

Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua-León

Unan-León

Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias



Monografía para optar al título de Médico Veterinario.

Tema: Evaluación *in vitro* de *Piper tuberculatum* para el control de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtenidas de bovinos en el municipio de León.

Autor:

Br. Hailyng Hugette Barrios González

Tutor:

Dr. Byron Flores Somarriba

León, Nicaragua 2021

“A la libertad por la universidad”

Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua-León

Unan-León

Escuela De Ciencias Agrarias y Veterinarias



Monografía para optar al título de Médico Veterinario.

Tema: Evaluación *in vitro* de *Piper tuberculatum* para el control de garrapatas

Rhipicephalus microplus obtenidas de bovinos en el municipio de León.

Autor:

Br. Hailyng Hugette Barrios González

Tutor:

Dr. Byron Flores Somarriba

León, Nicaragua 2021.

“A la libertad por la universidad”

DEDICATORIA.

El presente trabajo está dedicado a mi padre, **Nelson Alejandro Barrios Paredes** que me enseñó a trabajar por mis sueños y quien tuvo fé en mí siempre, aunque ya no está en este plano, su amor seguirá conmigo todos los días de mi vida.

A mi madre, **Sara Candelaria González Escorcía** por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi hermano, **Nelson Alejandro Barrios González** por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento.

A mi esposo, **Hilton Moisés Lara Ruiz** por tanta ayuda y tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración y mi motivación.

AGRADECIMIENTO

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi familia por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio, gracias a mi hermano por cada uno de sus consejos y de sus palabras de motivación.

A mi esposo por ser un apoyo incondicional en mi vida.

A mis profesores personas de gran sabiduría, por enseñarme todo lo que sé y más que eso, guiarme para ser una mejor profesional.

A mi tutor Dr. Byron Flores Somarriba, quien con sus conocimientos y apoyo me guio a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba.

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es la especie de mayor importancia en el ámbito veterinario por su impacto en la salud bovina debido a su papel como vector de hemoparásitos, y a nivel económico, en la producción de leche, carne y pieles. La planta *Piper tuberculatum* es ampliamente distribuido en nicaragua, sin embargo, no se ha utilizado como acaricida. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto acaricida del extracto de *P. tuberculatum* sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtenidas de bovinos en el municipio de León. Se aplicó un estudio experimental aplicando la prueba de inmersión de adulto (PIA) con su respectiva inhibición de la ovoposición, realizado en 6 grupos de 10 especímenes vivos; se realizaron 5 repeticiones por grupo con diferentes concentraciones del extracto de *P. tuberculatum* (100, 50, 25 y 12.5 mg/ml), un grupo expuesto al acaricida Amitraz y un grupo control expuesto a Tween 80% diluido en agua destilada, también se realizó la prueba de paquete de larvas (PPL) y la prueba de inmersión de larvas (PIL) con *Piper tuberculatum* en una concentración de 50 mg/ml y Amitraz a la concentración indicado por el fabricante. Para la PIA con concentración de 100mg/ml de *P. tuberculatum* fue la que mostró mejor resultado de mortalidad con un 100% y no se observó ovoposición, en la PPL tratadas con *P. tuberculatum* (50 mg/ml) mostraron una mortalidad del 56% y para PIL con *P. tuberculatum* (50 mg/ml) presentó una mortalidad del 88.75%. Se encontró una alta efectividad del extracto como acaricida de *P. tuberculatum* con una alta tasa de mortalidad en concentraciones de 100 mg/ml en garrapatas adultas de *R. microplus*.

Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	2
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	4
IV. JUSTIFICACIÓN	5
V. HIPOTESIS.....	6
VI. OBJETIVOS.....	7
5.1 Objetivo General	7
5.2 Objetivo Específico	7
VII. MARCO TEÓRICO.....	8
7.1 Generalidades.....	8
7.2 Clasificación taxonómica	8
7.3 Morfología.....	9
7.4 Ciclo biológico.....	9
7.5 Distribución geográfica.....	11
7.6 Importancia.....	11
7.7 Control de la garrapata.....	12
7.7.1 Control Químico.....	12
7.7.1.1 Inmersión.....	12
7.7.1.2 Aspersión	13
7.7.1.3 Pour-on	14

7.7.1.4 Inyectables.....	14
7.7.1.5 Generalidades del Amitraz.	14
7.7.2 Control Inmunológico.....	15
7.7.2.1 Vacunas contra garrapatas <i>R. microplus</i>	15
7.7.3 Control biológico.....	16
7.7.4 Extractos acaricidas de origen natural.....	16
7.7.5 Resistencia o resiliencia.....	16
VIII. MATERIAL Y MÉTODO.....	18
8.1 Preparación y obtención del extracto <i>Piper tuberculatum</i>	18
8.2. Recolección y preparación de las garrapatas.	18
8.3 Manejo laboratorial de las garrapatas hembra ingurgitadas	19
8.3.1 Protocolo de Drummond o prueba de inmersión (PIA).....	19
8.3.2 Determinación de la eficacia en adultos	20
8.4 Larvas	20
8.4.1 Prueba de paquete larvario (PPL)	20
8.4.2 Prueba de inmersión de larvas (PIL)	21
8.5 Análisis Estadístico.	22
IX. RESULTADOS.	23
9.1 Prueba de inmersión de adultas (PIA).....	23
9.2 Inhibición de la ovoposición de adultas.....	23

9.3 Prueba de paquete de larvas (PPL).....	24
9.4 Prueba de inmersión de larvas (PIL)	24
X. DISCUSIÓN.....	25
XI. CONCLUSIÓN	28
XII. RECOMENDACIONES	29
XIII. BIBLIOGRAFIA	30
XIV. ANEXOS	35

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina en Las Américas constituye un rubro estratégico para las economías, el bienestar rural y la provisión de proteína de calidad para territorios rurales y urbanos. La oportunidad que tiene el desarrollo ganadero, dada la demanda creciente de proteína de origen animal a nivel mundial, especialmente liderada por el crecimiento del consumo en países en desarrollo, puede verse limitada por la presencia de enfermedades que pueden afectar el comercio, la productividad y la salud pública (1) .

En Nicaragua la mayoría de las fincas tienen un carácter productivo de doble propósito (carne y leche), las cuales se encuentran en manos de pequeños y medianos productores generando uno de los rubros que más valor, divisa y empleo genera a la economía nacional desde hace mucho tiempo.

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, denominada la “Garrapata Común del Ganado”, es la especie de mayor importancia en el ámbito veterinario por su impacto en la salud bovina, debido a su papel como vector de hemoparásitos como *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp, y a nivel económico, en la producción de leche, carne y pieles (2) . Este ectoparásito se encuentra ampliamente distribuida en Latinoamérica, donde causa pérdidas económicas significativas anuales en la ganadería bovina, cabe destacar que cada garrapata adulta puede consumir 1.0 mL de sangre provocando pérdidas de 1 g de peso corporal y 8.9 mL de leche durante el tiempo que están parasitando al bovino (3).

Además, produce pérdidas relacionadas con mortalidad de los animales, reducción en los niveles de producción, alteraciones reproductivas, altos costos de control, transmisión de diversos agentes patógenos como virus, bacterias, rickettsias y protozoos. Esto puede conducir a enfermedades agudas, crónicas o incluso, a la muerte de los animales. Estos efectos ocasionan pérdidas de varios miles de millones de dólares en la economía pecuaria mundial (4).

El empleo de plantas con fines medicinales ha enfrentado altos y bajos, en las épocas medievales presento un gran auge, pero a principios del siglo XX con el desarrollo de la química, el descubrimiento de la síntesis orgánica y por ende el crecimiento de la industria farmacéutica, mermó el empleo de las plantas. Sin embargo, la utilización de plantas medicinales aún sigue en vigencia, debido al hecho que está vinculado a las tradiciones y costumbres de los pueblos (5).

II. ANTECEDENTES

Piper tuberculatum es ampliamente distribuido en Nicaragua y es utilizado como una planta ornamental por la población en general, sin embargo, no se ha dado una utilidad mayor para esta planta desde el punto de vista acaricida en Nicaragua (6).

Ribeiro *et al.* en año 2008 estudiaron la efectividad del extracto de la planta *Calea serrata* para el control *R. microplus* y *R. sanguineus*, en los cuales tuvieron como resultado una reducción del 11 al 14 % en la ovoposición y el 100% de larvas en una concentración de 50, 25, 12.5 y 6.25 mg ml⁻¹ (7).

Estudios realizados por Martines *et al.* en año 2011 investigaron la actividad acaricida de los aceites esenciales extraídos de las semillas de comino (*Cuminum cyminum*), las bayas de pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica*) y las hojas de albahaca (*Ocimum Basilicum*) se probaron en larvas de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* realizando disoluciones de los tres aceites esenciales una dilución inicial del 20% hasta el 1,25% una mortalidad del 100% en todas las concentraciones probadas en larvas de *R. microplus*, de manera similar, el aceite esencial de pimienta de Jamaica produjo un 100% de mortalidad en todas las concentraciones, con la excepción de una disminución dramática en una concentración de 1.25%, Por el contrario, el aceite esencial de albahaca no demostró ser tóxico contra las larvas de *R. microplus* (8).

Braga *et al.* en el año 2018 evaluaron la actividad de *P. tuberculatum* para el control de hembras ingurgitadas y larvas de *R. microplus* las concentraciones evaluadas fueron 50; 25; 12,50; 6.25; 3.12 y 1.56 mg mL⁻¹ de extracto etanólico de hoja, tallo y fruto de *P. tuberculatum*. Las concentraciones letales para el 50% de los individuos (LC50) después de 24 horas de exposición de larvas de *R. microplus* fueron 3,62; 3.99 y 5.30 mg mL⁻¹ para extractos de etanol de frutas, tallos y hojas, respectivamente. Para las hembras congestionadas, la mayor eficiencia resultó de la concentración de 50 mg mL⁻¹ de extracto de fruta (71.57%). El efecto principal de los extractos de etanol de *P. tuberculatum* fue sobre la incubabilidad, con una reducción del 55,63% para los extractos de frutas y hojas. *P. tuberculatum* se muestra prometedor como fuente de moléculas candidatas para su uso en pesticidas, en formulaciones diseñadas para controlar las infestaciones de *R. microplus*. El extracto de fruta presentó el mejor resultado como acaricida para larvas, seguido de los extractos de tallos y hojas. Contra las hembras

congestionadas, los extractos de frutas y hojas presentaron la mayor eficacia. A pesar de la alta actividad contra las larvas, el extracto de tallo presentó baja eficacia contra las hembras congestionadas. En general, el fruto de *P. tuberculatum* fue el material más prometedor para el desarrollo de acaricidas (9).

Aguilar Caballero *et al.* en el año 2008 realizaron una evaluación con extractos crudos de *Diospyros anisandra* disueltos en Tween, etanol y dimetilsulfóxido (DMSO) para el control de larvas de *R. microplus*. Los extractos crudos de la planta completa y sus partes vegetales (hoja, corteza y raíz), fueron extraídos con metanol y evaluados mediante la prueba de inmersión larval, las cuales fueron expuestas a los extractos crudos de la planta completa disueltos en Tween-20 (2%), etanol (95%) y DMSO (2.5%). Los extractos crudos de la planta completa disueltos en Tween-20 (2%) y etanol (95%) presentaron las mayores mortalidades ($79.68 \pm 22.79\%$ y 69.42 ± 30.58 respectivamente (10).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Rhipicephalus (Boophilus) microplus ha estado asociado con daños directos por su acción traumática, tóxica y expoliatriz y daños indirectos como el deterioro de la piel, la disminución de la producción de carne y leche, el desarrollo lento de los animales, la limitada adaptación de razas seleccionadas y la predisposición a adquirir enfermedades(11), causando pérdidas de 32 a 46 millones de dólares anuales por concepto de gastos con garrapaticidas, pérdidas de peso, gastos de tratamientos, muertes por tristeza parasitaria y costos por la campaña sanitaria(12). Por ende, con el paso del tiempo han desarrollado resistencia a los acaricidas químicos siendo este el más utilizado, por todo lo anterior esta investigación tiene como objetivo evaluar *in vitro* el efecto acaricida del extracto de *Piper tuberculatum* sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtenidas de bovinos en el municipio de León.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las garrapatas globalmente son un problema debido a la gran cantidad de gérmenes patógenos que transmiten tanto a humanos como a los animales, lo cual las convierte en un potencial zoonótico perteneciente a uno de los grupos ectoparásitos más importantes, no solo por el daño directo que ocasionan a los animales sino también por las pérdidas económicas que ellas generan y por el impacto ambiental producido por los químicos empleados y los residuos dejados por ellos.

En Nicaragua los bovinos afectados por *R. microplus* son tratados con aspersión de mochila utilizando para esto diferentes acaricidas a base de piretroides, Amitraz, Fipronil, inyecciones de ivermectina y tratamientos sistémicos lo que produce una resistencia a los productos convencionales y falta de implementación de estrategias para el control de garrapatas.

La resistencia ocurre con anterioridad al uso de los acaricidas, por la presencia de los genes que los artrópodos tienen; a medida que entran en contacto con los principios químicos, esos genes se van desarrollando hasta el punto de la pérdida de la efectividad. Se empieza entonces el proceso de rotación de productos, situación que finalmente lleva a la resistencia de todos los principios activos (3).

Se han realizado estudios que han demostrado resultados positivos interesantes, con extractos del árbol de neem (*Azadirachta indica*), extractos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y extracto etéreo de la semilla del mamey (*Mammea americana*), pero se requieren más estudios (3).

La resistencia es uno de los mayores problemas, ya que la disponibilidad de nuevos antiparasitarios es cada vez más escasa (11) por lo tanto el presente trabajo tiene como objetivo la evaluación del efecto acaricida del extracto de *Piper tuberculatum* sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtenidas de bovinos en el municipio de León.

V. HIPOTESIS

El extracto hidroalcohólico de *Piper tuberculatum* muestra capacidad acaricida *in vitro* contra garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en adultos y larvas en bovinos.

El extracto hidroalcohólico de *Piper tuberculatum* no muestra capacidad acaricida *in vitro* contra garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en adultos y larvas en bovinos.

VI. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Evaluar *in vitro* el efecto acaricida del extracto de *Piper tuberculatum* sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* obtenidas de bovinos en el municipio de León.

5.2 Objetivo Específico

- Valorar el efecto acaricida *in vitro* del extracto de *Piper tuberculatum* en garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus*.
- Valorar el efecto acaricida *in vitro* del extracto de *Piper tuberculatum* en larvas de *Rhipicephalus microplus*.
- Estimar la concentración letal media de *Piper tuberculatum* en garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus*.
- Comparar el efecto acaricida del extracto de *Piper tuberculatum* con Amitraz para el control de garrapatas *in vitro* en bovinos.

VII. MARCO TEÓRICO

7.1 Generalidades

Las garrapatas duras (Familia *Ixodidae*) son ectoparásitos hematófagos y se reconocen como importantes ectoparásitos obligados a necesitar sangre durante una parte fundamental de su ciclo de vida (12).

7.2 Clasificación taxonómica

Las garrapatas pertenecen al orden Ixodida, que consta de tres familias: *Ixodidae* (para algunos autores en realidad esta familia sería dos: *Ixodidae* y *Amblyomidae*), *Argasidae* y *Nuttalliellidae*(13).

Tabla 1. Categorías taxonómicas de las garrapatas (14)

Categoría	
Reino	Animal
Phylum	<i>Arthropoda</i>
Subphylum	<i>Chelicerata</i>
Clase	<i>Arachnida</i>
Subclase	<i>Acari</i>
Orden	<i>Acarina</i> (garrapatas y acaros)
Grupo	<i>Parasitiforme</i>
Suborden	<i>Ixodoidea</i>

Tabla 2. Subfamilias y géneros de Garrapatas (14).

Familia	Subfamilia	Genero	N° de especies
<i>Ixodidae</i>	<i>Ixodinae</i>	<i>Ixodes</i>	217
	<i>Rhipicephalinae</i>	<i>Dermacentor</i>	30
		<i>Hyalomma</i>	75
	<i>Hyalomminae</i>	<i>Hyalomma</i>	30
	<i>Haemaphysalinae</i>	<i>Haemophysalis</i>	155
	<i>Amblyomminae</i>	<i>Amblyomma</i>	102
<i>Argasidae</i>	<i>Ornithodorinae</i>	<i>Ornithodoros</i>	100
	<i>Antricolinae</i>	<i>Antricola</i>	8
	<i>Otobinae</i>	<i>Otobius</i>	56
	<i>Argasinae</i>	<i>Argas</i>	56
<i>Nuttalliellidae</i>	<i>Nuttalliella</i>	<i>Nuttalliella</i>	1 (namaque)

7.3 Morfología.

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es un artrópodo conocido como garrapata dura, de cuerpo generalmente ovalado y aplastado y con una capa o placa dura quitinizada (escutum o escudo) que cubre la parte anterior de la región dorsal de la hembra y casi toda la superficie dorsal del macho. Tienen un cuerpo no segmentado con cabeza y capitulum, tórax y abdomen unidos, boca especializada, colocadas en la parte anterior del cuerpo, conformado por el hipostoma o probóscide armados con dientes en hilera para poder fijarse al huésped, palpos que son las partes sensoriales o táctiles y quelíceros que se utilizan para cortar y perforar la piel. El escudo en las hembras es muy pequeño y tiene forma de lengüeta, es decir es más largo que ancho encontrándose los ojos en la parte más ancha del escudo; en los machos se extiende a lo largo del cuerpo, sin patrón ornamental, liso, brillante y de color café rojizo. Los machos presentan ventralmente placas adanales y accesorias (15).

7.4 Ciclo biológico

El ciclo de vida de *R. microplus* se desarrolla en dos fases:

- a) La fase parasitaria sobre el bovino
- b) La fase de vida libre fuera del bovino

El periodo de vida libre comprende cuatro etapas:

- Preoviposición,
- Oviposición,
- Incubación
- Periodo de sobrevivencia de las larvas sobre el pasto.

El periodo de vida libre comprende desde que una hembra ingurgitada se desprende del bovino y cae al suelo, hasta que las larvas de su progenie logran parasitar un nuevo hospedero.

La fase parasitaria, pasa de larvas a metalarvas y de ninfas a metaninfas, posteriormente en neóginas, partenóginas y teleóginas. Para el caso de los machos, pasan a meandros y a gonandro. Los machos pueden permanecer sobre los bovinos durante periodos de hasta 90 días. Todas las etapas de la fase parasitaria se llevan a cabo en el mismo animal, por lo cual se llama garrapata de un hospedero, para diferenciarla de otras

garrapatas que necesitan 2 o 3 hospederos para completar su vida parasitaria, como ocurre con otras especies, como *R. bursa* y *Amblyomma*.

La vida parasitaria de la garrapata *Rhipicephalus* spp. sobre el bovino es generalmente de tres semanas, que incluyen dos mudas (de larva a ninfa y de ninfa a adulta). Las hembras fecundadas y repletas de sangre se caen del animal hospedero (bovino) y depositan entre 2,000 y 3,000 huevecillos, en lugares protegidos en el suelo, de los que, dependiendo del clima, nace una nueva generación de larvas en un lapso de 6 a 8 semanas. La hembra muere después de la oviposición.

Estas larvas, apenas perceptibles a simple vista, se mueven con sus 6 patas, trepan hierbas y arbustos, y esperan a que pase algún animal que les sirva de hospedero

Con sus órganos bucales se adhieren a la piel, la perforan, chupan sangre y líquido corporal hasta repletarse para luego mudar al estadio de ninfa. La ninfa con cuatro pares de patas vuelve a chupar sangre y pasa una segunda muda para convertirse en garrapata adulta de sexo diferenciado.

Luego de la copulación, las hembras fecundadas y llenas de 0.3 a 0.5 ml de sangre se caen del animal hospedero y así comienza el nuevo ciclo con la puesta de los huevos y la muerte de la hembra (figura 1) (16).

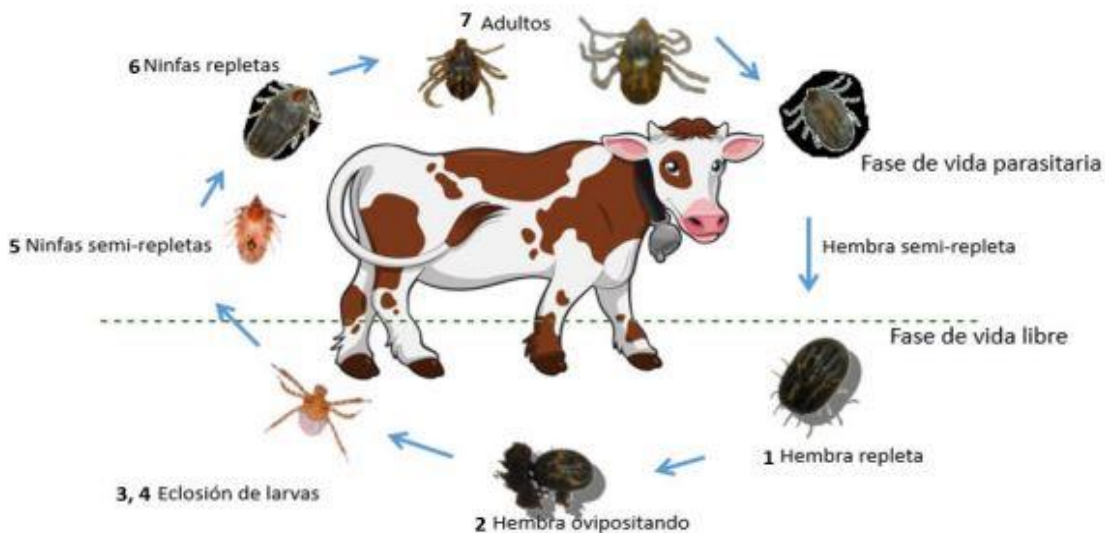


Figura 1-Esquema del ciclo biológico de la garrapata *R. microplus*. 1) Hembras repletas de sangre se dejan caer al suelo, 2) Puesta de huevos en el suelo, 3) Larva al salir del huevo, 4) Larva se adhiere al hospedero, 5) Larva repleta muda

a ninfa en el hospedero, 6) Ninfa repleta muda a garrapata adulta sobre el hospedero y 7) Fecundación de las hembras antes de la succión de sangre (16).

7.5 Distribución geográfica

La garrapata común del ganado, *R. microplus* se encuentra distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Estas garrapatas son endémicas de la India, Asia, Australia, Madagascar, África, el Caribe y México (4).

7.6 Importancia

La importancia de las garrapatas radica en su capacidad de ser tanto parásitos obligados como vectores de un importante número de enfermedades parasitarias, bacterianas y víricas. Algunas de esas enfermedades están consideradas como graves plagas de los animales domésticos, provocando altas pérdidas económicas. Muchas de ellas son zoonosis, es decir son procesos transmitidos de los animales (tanto domésticos como silvestres) a la especie humana. Algunas enfermedades víricas transmitidas por las garrapatas a los humanos pueden ser mortales, en un porcentaje relativamente alto. Las cifras de prevalencia, incidencia y mortalidad son muy variables, y dependen del agente etiológico implicado, el vector y las condiciones sociales que pueden facilitar o impedir su transmisión (17).

Rhipicephalus microplus (anteriormente conocida como *Boophilus microplus*) es considerada la garrapata más importante del ganado bovino a nivel mundial. *R. microplus* es una garrapata dura que se puede encontrar en diversos huéspedes, entre ellos el ganado bovino, búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres. Una alta carga de garrapatas en los animales puede disminuir la producción y dañar los cueros. *R. microplus* también puede transmitir la babesiosis (causada por los parásitos protozoarios *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*) y la anaplasmosis (causada por *Anaplasma marginale*). Bajo condiciones experimentales, esta garrapata puede transmitir *Babesia equi*, que causa la piroplasmosis equina (18).

7.7 Control de la garrapata

7.7.1 Control Químico

El control químico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se ha efectuado con productos de la familia de los carbamatos, organoclorados, organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS), amidinas, inhibidores de la regulación del crecimiento (IGR), Ivermectinas y recientemente las fenilpirazolonas. La secuencia en su utilización ha sido histórica dependiendo entre otras cosas del desarrollo de la resistencia a las diferentes familias, por otro lado, la eficacia y persistencia ha sido variable, aumentándose esta última debido al mejoramiento tecnológico en los acaricidas.

Entre los problemas más importantes a los que se ha enfrentado el combate químico de las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se encuentra el desarrollo de la resistencia a los ixoidicidas, como ha ocurrido en casi todos los países en donde se han usado por largos períodos es decir que en la mayoría de los casos los ixoidicidas propician alteraciones en las garrapatas que conducen a través del fenómeno de selección genética a una adaptación que les permite sobrevivir bajo las nuevas condiciones artificiales impuestas. Este fenómeno ha sido denominado en términos mundialmente aceptados como resistencia y se define como la capacidad adquirida por la fracción poblacional de una especie parásita que les permite sobrevivir a concentraciones de algunos productos que son capaces de eliminar al resto de la población normal, esta capacidad es transmitida a la siguiente generación (19).

En Nicaragua existen cuatro formas de aplicación de los productos: Inmersión, aspersion, pour-on (derrame dorsal) e inyectable.

7.7.1.1 Inmersión

- Es la forma de aplicación internacionalmente más aceptada en la cual se tiene más experiencia de uso.
- Actúa por contacto.
- Tienen un Stripping (agotamiento) controlado.
- Tiempo de espera para la faena entre 0 a 15 días según marca comercial.

Ventajas

- Gran capacidad de volteo de las formas parasitarias.
- Se puede conocer la concentración de trabajo mediante análisis químico.
- Los productos tienen 0 o pocos días de espera para envío a faena.

Desventajas

- No tienen poder residual para larvas infectantes.
- Es crítico el manejo del baño, el mojado del animal, el diseño del mismo, la cubicación, la regla, etc.
- Los productos que tienen varios días de espera para envío a faena.
- Dificultad para tratar animales preñados o previos al embarque para faena.
- Contaminante del medio ambiente.
- Requiere de instalaciones costosas y de difícil mantenimiento.
- Difícil de rotar diferentes acaricidas de inmersión dentro de una estrategia de control (20).

7.7.1.2 Aspersión

Se utilizan los mismos garrapaticidas y tienen muchas características similares a la inmersión. Generalmente son considerados como menos eficaces en el tratamiento por su tendencia a dejar garrapatas sin tratar en zonas del animal de difícil acceso a la aspersión.

Ventajas

- Útil en animales preñados.
- Se puede cambiar de núcleo químico más fácilmente en comparación a la inmersión.

Desventajas

- Es crítico el diseño del baño, es estado de los picos, el mojado del animal, caudal y presión de agua utilizada.
- Polución del medio ambiente y de los operarios.
- Costo del equipo y de mantenimiento (21).

7.7.1.3 Pour-on

Su eficacia depende del poder de difusión. Tiempo de espera para faena 0 a 100 días según marca comercial.

Ventajas

- Son de fácil aplicación, no requieren de instalaciones especiales.
- Útil en animales preñados.
- Poder residual para larvas infectantes durante 35 días.
- Menos contaminante del medio ambiente.

Desventajas

- Mayor número de días para lograr el volteo total de garrapatas.
- Crítico el cálculo de peso del vacuno.
- Pueden tener menor eficacia con pelo largo y clima muy adverso.

7.7.1.4 Inyectables

Son insecticidas, actúan contra parásitos externos e internos

Ventajas

- Son de fácil aplicación, no requieren de instalaciones especiales.
- Útil en animales preñados.
- Poder residual máximo 60 días según formulación.

Desventajas

- Su eficacia depende de la biodisponibilidad del producto.
- Mayor número de días para volteo total de garrapatas.
- Crítico el cálculo de peso del vacuno.
- Tiempo de espera para faena entre 28 a 122 días según marca (19).

7.7.1.5 Generalidades del Amitraz.

Pertenece a las Amidinas, tiene un efecto antagonista a la Octopamina (22) lo que produce hiperexcitabilidad en la garrapata, por lo que se desprende del hospedero y muere, esto en etapa larval, en adultos provoca la disminución de la alimentación e

imposibilita la digestibilidad de las proteínas sanguíneas lo que afecta a la reproducción, disminuye la oviposición y la viabilidad larval (23). El Amitraz ha sido ampliamente utilizado e ingresó al mercado en los 60's.

7.7.2 Control Inmunológico

7.7.2.1 Vacunas contra garrapatas *R. microplus*

Hay disponibles vacunas comerciales contra *R. microplus* en algunos países. Se basan sobre todo en el antígeno recombinante Bm86, un polipéptido del intestino de las garrapatas. Estas ingieren el anticuerpo correspondiente al chupar sangre de un hospedador vacunado. Los anticuerpos destruyen poco a poco las células digestivas de la garrapata y acaban causando su muerte. Algunas garrapatas mueren sobre el hospedador y otras una vez ya en el suelo, comenzada la oviposición. La viabilidad de los huevos depositados es variable. Si se vacuna regularmente todo el hato que ocupa un potrero, la población de garrapatas en dicho potrero será decimada poco a poco hasta descender, tras varios años, bajo el umbral de daño económico (24).

Las vacunas contra *R. microplus* están indicadas para el control de poblaciones de garrapatas, pero no para la protección a corto o medio plazo de las reses individuales contra las infestaciones, ni para derribar inmediatamente las garrapatas que ya infestan el ganado en un momento determinado.

Las vacunas tienen ventajas: son eficaces contra garrapatas resistentes a los productos químicos, y no dejan residuos en la carne o en la leche, lo que las hace particularmente atractivas para explotaciones lecheras.

El mayor inconveniente de estas vacunas es que el antígeno no se introduce en el hospedador durante la picadura, lo que exige inyecciones periódicas de refuerzo cada 6 a 10 semanas. Otro inconveniente es que la vacuna no evita que el ganado se infeste con las garrapatas presentes en los pastos tras la vacunación, lo que exige que el ganado vacunado siga siendo tratado con acaricidas clásicos hasta que los pastos se limpien poco a poco de garrapatas, algo que puede durar varios años: el número de tratamientos acaricidas necesarios disminuirá sólo lentamente.

Otro inconveniente de las vacunas es que la respuesta inmunológica individual de cada res puede variar considerablemente, y se ve reducida si la res sufre de estrés, está

enferma o debilitada. Por lo tanto, dentro de un mismo hato la eficacia de la vacuna puede variar considerablemente, frenando el proceso de limpieza de los pastos y dando la impresión de que no trabaja porque algunos animales siguen llevando bastante garrapata (20).

7.7.3 Control biológico

Este se logra mediante la utilización de hongos entomopatógenos que infectan y matan a las garrapatas tales como: *Metarhizium anisopliae* cepas 127 y Brasil, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Verticillium lecanii* cepas 1 y 2, *Beauveria bassiana* cepa LBBb14 entre otros. Los hongos entre sus principales características se puede citar su alto poder residual, la especificidad con el hospedero, elevado poder patógeno, las altas posibilidades de multiplicación en laboratorio y la conservación de su virulencia en campo (25).

7.7.4 Extractos acaricidas de origen natural.

El uso de extractos naturales de plantas ha sido cada vez más estudiado, debido a sus beneficios en comparación con el uso de principios activos químicos (26), los acaricidas de origen natural se obtienen de materia prima que se degrada con facilidad, no causa daño al medio ambiente ni deja residuos en el animal tratado sin embargo, es un proceso lento de extracción.

Se ha demostrado, como ejemplo, que extractos etanólicos de la semilla de la fruta anona (*Annona squamosa*) y las hojas del árbol de nim (*Azadirachta indica*) tienen eficacia de un 70.8% y 80%, contra *R. microplus*, en un estudio de Álvarez *et al.* (2006) se logró mortalidad y reducción de oviposición con: el clavo de olor (*Zizygium aromaticum*), las hojas del árbol de la morera (*Morus alba*), pimienta negra (*Piper nigrum*), y la mezcla de dientes de ajo (*Allium sativum*) con clavo de olor (*Z. aromaticum*) (25).

7.7.5 Resistencia o resiliencia

El control químico se ha vuelto ineficaz en algunas regiones debido a la aparición de garrapatas resistentes a estos productos. La resistencia es uno de los mayores

problemas, debido a que la disponibilidad de nuevos antiparasitarios es cada vez más escasa (27).

Se define como resistencia la capacidad adquirida por individuos de una población parásita que les permite sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal. La resistencia cruzada (RC) es el mecanismo que utilizan especies de insectos resistentes para sobrevivir a la exposición de insecticidas relacionados químicamente, usando un patrón de detoxificación genérico. La resistencia múltiple (RM) es la utilización de varios mecanismos hacia la acción de varias clases de insecticidas no relacionados químicamente (27).

La resistencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS) y Amitraz (AM) ha sido ampliamente descrita, principalmente en Australia y Latinoamérica. La definición de los criterios para considerar una población resistente de acuerdo a la FAO basan en que la resistencia está definida como la detección, por medio de pruebas sensibles, de un aumento significativo del número de individuos de una única población de una especie determinada que toleran drogas en dosis comprobadamente letales para la mayoría de los individuos de la misma especie (28).

El desarrollo de la resistencia a los productos químicos depende de las presiones evolutivas y de constantes ajustes, que involucran factores de variabilidad genética, causada por mutaciones al azar o rearrreglos genéticos que son generados por el uso constante de los pesticidas; permitiendo la reproducción de individuos con el rasgo de resistencia (21).

Los métodos actuales para el control de garrapatas implican el uso de métodos químicos y no químicos. Aunque el control de garrapatas está basado fuertemente en el uso de productos químicos, el desarrollo de *R. (Boophylus) microplus* resistente a estos compuestos es una grave amenaza en todo el mundo. El desarrollo de resistencia a los acaricidas en una población de garrapatas depende de la frecuencia de aparición de individuos resistentes en la población, y la intensidad de la presión de selección química. La aparición de *R. (Boophylus) microplus* resistente a organofosforados (OPs), piretroides sintéticos (SPs) y el Amitraz ha sido descrita alrededor del mundo, principalmente en Australia y Latinoamérica (29).

VIII. MATERIAL Y MÉTODO

Tipo de estudio: Experimental.

Universo: Garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que parasiten a bovinos en el municipio de León.

Población: Garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que parasiten a 39 bovinos.

Muestra: 13 garrapatas extraídas por animal, para un total de 507 garrapatas.

Tipo de muestreo: No probabilístico.

Selección de muestra: Por conveniencia, se tomaron en cuenta únicamente todos aquellos bovinos infestados con garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

8.1 Preparación y obtención del extracto *Piper tuberculatum*.

Inflorescencias maduras, con frutos y semillas, fueron secados a temperatura ambiente bajo sombra durante 20 días y luego molidas hasta obtener un polvo fino. Después de determinado el peso seco se sometió al proceso de extracción con alcohol etílico 70%, dejándolo al aire libre para la evaporación de este. El extracto fue pesado para determinar el rendimiento y luego de disolverse a razón de 1 g en 10 ml de agua destilada se llevó al volumen correspondiente de agua corriente para obtener la solución final (Figura 2-4) (30).

8.2. Recolección y preparación de las garrapatas.

Las garrapatas en estudio fueron extraídas de bovinos de las fincas en estudios, se recolectaron garrapatas de la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, hembras ingurgitadas este procedimiento fue realizado al finalizar la tarde entre las 4:00 y 6:00 pm. Se recolectaron 507 garrapatas hembra (13 por animal) con una longitud igual o mayor a 4 mm (Figura 5-7), los especímenes fueron recolectados de vacas infestadas naturalmente, ninguna de las cuales había recibido tratamientos garrapaticidas durante al menos 30 días (31).

Luego que las garrapatas se retiraron del animal, se introdujeron en tubos de ensayo, usando como tapón un trozo de algodón húmedo con el objetivo de proporcionar oxígeno a las garrapatas, además se agregaron hojas de árboles para el mismo fin, para luego

ser transportadas en un termo con poca luz hasta el laboratorio de CEVEDI en la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias (ECAV).

8.3 Manejo laboratorial de las garrapatas hembra ingurgitadas

Las garrapatas hembra ingurgitadas fueron separadas y observadas con estereoscopio para su clasificación taxonómica que fue realizada utilizando la clave taxonómica descritas previamente (32). Luego se lavaron con suero fisiológico y pesadas en balanza electrónica. Posteriormente se colocaron en placas Petri con algodón húmedo y llevadas a una recámara con poca luz, donde la temperatura se mantuvo entre 30 a 35°C, durante un periodo de dos días para la realización de la Prueba de Inmersión de Adultas (PIA) y esperar el inicio del proceso de ovoposición. A las hembras que no se les realizó la PIA (grupo control) se dejaron por un tiempo de 18 a 21 días hasta que iniciaron su ovoposición.

8.3.1 Protocolo de Drummond o prueba de inmersión (PIA).

Se realizó con base a la prueba diseñada por Drummond, en el cual, grupos de 10 hembras (replicas/tratamiento) de *R. microplus* previamente pesadas, fueron sumergidas por 5 minutos en 10mL del extracto hidroalcohólico de *P. tuberculatum*, en las diferentes concentraciones (100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml. p:v), (Figura 8). Además, se utilizó el vehículo (alcohol al 70% con 7 días de incubación al aire libre) como control negativo.

Una vez listas las distintas soluciones se realizó la inmersión de garrapatas adultas en grupos de 10 hembras (Figura 9-10), uno para el grupo tratado, uno para el Amitraz y otro grupo para el control. El tiempo de inmersión fue de 5 min. Las placas Petri se agitaron con suavidad, seguidamente se extrajeron de la solución y se les depositaron en papel toalla para eliminar el exceso del producto.

Posteriormente se colocaron en placas Petri en donde se incubaron por 15 días a 28 +2°C y humedad relativa 80% con la finalidad de que las garrapatas opositen. Estas se observaron todos los días con un estereoscopio y se registraron las mortalidades y la oviposición (33).

Porcentaje de mortalidad (%)

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\# \text{ de garrapatas muertas}}{\# \text{ de garrapatas totales}} * 100\%$$

8.3.2 Determinación de la eficacia en adultos

Las hembras adultas fueron colectadas y lavadas con agua, secadas con papel absorbente y pesadas individualmente para la primera evaluación del extracto de *Piper tuberculatum*. Se prepararon 10 ml de cada solución a diferentes concentraciones de 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml p:v, cada grupo experimental fue sometido a tratamiento individual por una sola vez en las soluciones preparadas y el grupo control, utilizando la técnica de inmersión de adultas descrita, en las que se sumergen las garrapatas en 10 ml de la solución correspondiente durante 5 minutos (34).

8.4 Larvas

Las larvas obtenidas de las hembras ingurgitadas se depositaron en tubos de ensayo durante 21 días con el propósito de darles la madurez necesaria antes de la realización de la prueba de paquete de larvas (PPL) (34).

8.4.1 Prueba de paquete larvario (PPL)

Las larvas que se obtuvieron de la ovoposición de las hembras colectadas de las fincas en estudio. De cada grupo (Control, Amitraz y Tratamiento) se reservaron en un tubo contenido de larvas que no serían sometidas a tratamiento (35). Se prepararon 10 ml de cada solución en estudio a diferentes concentraciones (Figura 11), se colocaron 90 larvas aproximadamente en sobres realizados con papel filtro tipo Whatman del No. 1 con dimensiones de 7.5 cm de largo x 8.5 cm de ancho y con la ayuda de cinta adhesiva se cierran los espacios laterales, quedando sólo el espacio superior para permitir el llenado con las larvas de *R. microplus*; estos paquetes se identificaron con lápiz con el código de la finca, grupo de repetición y el nombre de la prueba (Figura 12). El grupo control se preparó con el mismo procedimiento, pero impregnándolas con diluyente (tween 80 más agua destilada).

Una vez preparadas las concentraciones primero se impregnan los controles y se continúa con los tratados, aplicando 5 ml de las distintas soluciones a cada sobre ya identificado posteriormente se ponen a secar al aire libre durante 30 minutos para eliminar el exceso de producto (Figura 13), luego se procedió al llenado de los sobres colocando 90 larvas para cada grupo y sus 3 repeticiones (control, *Piper tuberculatum*, Amitraz). Al concluir el llenado de los paquetes, se colocarán en una placa Petri limpia permaneciendo por 24 horas para posteriormente realizar la lectura de los resultados (33).

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\# \text{ de larvas de garrapatas muertas}}{\# \text{ de larvas de garrapatas totales}} * 100\%$$

8.4.2 Prueba de inmersión de larvas (PIL)

Consiste en la inmersión de larvas de 7 a 14 días de edad en sobres en papel filtro en las distintas soluciones (Control, Amitraz, *Piper tuberculatum*).

La preparación de los sobres se realizó de la misma manera como se menciona en la prueba de paquete de larvas. Estos paquetes deben ser identificados con lápiz con el código de la finca, grupo de repetición y el nombre de la prueba y también deben utilizarse tres repeticiones de cada producto, incluyendo a los controles.

Las soluciones utilizadas fueron para el *Piper tuberculatum* 50 mg/ml, Amitraz solución recomendada y para el control Tween 80 más agua destilada.

Para la inmersión de larvas se colocaron en una placa Petri de vidrio en donde estuvieron colocadas en sobres con papel filtro Whatman del No. 1 de 12.5 cm. Se tomaron 3 ml de la concentración a probar, iniciando con la solución testigo (Tween 80 más agua destilada) y continuando con las diferentes concentraciones (Figura 14). El papel filtro se impregnaron con 3 ml de la concentración y con la ayuda de un pincel del no.4, se colocaron 50 larvas aproximadamente que son distribuidas en el papel, sellándolas con cinta adhesiva para evitar su fuga una vez los sobres sellados se colocaron en placas Petri y se introdujeron por 72 horas, Transcurrido el tiempo se procedió a la lectura de los resultados contabilizando el número de larvas vivas y muertas en los tratados y controles. Para calcular el porcentaje de mortalidad se utilizó la misma fórmula que la prueba de paquete de larvas (33).

8.5 Análisis Estadístico.

La concentración letal (LC) del extracto de *P. tuberculatum* para el 50% de la población de garrapatas adultas (LC50) se calculó mediante análisis Probit. Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de Tukey post-hoc para establecer diferencias entre los grupos (la significación estadística se estableció en $p < 0.05$).

IX. RESULTADOS.

9.1 Prueba de inmersión de adultas (PIA)

En la prueba de inmersión de adultas de Drummond realizado en 6 grupos de 10 especímenes vivos; se realizaron 5 repeticiones por grupo con diferentes concentraciones del extracto de *P. tuberculatum* (100, 50, 25 y 12.5 mg/ml), un grupo expuesto al acaricida Amitraz y un grupo control expuesto a Tween 80% diluido en agua destilada.

Al analizar la media de mortalidad en los distintos grupos estudiados, se encontró que todos los grupos expuestos a *P. tuberculatum* mostraron la mortalidad más alta en comparación con la mortalidad de los grupos de Amitraz y control. La concentración de *P. tuberculatum* a 100mg/ml fue la que mostró mejor resultado de mortalidad *in vitro* en adultos durante los 15 días de observación, para el primer día la mortalidad ya era de 68%, mientras que, para el día 13 ya había alcanzado el 100%. En cuanto al Amitraz el primer día la mortalidad fue del 8% y al día 15 alcanzó un 92%. La concentración más baja de *P. tuberculatum* de 12.5 mg/ml mostró una mortalidad el primer día de 72%, mientras que el día 15 alcanzó un 96%. La comparación de las mortalidades para los grupos durante los 15 días fue significativamente distinta con valores de $P < 0.001$, de acuerdo con la prueba de ANOVA de un factor, (Grafica 1, Tabla 3). El cálculo de la Concentración letal media (CL 50) para el extracto de *P. tuberculatum* fue de 47.50 mg/ml después de 24 horas.

9.2 Inhibición de la ovoposición de adultas

Se realizó conteo de ovoposición de adultos expuestos a las diferentes concentraciones del extracto *P. tuberculatum*, así como grupo control y expuestos a Amitraz.

En cuanto a los porcentajes de ovoposición durante los primeros 12 días no se observó diferencia significativa entre los grupos. En cambio, a partir del día 13 se encontró diferencias significativas en el porcentaje de ovoposición con un valor de $P = 0.012$ observando un mayor porcentaje de ovoposición en el grupo control con un 30%, mientras que los tratados con Amitraz y *P. tuberculatum* (100 mg/ml) no se observó ovoposición.

Al día 15 el mayor porcentaje de ovoposición se observó en el grupo control, mientras que en el grupo de *P. tuberculatum* y los tratados con Amitraz fue de 0% mostrando diferencias significativas $P < 0.01$ (Tabla 4, Gráfico 2).

9.3 Prueba de paquete de larvas (PPL)

Las larvas tratadas con *P. tuberculatum* (50 mg/ml) mostró una mortalidad del 56%, el grupo tratado con Amitraz de 35.3% y en el grupo control con 2.67%. La prueba de análisis de varianza mostró diferencias significativas entre las tres medias del porcentaje de mortalidad, mientras que la prueba de Tukey reveló que los tres grupos fueron diferentes entre sí, encontrando que el grupo control y el grupo Amitraz presentaron una diferencia de medias de 32.67 con valor de $P = 0.01$, mientras que el Amitraz y el *Piper tuberculatum* se obtuvo una diferencia de medias de 20.67 y un valor de $P = 0.18$. La comparación entre el grupo control y *P. tuberculatum* mostró una diferencia de medias de 53.33 con valor de $P < 0.01$. (Gráfico 3, Tabla 5).

9.4 Prueba de inmersión de larvas (PIL)

Las larvas tratadas con *P. tuberculatum* con una concentración de 50 mg/ml presentó una mortalidad del 88.75%, el grupo tratado con Amitraz de 17.92% y en el grupo control con 5.42%. La prueba de análisis de varianza reveló diferencias significativas entre las tres medias del porcentaje de mortalidad, mientras que la prueba de tukey mostró que los tres grupos fueron diferentes entre sí, encontrando que el grupo control y el grupo Amitraz presentaron una diferencia de medias de 12.50 con valor de $P = 0.042$, mientras que, entre Amitraz y *P. tuberculatum* se obtuvo una diferencia de medias de 70.83 y un valor de $P < 0.01$. Al comparar el grupo control con el grupo tratado con *P. tuberculatum* se observó una diferencia de medias de 83.33 con valor de $P < 0.01$, (Gráfico 4, Tabla 6).

X. DISCUSIÓN.

En la actualidad, la infestación con ectoparásitos en ganado bovino representa una inversión negativa de gran valor cuantitativo y cualitativo para los ganaderos nacionales, debido al costo que requieren los tratamientos para el control y eliminación de los agentes infecciosos, así como el daño físico causado en la calidad del ganado mismo.

Es por este motivo que constantemente se busca la manera de utilizar productos de origen orgánico de bajo costo y menor grado de afectación física y ambiental al ganado. En las pruebas realizadas con extracto de la planta de *P. tuberculatum* en ectoparásitos hematófagos pertenecientes a *R. microplus* (garrapata de ganado), se encontró que la mortalidad obtenida en la prueba de inmersión de adultas, los grupos expuestos a concentraciones de 100 mg/ml de extracto mostraron los mayores porcentajes (100% en 13 días de exposición), en contraste con los grupos expuestos a concentraciones de 50 mg/ml quienes únicamente obtuvieron un porcentaje de mortalidad de 88% en 15 días de exposición. Los valores de mortalidad obtenidos en este estudio fueron elevados, principalmente cuando se comparan con otros trabajos como el realizado por Aguilar et. al (2008), quienes encontraron que los extractos crudos de la planta completa disueltos en Tween-20 (2%) y etanol (95%) presentaron mortalidades de $79.68 \pm 22.79\%$ y 69.42 ± 30.58 respectivamente (10). La propiedad acaricida de *P. tuberculatum* se puede atribuir a que su hojas y tallos contienen una distribución amplia de amidas y de otros compuestos con actividad insecticida (36).

En este estudio se encontró que la CL50 del extracto de *P. tuberculatum* después de 24 horas fue de 47.50 mg/ml, Braga et al. en el año 2018 encontraron resultados similares al evaluar la actividad de *P. tuberculatum* para el control de hembras congestionadas y larvas de *R. microplus* en donde encontraron que las concentraciones letales para el 50% de los individuos (LC50) después de 24 horas de exposición de larvas de *R. microplus* fueron 36.2; 39.9 y 53.0 mg/ml para extractos de etanol de frutas, tallos y hojas, respectivamente (9). La LC50 es la concentración de una sustancia que cuando se aplica al medio ambiente de una población objetivo causa la muerte del 50% de los individuos expuestos (37). Cuanto más bajo sea el valor de la LC50 del extracto para la garrapata, más eficaz será contra estos ectoparásitos y también tiene la ventaja de ser menos tóxico al huésped (38).

Por otra parte, durante la realización de la exposición al extracto, se midió el porcentaje de inhibición de ovoposición en adultas durante los 15 días de exposición en los cuales el grupo control presentó altos niveles con un 56% del total de adultos expuestos. Sin embargo, todos los grupos expuestos en concentración de 100 mg/ml no presentaron ovoposición durante el periodo de exposición. En el estudio realizado por Rodríguez Molano *et al.* en el año 2015, encontraron que el extracto puro de *Morus alba* inhibió en un 73.01% la ovoposición *in vitro* de la garrapata adulta (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*), mientras que en la concentración 1:2 se observó 26,21 % de inhibición (39). La capacidad inhibitoria del *P. tuberculatum* en la ovoposición de *R. microplus* se podría asociar a la presencia de algunas moléculas con acción sobre este parámetro reproductivo en esta parte de la planta (40).

Se ha observado que la hoja de *P. tuberculatum* tiene un mejor efecto en la mortalidad en adultos en comparación con los frutos, sin embargo, el extracto de frutos presenta una mejor capacidad para inhibir la ovoposición (9), por lo tanto, es probable que los compuestos en cada elemento de la planta posean propiedades diferentes, remarcando la necesidad de realizar estudios fitoquímicos dirigidos a aislar estas sustancias, así como pruebas *in vitro* con fracciones de extractos de plantas y sustancias aisladas del metabolismo de las plantas. Las diferencias en los componentes químicos aislados de diferentes especies de *Piper* pueden estar relacionadas con la diversidad genética de estas especies, así como con la edad foliar de la planta, variaciones edafoclimáticas y diferentes métodos de extracción aplicados (41).

Respecto a la prueba de paquetes en larvas, el mayor porcentaje de mortalidad se encontró en los especímenes expuestos a *P. tuberculatum* con 56% a una concentración de 50 mg/ml, en cambio, para el grupo de Amitraz su mortalidad fue de 35.33%. En el estudio realizado por Pajuelo (2008) midieron la mortalidad larval a través de la prueba de paquete larva utilizando extractos crudos de pericarpio de *Sapindus saponaria* al 6%, 8%, 10%, 15%, y 25% en donde los resultados de mortalidad de las larvas variaron de 63% a 100%, siendo la dilución de 6% la que ocasiona el 73.3% de mortalidad y el 8% ocasiona el 82.5%, de mortalidad seguido del 10% que logra el 88.33%, de mortalidad y finalmente el, 15% y 25% ocasionando el 100% de mortalidad (42).

Por último, en la prueba de inmersión de larvas de *R. microplus*, se obtuvo un alto porcentaje de mortalidad de los grupos expuestos al extracto de *P. tuberculatum* con 88.75%, al contrario del grupo Amitraz con 17.92%. En estudios realizados por Francisco *et al.* (2008) encontraron mediante la prueba de inmersión en larvas que el aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) *in vitro* en la garrapata *Boophilus microplus* presenta una DL50 en la concentración de 4,11% frente a las larvas (43). Otro estudio realizado por González *et al.* (2019) demostraron que los extractos etanólicos de tres genotipos de *Leucaena* spp sobre *R. microplus* en condiciones *in vitro* mostraron una mortalidad en larvas de 91.68, 82.00 y 54.06 % para los genotipos Cunningham, KX2 y Nativa, respectivamente, sin embargo, se requiere de más estudios para identificar los metabolitos que tengan una acción individual o en sinergia en el control de *R. microplus* (44).

XI. CONCLUSIÓN

- Se encontró una alta efectividad del extracto como acaricida de *Piper tuberculatum* con una alta tasa de mortalidad en concentraciones de 100 mg/ml en garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus*.
- Se obtuvo una mortalidad moderada del extracto como acaricida de *Piper tuberculatum* en prueba de paquete de larvas, en cambio, para la prueba de inmersión de larvas tuvo una alta tasa de mortalidad, ambas pruebas con concentraciones de 50 mg/ml.
- Se determinó que la concentración más efectiva como acaricida de *Piper tuberculatum* fue de 100 mg/ml en garrapatas adultas *Rhipicephalus microplus*.
- Se determinó que el acaricida con la mortalidad más alta fue *Piper tuberculatum* en las distintas concentraciones en comparación al Amitraz.

XII. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios *in vivo* del extracto *Piper tuberculatum* para el control de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos.
- Comprobar la efectividad del extracto de *Piper tuberculatum* con otras especies tanto ganaderas como domésticas realizando pruebas *in vitro* e *in vivo*.
- Realizar determinación de los metabolitos secundarios de la planta.

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Yamamoto W, Dewi IA, Ibrahim M. Effects of silvopastoral areas on milk production at dual-purpose cattle farms at the semi-humid old agricultural frontier in central Nicaragua. *Agric Syst* [Internet]. 1 de mayo de 2007 [citado 19 de junio de 2021];94(2):368-75. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308521X06001648>
2. Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W. Babesiosis del ganado. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S247-269.
3. Valencia GL. Garrapatas (Acari: Ixodidae y Argasidae) de importancia médica y veterinaria procedentes de norte, centro y sur América. Universidad de Antioquia; 2017. 126 p.
4. Rodríguez-Vivas RI, Rosado-Aguilar JA, Ojeda-Chi MM, Pérez-Cogollo LC, Trinidad-Martínez I, Bolio-González ME. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas Recur Agropecu*. agosto de 2014;1(3):295-308.
5. Evaluación de la efectividad de la semilla de Cucurbita moschata Duchesne como desparasitante interno en caninos, en Ciudad Belén-Managua. Noviembre 2016- Octubre 2017 [Internet]. [citado 8 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnl73g124.pdf>
6. Trujillo W, Cardozo F. El género Piper (Piperaceae) en la reserva natural Las Dalias, municipio de La Montañita-Caquetá. *Rev Momentos Cienc*. 1 de enero de 2013;10:88-96.
7. Ribeiro VLS, Avancini C, Gonçalves K, Toigo E, von Poser G. Actividad acaricida de *Calea serrata* (Asteraceae) en *Boophilus microplus* y *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol*. 14 de febrero de 2008;151(2):351-4.
8. Moises Martinez-Velazquez, Castillo-Herrera GA, Rosario-Cruz R, Flores-Fernandez JM, Lopez-Ramirez J, Hernandez-Gutierrez R, *et al*. Efecto acaricida y composición química de aceites esenciales extraídos de *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* y *Ocimum basilicum* contra la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res*. febrero de 2011;108(2):481-7.
9. Braga AGS, Souza KFA de, Barbieri F da S, Fernandes C de F, Rocha RB, Vieira Junior JR, *et al*. Actividad acaricida de extractos de diferentes estructuras de *Piper tuberculatum* contra larvas y adultos de *Rhipicephalus microplus*. *Acta Amaz*. marzo de 2018;48(1):57-62.
10. Aguilar-Caballero A, Cáceres-Farfán M, Méndez M, Borges-Argaez R, Rosado-Aguilar J, Dorantes A, *et al*. Actividad ixodicida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Trop Subtrop Agroecosystems*. 1 de enero de 2008;8:297-301.

11. Fragoso Sánchez H, Ortiz Estrada M, Labra Vaca G de, Ortiz Nájera A. Evaluación de la vacuna contra la garrapata Bm86 (Gavae) para el control de *Boophilus annulatus*. En 1999 [citado 9 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XL2012000640>
12. 1. *boophilus microplus* incubación de los.pdf [Internet]. [citado 24 de mayo de 2020]. Disponible en: [http://www.ucla.edu/ve/bioagro/rev11\(3\)/1.%20boophilus%20microplus%20incubaci%C3%B3n%20de%20los.pdf](http://www.ucla.edu/ve/bioagro/rev11(3)/1.%20boophilus%20microplus%20incubaci%C3%B3n%20de%20los.pdf)
13. Parasitología para veterinarios.pdf | Mosca | Insectos | Prueba gratuita de 30 días [Internet]. Scribd. [citado 24 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/358110565/Parasitologia-para-veterinarios-pdf>
14. LAS GARRAPATAS DE LA FAMILIA Argasidae Y DE LOS GÉNEROS Dermacentor, Haemaphysalis, Ixodes y Rhipicephalus (Ixodidae) DE LA ARGENTINA: DISTRIBUCIÓN Y HOSPEDADORES [Internet]. [citado 24 de mayo de 2020]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/69-garrapatas_argasidae.pdf
15. “DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD IXODICIDA in vitro DE SEMILLAS DE MAMEY (*Mammea americana* L.) PARA EL CONTROL DE LA GARRAPATA *Rhipicephalus microplus* DEL GANADO BOVINO” [Internet]. [citado 24 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/1874/1/Tesis%20Med%20Vet%20LesliArchila.pdf>
16. Ramírez Rodríguez PB, Rosario Cruz R, Domínguez García DI, Hernández Gutiérrez R, Lagunes Quintanilla RE, Ortuño Sahagún D, *et al.* Identificación de nuevos antígenos con potencial inmunoprotector en tejidos de intestino y ovario de la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, a través de un enfoque inmunoproteómico. *Exp Parasitol.* noviembre de 2016;170:227-35.
17. Estrada-Peña A. Orden Ixodida: Las garrapatas. :15.
18. Spickler AR. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 2007;3.
19. Condega JJJ. Eficacia in vitro de tres ixodidas contra *microplus* extraídos de bovinos en los meses de Julio-agosto del 2012. :49.
20. Caracterización parcial de secuencias ESTs codificantes de proteínas de superficie celular, con potencial inmunogénico, en la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [Internet]. [citado 29 de mayo de 2020]. Disponible en: http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5798/Gutiérrez_Torres_Cesar_Alejandro.pdf?sequence=1

21. Rodrigues DS, Leite RC. Impacto económico de Rhipicephalus (Boophilus) microplus: estimación de la disminución de la producción de leche en una granja lechera. Arq Bras Med Veterinária E Zootec. octubre de 2013;65(5):1570-2.
22. Castelli ME, Mangold A, Nava S, Guglielmone AA. Determinación de la concentración letal 50 para rhipicephalus (boophilus) microplus de la formamidina (amitraz) en diferentes poblaciones de la argentina. FAVE Sección Cienc Vet. 2013;12(1/2):7-14.
23. Fragoso H, García-Vázquez Z, Vargas M, Soberanes N. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado boophilus microplus en México. Téc Pecú En México. 1 de enero de 2002;
24. GARRAPATAS BOOPHILUS en el ganado BOVINO: biología, prevención y control [Internet]. [citado 29 de mayo de 2020]. Disponible en: https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=26&Itemid=471
25. Hidalgo RR, XIMENA FERNANDA PÉREZ OTÁÑEZ. RESISTENCIA A ALFA-CIPERMETRINA, IVERMECTINA Y AMITRAZ EN GARRAPATAS Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1887) COLECTADAS EN CUATRO LOCALIDADES. :56.
26. Rodríguez Vivas RI, Rosado-Aguilar J, Ojeda M, Perez-Cogollo LC, Trinidad-Martínez I, Bolio-González M. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. Ecosistemas Recur Agropecu. 1 de agosto de 2014;1:295-308.
27. Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R. Resistencia de la garrapata Boophilus microplus a los ixodicidas. Arch Med Vet [Internet]. 2006 [citado 29 de mayo de 2020];38(2). Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en
28. CADENA DE IMPLICACIONES EN EL CONTROL DE ENDO Y ECTOPARASITAS EN RUMINANTES [Internet]. [citado 29 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e03.pdf>
29. Rodríguez-Vivas RI, Hodgkinson JE, Trees AJ. Resistencia a los acaricidas en Rhipicephalus (Boophilus) microplus: situación actual y mecanismos de resistencia. Rev Mex Cienc Pecú. septiembre de 2012;3:9-24.
30. Delgado-Paredes GE, Duque-Aurazo AJ. Propagación masiva del matico (Piper tuberculatum Jacq.) y su aplicación en la erradicación de vectores de enfermedades metaxénicas en Lambayeque (Perú). 2017;12.
31. Brito LG, Barbieri FS, Rocha RB, Oliveira MCS, Ribeiro ES. Evaluación de la eficacia de los acaricidas utilizados para controlar la garrapata del ganado, Rhipicephalus microplus, en hatos lecheros criados en el suroeste del Amazonas brasileño [Internet]. Vol. 2011, Veterinary Medicine International. Hindawi; 2011

[citado 8 de mayo de 2020]. p. e806093. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/806093/>

32. Fairchild GB, Kohla GM, Tipton VJ. The ticks of Panama (Acarina: Ixodoidea). Ectoparasites Panama [Internet]. 1966 [citado 15 de noviembre de 2021];167-219. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/part/91348>
33. Torres-Acosta F, Chan-Pérez JI, López-Arellano M, Rosado-Aguilar J, Soberanes N, S. O-N, *et al.* CHAPTER: 12 Diagnóstico de resistencia a los antiparasitarios en rumiantes. En: Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. AMPAVE-CONASA, México D.F. En 2015. p. 355-403.
34. Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH. Boophilus annulatus y B. microplus: pruebas de laboratorio de insecticidas. J Econ Entomol. 1 de febrero de 1973;66(1):130-3.
35. Benavides E, Romero A, Rodríguez J. Situación actual de resistencia de la garrapata Boophilus microplus a acaricidas en Colombia. Segunda Entrega. Carta Fedegan 0123-2312. 10 de febrero de 2000;60:13-8.
36. Soberón GV, Rojas C, Saavedra J, Kato MJ, Delgado GE. Acción biocida de plantas de Piper tuberculatum Jacq. sobre Diatraea saccharalis (Lepidóptera, Pyralidae). Rev Peru Biol. octubre de 2006;13(1):107-12.
37. Araujo AM, Roma GC, Pizano MA, Furquim KCS, oliveira PR de, Camargo-Mathias MI. Determination of the LC50 of selamectin (active principle of the antiparasitic Revolution®, Pfizer) applied on engorged female of the tick Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Int J Acarol [Internet]. 1 de mayo de 2012 [citado 12 de julio de 2021];38(4):277-81. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/01647954.2011.638320>
38. Novotny MJ, Krautmann MJ, Ehrhart JC, Godin CS, Evans EI, McCall JW, *et al.* Safety of selamectin in dogs. Vet Parasitol. 23 de agosto de 2000;91(3-4):377-91.
39. Molano CER. Eficacia de extractos vegetales sobre la garrapata adulta Rhipicephalus (Boophilus) microplus y su oviposición. :14.
40. Álvarez V, Loaiza J, Bonilla R, Barrios M. Control in vitro de garrapatas (Boophilus microplus; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. Rev Biol Trop. marzo de 2008;56(1):291-302.
41. Facundo VA, Polli AR, Rodrigues RV, Militão JSLT, Stabelli RG, Cardoso CT. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de Piper tuberculatum Jacq. e das raízes de P. hispidum H. B. K. Acta Amaz [Internet]. diciembre de 2008 [citado 12 de julio de 2021];38:743-8. Disponible en: <http://www.scielo.br/j/aa/a/c8z8vBR84YGjJPVrf3nVT9M/?lang=pt>

42. Pajuelo PD. EVALUACIÓN IN VITRO DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE *Sapindus saponaria* SOBRE HUEVOS Y LARVAS *Boophilus microplus*. :67.
43. Francisco R, Vargas G, Gonçalves RB. Uso del aceite de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) (Panicoidideae) como acaricida frente a la garrapata *Boophilus microplus* Canestrini (Acari:Ixodidae). undefined [Internet]. 2007 [citado 9 de julio de 2021]; Disponible en: [https://www.semanticscholar.org/paper/Uso-del-aceite-de-citronela-de-Java-\(Cymbopogon-a-Francisco-Vargas/6fffc82589809f2936503bbcb967bf52372090ea](https://www.semanticscholar.org/paper/Uso-del-aceite-de-citronela-de-Java-(Cymbopogon-a-Francisco-Vargas/6fffc82589809f2936503bbcb967bf52372090ea)
44. González-López G, Ojeda-Chi MM, Casanova-Lugo F, Oros-Ortega I, Hernández-Chávez LI, Piñeiro-Vázquez ÁT, et al. Actividad acaricida de extractos etanólicos de tres genotipos de *Leucaena* spp. sobre *Rhipicephalus microplus* en condiciones in vitro. *Rev Mex Cienc Pecu.* septiembre de 2019;10(3):692-704.

XIV. ANEXOS

Tabla 3: Comparación de mortalidad por día (%) para la prueba de inmersión de adultas.

Días	Grupos	N	Media del porcentaje de mortalidad	Desviación estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	Control	5	14.00	15.17	-4.83	32.83
	Amitraz	5	8.00	17.89	-14.21	30.21
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	72.00	17.89	49.79	94.21
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	32.00	21.68	5.08	58.92
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	64.00	27.93	29.32	98.68
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	68.00	4.47	62.45	73.55
	Significancia				0.000	
2	Control	5	14.00	15.17	-4.83	32.83
	Amitraz	5	28.00	22.80	-0.31	56.31
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	78.00	13.04	61.81	94.19
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	46.00	33.62	4.26	87.74
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	74.00	18.17	51.44	96.56
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	82.00	8.37	71.61	92.39
	Significancia				0.000	
3	Control	5	14.00	15.17	-4.83	32.83
	Amitraz	5	38.00	21.68	11.08	64.92
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	80.00	12.25	64.79	95.21
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	48.00	29.50	11.38	84.62
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	74.00	18.17	51.44	96.56
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	86.00	5.48	79.20	92.80
	Significancia				0.000	
6	Control	5	24.00	19.49	(0.20)	48.20
	Amitraz	5	68.00	19.24	44.12	91.88
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	80.00	12.25	64.79	95.21
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	66.00	26.08	33.62	98.38
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	78.00	13.04	61.81	94.19
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	92.00	4.47	86.45	97.55
	Significancia				0.000	
7	Control	5	24.00	19.49	-0.20	48.20

Piper tuberculatum para el control de garrapatas

	Amitraz	5	76.00	11.40	61.84	90.16
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	84.00	11.40	69.84	98.16
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	70.00	27.39	36.00	104.00
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	82.00	10.95	68.40	95.60
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	94.00	5.48	87.20	100.80
	Significancia			0.000		
8	Control	5	26.00	23.02	-2.59	54.59
	Amitraz	5	80.00	7.07	71.22	88.78
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	86.00	8.94	74.89	97.11
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	72.00	27.75	37.55	106.46
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	82.00	10.95	68.40	95.60
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	96.00	5.48	89.20	102.80
	Significancia			0.000		
9	Control	5	30.000	25.4951	-1.656	61.656
	Amitraz	5	88.000	4.4721	82.447	93.553
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	86.000	8.9443	74.894	97.106
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	78.000	31.9374	38.344	117.656
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	82.000	10.9545	68.398	95.602
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	96.000	5.4772	89.199	102.80
	Significancia			0.000		
10	Control	5	42.00	24.90	11.08	72.92
	Amitraz	5	90.00	7.07	81.22	98.78
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	92.00	8.37	81.61	102.39
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	82.00	30.33	44.34	119.66
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	82.00	10.95	68.40	95.60
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	98.00	4.47	92.45	103.55
	Significancia			0.000		
13	Control	5	48.00	27.75	13.55	82.46
	Amitraz	5	92.00	8.37	81.61	102.39
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	94.00	5.48	87.20	100.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	86.00	21.91	58.80	113.20
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	86.00	8.94	74.89	97.11
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	100.00	0.00	100.00	100.00
	Significancia			0.000		

Piper tuberculatum para el control de garrapatas

14	Control	5	50.00	28.28	14.88	85.12
	Amitraz	5	92.00	8.37	81.61	102.39
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	96.00	5.48	89.20	102.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	90.00	17.32	68.49	111.51
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	90.00	7.07	81.22	98.78
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	100.00	0.00	100.00	100.00
	Significancia				0.000	
15	Control	5	48.00	27.75	13.55	82.46
	Amitraz	5	92.00	8.37	81.61	102.39
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	96.00	5.48	89.20	102.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	94.00	13.42	77.34	110.66
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	88.00	13.04	71.81	104.19
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	100.00	0.00	100.00	100.00
	Significancia				0.000	

Piper tuberculatum para el control de garrapatas

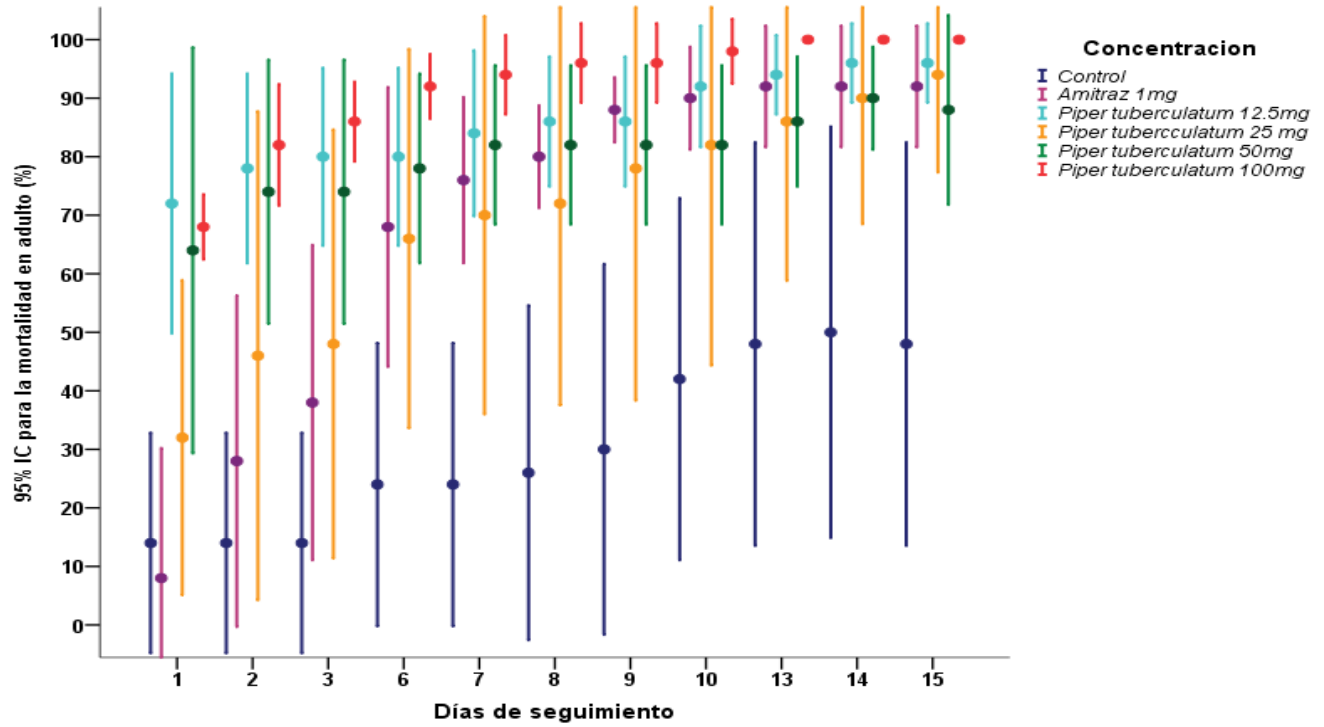


Gráfico 1: Porcentaje de mortalidad de *R. microplus* mediante la prueba de inmersión de adulto.

Tabla 4: Comparación de resultados de la ovoposición para la prueba de inmersión de adultas.

Día	Grupos	N	Media del porcentaje de ovoposición	Desviación Estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
2	Control	5	2	4.47	-3.55	7.55
	Amitraz	5	0	0	0	0
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	0	0	0	0
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	0	0	0	0
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	0	0	0	0
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0	0	0	0
	Significancia				0.439	
3	Control	5	6	8.94	-5.11	17.11
	Amitraz	5	0	0	0	0
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	0	0	0	0
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	0	0	0	0
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	0	0	0	0
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0	0	0	0
	Significancia				0.82	
6	Control	5	20	25.50	-11.66	51.66
	Amitraz	5	0	0.00	0.00	0.00
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	4	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	10	14.14	-7.56	27.56
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	4	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0	0.00	0.00	0.00
	Significancia				0.128	
7	Control	5	24	26.08	-8.38	56.38
	Amitraz	5	0	0.00	0.00	0.00
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	4	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	12	17.89	-10.21	34.21
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	4	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0	0	0	0
	Significancia				0.64	
8	Control	5	26	29.66	-10.83	62.83
	Amitraz	5	0	0.00	0.00	0.00
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	4	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	12	16.43	-8.40	32.40

***Piper tuberculatum* para el control de garrapatas**

	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	4	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0	0.00	0.00	0.00
	Significancia			0.61		
9	Control	5	30	33.17	-11.18	71.18
	Amitraz	5	0	0.00	0.00	0.00
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	4	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	12	17.89	-10.21	34.21
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	6	8.94	-5.11	17.11
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0	0	0	0
	Significancia			0.56		
10	Control	5	24.00	26.08	-8.38	56.38
	Amitraz	5	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	4.00	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	14.00	16.73	-6.78	34.78
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	6.00	8.94	-5.11	17.11
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0.00	0.00	0.00	0.00
	Significancia			0.061		
13	Control	5	30.00	27.39	-4.00	64.00
	Amitraz	5	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	4.00	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	16.00	15.17	-2.83	34.83
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	6.00	8.94	-5.11	17.11
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0.00	0.00	0.00	0.00
	Significancia			0.012		
14	Control	5	38.00	37.68	-8.79	84.79
	Amitraz	5	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	4.00	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	14.00	15.17	-4.83	32.83
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	8.00	8.37	-2.39	18.39
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0.00	0.00	0.00	0.00
	Significancia			0.015		
15	Control	5	56.00	27.02	22.45	89.55
	Amitraz	5	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>P. tuberculatum</i> (12.5 mg/ml)	5	4.00	5.48	-2.80	10.80
	<i>P. tuberculatum</i> (25 mg/ml)	5	16.00	15.17	-2.83	34.83
	<i>P. tuberculatum</i> (50 mg/ml)	5	8.00	10.95	-5.60	21.60
	<i>P. tuberculatum</i> (100 mg/ml)	5	0.00	0.00	0.00	0.00
	Significancia			0.000		

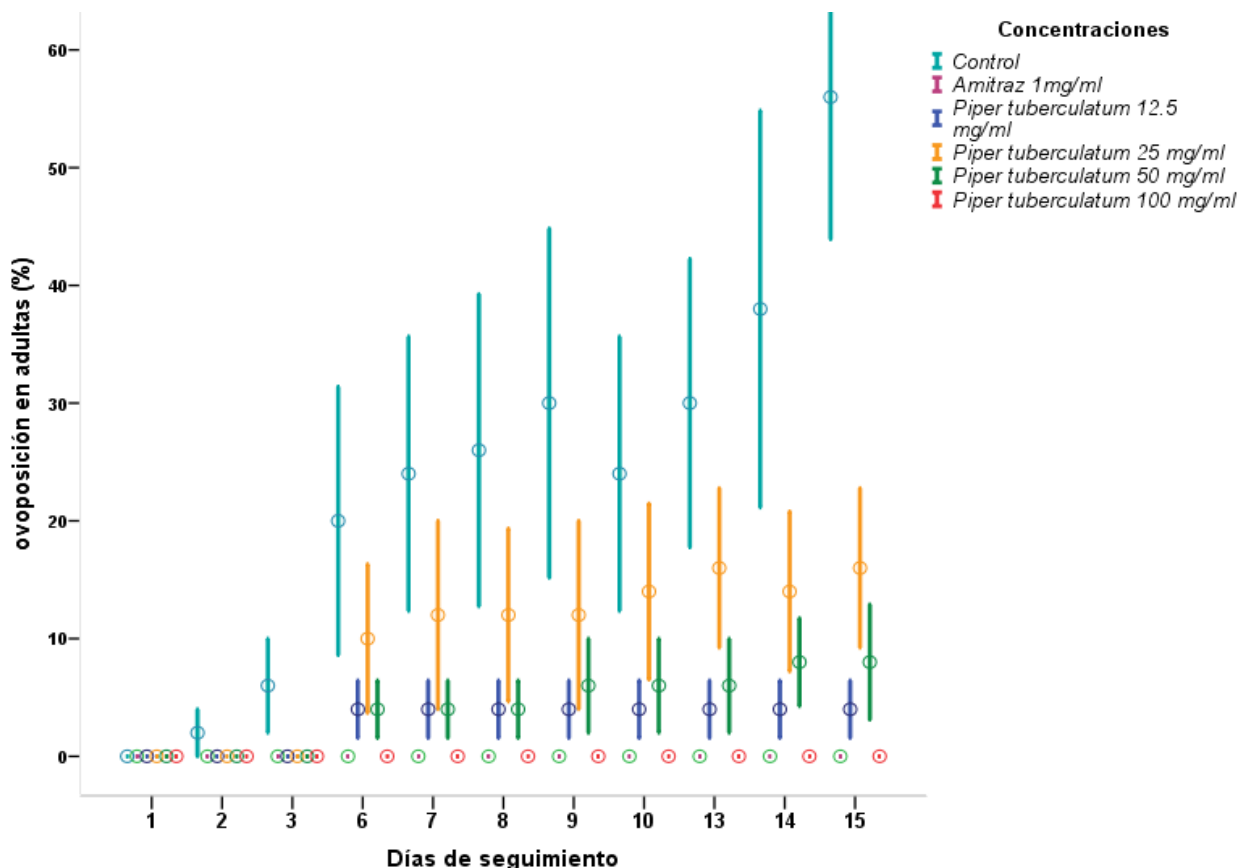


Gráfico 2: Media porcentual de ovoposición en adultas de *R. microplus*.

Tabla 5. Análisis de varianza para la mortalidad encontrada en la prueba de paquete de lava entre los grupos en estudio.

Grupos	Media	Intervalo de confianza para la media al 95%		Post-hoc (Tukey)				Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior	Grupo (I)	Grupo (J)	Diferencia de medias (I-J)	Significancia*	Límite inferior	Límite superior
Amitraz	35.33	15.25	55.41	Amitraz	Control	32.67	0.002	16.65	48.69
					<i>P. tuberculatum</i>	20.67	0.018	-36.69	-4.65
Control	2.67	-8.81	14.14	Control	Amitraz	32.67	0.002	-48.69	-16.65
					<i>P. tuberculatum</i>	53.33	0.000	-69.35	-37.31
<i>P. tuberculatum</i>	56.00	41.10	70.90	<i>P. tuberculatum</i>	Amitraz	20.67	0.018	4.65	36.69
Significancia	0.000				Control	53.33	0.000	37.31	69.35

*: Valor de *P* para la diferencia de medias del grupo I menos los grupos J

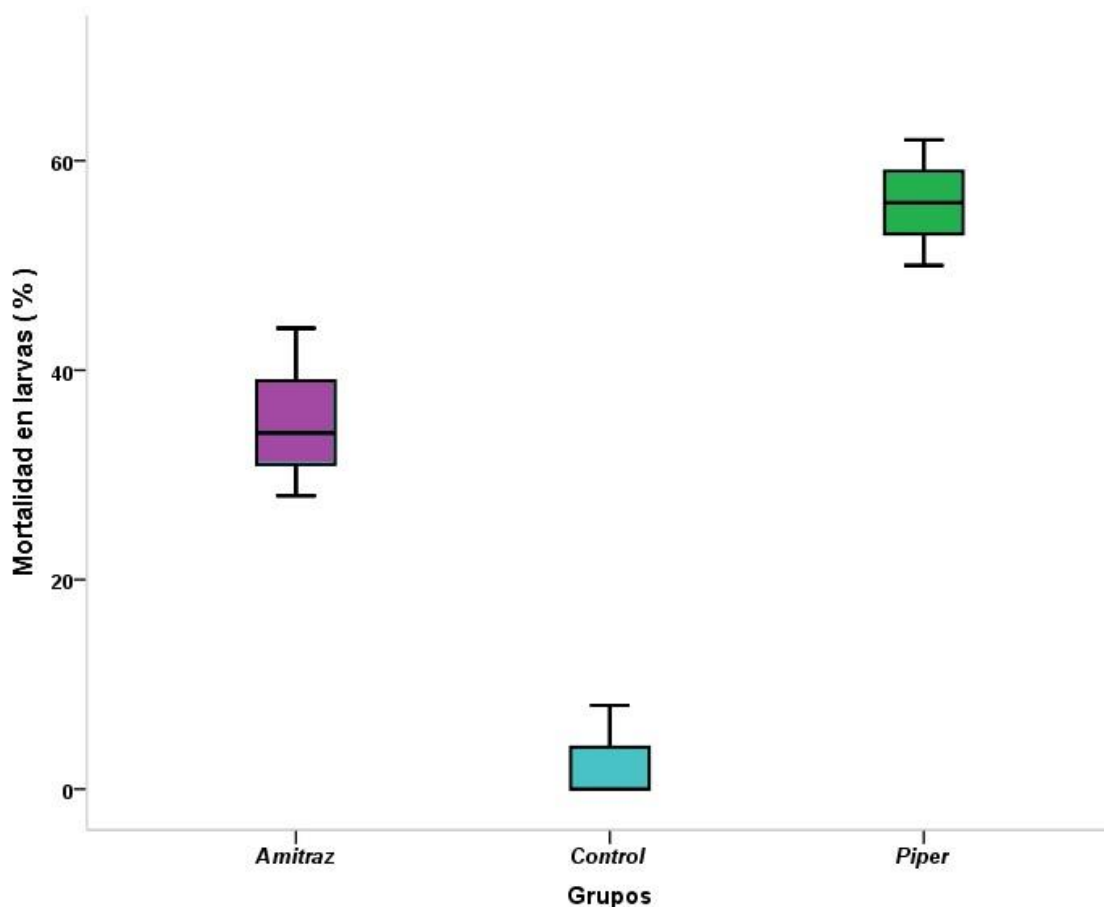


Gráfico 3: Porcentaje de mortalidad de *R. microplus* mediante la prueba de paquete de larvas.

Tabla 6. Análisis de varianza para la mortalidad encontrada en la prueba de inmersión de larvas entre los grupos en estudio.

Grupos	Media	Intervalo de confianza para la media al 95%		Post-hoc (Tukey)				Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior	Grupo (I)	Grupo (J)	Diferencia de medias (I-J)	Significancia*	Límite inferior	Límite superior
Amitraz	17.92	5.37	30.47	Amitraz	Control	12.50*	0.042	0.55	24.44
					<i>P. tuberculatum</i>	70.83*	0.000	-82.78	-58.88
Control	5.42	-6.34	17.17	Control	Amitraz	12.500*	0.042	-24.44	-0.55
					<i>P. tuberculatum</i>	83.33*	0.000	-95.28	-71.38
<i>P. tuberculatum</i>	88.75	77.55	99.95	<i>P. tuberculatum</i>	Amitraz	70.83*	0.000	58.88	82.78
					Control	83.33*	0.000	71.38	95.28
Significancia		0.000							

*: Valor de P para la diferencia de medias del grupo I menos los grupos J

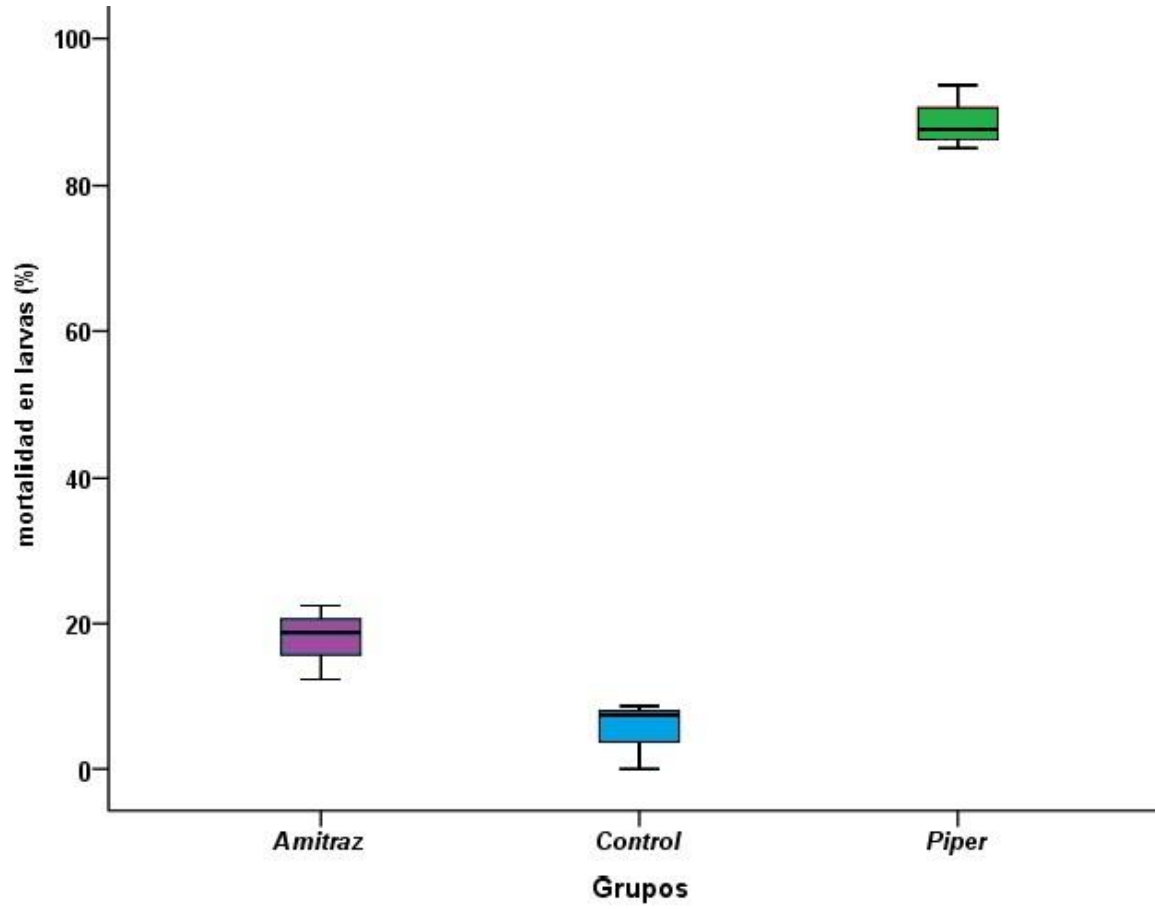


Gráfico 4: Porcentaje de mortalidad de *R. microplus* mediante la prueba de inmersión de larvas.



Figura 2: Trituración de hojas, fruto y tallo de *Piper tuberculatum* para la realización del extracto.



Figura 3: Extracto de *Piper tuberculatum*.



Figura 4: Extracto de *Piper tuberculatum* luego de 8 días al aire libre.



Figura 5: Recolección de garrapatas ingurgitadas en ganado del municipio de León (Troilo).



Figura 6: Recolección de garrapatas ingurgitadas en ganado del municipio de León (Poneloya).



Figura 7: Recolección de garrapatas ingurgitadas en ganado del municipio de León (Troilo).



Figura 8: Extracto de *Piper tuberculatum* en concentraciones de 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml.

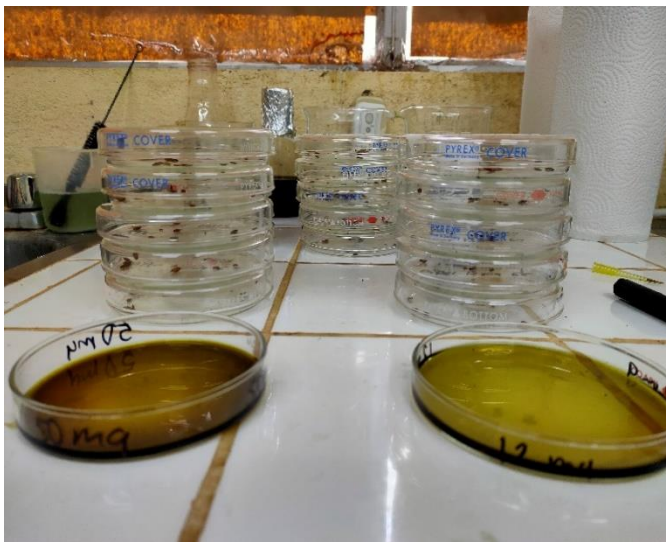


Figura 9: Preparación de las distintas soluciones para la prueba de inmersión de adultas.



Figura 10: Prueba de inmersión de adultas



Figura 11: Soluciones a utilizar para la prueba de paquete de larvario.

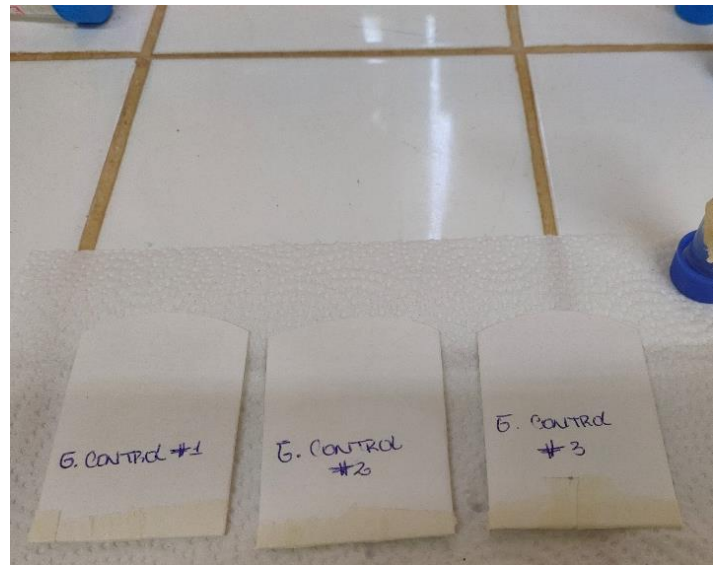


Figura 12: Sobres para la prueba de paquete de larvario



Figura 13: Distintas soluciones a utilizar en la prueba de paquete de larvario secándose al aire libre para la eliminar el exceso de producto.

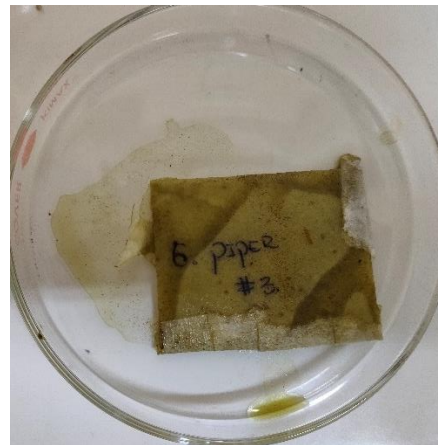


Figura 14: Prueba de inmersión de larvas