

**Actividad acaricida de extractos etanólicos de tres genotipos de *Leucaena* spp.
sobre *Rhipicephalus microplus* en condiciones *in vitro***

Guadalupe González-López ^a

Melina Maribel Ojeda-Chi ^b

Fernando Casanova-Lugo ^{a*}

Iván Oros-Ortega ^a

Luis Ignacio Hernández-Chávez ^c

Ángel Trinidad Piñeiro-Vázquez ^d

Roger Iván Rodríguez-Vivas ^b

^a Tecnológico Nacional de México / I.T. Zona Maya, Quintana Roo, México.

^b Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Mérida, Yucatán, México.

^c Tecnológico Nacional de México / I.T.S. Felipe Carrillo Puerto, Quintana Roo, México.

^d Tecnológico Nacional de México / I.T. Conkal, Yucatán, México.

*Autor de correspondencia: fkzanov@gmail.com

Resumen:

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad acaricida de extractos etanólicos de tres genotipos de *Leucaena* spp: *L. leucocephala* (Lam.) de Wit (Nativa), *L. leucocephala* (Cunningham) y *L. Leucocephala* x *L. padilla* (KX2), sobre larvas y garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus*. Para evaluar la actividad acaricida se usaron las pruebas de inmersión de larvas e inmersión de adultas. Asimismo, en los extractos de los tres genotipos de *Leucaena* spp. se analizó el perfil de metabolitos secundarios mediante placas analíticas de cromatografía. Los extractos a concentración del 50 % mostraron una mortalidad en larvas de 91.68, 82.00 y 54.06 % para los genotipos Cunningham, KX2 y Nativa, respectivamente. El genotipo Nativa presentó el mejor comportamiento para el control de *R. microplus* adultas con un 50 % de mortalidad a la concentración de 20 %. En los extractos se identificaron flavonoides y terpenos que pudieran ser los responsables de la actividad acaricida de los tres genotipos de *Leucaena*; 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*.

Palabras clave: Ectoparásitos, Metabolitos secundarios, Extractos vegetales, Trópico subhúmedo.

Recibido: 23/03/2018

Aceptado: 19/06/2018

Introducción

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es uno de los ectoparásitos que más pérdidas ocasiona en la ganadería bovina. Asimismo, es vector de agentes patógenos como *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *B. bovis*⁽¹⁾. De forma global se estima que el 80 % del ganado bovino del mundo está infestado con garrapatas, el cual provoca pérdidas anuales de 2,000 a 3,000 millones de dólares americanos. En México recientemente se estimó que las pérdidas anuales por las infestaciones de *R. microplus* en el ganado bovino fueron de 573.61 millones de dólares americanos⁽²⁾.

El método más empleado para el control de *R. microplus* es el uso de compuestos químicos, como piretroides (PSs), organofosforados (OFs), amidinas (Am), fenilpirazolonas, inhibidores del crecimiento de las garrapatas y lactonas macrocíclicas; sin embargo, en los últimos años se ha reportado el aumento de cepas multiresistentes a ixodicidas, principalmente a OFs, PSs, y Am, en el sureste de México⁽³⁾. Además, Pérez-Cogollo *et al*⁽⁴⁾ y Miller *et al*⁽⁵⁾ reportaron en México los primeros casos de *R. microplus* resistente a ivermectina y fipronil, respectivamente. Esta situación ha propiciado la búsqueda de métodos alternativos para el control de esta especie de garrapata que reduzca los daños al ambiente y a los humanos⁽¹⁾.

Los extractos de plantas pueden ser empleados como métodos alternativos para el control de artrópodos, ya que producen metabolitos secundarios que presentan diferentes mecanismos de

acción tales como la inhibición de la alimentación y la síntesis de quitina, disminución del crecimiento, desarrollo, y reproducción, así como afectar su comportamiento sin efectos adversos en especies no objetivo⁽⁶⁾. Las plantas de las familias Lamiaceae, Fabaceae, Asteraceae, Piperaceae, Verbenaceae y Poaceae presentan mayores eficacias para el control de garrapatas⁽⁷⁻¹¹⁾.

Entre los metabolitos secundarios con efecto acaricida contra *R. microplus* que se han identificado, en extractos de plantas de *Cunila angustifolia*, *Acacia pennatula*, *Piscidia piscipula*, *Leucaena leucocephala*, *Tagetes minuta*, *Piper amalago*, *Lippia graveolens* y *Milinis minutiflora* se encuentran los terpenos, estilbenos, cumarinas, ácidos, alcoholes, compuestos sulfurados, taninos, y aldehídos de aceites esenciales^(7,12).

Hoy en día existen pocos estudios del efecto de los extractos de *Leucaena* spp. para el control de garrapatas. Fernández-Salas *et al*⁽¹²⁾ evaluaron el efecto de un extracto de *L. leucocephala* sobre *R. microplus* y encontraron eficacia de 66.79 % sobre larvas; sin embargo, no encontraron eficacia para el control de garrapatas adultas. Recientemente, se he reportado⁽¹³⁾ que las proteínas defensivas producidas por *L. leucocephala* (Lam.) de Wit tuvieron un efecto contra garrapatas adultas de *R. microplus* (56.3 % de eficacia).

Actualmente se encuentran disponibles en el sur sureste de México tres genotipos de *Leucaena*: *L. leucocephala* (Nativa), *L. leucocephala* (Cunningham) y *L. leucocephala* x *L. padilla* (KX2), las cuales han sido ampliamente utilizadas como plantas arbustivas forrajeras en sistemas silvopastoriles tropicales, y que podrían contribuir adicionalmente al control de artrópodos. Por tal motivo, el propósito del presente estudio fue evaluar la actividad acaricida de extractos etanólicos de tres genotipos de *Leucaena* para el control de *R. microplus* en condiciones *in vitro*.

Material y métodos

Sitio experimental

El estudio experimental se desarrolló en el Instituto Tecnológico de la Zona Maya (ITZM), ubicado en la carretera Chetumal–Escárcega en el km. 21.5, el ejido Juan Sarabia, Othón P. Blanco, Quintana Roo, México (18° 30' 58" N y 88° 29' 19" O). La temperatura máxima promedio de la región es de 32.1 °C, la temperatura mínima promedio de 21.7 °C, precipitación anual de 1,180 mm y humedad relativa promedio de 76 a 82 % (<http://smn.conagua.gob.mx>).

Producción de larvas de *Rhipicephalus microplus*

Se colectaron 300 garrapatas adultas ingurgitadas de al menos 25 bovinos del rancho "Las flores" ubicado en el km 4 en el poblado de Xul-ha, Othón. P. Blanco, Quintana Roo, México. Las garrapatas ingurgitadas se colocaron en tubos de vidrio con tapas de algodón y transportadas al Laboratorio de control biológico del ITZM. Las garrapatas fueron lavadas y secadas y posteriormente pesadas. El peso promedio de las garrapatas fue 200 ± 20 mg. Se utilizó un grupo de garrapatas ingurgitadas para la prueba de inmersión de adultos (PIA) y otro grupo de garrapatas ingurgitadas se incubó a 27 ± 1.5 °C y 70 a 80 % de humedad relativa⁽¹⁴⁾ durante dos semanas para permitir la oviposición; los huevos se transfirieron a viales de vidrio de 10 ml con tapa de algodón. La eclosión de las larvas ocurrió aproximadamente 30 días después de la recolección de las hembras ingurgitadas. Larvas de 7 a 14 días de edad se utilizaron para la prueba de inmersión en larvas.

Material vegetal

Se estudiaron tres genotipos de *Leucaena* spp: *L. leucocephala* (Lam.) de Wit (Nativa), *L. leucocephala* (Cunningham) y *L. Leucocephala* x *L. padilla* (KX2). Para ello se colectaron de cada genotipo 25 kg de hoja fresca de diferentes partes de la planta. Las plantas fueron cultivadas y usadas cuando tenían siete meses de edad; se secaron a 60 °C durante 72 h y se pulverizaron con un molino eléctrico tipo Thomas Wiley para obtener partículas de 3 mm.

Elaboración de extractos

El material pulverizado se llevó al laboratorio del ITZM donde se sumergió en 80 % de etanol (etanol absoluto) durante 72 h (800 ml de metanol y 350 g de material pulverizado de cada genotipo). Se usó etanol por ser un disolvente polar general que extraen distintos compuestos polares de interés desde la matriz vegetal (ejemplo terpenos y flavonoides). La extracción etanólica se filtró y evaporó a 45 °C mediante un evaporador rotacional de vacío. Los extractos crudos obtenidos se transfirieron a frascos de cristal y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

Bioensayo con larvas

Para determinar la eficacia de los tres genotipos de *Leucaena* se realizaron bioensayos con larvas empleando la prueba de inmersión de larvas modificada por Soberanes *et al*⁽¹⁵⁾. Se realizaron seis concentraciones (50, 40, 30, 20 y 10 %) de cada genotipo de *Leucaena*. Cada concentración se transfirió en placas de Petri (60 mm x 15 mm de diámetro), y 300 a 500 larvas se colocaron entre dos papeles Whatman No. 1 y sumergidas por 10 min. Aproximadamente 100 larvas se recolectaron con un pincel (No. 4), y transferidas suavemente a un paquete de papel filtro limpio previamente identificado; la abertura del papel filtro se selló con un clip metálico. El grupo control fue expuesto

a Tween 20 (2 %) y agua. Se probaron tres repeticiones por concentración. Los paquetes, se colocaron en charolas y se introdujeron a una incubadora por 48 h a una temperatura de 27 ± 2 °C y 80 a 90 % de humedad relativa.

A las 48 h, se realizó el conteo de larvas vivas y muertas; únicamente las larvas con capacidad de caminar se consideraron vivas. Las larvas sin movimiento, ataxia o movimiento de apéndices fueron consideradas muertas. Para calcular el porcentaje de mortalidad se utilizó la fórmula descrita por Santamaría y Soberanes⁽¹⁶⁾. Asimismo se calculó la eficacia para los diferentes genotipos de *Leucaena*⁽¹⁷⁾.

% Mortalidad= larvas muertas/larvas totales x 100

Media del % mortalidad = (mortalidad 1 + mortalidad 2 + mortalidad 3)/3

%Eficacia = (grupo control-grupo tratado)/grupo control x 100

Bioensayo con adultas

Se formaron 12 grupos homogéneos de 10 garrapatas ingurgitadas cada uno con un peso promedio de 200 ± 20 mg. Se emplearon los mismos extractos de *Leucaena* spp., en las concentraciones de 20 y 10 %; cada uno con tres repeticiones. Los grupos tratados y el grupo control se sumergieron durante un minuto en el extracto diluido y en Tween 20 (2%), respectivamente⁽¹⁸⁾.

Las garrapatas se colocaron individualmente en una placa de cultivo con 24 pozos y se incubaron durante 15 días a las condiciones de temperatura y humedad ya descritas. La mortalidad y sobrevivencia de las garrapatas se registró diariamente con ayuda de un estereoscopio, asimismo, 15 días después de iniciado el bioensayo se registró el peso de los huevos producidos en cada grupo, se colocaron 100 huevos en viales de vidrio en las mismas condiciones y durante 21 días se estimaron los porcentajes de eclosión en los diferentes tratamientos y se compararon con los controles.

Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD)

Para determinar el perfil de metabolitos secundarios de los tres genotipos de *Leucaena* se emplearon placas analíticas de cromatografía para CCD de Sílica gel 60 F₂₆₄ de la marca Merck, así como Sílica gel 60, malla 70-230 (Sigma Aldrich®) para cromatografía por gravedad. Como reveladores cromatográficos se emplearon sulfato cérico (revelador universal), Oleum (Identificación de terpenos) y cloruro de estaño (detección de flavonoides y terpenos)⁽¹⁹⁾.

Análisis estadísticos

La mortalidad larval se calculó a través de la fórmula de Santamaría y Soberanes⁽¹⁶⁾, para el cálculo de la eficacia se utilizó la fórmula reportada por Álvarez *et al*⁽¹⁷⁾. La eficiencia reproductiva (ER) y el porcentaje de reducción de la reproducción estimada (PRRE) se obtuvieron por medio de la ecuación reportada por Rodríguez-Vivas *et al*⁽²⁰⁾, y por último se calculó la concentración letal al 50% (CL₅₀) y su intervalo de confianza al 95% (IC₉₅), mediante el programa de análisis probit. A continuación se presentan las fórmulas para determinar el ER y PRRE.

ER= peso de la masa de huevos X % de eclosión de larvas/ peso inicial de la garrapata

PRRE= ER grupo control- ER grupo tratado/ ER grupo control X100

Resultados

Mortalidad larvaria

Los extractos de los genotipos Cunningham y KX2 al 50 % presentaron 91.7 y 82.0 % de mortalidad y 92.7 y 90.7 % de eficacia respectivamente, contra larvas de *R. microplus*; mientras que el genotipo Nativa alcanzó 54.6 y 75.6 %, respectivamente. Asimismo, se calculó la CL₅₀ de los tres genotipos y se encontró que KX2 necesita 15.8 % (11.9 ± 19.0) de la concentración para matar al 50 % de las larvas, mientras que los genotipos Cunningham y Nativa necesitan 22.2 % (19.2 ± 25.3) y 43.7 % (36.0 ± 19.0), respectivamente.

Mortalidad de adultos, índice de eficiencia reproductiva y reducción de la reproducción estimada

El genotipo Nativa presentó el mejor comportamiento con 50 % de mortalidad a la concentración de 20 %. Asimismo, este genotipo redujo el PRRE en 51.3 %. Los genotipos Cunningham y KX2 presentaron mortalidades ≤20 % y PRRE de 52.0 y 40.8 %, respectivamente (Cuadro 1).

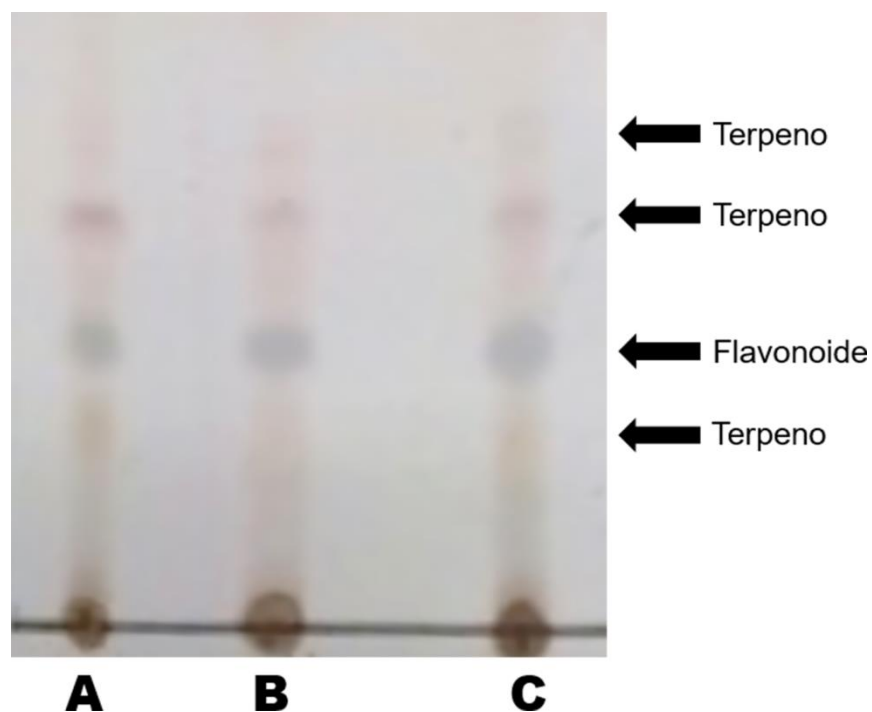
Mediante la CCD no se observaron diferencias en el perfil cromatográfico de los metabolitos mayoritarios de los tres genotipos. Entre los metabolitos encontrados se observaron terpenos y flavonoides, principalmente a polaridad media (Figura 1).

Cuadro 1: Porcentaje de mortalidad e índice de eficiencia reproductiva (IER) y porcentaje de reducción en la reproducción estimada (PRRE) en garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus* expuestas a diferentes concentraciones de *Leucaena* spp.

<i>Leucaena</i> spp.	Mortalidad (%)	IER (%)	PRRE (%)
Control	0	NA	NA
Nativa 20%	50	16.01	51.31
Nativa 10%	0	45.09	13.19
Cunningham 20%	10	4.04	52.04
Cunningham 10%	20	40.36	0.0
KX2 20%	20	42.05	44.55
KX2 10%	10	49.84	40.86

NA= no aplica.

Figura 1: Cromatografía en capa delgada de tres genotipos de *Leucaena* spp.: A) KX2, B) Nativa, y C) Cunningham. Sistema Hexano:AcOEt 8:2, revelador oleoum



Discusión

La leguminosa arbustiva *L. leucocephala* es una planta con amplia distribución en áreas tropicales y sub-tropicales⁽²¹⁾. Ha mostrado gran relevancia debido a la capacidad de desarrollar mecanismos de defensa contra hongos, bacterias e insectos herbívoros^(22,23), por lo que podría ser empleada como una alternativa de control de la garrapata *R. microplus*.

Los genotipos Cunningham y KX2 a la concentración de 50% presentaron 91.7 y 82.0 % de mortalidad contra larvas de *R. microplus* (Cuadro 2). Asimismo, se determinó que se necesita 15.8 % de concentración del genotipo KX2 para matar al 50 % de larvas, mientras que el genotipo Cunningham necesita una concentración de 22.2 %. Estos resultados son similares a los reportados en otro trabajo⁽¹²⁾ donde evaluaron el efecto de un extracto acetónico de *L. leucocephala* contra diferentes fases de *R. microplus*; los autores reportaron que los extractos produjeron una mortalidad en la fase larval de 66.79 %.

Cuadro 2: Porcentaje de mortalidad y eficacia de larvas de *Rhipicephalus microplus* expuestas a diferentes concentraciones de extractos etanólicos de tres genotipos de *Leucaena* spp.

<i>Leucaena</i> spp.	Concentración (%)	Mortalidad (%)	Eficacia (%)
Control	NA	0	NA
Nativa	50.0	54.6	75.6
Nativa	40.0	49.5	67.3
Nativa	30.0	38.7	62.1
Nativa	20.0	28.0	57.0
Cunningham	50.0	91.7	92.7
Cunningham	40.0	78.4	82.0
Cunningham	30.0	62.4	71.0
Cunningham	20.0	29.5	59.3
KX2	50.0	82.0	90.7
KX2	40.0	77.7	83.0
KX2	30.0	64.9	82.0
KX2	20.0	58.4	72.7

NA= no aplica.

En garrapatas adultas se encontró que el genotipo Nativa presentó 50.0 % de mortalidad a una concentración de 20 %; además redujo en el 51.3 % del PRRE. Estos resultados difieren a los obtenidos por Fernández-Salas *et al*⁽¹²⁾ quienes no encontraron efecto en el control de garrapatas adultas. Recientemente⁽¹³⁾ evaluaron el efecto de las proteínas defensivas y la peroxidasa que produce *L. leucocephala*, cuando se encuentran en estrés, contra garrapatas adultas de *R. microplus* adultas, y mencionaron que las proteínas defensivas producidas por *L. leucocephala* redujeron

8.5 % la producción de huevos, 47.7 % la eclosión de larvas y presentaron una eficacia del 56.3 % a una concentración de 0.1 mg/ml. Existen otros estudios que evaluaron el efecto de otras plantas de la familia Fabaceae contra *R. microplus*. Por ejemplo Rosado-Aguilar *et al*⁽⁷⁾ evaluaron el efecto de los extractos de hojas de *Habardia albicans* y *Cesalpinia gaumeri* a una concentración de 20 % y reportaron una baja mortalidad de 23 y 30 %, respectivamente, así como una eficacia moderada en la inhibición de la postura y eclosión de larvas para *H. albicans* (54.4 % y 48.7 %) contra garrapatas adultas de *R. microplus*. Adicionalmente encontraron una mortalidad de 90 a 93 % a una concentración de 10 % para el control de larvas. Por su parte, Singh *et al*⁽²⁴⁾ evaluaron el extracto etanólico de *Dalbergia sissoo* a una concentración del 10 % contra garrapatas adultas de *R. microplus* y reportaron mortalidad, inhibición de la postura y de la eclosión de larvas en 85.0, 55.9 y 0 %, respectivamente. Asimismo, los extractos etanólicos de las hojas *Acacia farnesiana* y *A. harmandiana* a una concentración del 10 % produjeron una mortalidad de 4.0 y 5.0 % contra garrapatas adultas de *R. microplus*, respectivamente⁽²⁵⁾. En otro estudio⁽²⁶⁾ utilizaron los extractos metanólicos de *Stylosanthes humilis* y hojas de *S. hamata* y la eficacia contra larvas de *R. microplus* fue del 82 y 75 %, respectivamente.

La mayoría de estos compuestos naturales tienen modos de acción que difieren de los tratamientos farmacéuticos comerciales disponibles y, por lo tanto, pueden ser eficaces para el control de *R. microplus*. Debido a los buenos resultados que se encontraron en este estudio para el control de larvas y moderado para el control de adultas, los extractos etanólicos de *Leucaena* spp. podrían ser una alternativa para el control de *R. microplus*.

En un estudio⁽²⁷⁾ evaluaron la composición de cuatro genotipos de *Leucaena* spp: Cunningham, K636 (*L. leucocephala*), Nativa y KX2, y reportaron que los cuatro genotipos presentaron taninos condensados y mimosina en diferentes niveles. Las propiedades biológicas de los genotipos de *Leucaena* pueden ser atribuidas principalmente a la presencia y abundancia de taninos, mimosina, fenoles, cumarinas y flavonoides, entre otros. En este estudio únicamente se pudo observar la presencia de terpenos y flavonoides que son los metabolitos mayoritarios en los extractos. El efecto acaricida de terpenos sobre *R. microplus* ha sido reportado previamente^(28,29). Gomes *et al*⁽³⁰⁾ estudiaron el aceite esencial de hojas de *Lippia sidoides* y encontraron que el 67.6 % del aceite contenía timol (compuesto terpeno). Este aceite esencial fue evaluado contra larvas de *R. microplus* y encontraron mortalidades de más de 95 %. Asimismo, se ha determinado la eficacia del extracto natural de *Verbena officinalis* en el control *in vitro* de la garrapata adulta *R. microplus*⁽³¹⁾; los extractos contenían altas concentraciones de flavonoides y presentaron mortalidades de hasta 67 %. Estos estudios refuerzan la eficacia que pueden tener los terpenos y flavonoides para el control de la garrapata *R. microplus*.

El mecanismo de acción de los terpenos y flavonoides sobre artrópodos ha sido estudiado. Se ha demostrado⁽³²⁾ que los monoterpenos contenidos en aceites esenciales de plantas (D-limoneno, mircenol, terpineol, linalool y pulegona) son neurotóxicos para la mosca común (*Musca domestica*) y la cucaracha alemana (*Blattella germanica*). Priestley *et al*⁽³³⁾ sugieren que el timol potencializa

la acción de los receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) en lugares indefinidos en los insectos. En futuros estudios será necesario identificar los metabolitos contenidos en los extractos etanólicos de *Leucaena* que tengan actividad acaricida para probarlos de manera individual o en sinergia.

Conclusiones e implicaciones

Se concluye que los extractos de los tres genotipos de *Leucaena* spp. tuvieron una buena eficacia contra larvas y una moderada eficacia contra garrapatas adultas de *R. microplus*, además de reducir el PRRE. En los extractos se identificaron flavonoides y terpenos que pudieran ser los responsables de la actividad acaricida de los tres genotipos de *Leucaena* spp.; sin embargo, se requiere de más estudios para identificar los metabolitos que tengan una acción individual o en sinergia para el control de *R. microplus*.

Agradecimientos

Se agradece al Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Yucatán, al Instituto Tecnológico Superior de Felipe Carrillo Puerto y al Instituto Tecnológico de la Zona Maya por las facilidades y equipos brindados para realizar el presente estudio y obtener el grado de Maestro en Ciencias en Agroecosistemas Sostenibles del primer autor.

Literatura citada:

1. Rodríguez-Vivas RI, Rosado-Aguilar JA, Ojeda-Chi M, Pérez-Cogollo LC, Trinidad-Martínez I, Bolio-González ME. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosist Rec Agropecu* 2014;1(3):295-308.
2. Rodríguez-Vivas RI, Gris L, Pérez de León AA, Silva VH, Torres-Acosta J, Fragoso-Sánchez H, *et al.* Potential economic impact assessment for cattle parasites in México. *Rev Mex Cienc Pecu* 2017;8(1):61-74.
3. Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arévalo F, Fragoso-Sánchez H, Santamaria VM, Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 2006;336:335-342.
4. Perez-Cogollo LC, Rodriguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Miller RJ. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet Parasitol* 2010;168:165-169.

5. Miller RJ, Almazan C, Ortiz-Estrada M, Davey RB, George JE, De Leon AP. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. *Vet Parasitol* 2013;191:97–101.
6. Arceo-Medina GN, Rosado-Aguilar JA, Rodríguez-Vivas RI, Borges-Argaez R. Synergistic and antagonistic action of fatty acids: sulphides and stilbene against acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* ticks. *Vet Parasitol* 2016;228:121–125.
7. Rosado-Aguilar JA, Arjona-Cambranes K, Torres-Acosta JF, Rodríguez-Vivas RI, Bolio-González ME, Ortega-Pacheco A, *et al.* Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. *Vet Parasitol* 2017;138:66-76.
8. Silva WC, Martins JRS, Cesio MV, Azevedo JL, Heinzen H, De Barros NM. Acaricidal activity of *Palicourea margravii* a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 2011;179:189–194.
9. Ravindran R, Juliet S, Sunil AR, Ajith Kumar KG, Nair Suresh N, Amithamol KK, *et al.* Ecllosion blocking effect of ethanolic extract of *Leucas aspera* (Lamiaceae) on *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Vet Parasitol* 2011;179:287–290.
10. Koc S, Oz E, Cinbilgel I, Aydin L, Cetin H. Acaricidal activity of *Origanum bilgeri* P.H. Davis (Lamiaceae) essential oil and its major component, carvacrol against adults *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2013;193:316–319.
11. Dantas AC, Araujo A, Marques AG, Branco A, Sangioni LA, Guedes JR, *et al.* Acaricidal activity of *Amburana cearensis* on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Ciencia Rural* 2016;46:536-541.
12. Fernández-Salas A, Alonso-Díaz MA, Acosta-Rodríguez R, Torres-Acosta FJ, Sandoval-Castro CA, Rodríguez-Vivas RI. *In vitro* Acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2011;175:113-118.
13. Wanderley LF, Rodrigues-Batista KL, de Carvalho JF, da Silva-Lima A, Alves-Landulfo G, dos Santos Soares, *et al.* The first assessment of the stress inducible defense of *Leucaena leucocephala* with acaricidal potential effect against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Braz J Vet Parasitol* 2017;26(2):171-176.
14. Rosado-Aguilar JA, Aguilar-Caballero AJ, Rodríguez-Vivas RI, Borges-Argaez R, García-Vázquez Z, Méndez-González, M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Vet Parasitol* 2010;168:299-303.
15. Soberanes CN, Santamaría VM, Fragoso SH, García VZ. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Téc Pecu Méx* 2002;40:81-89.

16. Santamaría VM, Soberanes CN. Curso-Taller sobre diagnóstico de resistencia a ixodícidas en garrapatas *Boophilus microplus.*, Jiutepec, Morelos, México 2001;1-121.
17. Álvarez-Colom O, Neske A, Popich S, Bardón A. Toxic effects of Annonaceous Acetogenins from *Annona cherimolia* (Magnoliales: Annonaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J Pest Sci 2007;80:63-67.
18. Rosado-Aguilar A, Aguilar-Caballero A, Rodríguez-Vivas RI, Borges R, Méndez M, Dorantes A, *et al.* Evaluation of three solvents as vehicle of crude methanolic plant extract in the larval immersion test using *Boophilus microplus* ticks. 21st Int Conf WAAVP, Gent, Belgium 2007;634.
19. Gibbons S. An introduction to planar chromatography. Sarker SD, *et al.*, editors. Natural products isolation. New Jersey, U.S.A. Humana Press; 2006:77–116.
20. Rodríguez-Vivas RI, Cob GL. Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México 2005.
21. Geiger CA, Napompeth B, Van Den Beldt R. An update on the status of *Leucaena* Psyllid in Southeast Asia. In: Shelton HM, *et al.*, editors. *Leucaena*—opportunities and limitations. In: Proc Int Workshop. Bogor, Indonesia, Canberra 1995;125–128.
22. Eck G, Fiala B, Linsenmair KE, Bin Hashim R, Proksch P. Trade-off between chemical and biotic anti-herbivore defense in the South East Asian plant genus *Macaranga*. J Chem Ecol 2001;10:1979–1996.
23. Heil M, Baumann B, Andary C, Linsenmair KE, McKey D. Extraction and quantification of “condensed tannins” as valuable measure of plant anti-herbivore defence? Naturwissenschaften 2002;89:519–524.
24. Singh NK, Vemu B, Prerna M, Singh H, Dumka VK, Sharma SK Acaricidal activity of leaf extracts of *Dalbergia sissoo* Roxb. (Fabaceae) against synthetic pyrethroid resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet Sci 2016;106:1–6.
25. Chungsamarnyart N, Jiwajinda S, Jansawan W. Larvicidal effect of plant crude-extracts on the tropical cattle tick (*B. microplus*). Thail Kasetsart J Nat Sci Suppl 1991;25:80–89.
26. Muro-Castrejón FC, Cruz-Vázquez M, Fernández-Ruvalcaba J, Molina-Torres J, Soria Cruz J, Ramos-Parra M. Repellence of *Boophilus microplus* larvae in *Stylosanthes humilis* and *Stylosanthes hamataplants*. Parasitol Latinoam 2003;58:118–121.
27. Ahmed M, Solorio-Sánchez F, Ramírez-Avilés L, Elsaid-Mahdy R, Castillo-Camaal J. Tannins and mimosine in *Leucaena* genotypes and their relations to *Leucaena* resistance against *Leucaena psyllid* and *Onion thrips*. Agrofor Syst 2016;91:1-8.

28. Ferraz A de BF, Zini JM, Zini CA, Sardá-Ribeiro VL, Bordignon SAL, von Poser G. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three piper species. *Parasitol Res* 2010;107:243–248.
29. Gomes GA, Monteiro CM, Senra TO, Zeringota V, Calmon F, Matos RS, *et al.* Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lipia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: ixodidae). *Parasitol Res* 2012;111:2423–2430.
30. Gomes GA, Monteiro CM, Julião L de S, Maturano R, Souza TO, Zeringóta V, Calmon F. da Silva R, Daemon E, de Carvalho MG. Acaricidal activity of essential oil from *Lipia sidoides* on unengorged larvae and nymph of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: ixodidae). *Exp Parasitol* 2014;137:41–45.
31. Pulido NJ, Cruz A. Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Corpoica Cienc Tecnol Agropec* 2013;14:91–97.
32. Coats R, Karr LL, Drewes CD. Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. In: Hedin P. editor. *Natural occurring pest bioregulators*. Am Chem Soc Symp Series 449, 1991:305e316.
33. Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Satelle DB. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British J Pharmacol* 2003;140:1363.