

EVALUACION DE LAS PROPIEDADES ACARICIDAS DE *Piper crassinervium* Kunth. *Piper aequale* Vahl. (PIPERACEAE) SOBRE LARVAS DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (ACARI: IXODIDAE)

JOSE LUIS GARCIA PAZ

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADOS
PALMIRA
2011**

**EVALUACION DE LAS PROPIEDADES ACARICIDAS DE *Piper crassinervium*
Kunth. *Piper aequale* Vahl. (PIPERACEAE) SOBRE LARVAS DE *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) (ACARI: IXODIDAE)**

JOSE LUIS GARCIA PAZ

**Trabajo De Grado Para Optar El Título De Magister En Ciencias Agrarias Área
Producción Animal Tropical**

DIRIGIDO POR:

NORA CRISTINA MESA COBO. PhD

COORDIRECTOR:

MANUEL SALVADOR SANCHEZ. MSc

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADOS
PALMIRA
2011**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS
LINEA DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN ANIMAL TROPICAL

En Palmira a los 25 días del mes de Noviembre de 2011, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores LUIS ALEJANDRO VIDAL y CARLOS ALBERTO JARAMILLO CRUZ

Para calificar la Tesis de Grado de:

JOSE LUIS GARCÍA PAZ

Titulada:

“EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ACARICIDAS DE *Piper crassinervium* Kunth. *Piper aequale* Vahl. (PIPERACEAE) SOBRE LARVAS DE *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Canestrini, 1887) (ACARI:IXODIDAE)” bajo la dirección de Nora Cristina Mesa Cobo y Manuel Salvador Sánchez.

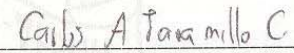
Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los docentes LUIS ALEJANDRO VIDAL y CARLOS ALBERTO JARAMILLO, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA



LUIS ALEJANDRO VIDAL



CARLOS ALBERTO JARAMILLO C.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida y por permitirme alcanzar un peldaño más a nivel profesional.

A mis adorados padres Jose Marcos García y Nohemy Paz, a mis hermanos Victor Manuel García, Oscar Fernando García, por su educación, por su amor y por su apoyo en todo este tiempo, los llevo como siempre en el corazón.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen Maria, por acompañarme siempre en las buenas y en las malas en mis logros profesionales, y en especial a:

Mi directora de tesis Nora Cristina Mesa por su apoyo, dedicación y paciencia en este Proyecto, a los profesores Manuel Salvador Sanchez por su colaboración, Javier Benavides por ser el iniciador de este proyecto, Julio Cesar Castro por su hospitalidad en su finca en la parte de campo.

Al grupo de Acarología un agradecimiento especial a: Milton Orlando Valencia, Karol Imbachi Lopez, Hector, Indira, Mayra, Yuri, Yeimy, Wilmar.

A los laboratoristas: Alfredo Rivera, Hojannes Delgado, Adriana Valencia, Andres Posso, Fernando Estrada, Jefferson Paz por su apoyo en prácticas y por sus concejos.

A los jurados Carlos Alberto Jaramillo, Luis Alejandro Vidal por sus aportes.

A toda la familia García Paz, a mis primos y primas.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira sus Profesores y sus laboratorios de Acarologia – Entomología, Fitoquímica, Granja Mario Gonzales Aranda, Nutrición animal.

A la facultad de Ciencias Agropecuarias por estar siempre pendientes de sus estudiantes de maestría.

A mis amigos y amigas, Laura Clavijo, Johana Santacruz, Lorena Ceron, Ernesto Hernandez, Oscar Perenguez, Raul Molina, Mabel Coronado, Juliana, Jenny Patricia, Asshly Lisset, Paola Mosquera, Luzmarina, Jesus Alberto Cajas, Dilio Pechene. Y a todos los que se me escapan pero que saben que están en el corazón

La facultad y los jurados de tesis no se harán
responsables de las ideas emitidas por el autor
Artículo 24, resolución 04 de 1974

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION	13
1. OBJETIVOS	15
1.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.1.1 ESPECÍFICOS	15
2. REVISION DE LITERATURA	16
2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA GARRAPATA DEL GANADO <i>R. (B.) microplus</i>	16
2.2 CARACTERÍSTICAS RELEVANTES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>R. (B.) microplus</i>	17
2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS de <i>R. (B.) microplus</i>	19
2.4 METODOS DE CONTROL de <i>R. (B.) microplus</i>	20
2.5 CONTROL QUÍMICO de <i>R. (B.) microplus</i>	21
2.6 RESISTENCIA A PLAGUICIDAS de <i>R. (B.) microplus</i>	21
2.7 CONTROL BIOLÓGICO DE <i>R. (B.) microplus</i>	24
2.8 USO DE EXTRACTOS DE PLANTAS COMO CONTROLADORES DE ESPECIES DE IXODIDOS	25
2.9 IMPORTANCIA DE ESPECIES DE PLANTAS DE LA FAMILIA PIPERACEA 28	
2.9.1 <i>Piper crassinervium</i>	31
3. SOLVENTES USADOS PARA DILUSION DE EXTRACTOS VEGETALES	32
4. METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD ACARICIDA	34
4.1 Terpenoides	34
4.2 Alcaloides	35
4.3 Compuestos fenólicos	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1 Localización de la zona de colecta	38
5.2 Colección de las especies de plantas estudiadas	38
5.3 Marcha Fitoquímica	41

5.3.1 Deteccion de Alcaloides.....	41
5.3.2 Esteroides y triterpenoides	42
5.3.3 Saponinas	42
5.3.4 Coumarinas	42
5.3.5 Flavonoides	43
5.4 Obtención de extractos acuosos.....	43
5.5 Obtención de aceites esenciales a través del método de arrastre por vapor	44
5.6 Caracterización fitoquímica por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC – MS) de los aceites esenciales de las especies <i>P. crassinervium</i> y <i>P. aequale</i>	45
5.6.1 Descripción del Análisis	46
6. COLECTA, PREPARACIÓN Y MONTAJE DE HEMBRAS DE <i>R. (B.) MICROPLUS</i> PARA LA OBTENCIÓN DE LARVAS	47
6.1 Evaluación de extractos vegetales acuosos, aceites esenciales de <i>P. crassinervium</i> , <i>P. aequale</i> y tres productos químicos sobre larvas de <i>R. (B.) microplus</i>	50
6.1.1 Tratamientos.....	50
6.1.2 Procedimiento	50
6.1.3 Diseño experimental	52
6.1.4 Evaluaciones	52
7. RESULTADOS Y DISCUSION	54
7.1 Marcha Fitoquímica de las ocho especies de plantas.....	54
7.2 Evaluación de la actividad acaricida de extractos acuosos y extractos oleosos de <i>P. crassinervium</i> , <i>P. aequale</i> y de los productos químicos cipermetrina, amitraz, dravafos, sobre larvas de <i>R. (B.) microplus</i>	56
7.4 Deteccion De La Composicion Química De Aceites Esenciales Por Cromatografia De Gases Con Detector Selectivo De Masas (GC – MS) para <i>P. crassinervium</i> y <i>P. aequale</i>	61
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFIA	69
ANEXOS.....	96

LISTA DE TABLAS

	pág.
TABLA 1. COLECCIÓN REFERENCIA DE HERBARIO.....	39
TABLA 2. TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN BIOENSAYOS	51
TABLA 3. MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR	55
TABLA 4. CONCENTRACIONES LETALES CL 50, CL 90.....	57
TABLA 5. COMPARACION DE LA MORTALIDAD EFECTUADA POR LOS PRODUCTOS EVALUADOS MEDIANTE PRUEBA DEL RANGO ESTUDENT (TUKEY).....	61
TABLA 6. DETECCION DE LA COMPOSICION QUÍMICA DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFIA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS (GC – MS) PARA LA ESPECIE <i>PIPER CRASSINERVIUM</i>	62
TABLA 7. DETECCION DE LA COMPOSICION QUÍMICA DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFIA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS (GC – MS) PARA LA ESPECIE <i>PIPER AEQUALE</i>	65

LISTA DE FIGURAS

pág.

FIGURA 1. A. <i>Erythroxylum Citrifolium</i> A.ST HILL; B. <i>Philodendron Yotocoense</i> CROAT.; C. <i>Piper Crassinervium</i> KUNTH; D. <i>Pteridium Aquilinum</i> L. KUHN; E. <i>Piper Aequale</i> VAHL; F. <i>Toxicodendrum Striatum</i> RUIZ & PAV.; G. <i>Solanum Sp.</i> ; H. <i>Ladenbergia Magnifolia</i> RUIZ & PAV KLOTZSCH	40
FIGURA 2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS. A. MOLINAJE HOJAS; B. MEZCLA DE MATERIAL CON ETANOL (80:20); C. FILTRADO; D. EMPAQUE; E. DETERMINACIÓN SÓLIDOS (ESTUFA/105 °C); F. SOLUCIÓN MADRE	44
FIGURA 3. EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL POR ARRASTRE DE VAPOR. A. PROCESO DE SECADO; B. PESO DE HOJAS; C. EXTRACCIÓN CON ARRASTRE DE VAPOR (EQUIPO CLEVENGER); D. ACEITE ESENCIAL (FASE ACUOSA)	45
FIGURA 4. COLECTA, PREPARACIÓN Y MONTAJE DE HEMBRAS DE <i>R. (B.) Microplus</i> PARA LA OBTENCIÓN DE LARVAS. A. COLECTA ADULTAS <i>R. (B.) microplus</i> ; B. MONTAJE DE ADULTAS <i>R. (B.) microplus</i> ; C. LARVAS DE <i>R. (B.) microplus</i> (VISTA MICROSCOPIO ÓPTICO); D. HUEVOS DE <i>R. (B.) microplus</i> ECLOSIONANDO; E. JERINGA MODIFICADA CON MICROPORE; F. CAMARA DE CRIA	48
FIGURA 5. EVALUACIONES DE EXTRACTOS ACUOSOS, ACEITES ESENCIALES Y ACARICIDAS QUIMICOS. A. HOMOGENIZACION DE TRATAMIENTOS; B. LECTURA PH; C. INMERSIÓN DE LARVAS <i>R. (B.) microplus</i> ; D. SECADO LARVAS <i>R. (B.) microplus</i> ; E. MONTAJE Y EVALUACIÓN DE LARVAS <i>R. (B.) microplus</i> ; F. JERINGA MODIFICADA CON MICROMALLA	53
FIGURA 6. PROBIT EXTRACTO <i>Piper crassinervium</i>	58
FIGURA 7. PROBIT EXTRACTO <i>Piper aequale</i>	58
FIGURA 8. PROBIT ACEITE <i>Piper crassinervium</i>	59
FIGURA 9. PROBIT ACEITE <i>Piper aequale</i>	59

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la actividad acaricida de extractos crudos y aceites esenciales, se colectaron hojas en la Reserva Bosque Natural de Yotoco, de las especies *Erythroxylum citrifolium* A.St Hill; B. *Philodendron yotocoense* Croat.; C. *Piper crassinervium* Kunth; D. *Pteridium aquilinum* L. Kuhn; E. *Piper aequale* Vahl; F. *Toxicodendrum striatum* Ruiz & Pav.; G. *Solanum sp.*; H. *Ladenbergia magnifolia* Ruiz & Pav klotzsch, las cuales fueron sometidas a una marcha fitoquímica preliminar para la detección de metabolitos secundarios, detectando evidencia de mayor contenido de alcaloides en *T. striatum*, seguido por *P. crassinervium*, *P. aequale*, *E. citrifolium* y en escasa cantidad para *Solanum sp.* En las otras plantas no fueron visibles los alcaloides. En el aceite esencial para las especies *P. crassinervium* y *P. aequale*, se encontraron 52 y 58 compuestos respectivamente, los componentes encontrados en mayor proporción en *P. crassinervium* fueron, Limoneno (19%), Germacreno D (16,7 %), sabineno (8,1 %), α - Pineno (7,6 %), Biciclogermacreno (4,7%), en *Piper aequale* Germacreno D (17.4), δ - Cadineno (4.9 %), β - Selineno (46 %), Trans - β - Cariofileno (4.1 %), α - Gurjuneno (3.6%). Los tratamientos químicos presentaron las mayores mortalidades promedio para larvas de *Rhipicephalus (Booophilus) microplus* de acuerdo a la (Prueba Rango de student de Tukey $P > 0.05$), Cipermetrina 82.8%, dravafos 75.7 % y amitraz con 52,2 %. Los aceites esenciales de *P. crassinervium* y *P. aequale*, presentaron mortalidad de 38.2% y 29.4%; extractos acuosos 9.3% y 7.3%.

Las plantas de la familia *Piperaceae*, son promisorias en el manejo de este acaroparasito y dada su abundancia en la reserva Bosque de Yotoco, y a sus compuestos de acción acaricida son factibles de realizar investigaciones dilucidando más la realidad en su acción acaricida.

Palabras clave: Acaricida, *Rhipicephalus (Booophilus) microplus*, extractos acuosos, aceites esenciales, *Piper crassinervium*, *Piper aequale*, Reserva Natural Bosque de Yotoco.

ABSTRACT

In order to evaluate the activity acaricide crude extracts and essential oils, collected leaves in the Forest Reserve Natural de Yotoco, of the species *Erythroxylum citrifolium* A. San Hill; B. *Philodendron yotocoense* Croata.; C. *Piper crassinervium* Kunth; D. *Pteridium aquilinum* L. Kuhn; E. *Piper aequale* vahl; F. *Toxicodendrum striatum* Ruiz & Pav.; G. *Solanum* sp. ; H. *Ladenbergia magnifolia* Ruiz & Pav klotzsch, which were subjected to a march preliminary phytochemical, detecting evidence of greater content of alkaloids in *T. striatum*, followed by *P. crassinervium*, *P. aequale*, *E. citrifolium* and lack of quantity to *Solanum* sp. In the other plants were not visible the alkaloids. In the essential oil to the species *P. crassinervium* and *P. aequale*, it was found 52 and 58 compounds respectively, the components found in greater proportion in *P. crassinervium* were Limonene (19 %), Germacrene D (16.7 %), sabinene (8.1 %), α -pinene (7.6 %), Bicyclogermacrene (4.7 %), in *Piper aequale* Germacrene D (17.4 %), - cadinene (4.9 %), β - Selinene (46 %), Trans - β - caryophyllene (4.1 %) , A - Gurjunene (3.6 %). Chemical treatments presented the greatest average mortalities larvae of *R. (B.) microplus* according to the (Test Range of student Tukey $P > 0.05$), Cypermethrin 82.8 %, dravafos 75.7 % and amitraz with 52.2 %. The essential oils of *P. crassinervium* and *P. aequale* presented mortality of 38.2 % and 29.4 %; aqueous extracts 9.3 % and 7.3 %. The plants of the family *Piperaceae*, are promising in the management of this mite - ectoparasite and given its abundance in the forest reserve de Yotoco, and their compounds of acaricide action are feasible research deliberating more reality in its action acaricide.

Key Words: Acaricide, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, aqueous extracts, essential oils, *Piper crassinervium*, *Piper aequale*, Natural Reserve Forest de Yotoco.

INTRODUCCION

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) es considerado el más importante parásito del ganado, infesta principalmente bovinos y búfalos, reduciendo la producción ganadera, produce pérdida de peso en los animales y disminuye la producción de leche. Su mayor importancia radica en ser vector de enfermedades limitantes en el trópico como la babesiosis (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*) y anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) Peter *et al.* (2005). La FAO (2007) reporta el gran impacto económico ocasionado por este ectoparásito con pérdidas entre 2000 a 3000 millones de dólares en el mundo. Benavides (2001) estimó que en Colombia las pérdidas ascendían en 76.713 millones de pesos por año.

El uso inadecuado e indiscriminado de sustancias de síntesis químicas como Organofosforados (OP), piretroides sintéticos (SP), amidinas (Am) y lactonas macrocíclicas (ML) han ocasionado múltiples problemas en el manejo de las garrapatas, ya que desde hace varios años se está reportando desarrollo de resistencia a varios de estos productos (Aguilar & Rodríguez, 2003; Rodríguez *et al.*, 2005; Rosario & Hernández, 2001). Además del impacto sobre el medio ambiente y la fauna benéfica.

Los compuestos químicos derivados de plantas se presentan como una alternativa a los productos de síntesis química, ya que tienen baja toxicidad, son solubles en agua y se degradan mejor en el ambiente, por radiación solar y humedad. Estas propiedades permiten reducir el desarrollo de resistencia acaricida y el alto impacto ecológico en los sistemas ambientales (Chungsamarnyart *et al.*, 1988, 1991; Morales & García 2000; Iannacone & Lamas 2002, Fernández & Freitas, 2007).

En Colombia se tienen reportes de especies como el “Rústico” *Monnina phytolaccaefolia* H.B.K. (Polygalaceae) y el Tabaco *Nicotiana tabacum* Morales L. (Solanaceae) con efectos acaricidas representados en mortalidad larvaria y reducción de eficiencia reproductiva. Así mismo existen reportes de la acción acaricida de las semillas de *Annona muricata* L.

(Annonaceae), las flores de *Syzygium malaccensis*. Merr & Perry (Myrtaceae) y las semillas de *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) (Pórtela *et al.*, 2003; Micheletti *et al.*, 2009).

Dada la riqueza y diversidad de plantas con la que cuenta la Reserva Natural Bosque de Yotoco, entre las que sobresalen la familia Piperaceae, de las cuales varias especies se conocen sus propiedades acaricidas, se decidió evaluar el efecto de dos especies nativas de la Reserva.

La Fitoquímica en la sede Palmira ha sido ampliamente trabajada sin embargo hasta el presente no se había evaluado el efecto de extractos de plantas sobre garrapatas. De ahí que este es el primer trabajo con el cual se pretende conocer la actividad de extractos acuosos, aceites esenciales de las especies *P. aequale* y *P. crassinervium*, así como de tres acaricidas de síntesis química de los grupos, Amidinas, Piretroides, Organofosforados.

Este trabajo hace parte de la investigación del grupo de Acarología, financiado por DIPAL.

Los objetivos propuestos en este trabajo fueron los siguientes:

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades acaricidas de los aceites esenciales y extractos acuosos de las especies *Piper crassinervium* Kunth, *Piper aequale* Vahl. (Piperaceae), sobre larvas de la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

1.1.1 ESPECÍFICOS

- Caracterizar mediante marcha fitoquímica los metabolitos secundarios de ocho especies de plantas presentes en la Reserva Natural Bosque de Yotoco
- Evaluar la actividad acaricida de extractos acuosos y extractos oleosos de *Piper crassinervium* Kunth., *Piper aequale* Vahl. y de los productos químicos cipermetrina, amitraz y dravafos sobre larvas de *R. (B.) microplus*
- Caracterizar por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS) los aceites esenciales de las especies *Piper crassinervium* Kunth, *Piper aequale* Vahl.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GENERALES DE LA GARRAPATA DEL GANADO *R. (B.) microplus*

Las mayores pérdidas económicas en ganadería en todo el mundo ocurren por infestación de garrapatas del ganado. Su acción puede causar dermatosis, pérdida de sangre y en algunos casos también pueden inocular toxinas, dañan el cuero, causan bajas en la productividad (Cordovés, 1997). Las garrapatas (Ixodidae) son ectoparásitos hematófagos obligados durante algunos o en todos los estados posembrionarios. Son consideradas como el grupo de vectores de patógenos más importantes dentro Phylum Arthropoda, siendo comparables con mosquitos de la Familia Culicidae (Hoogstraal, 2009). Varias especies son vectores de agentes que pueden causar enfermedades y llevar a la muerte a su hospedero. Pueden transmitir patógenos que afectan al hombre y a los animales domésticos como bacterias, helmintos, protozoos y virus (Jongejan & Uilenberg, 2004).

R. (B.) microplus, fue introducida desde la India a muchas regiones de Asia tropical y subtropical, Nororiente de Australia, Madagascar, costas y tierras bajas de Nororiente de África y muchas regiones de Sur y Centro América, México y el Caribe. Sin embargo, las especies *R. (B.) microplus* y *R. (B.) annulatus* fueron erradicadas de USA después de largos y costosos programas y permanente vigilancia para prevenir su reintroducción (George, 1987). Según Guglielmone *et al.* (2006 a), *R. (B.) microplus* está distribuida desde el norte de Argentina hasta México incluyendo las islas del Caribe. En estudios sobre análisis de la distribución del subgénero *Boophilus* en África y América Latina, Estrada-Peña *et al.* (2006) indican que en África esta especie esta restringida a Madagascar, sudeste de África. En tanto que, en América latina, *R. (B.) microplus* es abundante en el corredor Mesoamericano entre Venezuela y Colombia y al sureste de Brasil y Argentina. Según los autores esta especie está asociada a biomas como el Chaco y las Pampas Argentinas,

regiones del norte y centro de los Andes y bosques de la región atlántica y está muy relacionada con vegetación Meso-Americana.

2.2 CARACTERÍSTICAS RELEVANTES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *R. (B.) microplus*

Existen aproximadamente 870 especies de garrapatas descritas en el mundo, todas agrupadas en el suborden Ixodida (Metastigmata) el cual incluye tres familias. La familia Ixodidae contiene las especies conocidas como garrapatas duras y de las cuales se conocen cerca de 683 especies (Barros *et al.*, 2006).

Guglielmone *et al.* (2006) indicaron que el subgénero *Boophilus* está representado por dos especies en América Latina: *R. (B.) microplus* y *R. (B.) annulatus*. Esta última restringida al nordeste de México y a la región mediterránea del nuevo mundo y nunca se ha encontrado en la región Neotropical.

Morfológicamente, las especies de la familia Ixodidae se caracterizan por poseer capitulo siempre en posición terminal (visible dorsalmente) y escudo dorsal en todos los estados biológicos. El dimorfismo sexual es acentuado (escudo pequeño y corto en hembras, larvas y ninfas, no sobrepasando la región media del cuerpo; mientras que en machos el escudo es largo y se extiende hasta la margen posterior). En las hembras se observan áreas porosas; hipostoma denticulado en la mayoría de los géneros, en muy pocos casos con crenulaciones. El último artículo o segmento del palpo de la pata IV está en posición ventral, situado en una cavidad en la extremidad distal del artículo III. Las placas espirculares están situadas posteriores a la pata IV (Onofrio *et al.*, 2006).

Todas las especies de *Rhipicephalus* presentan coloración castaña a castaña rojiza, el escudo no es ornamentado, presentan ojos, rostro corto y base del capítulo hexagonal. Los

machos poseen dos a cuatro placas adanales y algunos presentan apéndice caudal (Onofrio *et al.*, 2006). Las características morfológicas que permiten separar a *R. (B.) microplus* de otras especies son: presencia de una proyección caudal en el macho, las espinas en la coxa I bien desarrolladas en las hembras, capitulo corto, palpos ligeramente más cortos que el hipostoma, algunas veces puede presentar dientes 5/5 ó 4/5, ausencia de festones, placas espiriculares ovals similares en ambos sexos y hasta 4 placas adanales en los machos bien desarrolladas (Guglielmone *et al.*, 2006).

Murrell & Barker (2003), mediante estudios moleculares y morfológicos de los géneros *Rhipicephalus* Koch, 1844 y *Boophilus* Curtice, 1891 indicaron que las cinco especies de *Boophilus* forman el género paraphyletico *Rhipicephalus*. Con base en esto, *Boophilus* es ubicado como un subgénero de *Rhipicephalus* y por lo anterior las cinco especies de *Boophilus* deben ser citadas así: *Rhipicephalus (Boophilus)*. De acuerdo a Faccini *et al.* (2006) las técnicas moleculares para determinaciones de especies y estudios de filogenia en garrapatas, se tiene en cuenta la variabilidad del segundo espacio de transcripción interno (ITS-2), fragmentos de secuencias génicas del DNA ribosomal mitocondrial o algunas veces la combinación de todas.

Esta nueva ubicación taxonómica del género *Boophilus* no es aceptada por algunos taxónomos como Caeiro (2006) en Portugal. El autor considera que los caracteres morfológicos que presentan los ixodidos definen muy bien los géneros, desde hace cientos de años y se ha admitido la solides de estos trabajos que han sido demeritados por la conclusión obtenida a través de técnicas de biología molecular. Según el autor la ubicación de *Boophilus* como subgénero del género *Rhipicephalus*, es un resultado tímidamente presentado que no es aceptado por varias razones: desde el punto de vista biológico las especies del género *Boophilus* completan su ciclo vital en un sólo hospedero, mientras que las especies del género *Rhipicephalus* lo completan en tres hospederos, con excepción para *Rhipicephalus bursa* y *Rhipicephalus evertsi* que lo realizan en dos hospederos. Filogeneticamente *Boophilus* y *Rhipicephalus* son próximos, no solamente porque exhiben

una secuencia de un cierto número de bases que se superponen a los caracteres morfológicos y biológicos que los definen.

2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS de *R. (B.) microplus*

La garrapata *R. (B.) microplus*, es una especie típicamente monoxena (un solo hospedero). Las larvas infestan al ganado en el pasto y se alimentan por 6 a 8 días hasta que sufren la muda para ninfas, las cuales alcanzan el estado adulto entre 7 a 9 días. La hembra fertilizada ingurgita y cae al suelo para realizar su ovoposición. Los machos permanecen sexualmente activos sobre el hospedero hasta por 70 días. El periodo total del parasitismo (desde larva no alimentada hasta hembra ingurgitada) varía de 18 a 22 días, pudiéndose extender hasta 30 días. La fase de parasitismo es poco influenciada por las condiciones climáticas, contrario a lo que ocurre en la fase no parasitaria que si está influenciada por las condiciones ambientales. En condiciones de alta humedad relativa y temperatura entre 24° a 28 °C, una hembra ingurgitada puede transformar entre el 50 al 60% de su peso corporal en huevos (2000 a 4000 huevos por hembra), con una tasa de eclosión de 85 a 95%. Las larvas pueden sobrevivir sin alimento por 30 días en ambientes calientes y más de 120 días en temperaturas bajas. *R. (B.) microplus* es vector de la enfermedad conocida como tristeza parasitaria bovina, causada por protozoarios del género *Babesia* y bacterias del género *Anaplasma*. Los protozoos *Babesia bovis* y *B. bigemina* son transmitidos por la hembra ingurgitada a los huevos por vía transovarica. *B. bovis* es transmitido al ganado por las larvas infectadas y *B. bigemina* solamente es transmitida por ninfas y adultos (Guglielmone *et al.*, 2006).

Las condiciones ambientales influyen de manera directa y crítica sobre el desarrollo y ciclo de vida de las garrapatas, pero aún no existe evidencia suficiente para incriminar al cambio climático como el principal responsable de las variaciones en la distribución geográfica y abundancia estacional de estos artrópodos. Por lo mismo, la modelización de las respuestas de poblaciones de garrapatas, en tiempos y espacios predeterminados, frente al

calentamiento global debe incluir los factores adicionales del cambio mundial, tales como: migración y colonización humana, globalización comercial, cambios del paisaje, nuevas tecnologías pecuarias, parásitos resistentes a fármacos, ampliación de la frontera agrícola, pobreza rural en el tercer mundo y la privatización de los servicios de salud pública. Los sistemas ganaderos con poblaciones bovinas genéticamente susceptibles al ataque de garrapatas, tales como lechería especializada, podrían ser fuertemente afectados por una nueva distribución geográfica de estos vectores. Así las cosas, la utilización de razas bovinas genéticamente resistentes a las garrapatas podría ser una estrategia efectiva para que las ganaderías bovinas enfrenten los efectos del cambio climático global en latitudes y altitudes superiores. Existe la necesidad innegable e inaplazable de mejorar el diagnóstico de las infestaciones por garrapatas y de las enfermedades transmitidas por ellas, aunado al desarrollo y la transferencia de las estrategias de manejo integrado de plagas (MIP) aplicadas al control de garrapatas, de importancia económica y sanitaria (Cortés, 2010).

2.4 METODOS DE CONTROL de *R. (B.) microplus*

El control de *R. (B.) microplus* en el centro y sur del continente Americano, representa uno de los grandes retos de la producción bovina. Aunque el ganado vacuno representa su hospedero preferido, puede tener hospederos alternos como equinos, ovinos, caprinos, venados y otros. La importancia económica de *R. (B.) microplus* se estima en pérdidas causadas de aproximadamente dos billones de dólares anuales para la producción de bovinos en Brasil (Castro-Silva *et al.*, 2009). El control de las garrapatas ha sido realizado con el uso intensivo de acaricidas sintéticos, los cuales se emplean en diferentes dosis y diferentes formas: concentrados, baños, sprays, inyecciones, etc., (Vargas *et al.*, 2003; Rodriguez-Vivas *et al.*, 2006; Patarroyo *et al.*, 2009).

Las continuas aplicaciones de estos productos ha causado el desarrollo de resistencia a organofosforados y piretroides, lo cual es una de las principales preocupaciones de los ganaderos (Patarroyo *et al.*, 2009). En diversas regiones las investigaciones se han dirigido

a buscar nuevas alternativas para el control de garrapatas como el uso de agentes biológicos entomopatogenos (hongos, nematodos, etc.) o extractos de plantas (Ojeda-Chi *et al.*, 2010; Rosado-Aguilar *et al.*, 2010).

2.5 CONTROL QUIMICO de *R. (B.) microplus*

Hasta el presente el control de garrapatas ha sido realizado con el uso continuo de productos de los grupos de Organofosforados (OP), piretroides sintéticos (SP), amidinas (Am) y lactonas macrociclicas (ML) (Aguilar & Rodríguez, 2003; Rodríguez *et al.*, 2005). La eficacia de algunos de estos productos en reducir las poblaciones de garrapatas se ha visto limitada por el desarrollo de resistencia de la plaga a estos productos, eliminación de organismos que no son el blanco, muchos de ellos agentes de control biológico, problemas de contaminación ambiental y peor aún, contaminación por residuos de plaguicidas en leche y carne (Graf *et al.*, 2004). Según reportes de la FAO (2004) en India las especies de garrapatas han desarrollado resistencia a todos los productos acaricidas comúnmente usados.

2.6 RESISTENCIA A PLAGUICIDAS de *R. (B.) microplus*

Los acaricidas han tenido un papel muy importante en el control de garrapatas, sin embargo como consecuencia de un uso extensivo de los químicos muchas especies de garrapatas han desarrollado resistencia a muchos de las clases de acaricidas en varios países del mundo. La prueba con larvas (LPT) es la prueba propuesta como referencia por la FAO (Food and Agriculture Organization) para el diagnostico de Resistencia de poblaciones a OP y SP en garrapatas del Ganado (FAO, 2004). Las pruebas con larvas son particularmente eficientes para medir niveles de resistencia de poblaciones de garrapatas. La detección de la resistencia además del registro de los acaricidas usados ofrecen una valiosa información para el manejo y control de garrapatas y el monitoreo de la resistencia en campo.

En Mexico el primer caso de resistencia a organofosforados (OP) fue detectada en *R. (B.) microplus* en Veracruz en 1983 (Aguirre & Santamaría, 1986). Hacia 1986, los acaricidas piretroides sintéticos (SP) fueron introducidos a Mexico para aliviar el problema de Resistencia a los OP, sin embargo hacia 1993 se detectó la resistencia a SP (Fragoso *et al.*, 1995). La formamidina (amitraz), fue introducido en 1986, su uso fue limitado por los altos costos, sin embargo en el 2001 fue confirmado el primer caso de resistencia a amitraz (Soberanes *et al.*, 2002).

El desarrollo de la resistencia en una población de garrapatas depende de la frecuencia de los individuos resistentes en la población y la intensidad de la presión de selección realizada con químicos (Kunz & Kemp, 1994).

En Brasil, la resistencia de las poblaciones de garrapatas del ganado a los acaricidas es muy amplia (Graf *et al.*, 2004). Existen reportes de organofosforados (OP), piretroides sintéticos (SP), amitraz, ivermectina y fipronil, los cuales representan la mayor parte de los acaricidas disponibles actualmente en el mercado (Furlong, 1999; Molento & Dias, 2000; Mendes *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2000; Klafke *et al.*, 2006; Castro Janer *et al.*, 2008). En estudios realizados en 2001, usando la técnica de bioensayos con inmersión de adultos con poblaciones de garrapatas del Estado de São Paulo (sudeste de Brasil) demostraron que los productos probados (cipermetrina – mezcla de clorpirifos (CCM), cipermetrina, deltametrina, coumafos, y amitraz) no tenían ninguna eficacia en el control de *R. (B.) microplus* (Drummond *et al.*, 1973).

Knowles (1982) indicó que la formamidina clordimeform y amitraz podían actuar como sinergistas de insecticidas organofosforados, organoclorinados, carbamatos, y piretroides. Investigaciones posteriores demostraron la sinergia de piretroides con amitraz sobre insectos y garrapatas (Usmani & Knowles 2001; Li *et al.*, 2007; Barré *et al.*, 2008). Los mecanismos propuestos para la sinergia de formamidinas incluyen disminución del metabolismo del insecticida (Bigley & Plapp, 1978) modificando el blanco del sitio

receptor (Liu & Plapp, 1990) y el incremento de la actividad de los insectos aumentando el contacto con el insecticida (Treacy *et al.*, 1987).

Prullage *et al.* (2011) realizaron pruebas de contacto a nivel de laboratorio para determinar si amitraz a 12.5 ppm., podría mejorar el potencial de contacto sobre garrapatas. En bioensayos controlados evaluaron fipronil solo, amitraz solo, y fipronil mas amitraz sobre adultos de *Rhipicephalus sanguineus*. La letalidad se evaluó a las 6, 24, y 48 horas despues de introducir las garrapatas en los viales. Los autores no encontraron mortalidad significativa en el tratamiento control o en amitraz solo. La mayor mortalidad fue obtenida en las garrapatas expuestas a fipronil solo o fipronil más amitraz. Los resultados indicaron sinergismo entre fipronil y amitraz sobre adultos de garrapatas lo cual significa mayor velocidad de muerte de las garrapatas.

Rosado-Aguilar *et al.* (2008) determinaron el efecto de la presión de selección de amitraz sobre el desarrollo de la resistencia en poblaciones de campo de *R. (B.) microplus* en regiones tropicales de Mexico. El Amitraz fue aplicado en todo el cuerpo de los animales con spray, en todas las fincas una vez al mes por 15 meses. Con este trabajo los autores demostraron que la presión de selección del amitraz en poblaciones de *R. (B.) microplus* presentes en el campo incrementa los niveles de resistencia en todas las poblaciones estudiadas en Mexico.

Evaluaciones de la resistencia en campo fueron realizadas por Mendes *et al.* (2011) mediante pruebas basadas en la técnica de inmersión de larvas. El objetivo era detectar resistencia a los grupos químicos mas usados (piretroides sinteticos SP (cipermetrina y deltametrina) y organofosforados OP (clorpirifos) para el control de *R. (B.) microplus* dentro de áreas de producción de ganado en el Estado de São Paulo y de otra parte obtener información sobre estrategias mas usadas para el control de *R. (B.) microplus*. Para el experimento, los investigadores seleccionaron seis campos en el estado de São Paulo y encontraron que 82.6% de las poblaciones presentaron resistencia a cipermetrina, 86.36% a deltametrina y 65.25% a clorpirifos 50%, presentaron resistencia tanto a acaricidas SP y

OP. De acuerdo a los resultados de las encuestas las mezclas de OP + SP seguidas por SP fueron las formulaciones mas comunes usadas para el control de las garrapatas. Los autores demostraron alta ocurrencia de resistencia a SP y a OP en el Estado de São Paulo.

2.7 CONTROL BIOLÓGICO DE *R. (B.) microplus*

Debido a los múltiples problemas derivados del uso intensivo de químicos para el control se han desarrollado métodos alternativos de control como el uso de agentes biológicos como nematodos (Vasconcelos *et al.*, 2004) y hongos entomopatogenos como *Beauveria* y *Metarhizium* (Mwangi *et al.*, 1995; Zhioua *et al.*, 1997; Bittencourt *et al.*, 1999; Kaaya & Hassan, 2000; Gindin *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2002; Polar *et al.*, 2005; Bahiense *et al.*, 2006; Leemon *et al.*, 2008).

Entre los agentes de control biológico usados para el control de *R. (B.) microplus* se destacan como los más evaluados hongos, nematodos (Rhabditida: Nematoda). De Oliveira - Vasconcelos *et al.* (2004) evaluaron la acción de las cepa de *Steinernema glaseri* Santa Rosa y la cepa de *Heterorhabditis bacteriophora* CCA como agentes de control biológico de *R. (B.) microplus*. Los autores encontraron que la oviposición se redujo en 90% con la mayor concentración.

Fernandes *et al.* (2006) evaluaron en 50 aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 (Ascomycota: Clavicipitaceae) el potencial patogénico sobre larvas de *R. (B.) microplus*. Las pruebas de virulencia demostraron que todos los aislamientos presentaron efecto letal sobre las larvas y la concentración letal varia entre los aislamientos.

2.8 USO DE EXTRACTOS DE PLANTAS COMO CONTROLADORES DE ESPECIES DE IXODIDOS

Ante la problemática a nivel mundial ocasionado por las infestaciones de garrapatas y las pérdidas económicas, se han investigado diversas opciones de manejo de esta plaga del ganado diferentes al control químico tradicional. Una de estas alternativas es la investigación desarrollada en diferentes partes del mundo sobre el uso de los metabolitos secundarios producidos por algunas plantas. Existen evidencias de que algunas plantas poseen propiedades garrapaticidas; por ejemplo, especies del género *Stylosanthes* (Sutherst *et al.*, 1982), *Melinis minutiflora* (Thompson *et al.*, 1978; Thadeu *et al.*, 1989; Mwangi *et al.*, 1995), *Andropogon gayanus* (Aycardi *et al.*, 1984; Thadeu *et al.*, 1989; Brizuela, 1996) y *Brachiaria brizantha* cv. *marandu* (Thadeu *et al.*, 1989).

En México, Fernandez-Ruvalcaba *et al.* (2004) encontraron que *Melinis minutiflora*, presentó mayor efecto garrapaticida sobre *R. (B.) microplus*, que *Andropogon gayanus* y *Cenchrus ciliaris* (usada como testigo). Los autores evaluaron el efecto de estas tres especies de la familia Poaceae, en parcelas establecidas con un diseño factorial y monitoreadas durante un periodo de 3 años. Cada parcela fue infestada con 5000 larvas de *R. (B.) microplus* y el efecto garrapaticida fue medido por el conteo de larvas colectadas mediante el método de arrastre de una tela blanca.

En India, Magadum *et al.* (2009) evaluaron la acción garrapaticida de ocho especies de plantas: semillas de *Annona squamosa*, semillas de *Tamarindus indicus*, hojas de *Nicotiana tobacum*, hojas de *Eucalyptus globulus*, hojas de *Citrus leminum*, bulbos de *Allium sativum*, sobre *R. (B.) microplus*. Estos investigadores encontraron que el extracto de semillas de *Annona squamosa* mostró el mayor porcentaje de mortalidad (70.8%) y un efecto importante en la tasa de ovoposición después de 24 horas. En el mismo trabajo compararon la acción de *Azadirachta indica* en pruebas in vivo con la acción de *A. squamosa* en pruebas in vitro y encontraron que los extractos de *A. indica* son más eficaces que los de *A. squamosa*.

Silva (2005) y Gonzaga *et al.* (2008) reportaron la toxicidad y la actividad insecticida de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae), planta nativa de Amazonas, Brasil. Posteriormente, Castro-Silva *et al.* (2011), evaluaron por primera vez, la actividad acaricida de las hojas de *P. marcgravii*, mediante el método de extracción sucesiva con hexano, etil acetato y etanol en su orden para evaluar su actividad sobre larvas y adultos de *R. (B.) microplus* y encontraron que el extracto de etil acetato mostró la mayor bioactividad de los extractos evaluados, ya que contiene 0.12% de ácido monofluoroacético. Sobre hembras el extracto de etil acetato mostro una concentración letal al 50% – LC50 = 30.08 mg/ml, concentración inhibitoria del 50% – IC50 = 5.79 mg/ml y un tiempo letal o de mortalidad de 50% – LT50 = 4.72 días, la reproducción fue controlada en un 100% con una concentración de 50 mg/ml y sobre larvas el extracto de acetato de etil mostro una LC50 = 2.46 mg/ml. No detectaron alcaloides en ninguno de los extractos. Según los autores la presencia de ácido monofluoroacético que es un compuesto de alta toxicidad y como uno de los más importantes metabolitos indica la necesidad de conocer el impacto ambiental, la actividad sobre otras especies antes de considerar esta planta como una alternativa biorracional para el control de garrapatas.

Giglioti *et al.* (2011) evaluaron el efecto de cuatro extractos de semillas de Neem *Azadirachta indica*, los cuales contenían, 2000,5000, 9000 y 10,000 ppm de Neem y en diluciones de 1.25%; 2.5%; 5.0%; 10.0% y 12.8% en pruebas in vitro con hembras engurgitadas y larvas de *R. (B.) microplus*. Los resultados de estos bioensayos con hembras mostraron que el principal efecto tóxico se refleja en la reducción de los parámetros reproductivos con la caída en el número de huevos y la eclosión principalmente cuando los extractos fueron diluidos al 10.0% y 12.8%. La efectividad del producto para todas las soluciones mostró que las soluciones a 10,000 ppm, fue la más efectiva.

El Timol, también conocido como ácido tímico (2-isopropil-5-metilfenol), es un monoterpeno derivado de plantas de la familia Lamiaceae (Meshkatalasadat *et al.*, 2007) y puede ser encontrado en forma de cristales poco coloridos ligeramente solubles en agua (Farmacopéia Portuguesa, VIII 2005). Varios autores se han referido a este monoterpeno

por su potencial bactericida, fungicida, nematocida, molusquicida, insecticida y acaricida en diferentes formulaciones (Imdorf *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 2000; Tsao & Zhou 2000; Ferreira *et al.*, 2009; Pandey *et al.*, 2009; Baggio *et al.*, 2004).

Bajo pruebas de laboratorio se ha encontrado que el Timol tiene una actividad acaricida sobre larvas y hembras engurgitadas de *R. (B.) microplus* (Novelino *et al.*, 2007a; Monteiro *et al.* 2010), sin embargo, en estos trabajos el timol fue usado en baños de vapor caliente (Daemon *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2009) o sobre superficies calientes (Silva, 2011) para facilitar la solubilización en agua y además se adiciono 1% de dimetil sulfoxido como coadyuvante para promover la solubilización. Sin embargo el calor causa perdida de la actividad del ingrediente activo por volatilización (Silva 2011; Hu & Coats 2008). Con base en lo anterior Scoralik *et al.* (2011), evaluaron el potencial del timol disuelto en etanol en diferentes formulaciones sobre larvas de *R. (B.) microplus*, obteniendo una mortalidad mayor al 95%.

Souza-Chagas *et al.* (2011), evaluaron la eficacia en experimentos in vitro de los extractos de aceite de semillas de *Carapa guianensis*, aceite esencial de hojas de *Cymbopogon martinii* y *Cymbopogon schoenanthus* extracto de hojas crudas de *Piper tuberculatum* sobre hembras ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, las cuales se sometieron a inmersión en cinco diluciones de 10% hasta 0.030625% de concentración. Las pruebas con larvas se hicieron con papel filtro impregnado a concentraciones de 10% hasta 0.02%. El análisis químico de los aceites fue realizado por cromatografía de gases obteniendo como principales compuestos acido oleico (46.8%) en *C. guianensis* y geraniol en *C. martinii* (81.4%), y en *C. schoenanthus* (62.5%). Estas sustancias no mostraron un efecto significativo sobre larvas pero el efecto sobre adultos si fue interesante, la LC50 y LC90 fueron de 2.93% y 6.66%, 3.76%, 25.03%, respectivamente. En las larvas la LC50 y LC90 obtenidas para *C. martinii*, *P. tuberculatum*, y *C. schoenanthus* fue de 0.47%, 0.63%, 0.41% y de 0.79%, 0.57% y 0.96%, respectivamente.

Martinez-Velazquez *et al.* (2011), evaluaron la actividad acaricida de los aceites esenciales de semilla de *Cuminum cyminum*, todas la espigas y frutos de *Pimenta dioica* y hojas de *Ocimum basilicum* sobre larvas de 10 días de *R. (B.) microplus* y encontraron que presento un efecto toxico muy alto con los extractos de *C. cyminum* y *P. dioica*, ya que produjeron 100% de mortalidad de larvas con todas las concentraciones evaluadas. Mientras que los aceites de *O. Basilicum* no mostraron ninguna actividad toxica sobre las garrapatas. El compuesto mas comun detectado en *C. cyminum*, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas fueron: cuminaldehido (22.03%), γ -terpineno (15.69%) y 2-carenen-10-al (12.89%); mientras que en *P. dioica* los productos mas comunes fueron: metil eugenol (62.7%) y eugenol (8.3%).

2.9 IMPORTANCIA DE ESPECIES DE PLANTAS DE LA FAMILIA

PIPERACEA

La familia Piperaceae, es considerado un grupo pantropical, presenta gran abundancia y diversidad de especies, agrupa catorce géneros y aproximadamente entre 1950 a 2000 especies (Mabberley, 1997; Quijano-Abril *et al.*, 2006). Los géneros más reconocidos son *Piper* y *Peperomia*, que contiene cada uno aproximadamente 700 y 600 especies, respectivamente (Joly, 1985). Diferentes investigaciones fitoquímicas han demostrado que algunas especies de *Piper* presentan compuestos bioactivos como amidas, alcaloides, lignanos, acido benzoico y cromenos (Parmar *et al.*, 1997; Alécio *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1997; Ruangrunsi *et al.*, 1992, Navickiene *et al.*, 2000, Silva *et al.*, 2002). El género *Piper* hace parte de la vegetación de zonas montañosas y bosques de tierras bajas (Quijano-Abril *et al.*, 2006). Recientes analisis filogeneticos del genero *Piper* sugieren que hay tres subgrupos taxonomicos representando tres grandes regiones geograficas: America (1300 especies), Asia (600 especies) y el Pacifico sur (100 especies) (Jaramillo y Manos, 2001).

Varias especies de *Piper* son parte de las plantas usadas en medicina tradicional en latinoamerica (Gupta, 1995). Las hojas de *Piper hispidum* y *P. elongatum* son usadas en

emplasto o en ungüentos para tratar úlceras cutáneas causada por leishmaniasis (Estevez *et al.*, 2007), y las hojas de *P. aduncum* son usadas como control de inflamaciones y como antisépticas (Orjala *et al.*, 1994). Estudios fitoquímicos de especies de *Piper* describen la presencia de metabolitos con propiedades fungicidas, antibacterial, insecticida, citotóxicos y antioxidantes (Terreaux *et al.*, 1998; Lago *et al.*, 2004, Parmar *et al.*, 1997, Ramji *et al.*, 2002, Siddiqui *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2006).

Otras investigaciones han encontrado metabolitos como: chalconas y dihidrochalconas, flavanonas, neolignanós y alcaloides con propiedades antiprotozoos (Portet *et al.*, 2007, Torres-Santos *et al.*, 1999; Hermoso *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2007, Luize *et al.*, 2006, Rukachaisirikul *et al.*, 2004. Sobre *P. aduncum* se han reportado aceites esenciales que contienen cromenos, ácido benzoico prenilado y dihidrochalconas (Rali *et al.*, 2007; Vila *et al.*, 2005, Moreira *et al.*, 1998, Orjala *et al.*, 1993; Baldoqui *et al.*, 1999; Lago *et al.*, 2004, Orjala *et al.*, 1994). Varias especies de *Piper* que contienen como parte de sus metabolitos ácido benzoico son usadas en la medicina tradicional para tratamiento de enfermedades parasitarias. Infortunadamente algunos nuevos reportes sobre compuestos parasitarios no han sido publicados (Lopes *et al.*, 2008; Flores *et al.*, 2008).

Silva dos Santos (2010), evaluaron el efecto acaricida del extracto metanólico (EM) de las hojas de *Piper amalago*, *P. mikanianum* y *P. xylosteoides* sobre larvas de *R. (B.) microplus* y analizaron la constitución fitoquímica de estos extractos. Los autores detectaron la presencia de alcalóides y flavonóides en las tres especies, y en las pruebas de inmersión larval observaron que solamente *P. mikanianum*, presentó actividad acaricida.

Flores *et al.* (2009), investigaron sobre especies de *Piper* en Bolivia, e hicieron análisis fitoquímico de las hojas de *Piper heterophyllum* y *P. aduncum* y encontraron tres nuevos derivados de ácidos prenilados, derivados del ácido benzoico, como posibles agentes antiparasitarios de leishmaniácis, tripanozomiácis y actividad antiplasmodial. Danelutte *et al.* (2003), en Brasil estudiaron agentes antifúngicas en hojas de *Piper crassinervium* para el control de *Cladosporium cladosporioides* y *C. sphaerospermum* encontrando por

primera vez la presencia de derivados prenilados de hidroquinona en especies de Piperaceae.

Estudios etnobotánicos en Manaus Brasil indicaron que *Piper aduncum* ha sido usada ampliamente en el norte y nordeste de Brasil y Selva Amazonica como una planta que posee propiedades insecticidas (Maia *et al.*, 2001). Las hojas y tallos de *P. aduncum* contiene un aceite esencial compuesto principalmente por dillapiole (5-allyl 6,7-dimethoxy 1,3- benzodioxole) (Pino *et al.*, 2004; Walia *et al.*, 2004) productos que han demostrado tener un efecto sinérgico con varios pesticidas de origen natural, además de poseer actividad bactericida y fungicida (Maia *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2007; Rafael *et al.* 2008). Castro Silva *et al.* (2009), reportaron la toxicidad de los extractos de *P. aduncum* sobre diferentes estados de desarrollo de *R. (B.) microplus*, y evaluaron su potencial en el control de la garrapata. Los mismos autores evaluaron la mortalidad de larvas de 14 a 21 días y de hembras engurgitadas de *R. (B.) microplus* a diferentes concentraciones de extractos de *P. aduncum* obtenidos con hexano, acetato de etilo y etanol y el aceite esencial hidro-destilado (94.84% dillapiole) obtenido del extracto obtenido con hexano. Encontraron que la LC50 para los extractos de hexano fueron de 9.30 mg/ml para larvas y reducción de la reproducción de 12.48% hasta 54.22%, mientras que con aceite esencial fue de 0.1 mg/ml y 100% de mortalidad de las larvas.

Ferraz *et al.* (2010), mediante cromatografía de gases y análisis de espectrometría de masas obtuvieron la composición química de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación de las partes aéreas de *Piper amalago*, *Piper mikanianum*, y *Piper xylosteoides* y encontraron que los aceites esenciales de *P. mikanianum* y *P. xylosteoides* presentan fenilpropanoides como uno de sus principales componentes (67.89% y 48.53%, respectivamente) mientras que *P. amalago* fue la más rica en monoterpenos y hidrocarburos sesquiterpénicos (84.95%). Los autores investigaron el efecto sobre larvas recién emergidas de *R. (B.) microplus* y encontraron que el aceite esencial de *P. mikanianum* presenta una LC 50 2.33 µL/mL, lo cual fue más activo que el encontrado en *P. xylosteoides* con una LC50 6.15 µL/mL para las larvas. En contraste el aceite de *P.*

amalago no mostro ninguna actividad. Los resultados sugieren que los fenilpropanoides, principalmente apiol y safrole, son responsables de la actividad acaricida.

2.9.1 *Piper crassinervium*

Piper crassinervium Kunth, es un arbusto pequeño de 2 a 5 metros de altura distribuido en Amazonia, incluyendo Brasil, Colombia, Ecuador y Perú (Yuncker, 1972). Arnaldo *et al.*, (2003), identificaron los aceites esenciales de *P. reticulatum* L. y *P. crassinervium*; para ello colectaron hojas y ramas de las plantas en la ciudad de Rio Branco (AC), Brasil. Los compuestos identificados fueron principalmente de naturaleza sesquiterpenoides. *P. reticulatum* contiene β -elemeno (24.6%) y β -cariofileno (16.7%) como su principal constituyente, además encontraron un 14% de sesquiterpenos no identificados. En *P. crassinervium* el principal componente del aceite esencial, fue β -cariofileno (17.7%), γ -elemeno (14.4%), y β -elemeno (10.9%).

Los productos aislados de las hojas de *P. crassinervium* son muy especiales (Danelutte *et al.*, 2003; Lago *et al.*, 2004). La actividad biológica de estos compuestos incluye propiedades antitumorales, antileucemica e inhibición de mitosis (Muller *et al.*, 1985 a,b). Además tienen efecto analgésico, relajante (De Pasquale *et al.*, 1991) y efectos antioxidantes (Cotele *et al.*, 1991). Existen reportes de varias especies de *Piper* que contienen estructuralmente compuestos similares al ácido benzoico prenilado, y en el caso de *P. aduncum* (Baldoqui *et al.*, 1999) se evaluó su actividad como antimicrobial y molusquicida (Okunade *et al.*, 1997; Orjala *et al.*, 1993), *P. arieianum*, *P. tabogatum* y *P. dilatatum* también contienen ácidos benzoicos prenilados con actividad fungicida (Green *et al.*, 1991; Roussis *et al.*, 1990; Terreaux *et al.*, 1998).

3. SOLVENTES USADOS PARA DILUSION DE EXTRACTOS VEGETALES

El uso de solventes orgánicos para realizar bioensayos en laboratorio es inevitable, ya que muchos compuestos naturales tienen poca solubilidad en agua y necesitan ser disueltos en solventes orgánicos o agentes surfactantes antes de iniciar los sistemas experimentales. Sin embargo con algunos de los solventes convencionales, las pruebas se dificultan ya que presentan toxicidad en sistemas biológicos. La selección de un solvente apropiado está determinada por la solubilidad de la muestra (extractos, fracciones o compuestos aislados) y por el estrés sobre los organismos probados. Existen muchos trabajos comparativos sobre la toxicidad de los solventes sobre peces e invertebrados acuáticos por ejemplo los trabajos con insectos de Gorb *et al.* (2000) y para la garrapata de los caballos *Anocentor nitens* (Beadles *et al.* 1973), para *R. (B.) microplus* (Chagas *et al.* 2003; Freitas & Fernandes 2005).

Gonçalves *et al.* (2007), evaluaron el efecto de los siguientes solventes: acetona, metanol, etanol, DMSO 1% (dimetil sulfoxido), y como agentes surfactantes usaron Tween 80 al 1% y Triton X-100 al 5% sobre *R. (B.) microplus* y usaron la metodología con algunas modificaciones propuesta por Sabatini *et al.* (2001). Las pruebas se realizaron sobre larvas y adultos de *R. (B.) microplus*. Larvas (LIT) y adultos (AIT), se sometieron a la prueba de inmersión y los adultos. Que para hembras se evaluó producción de huevos y tasa de eclosión. Los resultados encontrados es que la Acetona fue tóxica para adultos 100% de mortalidad. El metanol y etanol causaron 45.3 y 14.2% de mortalidad respectivamente. Los otros productos evaluados ninguno fue tóxico para las hembras de *R. (B.) microplus*. Encontraron mayor resistencia en larvas después de 48 horas el 100% sobrevivió a todos los tratamientos, excepto con acetona que causó un 10% de mortalidad. Los resultados obtenidos indican que la acetona y metanol no son solventes apropiados para pruebas donde se usen hembras de *R. (B.) microplus*

Muchos de los extractos de plantas o sus fracciones son disueltos en solventes polares o no polares, o sencillamente detergentes antes de evaluar su actividad acaricida. Estos solventes

no deben ser tóxicos y lo ideal es que tengan en lo mínimo un efecto acaricida. Brayton (1986); Penninckx *et al.* (1983) indicaron que el dimetil sulfoxido DMSO puede causar daños severos en las células. De otra parte, Triton X 100 y Tween 20 son detergentes no iónicos polioxietilenos. DMSO [(H₃C)₂ S=O], Triton X 100 y Tween 20 son en parte solubles en medios acuosos como orgánicos. Debido a su efecto liposoluble de sus compuestos ellos pueden remover la capa cerosa de la epicutícula, dejando que el ingrediente activo penetre dentro del integumento (Stammati *et al.* 1996).

Ravindran *et al.* (2011), evaluaron el efecto tóxico de los tres solventes comúnmente usados, dimetil sulfoxido (DMSO), Tween 20, Triton X100 a una concentración de 1% sobre *R. (B.) annulatus* sobre hembras. Los resultados del estudio revelaron que la menor actividad acaricida se presentó con Triton X 100, mientras que los otros dos solventes inhibieron la eclosión de los huevos de garrapatas tratadas.

4. METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD ACARICIDA

El uso de las plantas como acaricidas o insecticidas es amplio y permanente. Gracias a los avances en la investigación fitoquímica se ha podido demostrar que el valor otorgado en forma empírica a ciertas especies de plantas se debe a principios activos o metabolitos secundarios que contienen. Muchas de las plantas usadas como acaricidas presentan algunos metabolitos secundarios claves como Alcaloides, Coumarinas, Flavonoides, Esteroides, Glicosidos, Saponinas, Taninos. Cada uno de ellos tiene sus características químicas

4.1 Terpenoides

Los monoterpenos son los principales componentes de los aceites esenciales de vegetales (Vardar-Unlu *et al.*, 2003). Están formados por una estructura base de isopreno y cuando tienen elementos adicionales, comúnmente oxígeno, son llamados terpenoides. La actividad insecticida y acaricida de monoterpenos polihalogenados obtenidos de la alga roja *Plocamium cartilagineum* ha sido demostrada contra insectos como *Spodoptera frugiperda*, larva que puede dañar al maíz, caña de azúcar ó cebolla; *Heliothis virescens*, larva que puede afectar al tabaco, algodón ó tomate y *Aphis fabae*, áfido ó pulgón de la haba que también puede afectar a la remolacha. Argandoña *et al.* (2000), aislaron dos monoterpenos halogenados; mertenseno y violaceno de la alga roja, obteniendo también dos derivados del primero; dibromomertenseno y dihidromertenseno, para probar su actividad insecticida contra la larva del tomate *Tuta absoluta* y el áfido de los cereales *Schizaphis graminum*. Cuando los compuestos fueron probados contra larva de tomate se observó un 100% de mortalidad cuando se aplicó mertenseno y, 80% para violaceno y dibromertenseno (obtenido por la adición de 2 Bromuros en el doble enlace del mertenseno). Para el caso de los áfidos, el violaceno presentó un 92% de mortalidad y los otros compuestos no

mostraron efectividad a ninguna de las concentraciones que utilizaron (Argandoña *et al.*, 2000).

4.2 Alcaloides

Este grupo de biomoléculas se caracteriza por contener nitrógeno en su estructura, el cual dentro del metabolismo normal de las plantas no se transforma totalmente en proteína vegetal, sino que continúa su circulación en la savia o se fija en algunas partes de la planta, por lo que puede combinarse con moléculas de azufre formando heterósidos sulfurados ó con cianuro y dar heterósidos cianogénicos (Murphy, 1999; Oliva *et al.*, 2003). Los alcaloides derivados del tropano contienen en su estructura moléculas con átomos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario que le confiere alta toxicidad, actuando como fitoalexinas o evitando la interacción planta-insecto. Los alcaloides aporfínicos y acetogeninas anonáceas, han mostrado fuerte toxicidad contra larvas de crustáceos de mar como *Artemia salina* y del mosquito *Aedes aegypti*, vector de la fiebre amarilla (Chang *et al.*, 2000).

De las frutas de *Piper nigrum* han sido aislados alcaloides de isobutilamida, los cuales fueron probados contra el tercer estadio de la larva de los insectos *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* y *A. togoi*, observando que el compuesto más tóxico para la primer larva fue la pipericida. En el caso de las larvas *A. aegypti* y *A. togoi*, la actividad larvicida fue más pronunciada para retrofractamida A (Park *et al.*, 2002). También se ha reportado el uso efectivo de alcaloides de quinolina y quinolona para evitar el crecimiento de larvas de *Colletotrichum* (Oliva *et al.*, 2003).

4.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más abundantes de biomoléculas presentes en frutas y verduras, son sustancias químicas que poseen un anillo aromático con

uno o más grupos hidroxilos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.) (Cartaza & Reynaldo, 2001). La naturaleza de los fenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se encuentran en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos (Sang *et al.*, 2002; Robbins, 2003; Proestos *et al.*, 2005). Los compuestos reportados con actividad insecticida dentro de este grupo son los flavonoides (Morimoto *et al.*, 2000, 2003).

Los flavonoides son los polifenoles más distribuidos en las plantas y constituyen el grupo más importante con más de 5000 compuestos (Hertog *et al.*, 1992). Poseen bajo peso molecular debido a que comparten un esqueleto común de difenilpirano; comúnmente se encuentran como pigmentos en los vegetales, frutas y flores, biosintetizados a partir de fenilalanina y cuyo primer anillo es condensado por tres moléculas de malonil-CoA; se les conocen las mismas propiedades que a los fenoles (Merken *et al.*, 2001).

Los flavonoides naturales suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente unidos a azúcares en forma de glicósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres (Cartaza & Reynaldo, 2001). Los flavonoides son los constituyentes más importantes de la dieta en humanos. Los reportes más importantes acerca de éstos compuestos han sido sobre los beneficios que proporcionan a la salud porque poseen actividad antioxidante, sin embargo, debido a su gran diversidad pueden tener otro tipo de actividad biológica (Merken *et al.*, 2001).

Morimoto *et al.* (2000), reportaron la actividad de cuatro flavonoides: tres metoxiflavonas y una charcona, presentes en los extractos de *Gnaphalium affine* D. Don, planta medicinal conocida ampliamente en la región de Asia, los cuales mostraron actividad anti-alimentaria contra *Spodoptera litura* F, oruga común e insecto fitofago, que ataca cultivos que están en contacto con la tierra, como el melón. Los compuestos con mayor actividad insecticida fueron las metoxiflavonas; 5,6-dihidroxi-3,7- dimetoxiflavona y 5-hidroxi-3,6,7,

tetrametoxiflavona, una comparación de sus estructuras químicas determinó que la inclusión de un metil-eter en el anillo B de éstos flavonoides incrementó la actividad anti-alimentaria. En el 2003, Morimoto *et al.* aislaron 7 flavonas de extractos de raíz de *Sculletaria baicarensis* (Rutaceae): crisina, apigenina, luteolina, wogonina, isowogonina y norwogonina, para probar su actividad anti-alimentaria nuevamente contra *Spodoptera litura* F, basados en los resultados decidieron metilar los compuestos obtenidos para determinar su efecto sobre la actividad anti-alimentaria. Los resultados determinaron que las flavonas con mejor actividad insecticida fueron la crisina y la wogonina, y que al ser metiladas sólo la nobiletina (originada por la wogonina) incrementó en más de un 100 % su actividad; esta reducción en la actividad de los compuestos fue atribuida al cambio en la solubilidad de los compuestos, originando una disminución en la interacción de los mismos con los insectos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización de la zona de colecta

Las plantas se colectaron en la Reserva Natural de Yotocó, ubicada en la Cordillera Occidental en el departamento del Valle del Cauca. Hace parte del municipio de Yotoco, esta conformada por 559 hectáreas. Se encuentra a 3° 51' 47" de latitud norte y a 76° 23' 48" longitud oeste. Entre los 1.200 m.s.n.m y los 1.600 m.s.n.m. con un temperatura que fluctúa entre los 15 °C y los 22 °C (Escobar, 2001)

5.2 Colección de las especies de plantas estudiadas

Se seleccionaron ocho especies de plantas de la Reserva Bosque Natural de Yotoco (figura 1), las cuales fueron colectadas entre los meses de Abril – Junio de 2011 teniendo en cuenta que se encontraran en forma abundante en la zona de colección. De algunas de ellas, los pobladores de la región expresaron tener algún conocimiento sobre sus propiedades fitoquímicas, y efecto acaricida, aunque no las usaran para el control de esta plaga en el ganado. De estas plantas se colectaron hojas, ramas y estructuras reproductivas. En campo se prensaron y fueron llevadas al Herbario Jose Cuatrecasas Arumi de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, para su identificación taxonómica y procesamiento de las muestras para las colecciones de Herbario. La identificación de las plantas fue realizada por el Ingeniero Agronomo Oscar Perez.

Tabla 1. Colección referencia de Herbario

Especie	Colector	Ejemplar	Colecta
<i>Erythroxyllum citrifolium</i> St.Hill	Pérez, Parra, García, Benavides	417	Febrero 11 de 2010
<i>Ladenbergia magnifolia</i> (R.et p.) Kl	Pérez, Parra, García, Benavides	421	Febrero 11 de 2010
<i>Piper crasinervium</i> Kunth	Pérez, Parra, García, Benavides	418	Febrero 11 de 2010
<i>Piper</i> sp.	Pérez, Parra, García, Benavides	419	Febrero 11 de 2010
<i>Philodendron</i> sp	Pérez, Parra, García, Benavides	416-B	Febrero 11 de 2010
<i>Toxicodendrum striatum</i> *	Pérez, Parra, García, Benavides		Febrero 11 de 2010
<i>Pteridium aquilinum</i> *	Pérez, Parra, García, Benavides		Febrero 11 de 2010
<i>Solanum</i> sp*	Pérez, Parra, García, Benavides		Febrero 11 de 2010

* En proceso de clasificación



Figura 1. A. *Erythroxylum citrifolium* A.St Hill; B. *Philodendron yotocoense* Croat.; C. *Piper crassinervium* Kunth; D. *Pteridium aquilinum* L. Kuhn; E. *Piper aequale* Vahl; F. *Toxicodendrum striatum* Ruiz & Pav.; G. *Solanum* sp. ; H. *Ladenbergia magnifolia* Ruiz & Pav klotzsch

5.3 Marcha Fitoquímica

Para la detección de metabolitos secundarios de las ocho especies de plantas colectadas en la Reserva de Yotoco, se colectaron hojas en horas de la mañana, se almacenaron en bolsas plásticas negras de polipropileno, y fueron transportadas dentro de neveras de icopor al laboratorio de Entomología y Acarología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Antes de iniciar el secado se hizo una limpieza de las hojas (líquenes, excrementos de aves, insectos, etc.).

Las ocho especies de plantas se sometieron a un proceso de liofilización, para esto se uso un equipo marca Labconco, con capacidad de 4.5 litros. Los extractos obtenidos fueron macerados y almacenados en beakers de 250, 500 ml y llevados a una nevera de refrigeración por 1 día, evitando la evaporación para lograr mayor extracción. Los extractos fueron sometidos a dos fases, Etilica y Clorofórmica (alcohol etílico, cloroformo) y filtrados (papel filtro watman # 4) para obtener las soluciones (solución etanólica y solución clorofórmica) y poder realizar las pruebas de detección de metabolitos secundarios, tales como: Alcaloides, Esteroides, triterpenoides, Saponinas, Coumarinas y Flavonoides. Procedimiento que se hizo de acuerdo a los protocolos de Palomino y Mier, (1992) (Anexo 1) Cómo se describe a continuación:

5.3.1 Deteccion de Alcaloides

Se utilizaron dos tubos de ensayo con 1 ml de solución, uno proveniente de la solución etanólica y otro con la solución clorofórmica, a cada tubo se agrego 1 ml de HCL al 5%. Se espero que se formara o no precipitado, en donde se formo el precipitado se filtro la solución y se dividio en tres tubos de ensayo a los que se adicionaron 3 gotas de los siguientes reactivos: Precipitado Bercharadt, Precipitado Dregendorf y Precipitado Wagner en su repectivo orden. Los tubos donde se formó precipitado indicaron una prueba positiva.

5.3.2 Esteroides y triterpenoides

En un Beaker de 50 ml se agregaron 0.3 ml de solución etanólica y mediante baño maría se evaporó el solvente y se dejó enfriar, posteriormente se agregaron 0.5 ml de CHCl_3 (Cloroformo) y se agitó por 5 minutos. Luego el contenido se vertió en un vidrio de reloj para contrastarlo con un fondo blanco. Finalmente se agregaron 2 gotas de anhídrido acético y 2 gotas de H_2SO_4 concentrado. La prueba se consideró positiva cuando aparecieran manchas en cualquier tonalidad de rojo, azul o verde.

5.3.3 Saponinas

Del extracto etanólico, en un tubo de ensayo se disolvió 1 ml en 15 ml de agua destilada y se agitó por 5 minutos. La prueba se consideró positiva cuando se formó una fase de espuma permanente y estable por más de 30 minutos.

5.3.4 Coumarinas

En dos tubos de ensayo se agregaron 0.2 ml de solución, uno con solución etanólica y otro con solución clorofórmica, a cada uno se le agregó 3 gotas de éter etílico y se agitó por 3 minutos, luego en un papel filtro se aplicaron 2 gotas separadas de la solución etérea etanólica y 2 gotas de la solución etérea clorofórmica, para formar 4 manchas de 1 cm de diámetro aproximadamente y sin que se tocan entre sí. A una mancha de cada solución se agregó 1 gota de NaOH 1N y se dejó secar, para luego exponerlas a la luz ultravioleta. La aparición de fluorescencia azul en la mancha indicó reacción positiva.

5.3.5 Flavonoides

Se evaporaron 0.5 ml del extracto etanólico y 0.5 ml del extracto clorofórmico. El residuo fue disuelto en 1 ml de metanol y se adicionaron 2 gotas de HCL concentrado más un trozo de cinta de Mg y se esperó hasta que consumiera todo el Mg. El surgimiento de una coloración rosada, naranja, roja azulosa, violeta, verde o azul indico una prueba positiva. Una vez se obtuvieron estos resultados, se consideró que tres de las ocho especies seleccionadas contaban con los metabolitos considerados más importantes o con algún potencial acaricida. De otra parte se tuvo en cuenta la abundancia de la planta dentro de la reserva. En este sentido se seleccionaron las especies: *P. crassinervium*, *P. aequale* Vahl.

5.4 Obtención de extractos acuosos

Para la obtención de extractos acuosos se adaptó la metodología de Borges-Argáez *et al.*, (2007) y Rosado-Aguilar *et al.*, (2008). Se colectaron hojas de *P. crassinervium*, *P. aequale*, se secaron a temperatura ambiente y se molieron por 20 minutos (figura 2 a) en un molino (Wiley Mill model #2) estandarizando el material en un tamiz de 1 mm por partícula aproximadamente. Posteriormente se sometieron a extracción con etanol al 90% como solvente y con agua destilada en una proporción 80:20, por un periodo de 15 días (figura 2 b). Después de este tiempo los extractos acuosos se filtraron y se almacenaron en envases de vidrio color ámbar para evitar pérdida de la calidad de los extractos por fotólisis (figura 2 c) para conocer la concentración de cada extracto acuosos se determinó la cantidad de materia seca (ms), colocando muestras (50 ml) previamente homogenizadas en una estufa a evaporar (105°C / 48 horas). (Figura 2 e) De esta manera los tres extractos acuosos se estandarizaron a una concentración de 12000 mg/ml como solución madre, la cual quedo lista para los bioensayos, (figura 2 f)



Figura 2. Obtención de extractos acuosos. A. Molinaje hojas; B. Mezcla de Material con etanol (80:20); C. Filtrado; D. Empaque; E. Determinación sólidos (estufa/105 °C); F. Solución madre

5.5 Obtención de aceites esenciales a través del método de arrastre por vapor

Solamente, se logró hacer extracción de los aceites esenciales de *P. crassinervium*, *P. aequale*. Para este proceso se colectaron hojas y se llevaron al laboratorio de Entomología y Acarología de la Universidad Nacional de Colombia, donde fueron pesadas en fresco y se dejaron secar por 6 días (figura 3 a) una vez deshidratadas se pesaron nuevamente en una balanza analítica (figura 3 b) y se hizo una extracción por arrastre de vapor por 4 horas (figura 4 d), empleando un equipo de extracción tipo Clevenger para la obtención de aceites esenciales (figura 3 c) los cuales fueron secados con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). Una vez obtenidos los aceites se envasaron en frascos de vidrio transparentes de 2 ml, que fueron previamente lavados con un detergente inodoro, una solución acuosa de hidróxido de sodio y abundante agua, enjuagados con agua destilada y secados en una estufa (90 –

110°C); se cubrieron con papel aluminio, se rotularon y se embalaron en una cava de icopor con hielo, hasta que fueron usados.



Figura 3. Extracción de aceite esencial por arrastre de vapor. A. Proceso de secado; B. Peso de hojas; C. Extracción con arrastre de vapor (equipo clevenger); D. Aceite esencial (fase acuosa)

5.6 Caracterización fitoquímica por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC – MS) de los aceites esenciales de las especies *P. crassinervium* y *P. aequale*

Una muestra de los aceites esenciales de cada una de las especies, fue enviada para el laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander en Bucaramanga para la determinación de la composición química volátil (Cantidad relativa, % e identificación tentativa) empleando cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS) operado en un modo de barrido completo de radiofrecuencias (Full Scan)

5.6.1 Descripción del Análisis

La preparación de las muestras se llevó a cabo por dilución e inyección directa de los aceites esenciales al equipo cromatográfico. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas (*MSD Agilent Technologies* 5973) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (*Full Scan*). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (*J & W Scientific*, CA, EE.UU.) (5%-fenil-Poli (dimetilsiloxano), 60 mm x 0.25 mm x 0.25 μ m). La inyección se realizó en modo Split (30:1), Viny = 2 μ L. La identificación tentativa de los compuestos registrados de los aceites esenciales se estableció con base a sus espectros de masas, usando las bases de datos de Wiley 138 y NIST05.

6. COLECTA, PREPARACIÓN Y MONTAJE DE HEMBRAS DE *R. (B.) MICROPLUS* PARA LA OBTENCIÓN DE LARVAS.

Se colectaron hembras adultas de la garrapata *R. (B.) microplus* en bovinos de diferentes edades, provenientes de cruces 80% cebú, 20% pardo Suizo en la Hacienda Brasilia ubicada en el municipio de Cerrito, corregimiento Santa Elena. El ganado se infesto en forma natural y recibía ocasionalmente tratamientos de control.

Las hembras ingurgitadas, es decir, alimentadas con sangre del ganado se colectaron con ayuda de una pinza, levantándolas cuidadosamente para no destruir el hipostoma. Una a una se colocó en tubos de ensayo (figura 4 a) a los cuales se les colocó en la boca un tapón de algodón ligeramente humedecido. Los tubos se trasladaron al laboratorio de Entomología y Acarología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Una vez en el Laboratorio, las garrapatas fueron lavadas con agua destilada y secadas muy delicadamente con toallas de papel, para proceder al proceso de montaje para la obtención de huevos descrito por Rosado-Aguilar, *et al.*, (2008) con algunas adaptaciones como se describe a continuación: se organizó una unidad de oviposición de garrapatas que consistió en tomar una caja petri plástica de 9 cm de diámetro por 1,5 cm de alto, dentro de ella formando un círculo y hacia el borde de la caja se colocó una cinta de enmascarar con el lado pegante hacia fuera. Sobre esta superficie adhesiva de la cinta se colocaron las hembras de garrapatas una por una más o menos a una distancia de dos centímetros entre ellas. Las garrapatas se colocaron con la parte ventral hacia arriba, orientando el opistosoma hacia el centro de la caja petri es decir ellas quedaban en contacto con la cinta por el idiosoma dorsal (boca arriba), las patas le quedaban absolutamente libres pero el cuerpo se fijaba y quedaba inmovilizado. En cada caja Petri se colocaron entre 20 a 25 hembras. A cada caja Petri en la parte central se le colocó una mota de algodón humedecido para aumentar la humedad experimental. Las cajas Petri dispuestas de esta manera se colocaron sobre una bandeja plástica (de uso doméstico) con agua, impidiendo de esta manera que las hormigas o cualquier otro organismos entrara a perturbar la unidad de

oviposición; cada dos días el algodón de las cajas petri era asperjado con agua destilada para mantener una humedad experimental (figura 4 b). Estas unidades con las garrapatas se colocaron en una cámara de cría a una temperatura de 27 ± 32 °C y humedad relativa de 85 a 86% con el fin de obtener abundantes huevos. (Figura 4 f)

Una vez terminada la oviposición de las garrapatas de cada unidad, los huevos fueron transferidos en grupos de 100 con ayuda de un pincel a unas jeringas acondicionadas como se describe a continuación: se utilizaron jeringas plásticas estériles de uso humano de 5 ml, a estas jeringas se les hizo un corte al nivel donde se inserta la aguja y allí se colocó un tapón de algodón humedecido para mantener la humedad durante el periodo de incubación de las posturas. Adicionalmente, se les hizo un orificio en la parte central de la pared de la jeringa el cual se tapó con cinta micropore (figura 4 d, 4 e).

Las jeringas se llevaron a una cámara de cría bajo condiciones controladas (75% H.R y 30°C) (figura 4 f). Al cabo de 15 días de incubación se inició la emergencia de las larvas (figura 4 c; 4 d). Las larvas fueron utilizadas hasta 20 días después de haber emergido, después de este tiempo no se consideró conveniente usar larvas, pues podía estar alterada su viabilidad para los desarrollar los bioensayos.

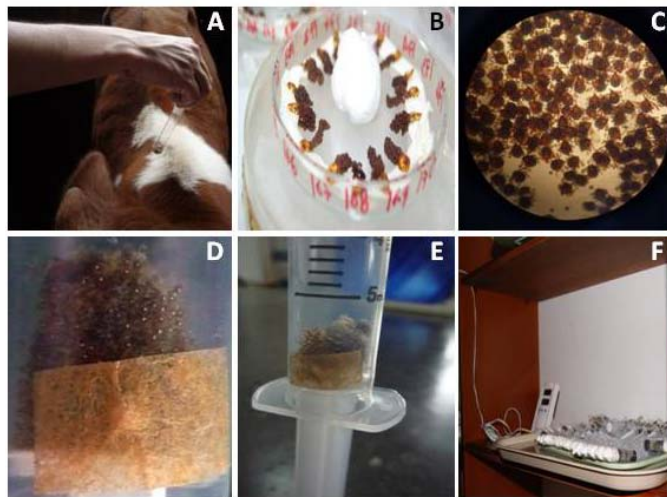


Figura 4. Colecta, preparación y montaje de hembras de *R. (B.) microplus* para la obtención de larvas. A. Colecta adultas *R. (B.) microplus*; B. Montaje de adultas *R. (B.) Microplus*; C.

Larvas de *R. (B) microplus* (vista microscopio óptico); D. Huevos de *R. (B) microplus* eclosionando; E. Jeringa modificada con micropore; F. Camara de cria

6.1 Evaluación de extractos vegetales acuosos, aceites esenciales de *P. crassinervium*, *P. aequale* y tres productos químicos sobre larvas de *R. (B.) microplus*

6.1.1 Tratamientos

En la tabla 1 se presentan los tratamientos y las diluciones empleadas. Se evaluaron tres extractos acuosos de las dos especies de plantas (*Piper crassinervium* y *Piper aequale*) cada uno con cinco concentraciones que corresponden a: 12,000 mg/l, 10,000 mg/l, 8,000 mg/l, 6,000 mg/l, y 4,000 mg/l. Cada concentración se hizo con 16 repeticiones y cada repetición consistió en una jeringa con 100 larvas. Se estableció un testigo TWEEN 20 al 2%

Solamente se evaluaron los aceites esenciales para *P. crassinervium* y *P. aequale*, cada uno con cinco concentraciones que corresponden a: 2 mg/ml, 1.5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5mg/ml y 0.1 mg/ml. Como testigo se usó Etanol Absoluto. Los acaricidas evaluados fueron cipermetrina, amitraz y dravafos en las concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% y 12.5%. La concentración del 100% correspondió a la dosis comercial del producto. Como testigo se usó agua destilada.

6.1.2 Procedimiento

Una vez obtenidas las concentraciones de los diferentes tratamientos (extractos vegetales acuosos, aceites esenciales y productos químicos) fueron homogenizadas en una plancha agitadora por 15 minutos (figura 5 a) y se tomó lectura del pH para cada uno de ellos (figura 5 b).

Tabla 2. Tratamientos empleados en Bioensayos

GRUPO	PRODUCTO	Concentraciones				
		A	B	C	D	E
*Químicos (ml/L)	Cipermetrina	100 %	75 %	50 %	25 %	12.5%
	Amitraz	100 %	75 %	50 %	25 %	12.5%
	Dravafos	100 %	75 %	50 %	25 %	12.5%
Testigo	Agua destilada	-	-	-	-	-
Extractos acuosos (mg/l)	<i>P. crassinervium</i>	12,000	10,000	8,000	6,000	4,000
	<i>P. aequale</i>	12,000	10,000	8,000	6,000	4,000
Testigo	Tween 20 2%	-	-	-	-	-
Aceites Esenciales (mg/ml)	<i>P. crassinervium</i>	2,0	1.5	1	0.5	0.1
	<i>P. aequale</i>	2,0	1.5	1	0.5	0.1
Testigo	<i>Etanol Absoluto</i>	-	-	-	-	-

*Grupos químicos (Formamidinas, Piretroides, organofosforados)

6.1.3 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con efecto anidado, el cual contenía 16 repeticiones cada repetición compuesta por 100 larvas de garrapatas, siete tratamientos y tres testigos. Para el análisis de los datos se utilizó mediante el análisis probit para el cálculo de la DL50 y dado que las dosis de los tratamientos variaron se usó un modelo anidado donde los factores de variación fueron Producto y Dosis (producto).

6.1.4 Evaluaciones

La evaluación del efecto acaricida de cada producto se realizó teniendo la seguridad de que las larvas se sumergieran y tuvieran contacto total con cada uno de los productos. Para cada tratamiento se usaron seis recipientes de vidrio de 20 cc. En cuyo interior se colocaron 10 ml del producto a evaluar; seguidamente se tomaron grupos de más de 100 larvas de *R. (B) microplus* (de 10 - 20 días de edad) de la cría establecida y se sumergieron en los recipientes por un periodo de 5 minutos, agitando delicadamente (figura 5 d). Al cabo de este tiempo las larvas se retiraron de la solución y se colocaron sobre papel toalla (figura 5 e) para evitar que siguieran en contacto con el tratamiento. Con ayuda de un estero-microscopio y un pincel se tomaron grupos de 100 larvas y se depositaron en jeringas plásticas de uso humano de 5 ml. A estas jeringas se les hizo un corte al nivel donde se inserta la aguja y allí se colocó una malla o tul para evitar que se salieran (figura 5 f). Adicionalmente, se les hizo un orificio en la parte central de la pared de la jeringa el cual se tapó con cinta micropore facilitando la entrada de oxígeno (5, f). Las jeringas se almacenaron bajo condiciones controladas (70% HR y 28 – 30°C) por un periodo de 24 horas, tiempo en el que se evaluó el número de larvas vivas y muertas, tal como lo describe la metodología de (Rosado-aguilar, *et al.* 2010).

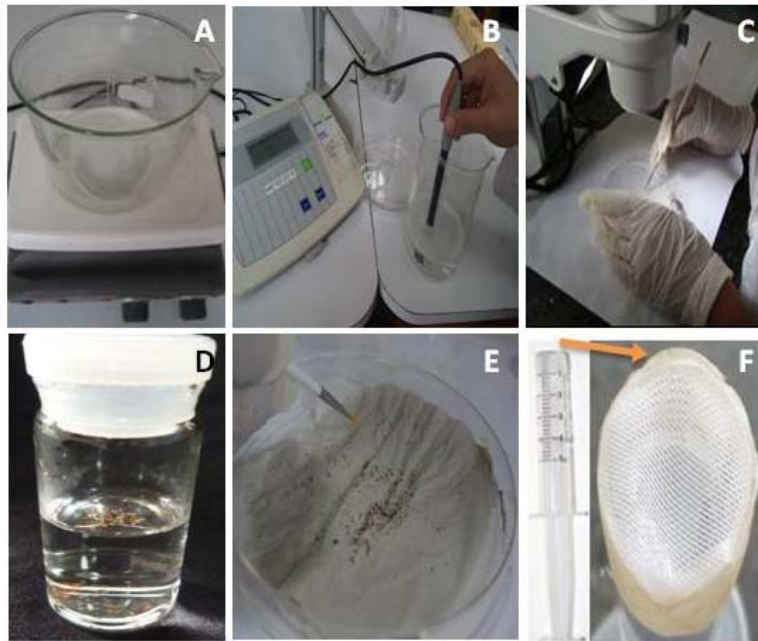


Figura 5. Evaluaciones de extractos acuosos, aceites esenciales y acaricidas químicos. A. Homogenización de tratamientos; B. Lectura pH; C. Inmersión de larvas *R. (B.) microplus*; D. Secado larvas *R. (B.) microplus*; E. Montaje y evaluación de larvas *R. (B.) microplus*; F. Jeringa modificada con micromalla

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Marcha Fitoquímica de las ocho especies de plantas

Las plantas colectadas con el propósito de conocer sus metabolitos secundarios pertenecen a siete familias de común ocurrencia en la Reserva de Yotoco. Las especies fueron: *Piper aequale* Vahl (Piperaceae); (figura 1 d) *Piper crassinervium* Kunth (Piperaceae) (figura 1 c); *Toxicodendron striatum* (Ruiz & Pav.) Kuntze (Anacardiaceae) (figura 1 e); *Erythroxylum citrifolium* A.St.-Hill (Erythroxylaceae) (figura 1 a); *Solanum* sp. (Solanaceae) (figura 1 f); *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (Dennstaedtiaceae) (figura 1 g); *Ladenbergia magnifolia* (Ruiz & Pav.) Klotzsch (Rubiaceae) (figura 1 h); *Philodendron yotocoense* Croat (Araceae) (figura 1 b)

La marcha fitoquímica permitió reconocer los tipos de metabolitos presentes en las ocho especies de plantas. La extracción etílica permitio reconocer el contenido de alcaloides en algunas de las plantas seleccionadas. De acuerdo a los resultados de la marcha fitoquímica, se encontró evidencia de mayor contenido de alcaloides en *T. striatum*, seguido por *P. crassinervium*, *P. aequale*, *E. citrifolium* y en muy poca cantidad se visibilizo para *Solanum* sp. En las otras plantas no fueron visibles los alcaloides.

Las coumarinas, los flavonoides y los taninos solo fueron evidentes en *P. aquilinum* tanto en la extracción etílica y cloroformica. Entre tanto en *T. striatum* fueron visibles flavonoides y esteroides. Los glicosidos no fueron visibles en ninguna de las plantas. Curiosamente en la especie *E. citrifolium*, fueron visibles alcaloides, coumarinas, flavonoides y esteroides, sin embargo esta planta no esta ampliamente distribuida en la

Reserva, por lo cual no fue posible continuar con los estudios. En la tabla 2 se presenta la marcha fitoquímica preliminar, de las ocho especies.

Tabla 3. Marcha fitoquímica preliminar

Metabolitos		<i>P. aequale</i>	<i>Solanum</i> sp.	<i>P. crassinervium</i>	<i>L. Magnifolia</i>	<i>P. aquilinum</i>	<i>T. striatum</i>	<i>P. yotocoense</i>	<i>E. citrifolium</i>
Alcaloides	Et	++	+	++ (P A ¹)	-	-	+++	-	++
	Cl	-	-	-	-	-	-	-	-
Coumarinas	Et	+	+	+	+	+++	-	-	++
	Cl		+	+	+	+++	-	++	-
Flavonoides	Et	+	-	-	-	+++	-	+	+++
	Cl	-	+	-	-	+++	+++	++	++
Esteroides	Et	-	+	+	+	-	+++	+	++
	Cl	+	+	+	+	-	+++	++	+++
Glicosidos	Et	-	-	-	-	-	-	-	+(PB ²)
	Cl	+	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	Et	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cl								
Taninos	Et	-	+	+	+	+++	+++	-	++
	Cl	-	-	+	-	-	-		-

+++ (Abundante)

++ (Moderado)

+ (Escaso)

Tunón *et al.* (2006) reporta las cumarinas del extracto de *Artemisia abrotanum* como los repelentes más potentes contra las ninfas de *Ixodes ricinus* en extracto de tolueno de ajeno (*Artemisia abrotanum*) y el aceite esencial de las flores de clavel (*Dianthus caryophyllum*). Este metabolito ejerce un efecto repelente pronunciado tanto contra las garrapatas (ninfas de *Ixodes ricinus*) y los mosquitos de fiebre amarilla (*Aedes aegypti*).

¹ Prueba positiva en la evaluación (A)

² Prueba positiva en la evaluación (B)

La actividad de los cuatro flavonoides extraídos de *Gnaphalium affine* fue reportada por Morimoto *et al.* (2000), actuando como antialimentario sobre larvas de *Spodoptera litura*. En experimentos posteriores de Morimoto *et al.* (2003) aislaron siete flavonas del extracto de raíces de *Sculletaria baicarenensis* (Rutaceae) y metilandas encontraron efectividad antialimentaria sobre larvas de *S. litura*. La rotenona es una flavona aislada de las raíces de *Derris elliptica* Wall (Fabaceae) y *Lonchorcapus utilis* A.C. Sm (Fabaceae) cuyos efectos insecticidas actúan inhibiendo el metabolismo de los insectos (Silva *et al.*, 2002). Niño (2007), encontró actividad de repelencia y disuasión con extractos de *Piper umbellatum* L. (Piperaceae) sobre la broca del café (*Hyphothenemus hampei*), encontrando metabolitos como alcaloides y sesquiterpenlactonas.

7.2 Evaluación de la actividad acaricida de extractos acuosos y extractos oleosos de *P. crassinervium*, *P. aequale* y de los productos químicos cipermetrina, amitraz, dravafos, sobre larvas de *R. (B.) microplus*

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, los extractos acuosos de *P. crassinervium* como de *P. aequale*, no produjeron mortalidad en las concentraciones evaluadas. Se evidencio que la concentración letal 50 - CL50, es decir la concentración necesaria para obtener mortalidad del 50 % de las larvas de *R. (B.) microplus* es el doble de la utilizada en el caso de *P. aequale* y en el caso *P. crassinervium* es necesario incrementar la dosis utilizada en este trabajo hasta 5000 gramos/litro. En igual proporción, se tendrían que aumentar las concentraciones si se pretendiera obtener la mortalidad del 90%. El comportamiento de los aceites esenciales con relación a la mortalidad fue similar a los extractos acuosos. Es necesario incrementar cinco veces la concentración de *P. aequale* y duplicar la concentración de *P. crassinervium* para obtener la concentración letal 50% de larvas de *R. (B.) microplus* y con relación a la mortalidad al 90% en el caso de *P. aequale* es necesario incrementar cinco veces.

En contraste la mortalidad ocasionada a bajas concentraciones por los productos químicos evaluados amitraz, cipermetrina y dravafos, fue contundente, indicando que la población de garrapatas evaluadas es susceptible a los productos, es decir, no se observa resistencia a los productos químicos comerciales. En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de los extractos vegetales y los productos químicos en sus diferentes concentraciones.

Tabla 4. Concentraciones letales CL 50, CL 90

TRATAMIENTOS	CL 50	CL 90
Extractos acuosos		
<i>P. aequale</i>	24.353,mg/ L	60.032,74 mg/ L
<i>P. crassinervium</i>	17.254mg/ L	33.379 mg/ L
Extractos oleosos o Aceites esenciales		
<i>Piper aequale</i>	11.13819 mg/ml	10102 mg/ml
<i>Piper crassinervium</i>	5.33413 mg/ml	53858 mg/ml
Productos acaricidas comerciales		
Amitraz	0.40718 ml/L	1.06297 ml/ L
Cipermetrina	0.11536 ml/ L	0.46622 ml/ L
Dravafos	0.0947 ml/ L	0.7173 ml/ L

7.3 Analisis Probit

Los resultados graficos del probit para la concentración de 12000 mg/L de los extractos acuosos de *P. crassinervium* y *P. aequale*, permiten apreciar lo siguiente: se presento una mortalidad inferior al 25%, con la concentración utilizada en este trabajo y se requiere una concentración de 17.254 mg/ L para obtener la CL50 con los extractos de *P. crassinervium*

mientras que con los extractos acuosos de *P. aequale* se presento una mortalidad inferior al 15% con la concentración usada y se requiere de 24.353mg/ L para obtener la CL50 con este extracto vegetal.

En las figuras 6 y 7 se presenta la mortalidad obtenida en las concentraciones usadas con los extractos acuosos de *P. crassinervium* y *P. aequale*.

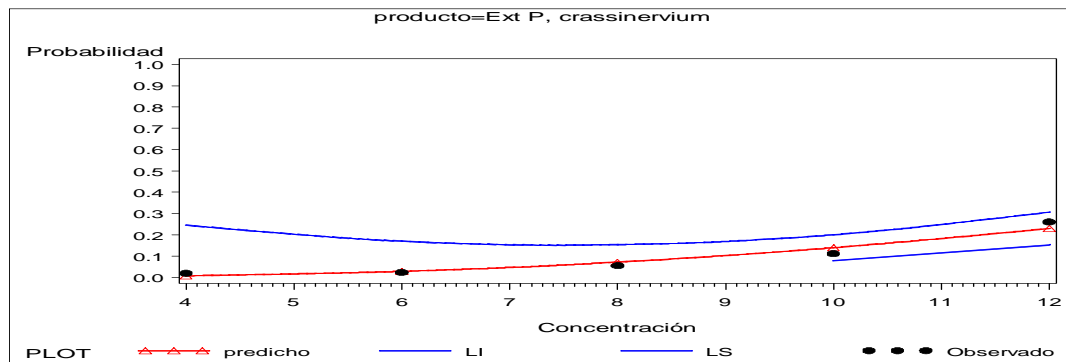


Figura 6. Probit extracto to *Piper crassinervium*

m

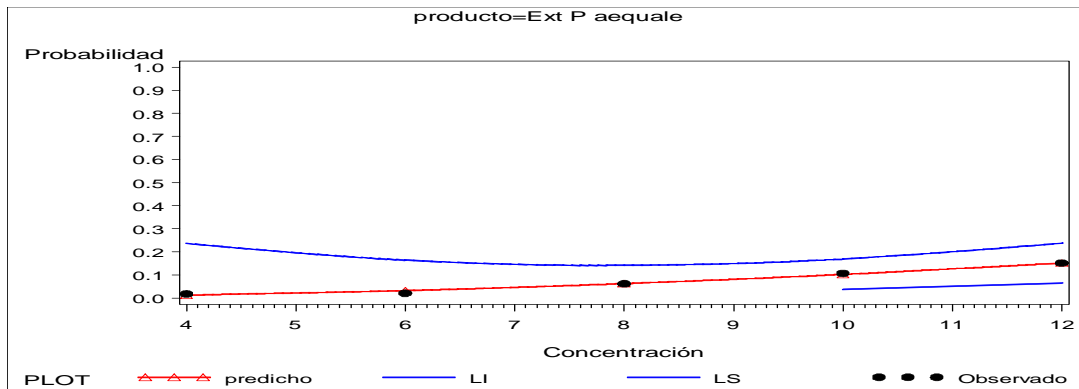


Figura 7. Probit extracto to *Piper aequale*

Para el caso de los aceites esenciales los resultados graficos del probit a la concentración de 2 mg/ml utilizada de *P. crassinervium* y *P. aequale*, permiten apreciar lo siguiente: se presento una mortalidad inferior al 45%, con la concentración utilizada en este trabajo y se requiere una concentración de 5.3 mg/ml para obtener la CL50 con los extractos de *P. crassinervium* mientras que con los aceites esenciales de *P. aequale* se presento una

mortalidad inferior al 40% con la concentración usada y se requiere de 11.13819 mg/ L para obtener la CL50 con este aceite esencial.

En las figuras 8 y 9 se presenta la mortalidad obtenida en las concentraciones usadas con los aceites esenciales de *P. crassinervium* y *P. aequale*.

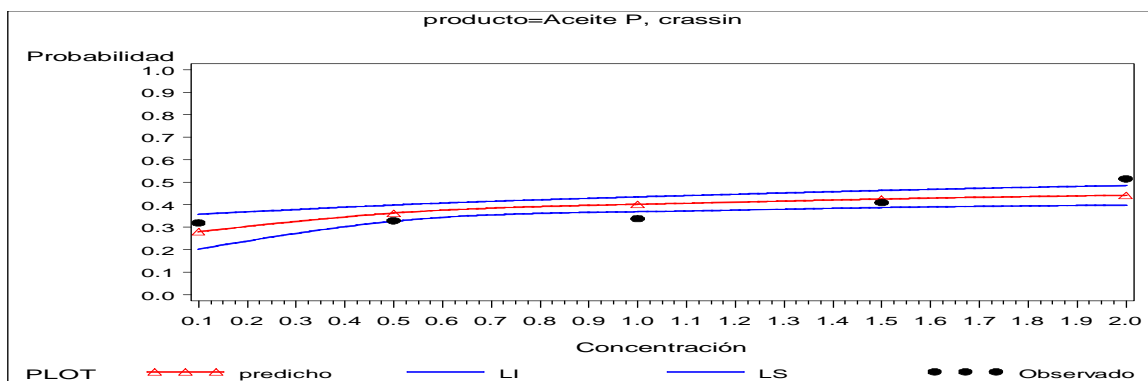


Figura 8. Probit Aceite *Piper crassinervium*

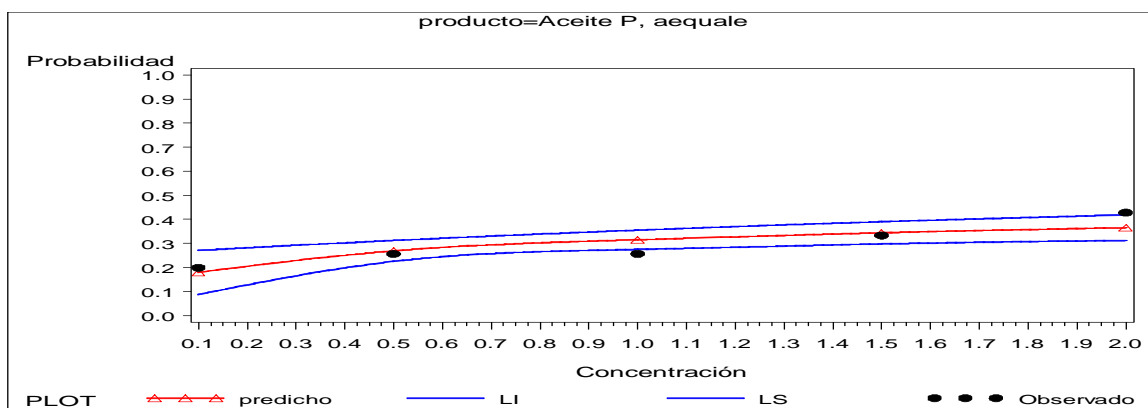


Figura 9. Probit Aceite *Piper aequale*

De acuerdo a Danelutte *et al.* (2003) y Lago *et al.* (2004), los productos aislados de las hojas de *P. crassinervium* son muy especiales (La actividad biológica de estos compuestos incluye propiedades antitumorales, antileucemica e inhibición de mitosis (Muller *et al.*, 1985a, b). Además tienen efecto analgésico, relajante (De Pasquale *et al.*, 1991) y efectos antioxidantes (Cotele *et al.*, 1991). Existen reportes de varias especies de *Piper* que contienen estructuralmente compuestos similares al ácido benzoico prenilado (Baldoqui *et*

al., 1999) y en el caso de *P. aduncum* se evaluó su actividad como antimicrobiana y molusquicida (Okunade *et al.*, 1997; Orjala *et al.*, 1993), *P. arieianum*, *P. tabogatum* and *P. dilatatum* también contienen ácidos benzoicos prenilados con actividad fungicida (Green *et al.*, 1991; Roussis *et al.*, 1990; Terreaux *et al.*, 1998).

Ferraz *et al.* (2010), obtuvieron resultados similares con la evaluación de aceites esenciales de *Piper amalago*, *Piper mikanianum* y *Piper xylosteoides* sobre larvas de *R. (B.) microplus*, en estudios realizados en el sur de Brasil. A una concentración de 2.33 µl/ml el aceite esencial de *P. mikanianum* fue el único que mostró alguna actividad acaricida en las larvas, las otras dos especies *P. xylosteoides* prácticamente no mostraron ningún efecto con una concentración de 6.15 µl/ml y *P. amalago* no produjo mortalidad. En contraste con el testigo Amitraz® con el cual se mataron todas las larvas.

Independientemente de las concentraciones empleadas, del tipo de extracto evaluado, la mayor mortalidad se presentó en los tratamientos químicos en todos los casos la mortalidad fue superior al 50%. La Cipermetrina presentó el mayor porcentaje de mortalidad con un 82.8%. En contraste, con los extractos vegetales, tanto acuosos como aceites esenciales solo se obtuvieron mortalidades entre 7 y 38%. Indudablemente los extractos acuosos fueron los menos eficientes ya que no superaron el 10% de mortalidad. La tabla 4, muestra las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados (Tukey test, $P > 0.05$).

Tabla 5. Comparacion de la mortalidad efectuada por los productos evaluados mediante Prueba del rango estudent (Tukey)

Producto	Promedio
Cipermetrina	82.8225 A
Dravafos	75.7435 B
Amitraz	52.2172 C
Aceite esencial de <i>P. crassinervium</i>	38.2164 D
Aceite esencial de <i>P. aequale</i>	29.4692 E
Extracto acuoso de <i>P. crassinervium</i>	9.3935 F
Extracto acuoso de <i>P. aequale</i>	7.3998 G

Promedios seguidos con la misma letra no son significativamente diferentes. (Tukey test, $P > 0.05$)

7.4 Deteccion de la composicion química de aceites Esenciales por Cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC – MS) para *P. crassinervium* y *P. aequale*.

Con este analisis se lograron identificar un total de 52 componentes de los aceites esenciales de *P. crassinervium* y 58 en *P. aequale*. Sin embargo, muchos de estos compuestos se encontraron en cantidades muy pequeñas. En las tablas 5 y 6 se presenta la composicion química de estos aceites esenciales.

Los componentes encontrados en mayor proporción en *P. crassinervium* fueron Limoneno (19%), Germacreno D (16,7 %), Sabineno (8,1 %), α – Pineno (7,6 %), Bicyclogermacreno (4,7%), mientras que en *Piper aequale* los de mayor proporción fueron Germacreno D (17.4), δ - Cadineno (4.9 %), β – Selineno (46 %), Trans- β –Cariofileno (4.1 %), α – Gurjuneno (3.6%).

Según los compuestos que se reportan en este estudio, la especie *Piper aequale* tiene mayores propiedades aromaticas de acuerdo a tipos de compuestos derivados de

terpenoides de funciones alcoholicas, aldehidos, cetonas, y cuyo peso molecular son menores que los de *Piper crassinervium* (J. Prieto, Com per. 2011)

Ferraz *et al.* (2010), reportaron para estudios con aceites esenciales de *Piper mikianium*, actividad larvicida sobre *R. (B.) microplus* y entre sus compuestos encontraron metabolitos como piperamidas y fenilpropanoides en concentraciones de (67.89%). En el análisis cromatografico de este trabajo también se encontró fenilpropanoides en las especies *P. crassinervium* y *P. aequale* pero en bajas concentraciones, 16.5 % y 13.6 % respectivamente. Esto puede explicar por que la baja actividad acaricidas en las pruebas realizadas en este estudio.

De otra parte, Seo *et al.* (2009) reportaron importante actividad acaricida sobre *R. (B.) microplus* en extractos de plantas que contenían eugenol. Martinez - Velazquez, *et al.* (2011) reportaron actividad del linalool (30,61%) y eugenol (6,61%) con accion larvicida en *R. (B.) microplus*, sin embargo en el análisis de las plantas usadas en este trabajo la concentración de estos compuestos es demasiado baja (1%) y (0.9%).

En las tablas 5 y 6 se presenta la composición de los aceites esenciales de *P. crassinervium* y *P. aequale*.

Tabla 6. Deteccion de la composicion química de aceites esenciales por cromatografia de gases con detector selectivo de masas (GC – MS) para La especie *Piper Crassinervium*

No Pico	t _R (Min)	Identificacion tentativa	Cantidad relativa (%) Especie 1
1	17.43	α – Tujeno	0.2
2	17.83	α – Pineno	7.6
3	18.61	Canfeno	0.1

4	19.59	Sabineno	8.1
5	19.86	β – Pineno	2.2
6	20.17	β – Mirceno	0.6
7	21.04	α – Felandreno	0.1
8	21.50	α – Terpineno	0.2
9	21.83	<i>p</i> - <i>Cimeno</i>	0.1
10	22.09	Limoneno	19.0
11	22.17	β – Felandreno	0.2
12	23.23	Γ – Terpineno	0.4
13	23.77	<i>Cis</i> – Hidrato de sabineno	0.1
14	24.37	Terpinoleno	0.1
15	25.05	<i>Trans</i> - Hidrato de sabineno	0.1
16	26.01	<i>Cis-p-ment-2,8-dien-1-ol</i>	< 0.1
17	28.24	Terpinen-4-ol	0.7
18	28.76	α – Terpeneol	< 0.1
19	32.08	Acetato de bornilo	0.2
20	34.11	δ - Elemeno	0.4
21	34.66	Eugenol	0.9
22	35.78	α – copaeno	0.4
23	36.20	β – elemeno	3
24	36.98	α – Gurjuneno	0.4
25	37.47	<i>Trans</i> - β – Cariofileno	1.8
26	37.59	Υ –elemeno	0.3
27	38.70	α – humuleno	2.7
28	38.85	<i>9-epi-</i> (E) Cariofileno	1.0
29	39.21	Υ – Muuroleno	1.4
30	39.54	Germacreno D	16.7

31	39.80	β – Selineno	1.0
32	39.97	Biciclogermacreno	4.7
33	40.52	N.I (M ⁺ 222)	3.4
34	41.44	Elemol	0.6
35	41.61	<i>Trans</i> -Nerolidol	0.7
36	41.96	Germacreno B	0.7
37	42.44	Espatulenol	3.4
38	42.66	Óxido de cariofileno	0.3
39	42.72	Globulol	0.8
40	42.89	Guaiol	0.8
41	42.99	Viridiflorol	1
42	43.63	N.I (M ⁺ 222)	0.3
43	43.77	N.I (M ⁺ 220)	0.8
44	43.93	Υ – Eudesmol	1.0
45	44.16	N.I (M ⁺ 222)	0.3
46	44.21	<i>Tau</i> - Muurolol	0.4
47	44.27	α – Muurolol	0.8
48	44.37	N.I (M ⁺ 204)	3.8
49	44.54	Valerianol	2.7
50	44.63	α – Eudesmol	2.0
51	44.79	Bulnesol	0.7
52	45.50	N.I (M ⁺ 220)	0.6

Tabla 7. Detección de la composición química de aceites esenciales por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC – MS) para la especie *Piper aequale*

No Pico	t _R (Min)	Identificación tentativa	Cantidad relativa (%) Especie 1
1	14.02	<i>Trans</i> - 2 Hexenal	< 0.1
2	17.83	3- Hexenol	< 0.1
3	15.41	Propilciclohexeno	0.1
4	17.77	α – Pineno	0.3
5	18.55	Canfeno	< 0.1
6	19.81	β – Pineno	0.2
7	19.90	6 – Metil-5-hepten-2-ona	0.2
8	20.13	β – Mirceno	< 0.1
9	21.00	α – Felandreno	0.1
10	21.11	δ -3-Careno	0.1
11	21.45	α – Terpineno	< 0.1
12	21.79	<i>p</i> -Cimeno	0.4
13	21.99	Limoneno	0.1
14	22.12	β – Felandreno	0.1
15	22.59	<i>Trans</i> - β – Ocimeno	0.1
16	23.20	γ – Terpineno	< 0.1
17	23.72	Óxido de Linalool	0.2
18	24.35	Terpinoleno	0.3
19	24.55	<i>p</i> -Cimeneno	0.1
20	24.82	Linalool	1.0
21	34.15	δ - Elemeno	2.3
22	34.61	α – Cubebeno	0.6
23	35.56	α – Ylangeno	0.4

24	35.81	α – Copaeno	1.5
25	36.23	β –Elemeno	2.8
26	37.02	α – Gurjuneno	3.6
27	37.40	N.I (M ⁺ 204)	3.6
28	37.51	<i>Trans</i> - β –Cariofileno	4.1
29	37.79	β –Copaeno	0.8
30	38.14	N.I (M ⁺ 204)	3.6
31	38.71	α – Humuleno	1.4
32	39.39	Υ – Muuroleno	3.5
33	39.62	Germacreno D	17.4
34	39.85	β – Selineno	4.6
35	40.04	α – Selineno	3.2
36	40.48	Υ – Cadineno	2.2
37	40.56	δ - Cadineno	4.9
38	40.71	<i>Cis</i> -Calameneno	1.0
39	41.28	Sibireno	1.5
40	41.42	Selina-3,7 (11)-dieno	1.7
41	41.48	Elemol	2.0
42	41.64	<i>Trans</i> -Nerolidol	1.2
43	41.98	Germacreno B	0.1
44	42.46	Espatulanol	1.4
45	42.76	Globulol	3.3
46	43.02	Viridiflorol	2.6
47	43.31	N.I (M ⁺ 222)	1.8
48	43.66	N.I (M ⁺ 222)	1.0
49	43.83	N.I (M ⁺ 220)	6.3
50	43.97	Υ – Eudesmol	0.9
51	44.19	Epi- α –Cadinol	2.8
52	44.25	<i>Tau</i> -Muurolol	1.6
53	44.30	α -Muurolol	1.3

54	44.59	N.I (M ⁺ 222)	2.6
55	44.67	α -Eudesmol	2.9
56	44.75	Selin-11-en-4- α -ol	1.5
57	45.77	N.I (M ⁺ 222)	0.6
58	48.91	N.I (M ⁺ 234)	0.6

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Las concentraciones de los extractos acuosos como la de los aceites esenciales fueron inferiores a las requeridas para obtener una mortalidad de 50% de una población.
2. Es posible que la metodología utilizada de inmersión de las larvas no permitiera que estuvieran en contacto suficiente con el producto vegetal.
3. Es necesaria la realización de nuevas investigaciones en donde se evalúen las concentraciones proyectadas por el probit, determinar si la estabilidad de los extractos no se altera con las diluciones.
4. Dado que los componentes activos de las plantas pueden variar según de la estructura de la planta utilizada, 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 extracción como, extracción en caliente (Soxleth), hidrolatos, infusión, etc. Además de probar con solventes diferentes, tanto en la elaboración como en la dilución del extracto.
5. Asimismo, realizar pruebas, evaluando efectos repelentes, inhibidores de oviposición en las garrapatas.
6. Se recomienda en futuras investigaciones, evaluar extractos puros y en mezclas (sinergia) ya que puede existir enmascaramiento de las propiedades acaricidas.
7. Debido a que la planta *E. citrifolium* presento alcaloides, flavonoides y esteroides, se recomienda caracterizar el extracto en crudo, para saber cuales metabolitos presenta con detalle, así como para las que presentaron alcaloides
8. Dado que en la cromatografía no se pudieron identificar algunos componentes *P. aequale* (20,1%), *P. crassinervium* (9,2%), se recomienda evaluar estas especies en otras localidades, para ver que tanto varían los compuestos.

BIBLIOGRAFIA

Aguilar, T.G.; Rodríguez, V.R.I. 2003. Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Vet Parasit* 11(2):211–216.

Aguirre, E.J; Santamaría, V.M. 1986. Purificación toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados. VII Reunión Anual de Parasitología Vet., Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

Alecio, A.C.; Bolzani, V.S.; Young, M.C.M.; Kato, M.J.; Furlan, M. 1998. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. *J. Nat. Prod.* 61: 637-639.

Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129, S427–S442.

Arnaldo, I. R. L. ; das Graças, M. B. Z.; Guilherme, J. S. M. 2003. the essential oils of *Piper reticulatum* L. and *P. crassinervium* H. B. K

Argandoña. V. I.; Del pozo, T.; San - Martin, A. and Roviroso, J. 2000. Insecticidal activity of *Plocamium cartilagineum* monoterpenes. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química.* 45: (3) 1 - 7

Aycardi E., Benavides E., Garcia O., Mateus G., Henao F. and Zuluaga F. 1984. *Boophilus microplus* tick burdens on grazing cattle in Colombia. *Trop. Anim. Health Prod.* 16: 78–84.

Barros, B.D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. 2006. Carrapatos de importância Médico - Veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. p. 223.

Bahiense, T.C.; Fernandes, E.K.; Bittencourt, V.R.E.P. 2006. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. Vet. Parasit. 141, 319–324.

Baggio A, Arculeo P, Nanetti A, Marinelli E, Mutinelli F. 2004. Field trials with different thymol-based products for the control of varroosis. Am Bee J 144(5): 395–400

Baldoqui, D.C.; Kato, M.J.; Cavalheiro, A.J.; Bolzani, V.D.; Young, M.C.M. et al.,1999. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. Phytochemistry 51, 899–902.

Barré, N. ; Li, A.Y.; Miller, R. J.; Gaïa, H.; Delathière, Jean-Michel , Davey, R. B.; George, J. E. 2008. *In vitro* and *in vivo* evaluation of deltamethrin and amitraz mixtures for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in New Caledonia. Veterinary Parasitology 155:1-2, 1

Beadles, M.L.; Drummond, R.O.; Whetstone, T.M. 1973. Tropical horse tick: effects of solvents on oviposition. J Econ Entomol 66: 125– 127

Benavides, O. E. 2001. Control, de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. Carta Fedegan No 69, julio-agosto, (Anexo Coleccionable “Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en explotaciones ganaderas 6”) p. 52-63

Bigley, W. S.; & Plapp, F. W.Jr. 1978. Metabolism of *cis*- and *trans*-14 C- permethrin by tobacco budworm. J. Agric. Food Chem. 26: 1128-1134.

Bittencourt, V.R.E.P., Macarenhas, A.G., Faccini, J.L.H., 1999. Mecanismo de infeccao do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato bovino *Boophilus microplus* em condicoes experimentais. Cienc. Rural. Santa Maria 29, 351–354

Borges-Argáez, R.; Canche-Chay, C.I.; Peña- Rodríguez, L.M.; Said-Fernández, S.; Molina- Salinas, G.M. 2007. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. Fitoterapia, 78: 370 - 372.

Brayton, C.F. 1986. "Dimethyl Sulfoxide (DMSO): a review." Cornell Vet., 76: 61-90

Brizuela, C.M.; Ortellano C.A.; Sanchez, T.I and Walker, A.R. 1996. Formulation of an integrated control of *Boophilus microplus* in Paraguay. Vet. Parasitol. 63: 95–108.

Caeiro, V. 2006. Reflexão sobre a taxonomia actual dos *ixodidae*. A sistemática morfológica *versus* sistemática molecular - o género *rhipicephalus* e o género *boophilus* revista portuguesa de ciências veterinárias rpcv 101: 557-558 p. 37-39

Cartaza, O.; Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales. 22: 5-14

Castro – Silva, W.; De Souza, J. R.; Cesiod, M. V.; Azevedo, J. L.; Heinzen, H.; Monteiro, N. de B. 2011. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Veterinary Parasitology. 179: 1-3 p. 189-194

Castro - Silva, W; De Souza, J.; Meneses, D. S; Heinzen, H; Cesio, M. V et al. 2009. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) *veterinary Parasitology* Vol. 64, p. 267-274

Castro - Janer, E.; Martins, J.R.; Mendes, M.C.; Schumaker T.T.S. 2008. Primeiros diagnósticos de resistência de *Boophilus microplus* ao Fipronil no Brasil através de bioensaios in vitro, presented at the 15th Brazilian Congress of Veterinary Parasitology and the 2nd Seminar on Veterinary Parasitology, Curitiba, Paraná, Brazil.

Cotele, N.; Moreau, S.; Bernier, J.S.; Catteau, J.P.; Henichart, J.P. 1991. Antioxidant properties of natural hydroquinones from the marine colonial tunicate *Aplidium californicum*. *Free Radic. Biol. Med.* 11, 63–68.

Chagas, A.C.S.; Leite, R.C.; Furlong J, Prates HT, Passos, W.M. 2003. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. *Ciência Rural* 33:109–114

Chang, F. R.; Chen, C-Y.; Wu, P-H.; Kuo, R-Y.; Chang Y-C. et al. 2000. New alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products.* 63: 746-748

Chungsamarnyart, N.; Jiwajinda, S.; Jansawan, W.; Kaewsuwan, U.; Buranasilpin, P. 1988. Effective plant crude-extracts on the tick *B. microplus*. I. Larvicidal Action. Thailand Kasetsart Journal (Nature Science Supplement), 22: 37-41.

Chungsamarnyart, N.; Jiwajinda, S.; Jansawan, W. 1991. Larvicidal effect of plant crude-extracts on the tropical cattle tick (*B. microplus*). Thailand Kasetsart Journal (Nature Science. Supplement), 25: 80-89.

Cordovés, C.O. 1997. Carrapato. Controle ou erradicação. Porto Alegre. Guaíba Agropecuária. 197p.

Cortés, J. 2010. Cambios en la distribución y abundancia de garrapatas y su relación con el calentamiento global. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 57, 65-75.

Chen, J.J.; Duh, C.Y.; Huang, H.Y. Chen, I.S. 2003. Cytotoxic constituents of *Piper sintenense*. *Helv. Chim. Acta*, 86, p. 2058–2064

Drummond, R.O.; Crust, S.F.; Trevino, J.L.; Gladney, W.J.; Graham, O.H. 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66, 130–133.

Daemon E, Monteiro CMO, Rosa LS, Clemente MA, Arcoverde A. 2009. Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 105:495–497

Danelutte A.P.; Lago J.H.; Young M. C.; Kato M.J. 2003. Antifungal flavanones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry.*64 (2):555-9.

De Oliveira-Vasconcelos, V.; Furlong, J.G.; Marques, F.; Dolinski, C.; Aguilera, M.M.; Devitte R. C. R. y Prata, M. 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA Strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res.* 94: 201–206.

De Pasquale, R.; Circosta, C.; Occhiuto, F.; De Rosa, S., De Stefano, S. 1991. Pharmacological studies on terpenoids from marine sponges – analgesic and muscle-relaxant effects. *Phytother. Res.* 5: 49–53.

Estrada-Peña, A.; Bouattour, J.; Camicas, A.; Guglielmone, I. Horak, F.; Jongejan, A.; Latif, R. Pegram y A.R. Walker. 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental and Applied Acarology.* 38:219–235.

Estevez, Y.; Castillo, D.; Pisango, M. T.; Arevalo, J.; Rojas, R. et al. 2007. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group *J. Ethnopharmacol.* 114: 254–259

Faccini, J.L.H & Barros-Battesti. 2006. Aspectos gerais da biologia e identificação de carrapatos. En: Carrapatos de Importancia Medico-Veterinaria da Região Tropical: Um guia Ilustrado para Identificação de especies. São Paulo, Vox/ICCTTD-3 butantan, p 5-10

FAO, 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants: Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aga.html>. [fecha de revision: 5 abril de 2011]

FAO Animal Production And Health Paper 36. 2007. Ticks and tick-borne diseases. Selected articles from the WORLD ANIMAL REVIEW: Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/004/X6538E/X6538E00.HTM> . [fecha de revision: 5 abril de 2011]

Farmacopéia Portuguesa VIII. 2005. INFARMED. Ministério da Saúde, Lisbon

Fernandes, E.K.K.; Costa, G.L.; Bittencourt, V.R.E.P. 2002. Potencial entomopatogenico de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* isolados e testados em

fêmeas ingurgitadas do carrapato *Boophilus microplus*. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 12, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: CBPV, 2002. CD-Rom. PJ Eventos.

Fernandes, F. de F.; Freitas, E. de P. S. 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 147: 1-2, p. 150-154

Ferraz, de B. F. A.; Balbino, J.M.; Zini, C.A.; Ribeiro, V.L.; Bordignon, S.A. et al., 2010. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three Piper species. *Parasitol Res* 107: 243–248

Fernández, E. K.; Costa, G. L.; Moraes, A. M.; Zahner, V.; Bittencourt, V.R. 2006. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick *bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. *Parasitol Res*. 98: 324–332.

Fernández, F.F y Freitas, E.P.S. 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) *Vet. Parasit.* Vol. 147; p. 150–154.

Fernandes, E. K. K.; Lara, G. C.; Lage, Á. M.M.; Zahner, V. Pinheiro, B. V. R. 2006. Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. *Parasitology Research*. 98: 4, p 324-332

Fernandes, F.F.; Freitas, E.P.S.; Costa, A.C.; Silva, I.G. 2005. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Pesq. Agropec. Bras.* 40, 1243–1245.

Fernández-ruvalcaba, M.; Preciado de la Torre, F.; Cruz-Vazquez C. and Garcia-Vazquez, Z. 2004. Anti-tick effects of *Melinis minutiflora* and *Andropogon gayanus* grasses on plots experimentally infested with *Boophilus microplus* larvae. *Experimental and Applied Acarology* 32: 293–299.

Ferreira, P.; Soares, G. L. G.; D'avila, S and B.; de Almeida E. C. 2009. The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Mollusca, Subulinidae). *Braz Arch Biol Technol* 52:945–952

Flores, N.; Jiménez, I.; Giménez, A.; Ruiz, G.; Gutiérrez, D. et al., 2009. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry* 70: 621-627.

Flores, N.; Jiménez, I.A.; Giménez, A.; Ruiz, G.; Gutiérrez, D. et al. 2008. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity. *J. Nat. Prod.*, 71, p. 1538–1543

Flores, N.; Cabrera, G.; Jiménez, I.A.; Piñero, J.; Giménez, A. et al. 2007. Leishmanicidal constituents from the leaves of *Piper rusbyi*. *Planta Med.*, 73, p. 206–211

Fragoso, H.; Soberanes, N.; Ortiz, M.; Santamaria, M.; Ortiz, A.; 1995. Epidemiologia de la resistencia a ixodicidas piretroides en garrapatas *Boophilus microplus* en la Republica Mexicana. III Seminario Internacional de Parasitología Animal-Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria. Acapulco, Guerrero, México, pp. 45–57.

Freitas, E.P.S.; Fernandes, F.F. 2005. Estudo da bioatividade larvicida das plantas *Stryphnodendron adstringens*, *Qualea grandiflora* e *Copaifera langsdorffii* para o controle de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari, Ixodidae). In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG-CONPEEX. Goiânia. Anais Eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica. Goiânia: UFG

Furlong, J. 1999. Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick, *Boophilus microplus* to acaricides in Minas Gerais state, Brazil. 4th International Seminar on Animal Parasitology. Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten CONASAG-INIFAP-INFARVET-IICA-AMPAVE-FILASA , Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, pp. 41–46.

Graf, J.F., Gogolewsk, N., Leach-Bing, G.A., Sabatini, M.B., Molento, E.L., George, J.E. 1987. Cattle fever tick eradication programme in the USA: history, achievements, problems and implications for other countries. In “The eradication of ticks”, Proceedings of the expert consultation on the eradication of ticks with special reference to Latin America, pp. 1–7.

Graf, J.F.; Gogolewsk, N.; Leach-Bing, G.A.; Sabatini, M.B.; Molento, E.L. Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. *Parasitology* 129, S427–S442.

Gonzaga, A.D.; Garcia, M.V.B.; De Sousa, S.G.A.; Py-Daniel, V.; Correa, R.D.S.; Ribeiro, J.D., 2008. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea margravii* St Hil) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). *Acta Amaz.* 38, 101–106.

Guglielmone, A.A.; Szabó, M.P.J.; Martins, J.R.S.; Estrada-Peña, A. 2006 A Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: Barros-Battesti, D.M.,

Arzua, M. & Bechara, G.H. (orgs.) Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan. ISBN: 85-99909-01-0 pp. 223.

Gupta, M.P.; Arias, T.D.; Williams, N.H.; Bos, R. Tattje, D.H.E.. 1985. Safrole, the main component of the essential oil from *Piper auritum* of Panama. J. Natural Products 48, 330–343.

Hu, D.; Coats, J. 2008. Evaluation of the environmental fate of thymol and phenethyl propionate in the laboratory. Pest Manag Sci 64:775–779

Gindin, G.M., Samish, M., Alekseev, E., Glazer, I., 2001. The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. Biocontrol. Sci. Technol. 11, 111–118.

Giglioti, R.; Forim M.R.; Oliveira H.N.; Chagas A.C.; Ferrezini J.; Brito L.G.; Falcoski T.O.; Albuquerque L.G y Oliveira M.C. 2011. In vitro acaricida activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Paras. 1873-2550.

Ghosh, S.; Sharma, A.K.; Kumar, S.; Tiwari, S.S.; Rastogi, S.; Srivastava, S.; Singh, M.; Kumar, R.; Paul, S.; Ray, D.D.; Rawat, A.K. 2011. In vitro and in vivo efficacy of *Acorus calamus* extract against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Parasitol Res. 108(2):361-70.

Goncalves, K.; Toigo, E.; Ascoli, B.; von, Poser G.; Ribeiro, VL. 2007. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. Parasitol Res 100: 1267–1270

Green, T.P.; Treadwell, E.M.; Wiemer, D.F. 1991. Arieianal, a prenylated benzoic acid from *Piper arieianum*. *J. Nat. Prod.* 62: 367–368.

Gorb, S.N.; Keselb, A.; Bergera, J. 2000. Microsculpture of the wing surface in Odonata: evidence for cuticular wax covering. *Arthropod Struct Dev* 29: 129–135

Hermoso, A.; Jiménez, I.A.; Mamani, Z.A.; Bazzocchi, I.L.; Piñero, J.E. et al. 2003. Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 11, p. 3975–3980

Hertog, M.G. L.; Hollman, P.C. H.; Venema, D. P. 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and Fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 40: 1591-1598

Hoogstraal, H. 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv Parasitol*, 24:135-238

Imdorf, A.; Kilchenman, V.; Bogdanov, S. 1995. Toxizität von thymol; campher, menthol and eucaliptol auf *Varroa jacobsoni* und *Apis mellifera* L. in labortest. *Apidol* 26:27–31

Iannacone, J.; Lamas, G. 2002. Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* vol 65: 92-101.

Jongejan, F. y Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129 (Suppl 1):S3-S14.

- Jaramillo, M.A.; Manos, P. 2001.** Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae). *American Journal Botany* 88:706–716.
- Joly, A.B.; Introdução a Taxonomia Vegetal. 1985.** Editora Nacional, São Paulo, SP, Brazil
- Kaaya, G.P., Hassan, S., 2000.** Entomopatogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp. App. Acarol.* 24, 913–926.
- Klafke, G.M.; Sabatini, G.A.; Albuquerque, T.A.A.; Martins, J.R.; Kemp, D.H. et al., 2006.** Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from the State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 142, 386–390.
- Knowles, C. O. 1982.** Structure-activity relationship among amidine acaricides and Insecticides, pp. 243–277. *In* J. R. Coats [ed.], *Insecticide mode of action*. Academic, New York.
- Kunz, S.E.; Kemp, D.H. 1994.** Insecticides and acaricides: resistance and environmental impacts. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 13, 1249–1286.
- Lago, J.H.G.; Ramos, C.S.; Casanova, D.C.C.; Morandim, A.A.; Bergamo, D.C.B. et al. 2004.** Benzoic acid derivatives from Piper species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *J. Nat. Prod.* 49, 1783–1788.

Leemon, D.M.; Turner, L.B.; Jonsson, N.N. 2008. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Vet. Parasitol.* 156, 248–260.

Li, A. Y.; Chen, A.C.; Miller, R. J.; Davey, R. B.; George, J. E. 2007. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest Manag. Sci.*, 63, pp. 882–889.

Liu, M. Y. and F. W Jr Plapp. 1990. Formamidines as synergists of cypermethrin in susceptible and pyrethroid resistant house flies (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol* 2181–2186. 83.1990.

Lopes, A.A.; Lopez, S.N.; Regasini, L.O.; Batista, J.M.; Ambrosio, D.L. et al. 2008. In vitro activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. *Nat. Prod. Res.*, 22, pp. 1040–1046

Luize, P.S.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B.P.; Cortéz, G.D.; Nakamura C.V. 2006. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (MIQ.) C.DC. var. *pallescens* (C.DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Pharm. Bull.*, 10, p. 2126–2130

Luz, a. I.r.; Zoghbi, m de g. B.; Maia, j. G. 2003. The essential oils of *piper reticulatum* l. And *p. Crassinervium* h. B. K. Amazonica 33(2): 341-344. 2003

Maia, J.G.S.; Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A. 2001. Plantas aromáticas na Amazonia e seus óleos essenciais, 1st ed. Museu Paraense Emilio Goeldi, Belem-PA, 200 p.

Maia, J.G.S.; Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.S.; Silva, M.H.L. et al. 1998. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flav. Frag. J.* 13, 269 – 272.

Mabberley, D. J. 1997. *The Plant-Book. A portable dictionary of the higher plants. Second edition.* Cambridge University Press, Cambridge.

Mansour, S.A.; Messeha, S.S.; El-Gengaihi, S.E. 2000. Botanical biocides. 4. Mosquitocidal activity of certain *Thymus capitatus* constituents. *J Nat Toxins* 9: 49–62

Magadum, S.; Mondal, D. B. & Ghosh, S. 2009. Comparative efficacy of *Annona squamosa* and *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus* Izatnagar isolate. *Parasitol Res.* 105:1085–1091.

Marcondes, CB. 2009. *Doenças transmitidas e causadas por artrópodes.* São Paulo: Editora Atheneu).

Martinez-Velazquez, M.; Castillo-Herrera, G.A.; Rosario-Cruz, R.; Flores-Fernandez, J.M.; Lopez-Ramirez, J. et al., 2011. 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) *Parasitol Res.* 108:481–487

Mansour, S.A.; Messeha, S.S.; el-Gengaihi, S.E. 2000. Botanical biocides. 4. Mosquitocidal activity of certain *Thymus capitatus* constituents. *J Nat Toxins* 9(1): 49

Mendes, M.C.; Lima, CK.; Nogueira, A.H.; Yoshihara, E.; Chiebao D.P. et al., 2011. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Veterinary Parasitology 178: 383–388

Mendes, M.C.; Veríssimo, C.J.; Kaneto, C.N.; Pereira, J.R., 2001. Bioassay for measuring the acaricides susceptibility of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in São Paulo State, Brazil. Arq. Inst. Biol. São Paulo 68, 23–27.

Merken, H.M.; Merken, C. D.; Beecher, G.R. 2001. Kinetics method for the quantitation of anthocyanidins, flavonols and flavones in foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 2727-1732

Meshkatsadat MH, Sarabi RS, Moharamipour S. 2007. Chemical constituents of *Thymus eriocalyx* leaves of Iranian origin plant. Asian J. Chem 19(2):1648–1650

Micheletti, S. M.; Valente, E.; Carine, N.; Alves De Souza, L.; DIAS N. et al. 2009. Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) con extractos vegetales. Rev. Colomb. Entomol. 35(2): 145-149.

Monteiro CMO, Daemon E, Silva AMR, Maturano R, Amaral C. 2010. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol Res 106:615–619

Monteiro CMO, Daemon E, Clemente MA, Rosa LS, Maturano R. 2009. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). Parasitol Res 105:1093–1097

Molento, M.B.; Dias, B. 2000. Avaliação da eficácia de produtos carrapaticidas contra o *Boophilus microplus* na região de Umuarama, Paraná. Arquivos Ciências Veterinárias Zool. UNIPAR 3, 231.

- Morales, S.; García, C. M. 2000.** Metodología para la evaluación del potencial insecticida de especies forestales. *Revista Facultad Nacional Agronomía* 53: 787-800
- Moreira, D.L.; Guimaraes, E.F.; Kaplan, M.A.C.1998.** A chromene from *Piper aduncum*. *Phytochemistry*, 48, p. 1075–1077.
- Morimoto, M.; Kumeda, S.; Komai, K. 2000.** Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphium affine* D. Don. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1888-1891
- Murrell, A. y Barker S. C. 2003.** Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology* 56: 169–172.
- Muller, W.E.G.; Maidhof, A.; Zahn, R.K.; Schoroder, H.C.; Gasic, M.J. et al., 1985a.** Potent antileukemic activity of the novel cytostatic agent avarone and its analogs in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 45, 4822-4826.
- Muller, W.E.G.; Zhan, R.K.; Gasic, M.J.; Dogovic, N.; Maidhof, A. et al., 1985 b.** Avarol, a cytostatically active compound from the marine sponge *Dysidea avara*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 80, 47–52.
- Murphy, C. M.1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 12:4 564 - 582
- Mwangi N.E., Essuman S., Kaaya P.G., Nyandat E., Munyinyi D. and Kimondo G.M. 1995.** Repellence of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* by the grass *Melinis minutiflora*. *Trop. Anim. Health. Prod.* 27: 211–216.

Mwangi, E.N., Kaaya, G.P., Essuman, S., 1995. Experimental infections of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, and natural infections of some ticks with bacteria and fungi. *J. Afr. Zool.* 109, 151–160.

Navickiene, H.M.D.; Alécio, A.C.; Kato, M.J.; Bolzani, V.S.; Young, A.J, M.C.M et al. 2000. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 55 p. 621–626

Niño, J.; Bustamante, A.M.; Correa, Y.M.; Mosquera, O.M. 2007. Evaluación de extractos vegetales para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari). *Scientia et Technica* 33:383-385.

Novelino, A.M.S.; Daemon, E.; Soares, G.L.G .2007a. Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) larvae. *Parasitol Res* 101:809–811

Ojeda-Chi , M. M.; Rodriguez - vivas, R.I.; Galindo-Velasco, E.; R. Lezama-Gutiérrez. 2010. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 170: 348-354.

Okunade, A.L.; Hufford, C.D.; Clark, A.M.; Lentz, D. 1997. Antimicrobial properties of the constituents of *Piper aduncum*. *Phytother. Res.* 11, 142–144

Onofrio, V.C.; Labruna, M.B.; Pinter, A.; Giacomin, F.G. & Barros-Battesti, D.M. 2006. Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*. In: Darci M.

Oliva, A.; Kimundini, M. M.; Wedge, E.; Harries, D.; Hale, A. L.; Aliotta, G.; S. O. 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 890 – 896

Orjala, J., Erdelmier, C.A.J., Wright, A.D., Rali, T., Sticher, O., 1993. 5 New prenylated p-hydroxybenzoic acid-derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Med.* 59, 546–551.

Orjala, J.; Wright, A.D.; Behrends, H.; Folker, G. Sticher, O. 1994. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *J. Nat. Prod.* 57: 18-26.

Palomino; Mier, CE. 1992. Detección de algunos metabolitos secundarios. Palmira, Valle del Cauca: Impresos Docentes Universidad Nacional; production systems with available resources in the tropics and sub-tropics. Armadale, Australia. Penambul Books. p. 245

Pandey, G.; Dorrian, S.J.; Russell, R.J.; Oakeshott, J.G. 2009. Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1G. *Biochem Biophys Res Commun* 380 (3):710–714

Park, Il-K.; Lee, S. G.; Shin, S.C.; Park, J.D.; Ahn, Y. J. 2002. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1866-1870

Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Bisht, K.S.; Jain, R.; Taneja, P. et al. 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46:597–673

Patarroyo, J.H.; Vargas, M.I.; Gonzáles, C.Z.; Gusmán, F.; Martins-Filho, O.A.; Afonso, L.C.C.; Valente, F.L.; Peconick, A.P.; Marciano, A.P.; Patarroyo, V.A.M.; Sossai, S. 2009. Immune response of bovines stimulated by synthetic vaccine SBm7462® against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasitol.* 166: 333–339.

Penninckx, F.; Cheng, N.; Kerremans, R.; Van, Damme. B.; De Loecker, W. 1983. The effects of different concentrations of glycerol and dimethyl sulfoxide on the metabolic activities of kidney slices. *Cryobiology* 20: 51–60

Peterson, C.; Tsao, R.; Eagler, L. A.; Coats, J.R. 2000. Insecticidal activity of cyanohydrin and monoterpenoid compounds. *Molecules* 5: 648-654

Peter, R.J.; Bossche, P.; Penzhorn, B.L.; Sharp, B. 2005. Tick, fly, and mosquito control-Lessons from the past, solutions for the future. *Vet Parasitol*, 132:205-215

Pino, J.A.; Marbot, R.; Bello, A.; Urquiola, A. 2004. Essential oils of *Piper peltatum* (L.) Miq. and *Piper aduncum* L. from Cuba. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Havana, Cuba. *J. Essent. Oil. Res.* 16, 124–126.

Polar, R.; Aquino de Muro, M, Kairo, T.K.; Moore, D.; Pegram, R.; John, S.; Roach-Benn, C., 2005. Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Vet. Parasitol.* 134, 159–167.

Portet, B.; Fabre, N.; Roumy, V.; Gornitzka, H.; Bourdy, G. et al. 2007. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *Berbicense*. *Phytochemistry*, **68**, p. 1312–1320

Pórtela, C.; Rodríguez, C.; Betancourt, E.; Quintero G., Velásquez, G.; Domínguez, V.; Hernández, R. 2003. Medicina herbaria en el control de ectoparásitos de bovinos. Corpoica C.I Palmira. Boletín técnico No. 24. 32p

Prieto, J. 2011. Comunicación personal. Fecha Consulta: 3 agosto de 2011

Proestos, C.; Chorianopoulos, Nychas, G-J. E.; Komaitis, M. 2005. RP-HPLC Analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1190-1195

Prullage, J.B.; Cawthorne, W.G.; Le Hir de Fallois, L.P.; Timmons, PR. 2011. Synergy between fipronil and amitraz in a *Rhipicephalus sanguineus* tick residual contact test. *Exp Appl Acarol* 54:173–176 DOI 10.1007/s10493-011-9424-x

Quijano-Abril, M. A.; R. Callejas-Posada; Miranda-Esquivel, D. R. 2006. Areas of endemism and distribution patterns for Neotropical *Piper* species (Piperaceae). *Journal of Biogeography* 33: 1266–1278.

Rafael, M.S.; Hereira-Rojas, W.J.; Roper, J.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P. 2008. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genet. Mol. Res.* 7, 772– 781.

Ramji, N.; Ramji, N. Iyer, R.; Chandrasekaran, S. 2002. Phenolic antibacterials from *Piper betle* in the prevention of halitosis. *J. Ethnopharmacol.*, **83**, p. 149–152

Rali, T.; Wossa, S.W.; Leach, D.N.; Waterman, P.G. 2007. Volatile constituents of *Piper aduncum* and *Piper gibbilimum* C.DC (Piperaceae) from Papua New guinea. *Molecules*, **12**, p. 389–394

Ravindran, Reghu.; Juliet, Sanis.; Karapparambu, A. K.; Krishnan, A.K.; Athalathil, S. R et al.,2011.Toxicity of DMSO, Triton X 100 and Tween 20 against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus*. J Parasit Dis DOI 10.1007/s12639-011-0054-3

Rodríguez, V.R.I.; Quiñones, A.F.; Fragoso, S.H. 2005. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Edit. McGraw-Hill- UADY, México. pp 571–592.

Robins, R. J. 2003. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 2866-2887

Rosado-Aguilar, J.A.; Aguilar-Caballero, A.; Rodriguez-Vivaz, R.I.; Borges- Argaez, R.; Garcia-Vazquez, Z.; Mendez-Gonzalez, M. 2010. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: ixodidae). Vet. Parasitol. 168: 299–303.

Rosado-Aguilar, J.A.; Rodriguez-Vivas R.I.; Garcia-Vazquez, Z.; Fragoso-Sanchez, H.; Ortiz-Najera, A.; Rosario-Cruz, R. 2008. 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

Rodriguez-Vivas, R.I.; Rodriguez-Arevalo, F.; Alonso-Diaz, M.A.; Fragoso- Sanchez, H.; Santamaria, V.M.; Rosario-Cruz, R. 2006. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. Prev. Vet. Med. 75: 280–286.

Rosario, C. R.; Hernández, O.R. 2001. Evolución química de la resistencia a acaricidas. *Memorias del Curso-Taller, diagnóstico de resistencia a ixodicidas en garrapatas Boophilus microplus*. Jiutepec, Morelos, México. p. 23-30.

Roussis, V.; Ampofo, S.A.; Wiemer, D.F. 1990. A prenylated benzoic acid derivative from the leaves of *Piper taboganum*. *Phytochemistry* 29,1787–1788.

Ruangrungsi, S.; Prathanturarug, Lange, G.; Organ, M. 1992. An N-methyl aristolactam and oxygenated cyclohexane derivative from *Piper rebesioides*. *Phytochemistry*, **31**. p. 2397–2400.

Rukachaisirikul, T.; Siriwattanakit, P.; Sukcharoenphol, K.; Wongvein, C.; Ruttanaweang, P. et al. 2004. Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *J. Ethnopharmacol.*, 93, p. 173–176

Sabatini, G.A.; Kemp, D.H.; Hughes, S.; Nari, A. Hansen, J. 2001. Tests do determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.*, 95, p. 53–62

Sang, S.; Lapsley, K.; Jeong, W.; Lachance, P.A.; Ho, C.; Rosen, R. T. et al. 2002. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond (*Prunus amygdalus Batsch*). *Journal of the Science of food and Agriculture*

Siddiqui, B.S.; Gulzar, T.; Mahmood, A.; Begun, S.; Khan, B. et al. 2004. New insecticidal amides from petroleum ether extract of dried *Piper nigrum* L. Whole fruits. *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, p. 1349–1352

Silva, W. C.; Martins, J. R.; Cesio, M. V.; Heinzend, H.; de Barros, N.M. 2011. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*. 179: 189–194

Silva, A.M.R. 2011. Atividade carrapaticida do thymol sobre larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) e fêmeas ingurgitadas e ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Dissertation, Universidade Federal de Juiz de Fora

Silva, dos Santos. M.; Von Poser, Gilsane.; Bordignon, Sérgio.; Sardá, V.L.; de Barros, A. et al., 2010. Análise química e avaliação da atividade acaricida das folhas de *Piper amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista de iniciação Científica da ulbra*. P. 65

Silva, W.C.; Ribeiro, J.D.; Souza, H.E.M.; Correa, R.S. 2007. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. *Acta Amaz.* 37, 297–302.

Silva, W.C. 2005. Atividade inseticida de *Palicourea marcgravii* St. Hil. (Rubiaceae) e *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre cigarrinha (*Aetalion* sp.), praga de importância econômica no Amazonas. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus-AM, Brasil.

Silva, R.V.; Navickiene, H.M.D.; Kato, M.J.; Bolzani, V.; Méda, S et al. 2002. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 59 p. 521–527

Silva, G.; A. Lagunes, J. C. Rodríguez y D. Rodríguez. 2002. Insecticidas vegetales; Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. Revista Manejo Integrado de Plagas (CATIE) (en prensa).

Silva, M.C.L.; Sobrinho, R.N.; Linhares, G.F.C. 2000. Avaliação in vitro da eficácia do clorfenvinfós e da cialotrina sobre o *Boophilus microplus* colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião de Goiânia, Goiás. Cic. Anim. Bras. 1: 143–148.

Scoralik, M.G.; Daemon E.; de Oliveira Monteiro.; C.M. y Maturano R. 2011. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. Parasitol Res. 2539-5

Souza- Chagas, A.C.; de Barros L.D.; Cotinguiba F.; Furlan M.; Giglioti R.; de Sena Oliveira M.C. y Bizzo HR. 2011. In vitro efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitol Res DOI 10.1007/s00436-011-2488-z.

Soberanes, C.N.; Santamaría, V.M.; Fragoso, S.H.; García, V.Z.; 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. Tec. Pec. Méx. 40, 81–92.

Sutherst, R.W., Jones, J.; Schnitzerling, H. J. 1982. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. Nature 295: 320–321

Stammati, A.; Zampaglioni, F.; Zucco, F. 1996. Furaladone cytotoxicity on three cell lines in the presence or absence of DMSO: comparison with furazolidone. Cell Biol Toxicol 13: 125–130

Terreaux, C.; Gupta, M.P.; Hostettmann, K. 1998. Antifungal benzoic acid derivatives from *Piper dilatatum*. *Phytochemistry* 49, 461–464.

Thadeu, A.M.; Barros, De A. and Evans E.D. 1989. Acao de gramineas forrageiras em larvas infestantes do carrapato dos bovidos *Boophilus microplus*. *Pesq. Vet. Bras.* 9: 17–21.

Thompson, K.C.; Roa, J.E. and Romero, T.N. 1978. Anti-tick grasses as the basis for developing practical tropical tick control pastures. *Trop. Anim. Health. Prod.* 10: 179–182.

Torres-Santos, E.C.; Moreira, D.L.; Kaplan, M.A.C.; Meirelles, M.N.; Rossi-Bergman, B. 1999. Selective effect of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, pp. 1234–1241

Treacy, M.F.; Benedict, J.H.; Schmidt, K.M.; Anderson, R.M.; Wagner, T.L. 1987. Behavior and spatial distribution patterns of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on chlordimeform-treated cotton plants. *J. Econ Entomol* 80:1149–1151

Tsao, R.; Zhou, T.2000. Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *J Essent Oil Res* 12(1):113–121

Tunón, H.; Thorsell, W.; Mikiver, A.; Malander, I. 2006. Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*.

Usmani, K.A.; & Knowles, C.O. 2001. Toxicity of pyrethroids and effect of synergists to larval and adult *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, and *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera; Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 94: 868-873.

Vargas, M.S.; Céspedes, N.S.; Sánchez, H.F.; Martins, J.R.; Céspedes, C.O.C. 2003. Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à amitraz. *Cienc. Rural* 33: 737–742.

Vardar – Unlu.; Candan, F.; Sökmen, A.; Dafera, D.; Polssiou, M.; Sökmen, M, Donmez, E.; Tepe, B. 2003. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and metanol extracts of *Thymus pectinatus* Fish. et. Mey. Var. *Pectinatus* (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 63- 67

Vasconcelos, V.O., Furlong, J., Freitas, G.M., Dolinski, C., Aguilera, M.M., Rodrigues, R.D., Prata, M., 2004. *Steinernema glaseri* Santa Rosa strain (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* CCA strain (Rhabditida: Heterorhabditidae) as biological control agents of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 94, 201–206.

Vázquez-Luna, A.; Pérez-Flores, L.; Díaz-Sobac, R. 2007. Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Cienc. Technol. Aliment.* 5: 4, 306-313

Vila, R.; Tomi, F.; Mundina, F.; Santana, A.I.; Solis, P.N. et al. 2005. Unusual composition of the essential oils from the leaves of *Piper aduncum*. *Flavour Frag. J.*, 20 , p. 67–69.

Walia, S.; Saha, S.; Parmar, B.S. 2004. Liquid chromatographic method for the analysis of two plant based insecticide synergists dillapiole and dihydrodillapiole. *J. Chromatogr. A* 1047, 229–233

Wu, Q.; Wang, S.; Tu, G.; Feng, Yang, J. 1997. Alkaloids from *Piper puberullum*. *Phytochemistry* 44:727-730.

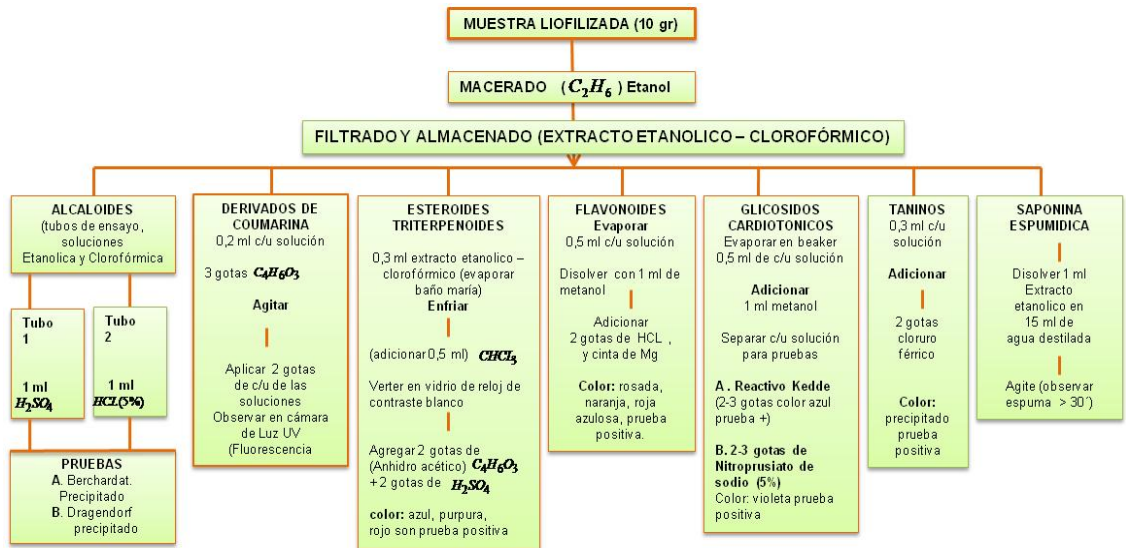
Yamaguchi, L.; Lago J.H.G.; Tanizaki, T.M.; Mascio, P.D.; Kato, M. J. 2006. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, **67**, p. 1838–1843

Yuncker, T. G. 1972. The Piperaceae of Brazil - I. *Piper* - group I, II, III, IV. *Hoehnea*, 2, 19-366.

Zhioua, E.; Browning, M.; Johnson, P.W.; Ginsberg, H.S.; Le Brun, R.A. 1997. Pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) to *Ixodes scapularis* (Acar: Ixodidae). *J. Parasitol.* 83, 815–818

ANEXOS

A. Marcha Fitoquímica Preliminar



Fuente: Adaptado de Palomino y Mier, 1992