

Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Efficacy of hydroalcoholic extracts of two plants on adult ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Néstor Julián Pulido Suárez¹, Anastasia Cruz Carrillo²

¹M.V.Z. Investigador externo. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja, Colombia. julian_m.v.z@hotmail.com

²M.V. Docente. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia. Anastasia.cruz@uptc.edu.co

Fecha de recepción: 06-02-2012

Fecha de aceptación: 14-02-2013

ABSTRACT

The efficacy of the natural extract of *Verbena officinalis* L. and *Ruta graveolens* L. *in vitro* monitoring of adult tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* was established. The extract of each plant was obtained by maceration. For testing two sizes (small and medium) of adult ticks were exposed to extracts of each plant, by immersion technique. At 24, 48, 72 and 96 h of exposure, mortality was recorded taken as 60% mortality as the effective minimum. Initial tests were conducted with pure extracts, and if efficacy detected, increased dilutions were made to establish the minimum efficiency. Tests were conducted in cool climates conditions. The extract of *R. graveolens* (rue), showed effectiveness in small and medium tick only with the pure extract; *V. officinalis* (common vervain) was effective on small and medium-tick in dilution 5:10. *V. officinalis* showed greater efficacy and found that the best results were obtained at higher concentrations.

Key words: Biological control, phytotherapy, *Ruta graveolens*, *Verbena officinalis*.

RESUMEN

Se determinó la eficacia del extracto natural de *Verbena officinalis* L. y de *Ruta graveolens* L. en el control *in vitro* de la garrapata adulta *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. El extracto de cada planta se obtuvo mediante la técnica de maceración. Para las pruebas, se utilizaron garrapatas adultas de dos tamaños (pequeñas y medianas), que fueron expuestas a los extractos de cada planta, utilizando la técnica de inmersión de garrapatas adultas. A las 24, 48, 72 y 96 h de exposición, se realizó la lectura de mortalidad, donde se tomó como mínimo eficaz una mortalidad de 60%. Las pruebas iniciales se realizaron con extractos puros y cuando éstos mostraban eficacia se procedía a realizar diluciones crecientes, hasta encontrar la concentración mínima eficaz. Las pruebas fueron realizadas en clima frío. El extracto de *R. graveolens* (ruda) mostró efectividad en garrapata pequeña y mediana, sólo con el extracto puro; *V. officinalis* (verbena negra) mostró eficacia sobre garrapata pequeña y mediana en la dilución 5:10. *V. officinalis* mostró mayor eficacia y se observó que los mejores resultados se obtuvieron con las mayores concentraciones.

Palabras claves: control biológico, fitoterapia, *Ruta graveolens*, *Verbena officinalis*.

INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es un ectoparásito hematófago que se encuentra con frecuencia en bovinos, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales y está ampliamente distribuida en Colombia. Dentro de los efectos adversos producidos, se destaca la transmisión de microorganismos de los cuales es vector, como *Babesia* spp., y *Anaplasma* spp.; así mismo, induce anemia, daño de la piel y estrés; esto último conduce a anorexia, disminución de peso y pérdidas económicas en los sistemas de producción animal (Benavides, 1985).

A pesar de que en el ámbito mundial se han utilizado diferentes estrategias para controlar estos ectoparásitos, a través del manejo integrado con control inmunológico por medio de vacunas, hongos, etc., el método más empleado incluye el tratamiento con compuestos químicos como piretroides, organofosforados, carbamatos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos ha favorecido su residualidad en diferentes componentes del ecosistema y la selección de poblaciones de garrapatas resistentes, hasta hacer ineficaz su uso (Pérez *et al.*, 2006).

En respuesta a esta problemática y buscando disminuir los costos que implica la creación de nuevas moléculas biológicamente activas, 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 (Bermúdez *et al.*, 2002).

De acuerdo con las investigaciones realizadas sobre el efecto insecticida de los extractos de plantas, se reporta la existencia de algunas de estas en el territorio de Colombia; tal es el caso de *Azadirachta indica* (Meliaceae), reportada contra garrapatas (Srivastava *et al.*, 2008), *Mammea americana* (Clusiaceae) con acción insecticida sobre mosquitos (Gibson *et al.*, 1996), *Bidens pilosa* (Asteraceae) con acción insecticida sobre el gorgojo de maíz (Gruben, 2004), *Brugmansia arborea* (Solanaceae) con efecto insecticida y repelente sobre *Rhynchophorus palmarum* (Pérez, 2006) y *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) con acción sobre la mosca *Haematobia irritans*. De igual forma, se reconocen otras especies promisorias con acción insecticida como *Sambucus nigra* (Adoxaceae), *Ambrosia cumanenses* (Asteraceae), *Ruta graveolens* (Rutaceae) y *Urtica dioica* (Urticaceae) (Gruben, 2004).

Es así como partiendo del uso que por tradición cultural se da a las plantas medicinales, consideradas ixodicidas en ciertas zonas del departamento de Boyacá, se desarrolló este estudio, con el fin de evaluar la eficacia del extracto natural de *Verbena officinalis* L. y *Ruta graveolens* L., en el control *in vitro* de la garrapata adulta *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

El estudio fue de tipo experimental *in vitro* y se desarrolló en tres fases. La primera consistió en la colecta de las plantas y la elaboración de los extractos por maceración, en el municipio de Nuevo Colón, Boyacá, Colombia. La segunda fase comprendió la colecta de garrapatas de bovinos parasitados naturalmente, en el municipio de Nuevo Colón, y el mantenimiento de las mismas en una cámara a temperatura constante de 18 °C y 75% de humedad relativa (HR), en el laboratorio de nutrición animal de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC). La tercera fase consistió en evaluar la eficacia ixodicida de cada extracto y de sus diluciones sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Colecta de plantas y elaboración de extractos

Se seleccionaron dos plantas con acción ixodicida, estas fueron: *V. officinalis* y *R. graveolens*. En los dos casos, se tomaron únicamente las hojas, que fueron cortadas con tijeras hasta alcanzar una cantidad superior a 5 kg, las cuales se colocaron en una superficie limpia, separadas unas de otras. Durante el secado se mantuvieron a temperatura ambiente, en un lugar aireado, cubierto y seco. Completado el secado, las hojas se trituraron manualmente hasta obtener una cantidad de 500 g y a partir de ahí se obtuvo el extracto necesario para las pruebas.

El método empleado para la elaboración de los extractos de las dos plantas analizadas fue la maceración (Sharapin, 2000), utilizado como método de extracción en práctica de campo en productos naturales. Macerar es colocar la muestra en el solvente escogido y dejarla unos días; para ello, se usaron, por planta, 500 g de material seco y molido que se colocó en un recipiente color ámbar, y se le adicionó agua y alcohol al 70% en una relación 1:3.

A esta mezcla de alcohol y agua, se agregaron los 500 g de material molido. Se agitó y se dejó en reposo

poder 10 a 15 días, revolviendo ocasionalmente; cumplido este tiempo, se filtró la mezcla en un lienzo; se descartó el ripio y así se obtuvo el extracto, se conservó a una temperatura ambiente entre 15 y 20 °C.

Con el objeto de comprobar si la extracción resultó eficaz y si realmente se obtuvieron los metabolitos secundarios responsables del efecto ixodicida, los extractos se sometieron a cuatro pruebas, para determinar los posibles metabolitos presentes en cada uno de ellos. Para cada una de las pruebas se tomaron 2 mL de cada extracto, se depositaron en tubos de ensayo ubicados en una gradilla, guardando siempre el mismo orden:

- Prueba de Shinoda para identificación de flavonoides: se efectuó agregando lentamente magnesio en limaduras y posteriormente, gotas de ácido clorhídrico; después se esperó 2 minutos para saber si se producía un cambio de coloración verde violeta (indicación de que es positivo a flavonoides).
- Prueba de Wagner para identificación de alcaloides: se efectuó empleando un reactivo de precipitación de Wagner (yodo y yoduro potasio) (Jurado, 2010); luego se esperó 2 minutos, para saber si se presentaba un cambio de coloración roja (indicación de que es positivo a alcaloides).
- Reacción de Legal para la identificación de cumarinas: se adicionó una solución de nitroprusiato de sodio 0,5% y unas gotas de KOH 2N (hidróxido de potasio) en cada una de las muestras de extracto, y se esperó a que se presentara el cambio de coloración a roja, que se interpreta como positiva a cumarinas (Sanabria *et al.*, 1997).
- Reacción de saponinas: los 2 mL de extracto se diluyeron en 5 veces su volumen en agua destilada, se agitó durante 5 min y se esperó más de 2 minutos a que se presentara espuma en la superficie, lo que se interpreta como positiva a saponinas (Lock, 1999).

Colecta y mantenimiento de las garrapatas

Las garrapatas adultas de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se colectaron en animales parasitados naturalmente, en el municipio de Nuevo Colón, Boyacá. Para tal propósito, se pasó suavemente la mano sobre el animal, una vez detectada la garrapata se procedió a girarla y tirarla suavemente en contrapelo hasta desprenderla (Gallardo, 1999). Posteriormente se colocaron en envases de vidrio y se llevaron al laboratorio de la UPTC, donde fueron lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% para prevenir contaminación

bacteriana y fúngica; se eliminaron aquellas que presentaban mutilaciones o malformaciones y finalmente se procedió a su identificación como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* utilizando las claves taxonómicas (Martins, 2006).

Durante toda la fase experimental se mantuvieron en condiciones controladas de humedad y temperatura por 24 h (75% HR \pm 18 °C), tiempo que se tomó como estabilización, por si se presentaba algún tipo de alteración o muerte. Diariamente se examinaron visualmente o con la ayuda de un estereoscopio para registrar la vitalidad de las garrapatas.

Cumplido este tiempo, las garrapatas se clasificaron según su tamaño, en pequeñas y medianas. Una vez clasificadas, fueron divididas en grupos de diez y ubicadas en cajas de Petri colocadas sobre icopor a temperatura ambiente (Gallardo, 1999).

Evaluación del efecto ixodicida de los extractos puros y las diluciones

Con el fin de evaluar cada uno de los extractos puros, así como las diluciones obtenidas a partir de estos, se emplearon para cada caso, tres grupos con diez garrapatas cada uno, lo que constituyó el grupo expuesto a cada extracto y sus tres réplicas.

La exposición de las garrapatas (pequeñas y medianas) a los extractos, se hizo mediante la prueba de inmersión de adultas (Bravo *et al.*, 2008). Para esto, en una caja de Petri se depositaron 10 mL del extracto a probar (puro o dilución), luego se colocaron allí las garrapatas ($n = 10$), las cuales se sumergieron completamente con la ayuda de una aguja de punta roma, para evitar daño en la cutícula, permaneciendo sumergidas durante 10 min; completado este tiempo, se eliminó el extracto (Bravo *et al.*, 2008), dejando así las garrapatas en un medio seco. Posteriormente, las cajas se taparon con un lienzo y se rotularon, indicando el nombre del extracto, la dilución y hora de exposición.

Se evaluó el efecto de cada extracto puro y posteriormente se evaluaron las diluciones de cada uno. Las diluciones evaluadas no fueron necesariamente las mismas para todos los extractos, puesto que se aplicó el método de mínimas y máximas, empleado en farmacología, para hallar dosis efectivas de moléculas nuevas. Bajo este concepto, la concentración del extracto se aumentó o disminuyó, aproximadamente 50%, respecto a la anterior, de acuerdo con los resultados de mortalidad.

En consecuencia, cuando la mortalidad fue efectiva, se preparó el extracto a una dilución mayor hasta encontrar la mínima eficaz.

De igual modo, y siguiendo la metodología descrita para la exposición de las garrapatas a los extractos, se trabajó con un grupo control positivo, en el que se empleó un insecticida piretroide a base de cipermetrina al 15%, preparado según las recomendaciones de la etiqueta (dilución 1:1000 en agua). Igualmente, se contó con dos grupos control negativo, empleando agua destilada y alcohol al 70%. Los grupos control, positivo y negativo, y sus respectivas réplicas, se mantuvieron en las mismas condiciones del ensayo.

La mortalidad de las garrapatas se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la aplicación del extracto; se consideraron garrapatas muertas aquellas que luego de una exposición a una fuente de calor durante 10 min mostraron ausencia de movimientos en sus patas. Se tomó como valor mínimo de eficacia una mortalidad de 60%, por lo cual valores inferiores fueron tomados como ineficacia (FAO, 1993).

Análisis estadístico

El experimento se desarrolló empleando un diseño completamente al azar. Los porcentajes de mortalidad fueron comparados entre grupos a través de un análisis de varianza y las diferencias estadísticas se determinaron mediante la prueba de comparación de medias de Tukey, con el uso del programa SPSS para Windows, versión 11.5.1 del 2002.

RESULTADOS

El método de extracción por maceración permitió obtener a partir de 500 gramos un volumen final de extracto puro de 5 L, con una concentración del 100% para *R. graveolens* y *V. officinalis*. En cuanto a las características de consistencia y olor, todos los extractos fueron líquidos, con olor característico a la planta de origen, excepto *V. officinalis* que mostró un olor a caramelo.

Análisis preliminar de metabolitos secundarios

En la prueba de Shinoda para la identificación de flavonoides, el extracto de *V. officinalis* resultó el único que presentó un cambio de coloración verde violeta. Para la evaluación colorimétrica de Wagner se presentó un cambio de coloración rojo marrón, positiva a alcaloides, en los extractos de *V. officinalis* y *R. graveolens*. En la reacción de Legal para el análisis preliminar de cumarinas, la única muestra positiva fue el extracto hidroalcohólico de *R. graveolens*. En la reacción para Saponinas se encontró mayor cantidad en el extracto de *V. officinalis* que en el de *R. graveolens*.

A partir del extracto hidroalcohólico de *V. officinalis* (verbena negra), se prepararon dos diluciones con agua destilada, 5:10 y 2,5:10 con las que se consiguieron mortalidades de 60% y 30%, respectivamente, y con el extracto puro una mortalidad de 66,6% (figura 1).

En el grupo de garrapatas expuestas al extracto hidroalcohólico de *R. graveolens*, únicamente el extracto puro mostró eficacia sobre *Rhipicephalus (Boophilus)*

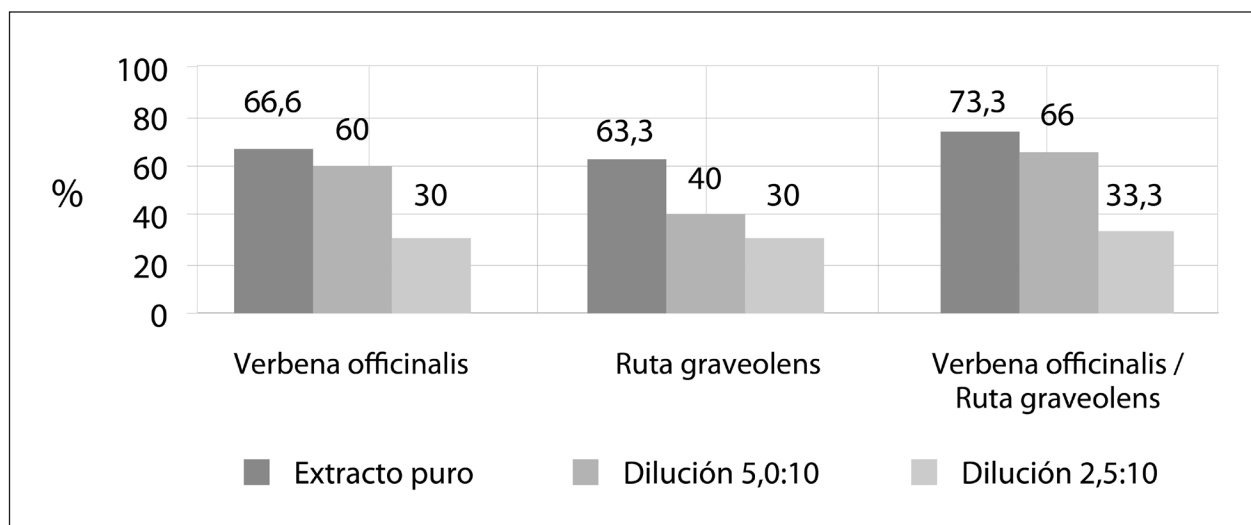


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* expuesta a extractos hidroalcohólicos de dos plantas medicinales

microplus, con una mortalidad de 63,3%. En el caso de la mezcla del extracto de *V. officinalis* y *R. graveolens* se encontró eficacia ixodicida con el extracto puro y la primera dilución, con mortalidades por encima de 65%, el cual mostró los niveles de mortalidad más altos contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (figura 1).

Analizando los resultados alcanzados con el grupo control positivo, se corroboró la eficacia del producto utilizado y del método de aplicación, observándose que hubo mortalidad de 70% en la dilución indicada en la etiqueta (1:1000). Con el grupo control negativo, se observó una mortalidad de 10%.

DISCUSIÓN

Analizando los resultados del extracto de *V. officinalis*, se encontró que con el uso de diluciones altas (5,0:10) se alcanzan resultados efectivos. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, se ratificó la acción de la verbena, reportada por varios autores (Martins, 2006).

Aunque la acción ixodicida de la *V. officinalis* no se había valorado en garrapatas, una vez analizados los resultados del presente trabajo *in vitro*, se puede confirmar que es efectiva como ixodicida y que en las condiciones planteadas en la investigación, se podría pensar en su posible uso como ixodicida natural en las producciones bovinas, no sin antes realizar estudios de toxicidad y residualidad en los animales tratados.

A pesar de la poca eficacia que mostró en este estudio, *R. graveolens* popularmente en el departamento de Boyacá es considerada una planta medicinal útil como insecticida y para infecciones parasitarias intestinales. Su acción como insecticida natural se atribuye a su principal componente, los taninos (Van Ginkel, 2003). En estudios realizados con *R. graveolens* sobre *Haemonchus contortus*, este extracto mostró ser eficaz en diluciones bajas (1,2:10), donde la mortalidad reportada fue de 75% (Mendoza, 2004). Sin embargo, en estudios donde se evaluó la mortalidad y repelencia en larvas de *Rhynchophorus palmarum* L. y *Eupalmides cyparissias* (Lepidoptera: Castniidae), se reportó una baja mortalidad con un aceptable efecto repelente (Pérez, 2006). Por lo anterior, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, se podrían llevar a cabo investigaciones que prueben su efecto repelente sobre garrapatas. Además, teniendo en cuenta los altos contenidos en flavonoides y cumarinas, es necesario realizar pruebas de toxicidad antes de empezar el uso en animales.

Se puede concluir que el extracto hidroalcohólico que presentó el mejor índice de mortalidad sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fue el obtenido con la planta *V. officinalis*.

En las pruebas realizadas con los extractos de las dos plantas estudiadas (extracto puro y diluciones), se observó que el tamaño del parásito influye sobre la eficacia de los extractos, observándose una mortalidad menor en garrapatas medianas que en garrapatas pequeñas. Además, se evidenció que la eficacia fue directamente proporcional a la dilución del extracto, ya que cuanto más diluido se encontraba el extracto menor era el porcentaje de mortalidad, posiblemente por la relación dosis-respuestas en la cual la mayor concentración de compuestos químicos logra un efecto insecticida más notorio (Álvarez *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

La investigación permitió la identificación de metabolitos secundarios como lo son flavonoides, cumarinas, alcaloides y saponinas, responsables del efecto ixodicida conseguido tras la utilización de extractos hidroalcohólicos de dos plantas.

Se puede concluir que el extracto hidroalcohólico que presentó el mejor índice de mortalidad (66,6%) sobre la *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fue el obtenido con la planta *V. officinalis*; además de presentar las diluciones más altas (5,0:10) manteniendo una mortalidad superior o igual al 60%.

Los resultados del estudio muestran que el uso de extractos naturales es una alternativa de elaboración artesanal, limpia y segura para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, alternativa que puede ser incorporada a programas de manejo integrado de las infestaciones de ganado bovino por dicho parásito.

El uso de extractos de plantas para controlar las garrapatas, especialmente *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es una alternativa viable, dado el enorme número de plantas con actividad ixodicida.

Es necesaria la realización de investigaciones donde se determine el nivel de concentración, estabilidad de las sustancias químicas en los extractos puros y en sus diluciones, así como la identificación de las sustancias responsables del efecto tóxico. De manera complementaria

será necesario investigar diversos tipos de solventes con el fin de lograr una penetración eficaz de los compuestos activos en la cutícula del parásito y con ello facilitar la acción de éstos.

Finalmente, teniendo en cuenta que los componentes activos de las plantas pueden variar por muchos factores, es recomendable la realización de trabajos similares, donde se evalúe la acción de estas plantas, utilizando diferentes partes de la planta (hojas, raíces, frutos) y

diferentes métodos de extracción como hidrolatos, infusión, extracción en caliente (Soxhlet), etc. Además de probar con solventes diferentes, tanto en la elaboración como en la dilución del extracto. Asimismo, realizar pruebas, evaluando efectos repelentes, inhibidores de queratina y oviposición en las garrapatas. También es adecuada la realización de pruebas in vivo y estudios de toxicidad, que permitan conocer el riesgo potencial de estas plantas promisorias en las especies animales de interés.

REFERENCIAS

- Alonso Díaz M, Rodríguez Vivas R, Frago Sánchez H, Rosario Cruz R. 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodídeos. Arch Med Vet 38(2):105-113.
- Álvarez V, Loaiza J, Bonilla R, Barrios M. 2008. Control *in vitro* de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. Rev Biol Trop 56(1):291-302.
- Benavides E. 1985. Consideraciones con relación a la epizootiología de anaplasmosis y babesiosis en los bovinos. Revista ICA 20 (1):69-75.
- Bermúdez A, Velásquez E. 2002. Etnobotánica médica de una comunidad campesina del estado de Trujillo, Venezuela: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. Rev Fac Farm 44:2-6.
- Bravo M, Coronado A, Henríquez H. 2008. Eficacia *in vitro* del amitraz sobre poblaciones de *Boophilus microplus* provenientes de explotaciones lecheras del estado de Lara, Venezuela. Zootecnia Trop 26(1):35-40.
- Davicino R, Mattar MA, Casali YA, Correa SG, Pettenati EM, Micalizzi B. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Rev Peru Biol 14(2):247-252.
- De Cupere F, Vandebroek I, Puentes M, Torres S, Van Damme P. 2001. Evaluation of vegetal extracts as biological herbicides and pesticides for their use in Cuban agriculture. Meded Rijksuniversiteit Gent Fak Landbouwkunde Toegep Biol Wet 66(2a):455-62.
- FAO. 1993. Norma Mexicana No 006 - Zoo, requisitos de efectividad biológica para los ixodídeos de uso en bovinos y método de prueba. México: Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.
- Fonnegra R, Jiménez SL. 2006. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2a ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia. p. 20-25.
- Gallardo JS, Morales J. 1999. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo negativo. Bioagro; 11(3):77-87.
- Gibson DM, Greenspan Gallo L, Allee L. 1996. Insecticidal effectiveness of *Mammea americana* (Guttiferae) extracts on larvae of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera:Chrysomelidae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera:Noctuidae). Economic Botany 50(2):236-242.
- Gorriti GA, Zárate OR, Jurado TB. 1998. Bioensayos en especies de *Bidens* con actividad terapéutica. Ciencia e Investigación, SISBIB. Consulta: 19 de junio, 2009; http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v01_n2/bidens.htm.
- Gruben GJ. 2004. Plant Resources of Tropical Africa. Netherlands: Backhuys publishers.
- Iannacone J, Ayala H, Román A. Efectos toxicológicos de cuatro plantas sobre el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulski 1855 (coleoptera:curculionidae) y sobre el gorgojo de las galletas *Stegobium paniceum* (Linnaeus 1761) (coleoptera:anobiidae) Perú. Gayana 69(2):234-240.
- Jurado B. 2010. Preparación de extractos y estudio fitoquímico de plantas biocidas. Universidad del Perú. Lima, Perú. p. 1-26.
- Lock O. 1999. Métodos de estudio de Productos naturales. Perú: Fondo Editorial Investigación Fitoquímica. 183-195.
- Martins RM, 2006. Estudio *in vitro* de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. Rev Bras Pl Med Botucatu 8(2):71-78.
- Mendoza P, López A. 2004. Estrategias para el control integral de las nematodosis gastrointestinales de los rumiantes. Libro Técnico No 1, publicado por el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. 2ª ed. INIFAP. México. p. 1-9.
- Osorno Mesa E. 2006. Las garrapatas de la República de Colombia. Biomédica 26(3):317-336.
- Pérez D, Iannacone J. 2006. Efectividad de extractos botánicos de diez plantas sobre la mortalidad y repelencia de larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., insecto plaga del Pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. Agric Téc 66(1): 21-30.
- Pérez I, Palma C, Villegas R, Vega M, Pérez R. 2006. Metodología analítica y detección de residuos de Ivermectina en muestras de leche de rebaños de la provincia de Ñuble, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria 38(2):143-150.
- Restrepo GM, Llanos RN, Fonseca ECE. 2007. Composición de las oleorresinas de dos variedades de ají picante (habanero y tabasco) obtenidas mediante lixiviación con solventes orgánicos. Rev Lasallista Invest 4(001):14-9.
- Ruedisueli FL, Manship B, 2006. Tick identification key. University of Lincoln. En línea. Consulta 19 de junio de 2009. URL disponible en: http://webpages.lincoln.ac.uk/fruedisueli/FR-ebpapes/parasitology/Ticks/TIK/tick-key/softticks_adult.htm.
- Sanabria G, López I, Gualdro R, 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemisa salina* de plantas colombianas. Revista Colombiana Ciencias Químicas Farmaceut (26):15-9.
- Sharapin N. 2000. Fundamentos de fitotecnología de productos fitoterapéuticos. Colombia: Convenio Andrés Bello.

Srivastava R, Ghosh S, Mandal DB, Azhahianambi P, Singhal PS, Pandey NN *et al.* 2008. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. Parasitol Res 104(1):149-53.

Torres AM, Richiardi GAL, Nassiff A, Ricciardi AE, Armando IA, Dellacassa E. 1999. Examen del aceite esencial de *Ambrosia tenuifolia*, "altamisa" de San Lorenzo, Corrientes. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. En línea. Consulta 19 de junio de 2009). URL disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/8-Exactas/E-011.pdf>.

Van Ginkel A. 2003. Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB "Plantas medicinales y fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y producción. 50-55.