Zootecnia Tropical, 26 (1): 41-46.
- Cartaya, O. & Reynaldo I. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales, 22(2): 5-14.
- Castro, E., Tizu, T., Marcondes, G., Rifran, L., González, P., Niell, C., Namindome, A. Gil, A., Piaggio, J., Martins, J., Mendes, M. y Miller R. 2012. Adaptación de bioensayos *in vitro* para diagnóstico de resistencia de *R. (B.) microplus* a fipronil e ivermectina.. Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA, Montevideo-Uruguay. Capítulo 2. 13-17. Disponible en <http://www.inia.uy/> descargado el 23 de junio del 2015.
- González, A., Olmeda, S., Burillo, J., Sanz, J., Sains, P., Umpiérrez, M. & Rossinni, C. 2012. PRODUCTOS NATURALES CONTRA PARÁSITOS EXTERNOS DEL GANADO BOVINO Y OVINO, TALES COMO MOSCA DE LOS CUERNOS Y GARRAPATAS.Echeverri, F. & Rossini, C. editores. Ediciones de la Universidad de Magallanes. Capítulo 4 58-71.
- Clifford, C., Anastos, G. & Elbil. A. 1961. The larval ixodid ticks of the Eastern United States (Acarina-Ixodidae). Entomological Society of America.
- Cooley, R. 1946. The genera *Boophilus*, *Rhipicephalus*, and *Haemaphysalis* (Ixodidae) of the new world. Nat. Inst. Health. 187:1-54.
- Cortés, J., Betancourt, J., Argüelles, J. & Pulido, L. 2010. Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). Copoica Ciencia Tecnológica Agropecuaria, 11 (1):73-84.

- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Cruz, R y Sousa, M. 2005. *Eysenhardtia officinallis* (Leguminosae, Papilionideae), una especie nueva de México. Novon, 15 (3):405-409.
- Cruz, D.R. 2006. Revisión del género *Eysenhardtia* (Leguminosae: Papilionidae). (tesis de Maestría). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Cruz, R y Sousa, M. 2013. *Eysenhardtia byei* (Leguminosae, Papilionideae), una especie nueva para el noroeste de México. Novon, 22 (4):391-395.
- Cuore, U. & Solari, M. 2014. Multiresistant population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in Uruguay. Sociedad Médica Veterinaria de Uruguay. 51 (193): 04-13.
- Cupp, E.W. 1991. Biology of ticks. Veterinary Clinics of North América. 2 (1): 1-26.
- Díaz, E. & Vallejo, G. 2013. Identificación de un poliformismo del gen Est9 relacionado con Resistencia a piretroides en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Revista MVZ Córdoba 18: 3708-3714.
- Díaz, E. 2012. Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus*. Revista Colombiana de Ciencia Animal, 5 (1): 72-81.
- Domínguez, I.D., Rosario, R., Almazán, C., Saltijeral, J., de la Fuente J. 2010. *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 12: 181-192.
- Escamilla, C., Cuevas, E. & Guevara J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Revista Facultad de Medicina 52(2): 73-75.
- Estrada, R., Ubaldo, D. & Araujo, A. 2012. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. Salud Mental. 35(5): 375-384.
- Estrela, A. Seixas, A. & Termignoni, C. 2007. A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitelin digestion activity. Comp. Biochem Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 148:410-416.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2003. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-y4813s.pdf> descargado el 8 de abril del 2015.
- Fernández, A., Alonso, M., Acosta, R., Torres, J., Sandoval, C. & Rodríguez R. 2011. In vitro acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology. 175: 113-118.
- Fernandez, A., Rodríguez, R. & Alonso, M. 2012 a. Resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to Amitraz and Cypermethrin in Tropical farms in Veracruz, Mexico. Journal of Parasitologists, 98 (5): 1010-1014.
- Fernandez, A., Rodríguez, R.I. & Alonso, M. 2012 b. First report of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. Veterinary Parasitology, 138: 338-342.
- Flores, A., Silva, G., Tapia., M. Casals, P. 2007. Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) collected in *Pimula obconica* Hnace and *Convolvulus arvensis* L. to acaricides. AGRICULTURA TÉCNICA (CHILE), 67(2)219-224.
- Gallardo, J. & Morales, J. 1999. *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae): preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. Bioagro, 11(3):77-87.

- Gaxiola, C. 2008. Dinámica estacional de la garrapata *Boophilus microplus* en bovinos del estado de Sinaloa (tesis de doctorado). México (D.F). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
- González, A., Olmeda, S., Burillo, J., Sanz, J., Sains, P., Umpiérrez, M. & Rossini, C. 2012. PRODUCTOS NATURALES CONTRA PARÁSITOS EXTERNOS DEL GANADO BOVINO Y OVINO, TALES COMO MOSCA DE LOS CUERNOS Y GARRAPATAS. Echeverri, F. & Rossini, C. editores. Ediciones de la Universidad de Magallanes. Capítulo 4 58-71.
- Granados, D. & Hernández, J. 1995. Sistema de recolección en una comunidad Hñahñu en el Valle del Mezquital. Revista Chapingo. Ciencia Forestal. 1:109-115.
- Grote, E. 2006. The science of the flavonoids. Estados Unidos de América: Springer Science + Business Media, 1-4.
- Guglielmone, A., Robbins, R., Apanaskevich, D., Petney, T., Estrada, A. & Horak, I. 2014. The Hard Ticks of the World (Acari: Ixodida: Ixodidae). Ed. Springer. New York.
- Havsteen, B. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics, 96: 72-202.
- Ibarra, F. 2012. Infestación por garrapatas *Boophilus*. En: Parasitología-Veterinaria. Vol. III Artrópodos. Eds Ibarra, V., Figueroa, F. & Quintero, M. 1era Ed. Editorial Color, S.A de C.V. México.
- Ibarra, F., Alcalá, Y. & Vera, Y. 2015. In vivo and in vitro evaluation of Permethrin, Cypermethrin or Zeta-Cypermethrin mixed with plant extracts against susceptible and resistant (San Alfonso) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) strains. Pharmacology & Pharmacy 6: 34-40.
- López, F., Del Valle, L. & Pastelin G. 2008. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica?. Archivos de Cardiología de México, 76(4):33-45.
- Manzano, R., Díaz, V. & Pérez, R. 2012. Garrapatas: características anatómicas, epidemiológicas y ciclo vital, detalles de la influencia de las garrapatas sobre la producción y sanidad animal. Sitio argentino de Producción Animal. 1-8.
- Martínez, M., Castillo, G., Rosario, R., Flores, J., López, J., Hernández, R. & Lugo, E. 2011 a. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitology Research, 108 (2):481-487.
- Martínez, M., Rosario, R., Castillo, G., Flores, J., Álvarez, A. & Lugo, E. 2011 b. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae). Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology, 48 (4):822-827.
- Mendes, M., Pereira, J. & Prado, A. 2007. Sensitivity of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and organophosphate in farms in the Vale do Paraíba region, São Paulo, Brazil. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 74 (2): 81-85.
- Mierziak, J., Kostyn, K. & Kulma, A. 2014. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. Molecules. 19: 16240-16265.
- Murrell, A. & Barker, S. 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Systematic Parasitology, 56 (3): 179-182.
- Neira, J., Carvajal, L., Cala, F. & Gómez, J. 2009. Evaluación del efecto de la tintura de tabaco (*Nicotiana tabacum*) en el control biológico de la garrapata. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 3 (22): 551-552.

- Ojeda, M., Rodríguez, R., Galindo, E., Lezama, R. & Cruz, C. 2011. Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 2(2): 1177-1192.
- Pérez, R., Vargas, R., García, L. & Dávila, L. 2002. Efecto de isoflavonas aisladas de la corteza de *Eysenhardtia polystachya* sobre el crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio urinario. EL COLEGIO MEXICANO DE UROLOGÍA, A.C., XVI (3):134-149.
- Pérez, R., Vargas, R., Pérez, S. & Zavala, M. 1998. Antiuroliathatic Activity of *Eysenhardtia polystachya* Aqueous Extracto on Rats. PHYTOTHERAPY RESEARCH, 12:144-145.
- Prado, M.G. 2013. Mecanismos de acción y toxicidad de nuevos carbamatos con efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. (tesis doctoral). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Rashid, A., Paulraj, M., Ahmad, T., Ahad, A., Hussain, Barkat, Ignacimuthu, S. & Chand, Hari. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant Signaling & Behavior. 7 (10): 1306-1320.
- Rodríguez, A., Rodríguez, C. & Cruz, A. 2010 b. Efecto ixodicida de los extractos etanólicos de algunas plantas sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Revista MVZ Córdoba, 15 (3):2175-2184.
- Rodríguez, R., Arieta, R., Pérez, L., Rosado, J., Ramírez, G. & Basto, G. 2010 a. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. Archivos Médicos Veterinarios, 42: 115-123.
- Rodríguez, R., Hodgkinson, J. & Trees, A. 2012. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 3(1): 9-24.
- Rodríguez, R., Ojeda, M., Pérez, L. & Rosado, J. 2011 a. Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. Quiroz H., Figueroa, J., Ibarra, & López, M. editores. Capítulo 33: 477-504.
- Rodríguez, R., Rodríguez, F., Alonso, M., Fragoso, H., Santamaría, V. & Rosario, R. 2006 b. Prevalence and potential risk in *Boophilus microplus* Preventive veterinary medicine, 75: 280-286.
- Rodríguez, R., Rosado, A., Basto, G., Sotero Z., Rosario, R. & Fragoso, H. 2006 a. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria - Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. SAGARPA & Industria Farmacéutica Veterinaria - Comisión de Parasitocidas, 4: 1-30.
- Rodríguez, R., J., Ojeda, M., Pérez, L., Martínez, I. & Bolio, M. 2014. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios, 1(3): 295-308.
- Rodríguez, R., Torres, J., Ramirez, G., Rosado, J., Águilar, A., Ojeda, M. & Bolio M. 2011 b. Manual técnico. Control de parásitos internos y externos que afectan al ganado bovino en Yucatán, México. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
- Rosado, J., Águilar, A., Rodríguez, R., Borges, R., García, Z. & Méndez, M. 2010 b. Acaracidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology, 168 (3): 299-303.
- Rosado, J., Águilar, A., Rodríguez, R., Borges, R., García, Z., Méndez, M., Cáceres, M. & Dorantes, A. 2008 a. Actividad ixodicida de extractos crudos de *Dyospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). Tropical and Subtropical Agroecosystems, 8(3): 297-301.

- Rosado, J., Rodríguez, R., García, Z., Frago, H., Ortiz, A. & Rosario, R. 2008 b. Development of amitraz resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) undergoing typical amitraz exposure in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 152: 349-353
- Rosado, J., Aguilar, A., Rodríguez, R., García, V. & Méndez, M. 2010 a. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) by larval immersion test. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12 (2): 417-422.
- Rzedowski, J. & Calderón G. 2010. Flora Fanerogámica del Valle de México. Edición digital. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora_del_Valle_de_Mx1.pdf. descargado el 10 de agosto del 2014.
- Sardá, V., Tiogo, E., Bordignon, S. Goncalves, K. & Rizzo, E. 2007. Seminario Regional, FAO: Aplicación del control integrado de parásitos (CIP) a la garrapata *Boophilus microplus* en Uruguay. Aplicación del control integrado de parásitos (CIP) en un establecimiento comercial. Montevideo, Uruguay, 9-25.
- Schleske, I. 2011. Prevalencia de unidades de producción con garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a Amidinas y factores de riesgo asociados a su presentación en la región centro del estado de Veracruz (tesis de maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.
- Soberanes, N. Rosario, R., Santamaría, M. & García, V. 2005. Variabilidad en la actividad general de esterases de la garrapata *Boophilus microplus* y su relación con la resistencia a organofosforados. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias*, 43 (2): 239-245.
- Soberanes, Noé., Santamaría, M., Frago, H. & García, Z. 2012. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Técnica Pecuaria en México*, 40 (1): 81-92.
- Stone B. y Haydock K. (1962). A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bulletin of Entomology Research*, 53: 563-657.
- Temeyer, K., Chen, A., Davey, R., Guerrero, F., Howell, J., Kammlah, D., Li, A., Lohmeyer, K., Olafson, P., Pérez de León, A., Phillips, P., Pound, J. & Welch, J. 2012. Nuevos enfoques para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3 (1): 25-40.
- Vázquez, C., Muro, J. & Clavijo, J. 2011. Garrapatas del género *Ixodes* Latreille, 1795 y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) presentes en la colección de Zoología Agrícola, Decanato de Agronomía, UCLA, Lara, Venezuela. *ENTOMOTROPICA*, 26 (2): 89-97
- Vázquez, C., Batis, M., Alcocer, M., Gual, D. & Sánchez, D. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto JO84. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Instituto de Ecología, UNAM. Disponible en http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/JO84_Fichas%20de%20Especies.pdf descargado el 13 de agosto del 2014.

Páginas electrónicas consultadas:

- Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Recuperado el 19 de octubre del 2014, de <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- Situación actual de *Boophilus sp.* 2015. Recuperado el 21 de marzo del 2015, de <http://www.senasica.gob.mx/?id=4393>
- Comisión y Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Recuperado el 19 de agosto del 2014 <http://www.conabio.gob.mx/>

Anexos.

11.1 Pruebas post hoc.

Comparaciones múltiples

HSD de Tukey

Variable dependiente	(I) CONCENTRAC IÓN	(J) CONCENTRAC IÓN	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
EXTRACTODEPA LOAZUL	1	2	-9,000	3,515	,152	-20,57	2,57
		3	-17,297*	3,515	,004	-28,86	-5,73
		4	-45,990*	3,515	,000	-57,56	-34,42
		5	-53,667*	3,515	,000	-65,23	-42,10
	2	1	9,000	3,515	,152	-2,57	20,57
		3	-8,297	3,515	,203	-19,86	3,27
		4	-36,990*	3,515	,000	-48,56	-25,42
		5	-44,667*	3,515	,000	-56,23	-33,10
	3	1	17,297*	3,515	,004	5,73	28,86
		2	8,297	3,515	,203	-3,27	19,86
		4	-28,693*	3,515	,000	-40,26	-17,13
		5	-36,370*	3,515	,000	-47,94	-24,80
	4	1	45,990*	3,515	,000	34,42	57,56
		2	36,990*	3,515	,000	25,42	48,56
		3	28,693*	3,515	,000	17,13	40,26
		5	-7,677	3,515	,260	-19,24	3,89
	5	1	53,667*	3,515	,000	42,10	65,23
		2	44,667*	3,515	,000	33,10	56,23
		3	36,370*	3,515	,000	24,80	47,94
		4	7,677	3,515	,260	-3,89	19,24
COATLINAS	1	2	-,667	,558	,754	-2,50	1,17
		3	-1,333	,558	,195	-3,17	,50
		4	-3,333*	,558	,001	-5,17	-1,50
		5	-5,667*	,558	,000	-7,50	-3,83
	2	1	,667	,558	,754	-1,17	2,50
		3	-,667	,558	,754	-2,50	1,17

MATLALINAS	3	4	-2,667*	,558	,005	-4,50	-,83
		5	-5,000*	,558	,000	-6,84	-3,16
		1	1,333	,558	,195	-,50	3,17
		2	,667	,558	,754	-1,17	2,50
		4	-2,000*	,558	,032	-3,84	-,16
	4	5	-4,333*	,558	,000	-6,17	-2,50
		1	3,333*	,558	,001	1,50	5,17
		2	2,667*	,558	,005	,83	4,50
		3	2,000*	,558	,032	,16	3,84
		5	-2,333*	,558	,013	-4,17	-,50
	5	1	5,667*	,558	,000	3,83	7,50
		2	5,000*	,558	,000	3,16	6,84
		3	4,333*	,558	,000	2,50	6,17
		4	2,333*	,558	,013	,50	4,17
		2	-17,667	6,677	,134	-39,64	4,31
	1	3	-23,333*	6,677	,036	-45,31	-1,36
		4	-24,667*	6,677	,027	-46,64	-2,69
		5	-35,667*	6,677	,002	-57,64	-13,69
		1	17,667	6,677	,134	-4,31	39,64
		3	-5,667	6,677	,909	-27,64	16,31
	2	4	-7,000	6,677	,828	-28,97	14,97
		5	-18,000	6,677	,125	-39,97	3,97
		1	23,333*	6,677	,036	1,36	45,31
		2	5,667	6,677	,909	-16,31	27,64
		4	-1,333	6,677	1,000	-23,31	20,64
	3	5	-12,333	6,677	,401	-34,31	9,64
		1	24,667*	6,677	,027	2,69	46,64
		2	7,000	6,677	,828	-14,97	28,97
		3	1,333	6,677	1,000	-20,64	23,31
		5	-11,000	6,677	,503	-32,97	10,97
	4	1	35,667*	6,677	,002	13,69	57,64
		2	18,000	6,677	,125	-3,97	39,97
		3	12,333	6,677	,401	-9,64	34,31
		4	11,000	6,677	,503	-10,97	32,97