



UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL
DE LOS LLANOS OCCIDENTALES "EZEQUIEL ZAMORA"
VICERRECTORADO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA.
SUBPROYECTO APLICACIÓN DE CONOCIMIENTOS II



**CIPERMETRINA Y BIORREGULADORES EN EL
CONTROL DE LA GARRAPATA DEL GANADO
BOVINO *Rhipicephalus microplus***

AUTOR(ES):

Eduard Barrios

Yulitza Toro

TUTOR:

Luisa Rivero

Guanare, noviembre 2023

UNIVERSIDAD NACIONAL EXPERIMENTAL
DE LOS LLANOS OCCIDENTALES “EZEQUIEL ZAMORA”
VICERRECTORADO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA.
SUBPROYECTO APLICACIÓN DE CONOCIMIENTOS II

**CIPERMETRINA Y BIORREGULADORES EN EL
CONTROL DE LA GARRAPATA DEL GANADO
BOVINO *Rhipicephalus microplus***

AUTOR(ES): Eduard Barrios C.I 24018287

Yulitza Toro C.I 26811878

TUTOR: Luisa Rivero

Guanare, noviembre 2023

VEREDICTO

CIPERMETRINA Y BIORREGULADORES EN EL CONTROL DE LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO *Rhipicephalus microplus*

Autores:

Eduard Barrios

Yulitza Toro

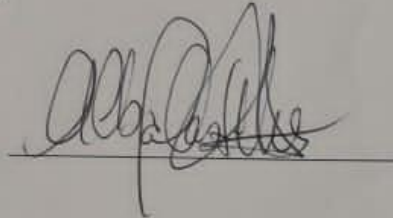
Guanare, noviembre 2023

Este trabajo ha sido aceptado en forma y contenido como requisito para optar al título de Ingeniero en Producción Animal del Vicerrectorado de Producción Agrícola de la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales "Ezequiel Zamora"



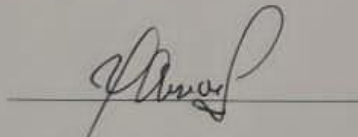
Luisa Rivero

Tutor



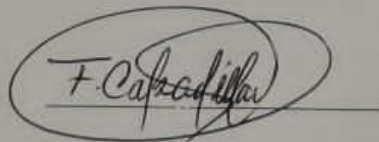
Albany Castillo

Jurado



Yumaris Arias

Jurado



Fernando Calzadilla

Coordinador del sub-proyecto



INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE FIGURAS.....	i
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	4
Objetivo General	
Objetivo Específicos	
REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	5
BASES TEORICAS.....	8
Garrapatas, ectoparásitos perjudiciales para el ganado	8
bovino.....	9
Acciones nocivas de las garrapatas	
.....	
<i>Rhipicephalus microplus</i>	10
Control de las garrapatas	10
Control químico	11
Cipermetrina	12
El control biológico	13
<i>Beauveria bassiana</i> (teleomorfo: <i>Cordyceps bassiana</i>)	15
Reproducción asexual	
Morfología microscópica	
Morfología macroscópica	
Modo de acción	
<i>Metarhizium</i>	<i>anisopliae</i> 17
.....	
Características microscópicas	
Características macroscópicas	
Modo de acción	
Extracto	vegetal 18
.....	
Modos de acción del extracto vegetal	
Tipos de extractos vegetales: etanólicos acuosos	20
Uso de Extractos Vegetales en el sector agrícola.	

MORERA (<i>Morus alba</i>)	
Clasificación Taxonomía	
METODOLOGÍA	23
	23
Ubicación del área de estudio	24
Características agroecológicas de la zona	
Población y muestra	25
Tipo de investigación.....	25
DESCRIPCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS.....	26
DISEÑO METODOLÓGICO.....	26
I. Fase de campo	
II. Fase de laboratorio	
I. FASE DE CAMPO	26
1-. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	
1.1-. Recolección de los individuos (garrapatas)	
1.2-. Recolección de las muestras	27
1.3-. Manipulación y traslado de los individuos	
1.4-. Manipulación y traslado de las muestras	
1.5-. Descripción del producto químico utilizado	
II. Fase de laboratorio	29
1-. Reactivación de los entomopatógenos <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metharizium</i> <i>anisopliae</i>	
1-. Multiplicación de los entomopatógenos <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisopliae</i> en estrato	31 32
1.2-. Determinación de los parámetros de calidad	
1.2.1-. Determinación de la concentración de conidios	
1.2.2-. Determinación de la Viabilidad de conidios	
2-. Preparación del extracto acuoso de Morera (<i>Morus alba</i> .)	34
.....	
3-. Determinación del efecto in vitro, de cuatro tratamientos sobre el control de la fase adulta de la garrapata del bovino <i>R. microplus</i>	35
Materiales y equipos	36

INDICE DE FIGURAS

N°	DESCRIPCION	Pag.
1	Planta de Morera (<i>Morus alba.</i>)	22
2	Ubicación del área estudio.	23
3	Cipermetrina, producto comercial.....	29
4	Adultos de <i>R. microplus</i> , Desinfección de <i>R. microplus</i>	30
5	Multiplicación de los entomopatógenos <i>B. bassiana</i> y <i>M. anisioplae</i>	31
6	Prueba de concentración de conidios.....	32
7	Cámara de Neubauer y conteo de conidios bajo microscopio óptico	33
8	Preparación del extracto vegetal de <i>M alba.</i>	35
9		

CIPERMETRINA Y BIORREGULADORES EN EL CONTROL DE LA GARRAPATA DEL GANADO BOVINO *Rhipicephalus microplus*

Autores:

Eduard Barrios

Yulitza Toro

Guanare, noviembre 2023

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la eficacia de algunos biorreguladores y de la Cipermetrina en el control *in vitro* de la garrapata adulta *Rhipicephalus microplus*, se utilizó *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y extracto de hojas de *Morus alba*, además de un garrapaticida cuyo principio activo es Cipermetrina. Los ensayos fueron *in vitro*, mediante la técnica de inmersión de adultas, cada tratamiento consistió en seis frascos con cinco individuos de *R. microplus*, para un total de treinta insectos adultos por tratamiento, se empleó un testigo absoluto que se le aplicó solamente agua destilada. Las unidades experimentales (frascos), se colocaron en condiciones de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50% de humedad relativa. Las observaciones se realizaron cada 24 horas durante siete días, se contabilizaron individuos vivos, muertos y vivos sin movimiento. *M. anisopliae* y *B. bassiana* tuvieron mayor efectividad en el control de garrapatas con un 100% de mortalidad al final del experimento. A pesar que la Cipermetrina no eliminó el total de las garrapatas, la diferencia con respecto a los tratamientos anteriores es muy similar, por lo tanto, estadísticamente se consideran resultados iguales. El extracto vegetal fue el que presentó menor efectividad pero aun así logró eliminar 83,33% de las garrapatas. *B. bassiana* y *M. anisopliae* arrojaron resultados similares, desde el punto de vista estadístico, con respecto a la Cipermetrina, pero si se considera el costo de aplicación, el efecto tóxico sobre la salud del animal e incluso sobre la salud humana, así como el impacto ambiental y el efecto residual, se puede establecer que los biorreguladores son una mejor opción frente al producto químico

Palabras clave: Control biológico, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Morus alba*, *Rhipicephalus microplus*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se reconocen más de 907 especies de garrapatas distribuidas en el mundo (Cortés-Vecino *et al.* 2010); sin embargo, la especie *Rhipicephalus microplus* es conocida como la garrapata común del ganado bovino y como el parásito externo que vive con mayor frecuencia sobre animales en las regiones en Centro, Sudamérica (González *et al.* 2011), Australia y parte de África (Cortés *et al.* 2010). Las infestaciones de la garrapata del ganado, producen el mayor problema global de ectoparásitos en ganado de regiones tropicales y subtropicales, provocando grandes pérdidas económicas en la producción bovina.

Rhipicephalus microplus 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 (Rodríguez *et al.* 2014). La pérdida de peso de un bovino parasitado por garrapatas del género *Rhipicephalus* se calcula en 0,26 kg garrapata/año y se ha observado que animales infestados con garrapatas reducen su consumo de alimento (4,37 kg) en comparación con animales no expuestos a garrapatas (5,66 kg). Estos efectos ocasionan pérdidas de varios miles de millones de dólares en la economía pecuaria mundial (Rodríguez *et al.* 2014).

Actualmente, el control curativo y preventivo de este parásito en Venezuela es realizado principalmente con la aplicación de compuestos químicos ixodicidas de las familias de los organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, lactonas macrocíclicas, fipronil y fenilpirazolonas, cuya efectividad está disminuida debido al uso inadecuado e indiscriminado, ocasionando problemas de resistencia en el campo (Abbas *et al.* 2014), así como también, la presencia de residuos en los productos cárnicos, lácteos y el medio ambiente.

Según Pérez (2006), cuando un acaricida es utilizado de manera intensiva, ocasiona una fuerte presión de selección que elimina los individuos susceptibles y el acaricida se convierte, en el agente de selección más importante. De hecho, el uso indistinto de ixodidas ha contribuido al desarrollo de resistencia que corresponde a un proceso evolutivo que aparece por selección genética y que conduce a la ineficacia de los productos químicos.

Todos estos factores, aunados al alto costo que resulta desarrollar nuevos acaricidas, han hecho necesario la búsqueda de nuevas alternativas (Fernández *et al.* 2012), destacándose como promisorios los métodos de control biológico mediante el empleo de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Rodríguez *et al.* 2014) y del extracto de hojas de morera *Morus alba*

Los hongos *M. anisopliae* y *B. bassiana* son los que con mayor frecuencia se han evaluado en el control de la garrapata *R. microplus* y muestran las mejores perspectivas como agentes de control biológico. En los últimos años, se han desarrollado más de 170 micoplaguicidas alrededor del mundo. Paralelamente, se ha empleado la nanotecnología para desarrollar formulaciones fúngicas, como por ejemplo, la microencapsulación de las conidias de *M. anisopliae* para protegerlas de las condiciones climáticas adversas e incrementar su eficacia (Fernández-Salas *et al.* 2012).

La planta seleccionada para la investigación *Morus alba* (morera) fue seleccionadas con base a la tradición popular como insecticida y además por revisión bibliográfica de trabajos previos (Rodríguez *et al.* 2015) en los que se obtuvieron buenos resultados con el uso de esta planta. Además, se consideró que en su composición química tiene sustancias como alcaloides, taninos, cumarinas, saponinas, flavonoides o nicotina (Rodríguez *et al.* 2015).

El hecho de que estos productos estén formulados con base en organismos vivos, implica un comportamiento variable tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, debido a diferentes factores, tales como las condiciones ambientales donde se realizan

las pruebas, el estado evolutivo de las garrapatas expuestas al hongo, el origen de los aislados y las características metodológicas de cada ensayo (Fernandes y Bittencourt 2008), lo cual ha sido documentado en diferentes investigaciones en varias partes del mundo.

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de fitopatología de la Unellez VPA, con muestras de garrapatas recolectadas del ganado bovino de las unidades del área de producción de la universidad, sometidas al efecto in vitro de las cepas de entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, extracto de hojas de *Morus alba* y tratamiento con químico comercial con el principio activo Cipermetrina, usado para el baño del ganado, con el fin de evaluar su efectividad.

OBJETIVOS

General

- Evaluar la eficacia, in vitro, de la aplicación de Cipermetrina, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y extracto de *Morus alba* sobre el control de la fase adulta de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

Específicos

Comparar *in vitro* *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, extracto de *Morus alba* y Cipermetrina sobre *Rhipicephalus microplus*

Calcular el porcentaje de mortalidad post tratamientos de individuos de *Rhipicephalus* tratados con *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, extracto de *Morus alba* y Cipermetrina

Estimar el costo para la aplicación de los tratamientos en estudio

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antecedentes o estudios previos

Bautista *et al.* (2021), realizaron una investigación para evaluar la patogenicidad in vitro de las cepas MM0801 y CD0804 de *Metarhizium anisopliae* sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Evaluaron cinco concentraciones 3×10^4 , 3×10^5 , 3×10^6 , 3×10^7 , 2.6×10^8 de conidios/ml de *M. anisopliae* sobre garrapatas en estado adulto recolectadas vivas de bovino de la cuenca lechera de Catazajá, Chiapas, México. Las garrapatas fueron susceptibles al hongo entomopatógeno encontrando una mortalidad del 50 % donde la Concentración Letal Media obtenida fue de $6,58 \times 10^6$ conidios/ml de la cepa MM0801. Se concluye que *M. anisopliae* influye en el grado de virulencia de la garrapata, lo cual puede ser una alternativa de control biológico de la garrapata en el trópico húmedo mexicano.

Ruela *et al.* (2019), realizaron un ensayo para evaluar la eficacia in vitro de tres concentraciones de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre el control de adultos de *Rhipicephalus microplus*. El estudio se realizó en el Laboratorio de Biocontroladores Pedro Ortiz del Instituto Nacional de Sanidad Agrícola Integral (INSAI), ubicado en Maturín, Monagas. . Para ello prepararon concentraciones de 10^7 ; 10^8 y 10^9 conidios/ml y un testigo con agua estéril. Recolectaron manualmente garrapatas adultas en bovinos de diferentes edades en el municipio Freites, estado Anzoátegui. Utilizaron un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial 3x3 con cinco repeticiones. Las garrapatas fueron asperjadas con los hongos y fueron incubadas durante 14 días. Se determinó que *M. anisopliae* y *B. bassiana* afectaron significativamente en 84 y 77,33%, respectivamente, la mortalidad de las teologinas de *R. microplus*. *Metarhizium anisopliae* resultó superior a *B. bassiana*, siendo la concentración de 10^9 conidios/ml la más efectiva con un 89,02% de mortalidad y 88,23% de eficacia.

Álvarez *et al.* (2017), efectuaron infestaciones artificiales, en establo de terneros *Bos taurus x Bos taurus*, para obtener teleoginas suficientes de *Rhipicephalus microplus*, posteriormente llevaron a cabo aspersiones, *in vitro*, de éstas con cepas de los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, cultivados en laboratorio, para determinar su patogenicidad y el eventual uso en programas de control. Para las aspersiones utilizaron diferentes concentraciones en conidias/ml. Como indicadores, se midió el porcentaje de mortalidad y el de inhibición de la oviposición. Se encontró que las cepas, BM-BL04 y BM-MSG06, lograron controlar la población de adultas en más de un 96%. La mezcla, entre las cepas BM-MSG06 y BM-BL04, en ambas dosis redujo la oviposición de las hembras casi en un 100% en ambos casos, seguidas de la cepa BM-MSG06 y la BM-BL04 aplicadas de forma individual.

Pulido *et al.* (2015), evaluaron la eficacia *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* para el control de la fase adulta de *Rhipicephalus microplus*, en Tunja, Colombia. Usaron la prueba de inmersión de adultas para evaluar la eficacia de la cepa MaF1309[®] de *M. anisopliae* a las siguientes concentraciones: 1×10^4 , 1×10^6 y 1×10^8 conidias/ml. Los resultados mostraron que en las garrapatas tratadas a una concentración de 1×10^8 conidias/ml se alcanzó el 100% de mortalidad a los 14 d postratamiento (PT), mientras que las concentraciones 1×10^6 y 1×10^4 conidias/ml alcanzaron el 100% de mortalidad a los días 16 y 20 PT, respectivamente. La mortalidad fue directamente proporcional a la concentración empleada del hongo, siendo las garrapatas tratadas con concentraciones mayores aquellas que alcanzaron una mortalidad en menor tiempo.

Rodríguez *et al.* (2015), evaluaron la eficacia del extracto de *Morus alba* y *Gliricidia sepium* en el control *in vitro* de la garrapata adulta (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) y su oviposición, para ello las hojas de cada planta se sometieron a secado, que se utilizaron para la preparación del extracto hidroalcohólico, obtenido por el método de maceración, los ensayos fueron *in vitro*, mediante la técnica de

inmersión de adultas y se usó el extracto puro y la dilución 1:2. Se utilizaron garrapatas adultas que fueron expuestas a los extractos de cada planta. A las 24, 48, 72 y 96 h de exposición, se realizó la lectura de mortalidad, donde se tomó como mínimo eficaz, una mortalidad del 60 %. Se efectuaron pruebas cualitativas para determinar la presencia de metabolitos secundarios. Los resultados mostraron que el extracto puro de morera, produjo una mortalidad del 73,3 % y con la dilución 1:2, una mortalidad del 40 % y el extracto de matarratón, manifestó una mortalidad del 53,33 % en garrapata adulta. Para la inhibición de la oviposición el extracto puro de morera expuso 73,01 % de inhibición y para la dilución 1:2 reveló 26,21 % de inhibición y el matarratón mostró con el extracto puro una inhibición del 58 %, concluyeron que el extracto que presentó el mejor índice de mortalidad sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e inhibición en la oviposición, fue el obtenido con la planta *Morus alba* y se encontró presencia de alcaloides y cumarinas.

Raymond *et al.* (2004), estudiaron la actividad biocontroladora de dos aislamientos de *Metarhizium anisopliae* (Mt019 y Mt020) sobre la garrapata *Boophilus microplus*, utilizaron un diseño completamente al azar que evaluó tres tratamientos aplicados por aspersión: cultivo en agar tradicional (EM), medio más activador de patogenicidad inespecífico (S) y este mismo medio adicionado de un activador específico para la garrapata (SA). La unidad experimental fue un grupo de diez teleoginas (cinco réplicas) y la concentración del hongo fue constante a 108 conidios ml⁻¹. El análisis de resultados demostró efecto de los activadores de patogenicidad en los dos hongos evaluados, concluyeron que el uso de activadores de patogenicidad durante la fase de cultivo es un proceso que asegura un mejor efecto biocontrolador de los hongos sobre la garrapata.

Arguedas (2008), evaluó la eficacia de *Metarhizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* a través de un ensayo con fase *in vitro* e *in vivo*. Determinando la efectividad del hongo sobre los distintos estadios, evaluando la reducción en la

eclosión de huevos, la elevada mortalidad de larvas y teleoginas así como la disminución del número de garrapatas por animal.

López *et al* (2009), evaluaron la efectividad de ocho cepas de *Metarhizium anisopliae* frente a la garrapata bovina *Boophilus microplus*, llevando a cabo el ensayo en laboratorio y en campo. Se tuvo en cuenta el efecto negativo sobre la reproducción de la garrapata (oviposición), reducción de la viabilidad del huevo y disminución de la infestación por garrapatas comparando diferentes cepas y concentraciones.

Garrapatas, ectoparásitos perjudiciales para el ganado bovino

Las garrapatas son artrópodos hematófagos obligados, tienen un impacto especial en el trópico. Pertenecen a la clase Arachnida, orden Acari o Acarina, donde a su vez se dividen en dos familias: Ixodidae y Argasidae, garrapatas duras y garrapatas blandas respectivamente, destacando en el primer caso los géneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* y *Rhipicephalus*. Además, son importantes vectores de un gran número de agentes patógenos causales de enfermedades en personas y animales como bacterias, rickettsias, protozoos o virus. Adicional a lo anterior, estos ectoparásitos pueden generar daños directos como: la acción traumática, tóxica, infecciosa y exfoliatriz; pero también pueden causar daños indirectos que se evidencian en el deterioro de la piel, disminución en la producción de carne y leche, crecimiento retrasado y predisposición de contraer enfermedades transmitidas por estas como por ejemplo la fiebre de la garrapata (Polanco 2016).

Los bovinos son animales susceptibles a la infestación de las garrapatas, dando lugar a efectos negativos y enfermedades que complican la producción de carne, cuero y leche, ya que las garrapatas son vectores de varias enfermedades como, por ejemplo, la fiebre de la garrapata que se describe como una enfermedad febril del ganado por la transmisión de parásitos protozoarios como *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Rickettsia* y *Anaplasma marginale*; estos son hemoparásitos. En la fase aguda la

clínica se va a caracterizar por presentar fiebre y anemia, acompañada de falta de apetito, pérdida de peso, baja producción de leche e incluso el riesgo de muerte para el animal.

Acciones nocivas de las garrapatas

Primero, la acción traumática ya que las garrapatas tienen órganos de fijación muy fuertes y agresivos; capaces de desgarrar la piel y los vasos sanguíneos, presentando diferentes efectos como dolor, cojera, trastornos visuales y auditivos, paresia facial y de los párpados, también alopecia e infecciones secundarias por bacterias y larvas de mosca. Segundo, la acción tóxica se debe a que el parásito elimina una serie de sustancias causando “un grado de toxicidad variable en el huésped, provocando daño en tejidos, órganos y por ende en las funciones vitales del huésped”, así mismo estos parásitos en sus piezas bucales segregan sustancias químicas anticoagulantes, vasodilatadoras o hemolíticas, que pueden aumentar la permeabilidad vascular causando edema, infiltración e inflamación, además de enzimas y neurotoxinas capaces de inhibir al sistema inmune y el metabolismo, llegando a producir prurito e inflamación papulosa . Tercero, la acción irritativa se debe a componentes enzimáticos de la saliva al sobre-estimulación de fibras nerviosas, causando una reacción de hipersensibilidad que posteriormente produce prurito. Cuarto, la acción exfoliatriz o sustractora, las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados en todos sus estadios, destacando a las hembras ya que la media de sangre ingerida hasta su repleción oscila entre 0,3-0,5 c.c. La importancia de esta acción radica en que es el origen de la anemia y debilitamiento general haciendo al animal más susceptible a otras infecciones y/o enfermedades, a razón de la sustracción de la sangre y todos los elementos nutricionales acompañantes. Por último, la acción inoculadora, es consecuencia de la actividad del parásito en el hospedero y consiste en la introducción de otros patógenos (Polanco 2016).

Cabe resaltar que las garrapatas pueden transmitir los patógenos entre fases (transmisión transestadial) y entre una generación y la siguiente (transmisión transovárica).

Rhipicephalus microplus

Más comúnmente conocida como la garrapata común del ganado, es un artrópodo de distribución cosmopolita endémica en varias regiones del mundo destacando Centroamérica y Suramérica. Morfológicamente es una garrapata dura que tiene un tamaño medio y rostro corto. Las hembras presentan un escudo en forma de pera, los ojos se ubican en los bordes laterales del escudo, carece de festones, el surco anal no es bien definido y sus espiráculos son redondeados. En cuanto a los machos, estos presentan cuatro placas ventrales; dos adanales y dos accesorias, además de un proceso caudal o cola, destacando que la coxal es bífida. En cuanto a su ciclo de vida, se ha establecido que es una garrapata evolucionada y adaptada ya que necesita de un único huésped para que todos sus estadios se desarrollen. Entre los hospederos se encuentran bovinos, búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres (Polanco 2016).

Control de las garrapatas

Los métodos de control para la garrapata *Rhipicephalus microplus*, se dividen en químicos y no químicos. Los primeros rompen el ciclo de vida de la garrapata mediante la aplicación de ixodicidas en intervalos de tiempo determinados mientras que en el segundo caso se emplean métodos sostenibles y más amigables con el medio ambiente, el ganado y sus productos. Especialmente el control de *R. microplus* se ha basado en el uso de ixodicidas; compuestos químicos pertenecientes a la familia de los organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazolonas e inhibidores del desarrollo que, con el tiempo y la mala aplicación de los mismos, han provocado el surgimiento de cepas de garrapatas resistentes a estos acaricidas. En cuanto a los métodos no químicos, se encuentran los inmunológicos (vacunas), genéticos (cruces con razas de bovinos resistentes),

biológicos (microorganismos y depredadores naturales), manejo de praderas (rotación, descanso y quema) y el control integrado. Es de resaltar que el control integrado de garrapatas consiste en la asociación del medio ambiente y el ciclo de vida de la plaga, utilizando una combinación de técnicas y métodos compatibles para un adecuado control de la población de garrapatas, con la disminución drástica de la frecuencia de los tratamientos químicos y el apoyo de herramientas como las técnicas moleculares, el conocimiento de la distribución espacial las garrapatas y las poblaciones resistentes, simulación de modelos, imágenes satelitales y control biológico (González 2011).

Control químico

Los químicos disponibles, que se utilizan para el tratamiento de ectoparásitos de importancia en medicina veterinaria, son sistémicos, todos los ixodicidas son neurotóxicos, y ejercen su efecto sobre el sistema nervioso de los ectoparásitos. Los métodos tradicionales del tratamiento ixodicida, para el control de garrapatas requieren de formulaciones que se diluyan en agua y se apliquen por aspersion o inmersión en los animales. Además se incluyen los métodos de derrame (pour-on), inyectables, bolos intraruminales, aretes impregnados con ixodicidas y feromonas. Entre los principales ixodicidas que se utilizan para el control de garrapatas se encuentran los organoclorados (OCs), OFs, PSs, Am, fenilpirazoles, reguladores del crecimiento y los endectocidas denominadas lactonas macrocíclicas (LM)(19,20,21). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha provocado la selección de poblaciones de garrapatas resistentes, debido a la fuerte presión que elimina a los individuos susceptibles, por lo que se disminuye progresivamente el efecto y se elevan los costos de desarrollo de nuevos ixodicidas. La resistencia mundial a los acaricidas se encuentra bien documentada (Rodríguez *et al.* 2007).

Cipermetrina

La cipermetrina según De Liñan (2015), es un insecticida piretroide de amplio espectro. Se sintetizó en 1974 y fue comercializada por primera vez en 1977 como un

piretroide sintético altamente activo, actúa a nivel sistema nervioso, generando una alteración de la transmisión del impulso nervioso. Los piretroides funcionan manteniendo abiertos los canales de sodio en las membranas de las neuronas. Los piretroides afectan tanto el sistema nervioso periférico (SNP) como el central del insecto (SNC). Inicialmente estimulan las células nerviosas a producir descargas repetitivas y eventualmente causan parálisis. Tales efectos son causados por su acción sobre el canal de sodio, un hueco diminuto que le permite a los iones de sodio penetrar al axón y causar excitación nerviosa. Existe una acción directa tóxica, y una indirecta de repelencia. Sobre el insecto origina una excitación primaria del sistema nervioso periférico, que hace que el insecto agite sus miembros y alas, alejándose del lugar de tratamiento (flushing-out). Luego, el insecticida se absorbe a través del exoesqueleto quitinoso de los artrópodos, tras lo cual estimula el sistema nervioso central, posiblemente por interferencia competitiva con la conductancia catiónica en la capa lipídica de las células nerviosas, bloqueando la transmisión del impulso nervioso. Una vez que la molécula ingresa al cuerpo del insecto, provoca una parálisis del sistema nervioso central -SNC (período de residencia) y el insecto queda paralizado y al no poder alimentarse durante más de 120 horas, muere por inanición. En los insectos adultos, también impide o altera la ovoposición y la eclosión de larvas.

Toxicidad

Puede producir una leve irritación en la dermis y moderada irritación en los ojos. La cipermetrina es un irritante ocular y sensibilizante de la dermis. Puede ser mutágeno, teratógeno o carcinógeno y no se acumula en tejidos grasos.

Los trabajadores expuestos sin protección facial a piretroides sintéticos, incluida la cipermetrina, suelen reportar una sensación transitoria de ardor u "hormigueo" en la cara, que se produce generalmente unos 30 minutos después de la exposición al piretroide

En humanos

La cipermetrina, como todo piretroide, no es mortal para el ser humano, pero puede llegar a producir efectos crónicos tales como vómitos, mareos permanentes, vértigo o migraña.

En caso de ingestión no se debe inducir al vómito, sino que se debe enjuagar la boca con abundante agua limpia, y luego concurrir al médico de emergencia. Tampoco se debe dar de beber leche ni sustancia grasa alguna.

En términos de toxicidad humana, la ingesta diaria admisible (IDA) es del orden de: $0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$.

Ecotoxicidad

En términos de ecotoxicología, se observan dosis letales 50 (DL50) cuyo orden de magnitud se muestra a continuación:

- CL50 para peces : $5\times 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,
- CL50 para Daphnias : $3\times 10^{-4} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,
- CL50 para algas : $> 0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Es altamente tóxico para las abejas y extremadamente tóxico para los peces.

El control biológico

Consiste en la liberación de enemigos naturales para controlar y reducir la población de plagas. Hay diferentes tipos de control biológico; el clásico, consiste en la introducción de una especie exótica para el control de la plaga; el aumentativo que incrementa la población de enemigos naturales mediante crías en laboratorio; y por conservación que se basa en la modificación del entorno y las prácticas con el fin de aumentar los enemigos naturales ya existentes en el entorno. Ahora bien, el control biológico de las garrapatas se realiza mediante agentes biológicos como hongos entomopatógenos (*Metarhizium sp*; *Beauveria sp*), bacterias (*Cedecea lapagei*, *Escherichia coli* y *Enterobacter agglomerans*), nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditidae* y *Steinernematidae*) y hormigas reguladoras (*Solenopsis*

germinata, *S. saevissima*, *Camponotus rengira* y *Ectatomma quadridens*); que se caracterizan por afectar principalmente los estadios de vida libre, impactando en diferentes estadios del ciclo de vida de la garrapata (González 2011).

Los hongos son organismos eucariotas (núcleo celular organizado y membrana nuclear bien definida), aerobios, heterótrofos, con una pared celular rígida compuesta de polisacáridos, polipéptidos y quitina, no motiles, presentan un crecimiento apical, es decir del centro hacia afuera, se reproducen sexual y/o asexualmente, pueden ser unicelulares en el caso de las levaduras o pluricelulares conocidos como hongos filamentosos y se pueden dividir en dos grupos según su coloración; hialinos y dematiáceos. Además, se caracterizan por crecer en muchos sustratos teniendo en cuenta factores como la disponibilidad de carbohidratos, nitrógeno, humedad y temperatura. Por otro lado, los hongos no son fotosintéticos debido a la ausencia de cloroplasto y son clasificados como heterótrofos; en general su nutrición es por absorción de sustancias simples o complejas, la realizan como organismos saprófitos que toman nutrientes de la materia orgánica muerta o en estado de descomposición y/o como parásitos cuando se nutren de materia viva (Monzón 2001).

Para poder desarrollarse, los hongos necesitan carbohidratos como fuente de carbono en especial glucosa, sacarosa y maltosa; nitrógeno, agua y iones como; potasio, fósforo, magnesio y en menor medida hierro, zinc, cobre y molibdeno. La mayoría de los géneros crecen entre 0 y 55°C, con un rango ideal entre 20-30°C, se desarrollan en rangos de pH entre 5,6 y 6,8 y aunque la luz no es vital para ellos, en algunos casos influye en la esporulación del mismo.

Ahora bien, entre los diversos géneros de hongos que presentan propiedades entomopatógenas, se destacan: *Metarhizium sp.*, *Beauveria sp.*, *Entomophthora sp.*, *Fusarium sp.*, *Paecilomyces sp.* y *Verticillium sp.* Aquellos hongos que se utilicen como biocontrol deben garantizar la inocuidad tanto para las personas como para los animales y deben generar daños mínimos en las plantas y el ambiente; por

consiguiente, el uso de estos hongos involucra ciertos procesos a tener en cuenta para lograr una producción masiva, por ejemplo la preparación de materiales y medios de cultivo así como las técnicas de asepsia, cuyo objetivo principal es la acción directa del hongo en el estado más infectivo del organismo plaga de manera in vivo (Monzón 2001).

Beauveria bassiana (teleomorfo: Cordyceps bassiana)

Comúnmente conocido como el hongo de la enfermedad de la muscardina blanca, es un hongo filamentoso entomopatógeno ubicuo en los restos de las plantas y el suelo. Se ha reportado raramente como un hongo causante de hialohifomicosis en humanos, sin embargo, es considerado un agente ecológico importante ya que regula diferentes poblaciones de insectos y/o artrópodos: vectores de enfermedades (mosquitos y garrapatas), plagas de cultivos (mosca blanca, orugas, saltamontes, barrenadores) y también plagas ecológicamente peligrosas: hormigas rojas, termitas (García *et al.* 2011).

Reproducción asexual

Beauveria bassiana no posee un estado sexual conocido es por eso que pertenece al grupo de los hongos imperfectos. Sin embargo, sus microconidios asexuales tienen un origen blástico-simpodial, es decir, que se forman a partir de una célula madre/conidiógena o bien de las propias hifas fértiles, presentando un crecimiento continuo apical que no es sincrónico ya que un conidio estimula el crecimiento del siguiente (García *et al.* 2011).

Morfología microscópica

Microscópicamente se observa como un hongo hialino con hifas tabicadas estrechas, las células conidiógenas tienen forma de matraz con un inflado en la base y filamentos estrechos en zigzag en el vértice, a los lados de estos filamentos surgen los conidios en cada punto de flexión, presentándose un crecimiento “geniculado-

simpodial”. Los microconidios tienen un diámetro de 2 a 4 micras, son hialinos, unicelulares y de forma globosa u ovoide.

Morfología macroscópica

Este hongo tiene una tasa de crecimiento moderadamente rápida, las colonias alcanzan un diámetro de 1 a 3 cm después de una incubación a 25 °C durante 7 días en agar glucosa de papa. Tienen una textura algodonosa, polvorienta o harinosa. La superficie es de color blanco a blanco amarillento o rosado pálido y el reverso es blanco o pálido (García *et al.* 2011).

Modo de acción

El desarrollo del hongo se puede dividir en dos fases y ocho etapas : La primera fase es la parasítica que comprende las siguientes etapas: adhesión (contacto hongo-hospedero y las esporas se depositan en la cutícula), germinación (a temperatura y humedad óptima se desarrolla el tubo germinativo y apresorio), penetración (mecanismos físicos y enzimáticos), producción de toxinas (actividad insecticida e inmunosupresora y destrucción física) y muerte (pérdida de la integridad estructural y deshidratación).Una vez terminada la fase parasítica comienza la saprofítica: multiplicación y crecimiento (unidades infectivas hifas, invasión completa), esporulación externa (el hongo emerge hacia el exterior) y hay producción de nuevas unidades reproductivas y/o infectivas.

Metarhizium anisopliae

Es un hongo anamórfico de reproducción asexual generalmente localizado en suelos y ampliamente utilizado en el control biológico, puesto que es capaz de parasitar y eliminar diversos tipos de plagas debido a sus características especiales de supervivencia y adaptación. El género *Metarhizium* fue descrito en 1883 por Sorokin, en donde se identificó parasitando larvas de *Anisoplia austriaca* y su enfermedad se denominó muscarina. Su reproducción es asexual, por lo que es considerado un hongo imperfecto; sus conidias se originan en forma de cadenas desde la fiálide en

sucesión basipetala, su conidióforo es ramificado y se originan a partir de hifas ramificadas (García *et al.* 2011).

Características microscópicas

Presenta hifas cenocíticas, conidióforo ramificado con forma de candelabro sencillo, en pares o incluso en ramilletes, estos crecen a partir del micelio con dos o tres ramificaciones en cada septo. De las fiálides se desprenden las conidias, son estructuras delgadas en el ápice de 6-15 micras de longitud y 1,5 a 2,5 micras de diámetro. Las conidias son hialinas y pueden ser de forma cilíndrica, oval, truncadas de largas cadenas con un diámetro de 2 a 4 micras y entre 4 a 10 micras de longitud, estos presentan extremos redondeados, agrupados y lisos.

Características macroscópicas

Se caracteriza por ser una especie mesófila, las colonias son circulares de color blanco al inicio; cuando el hongo empieza el proceso de esporulación presenta variaciones en el color; en la multiplicación de las conidias se exhibe un color verde oliva característico. Además para mejorar su producción es utilizado como sustrato el arroz; donde produce un pigmento amarillo el cual se difunde por el medio, este es considerado un metabolito secundario que si bien no es necesario para su crecimiento si está involucrado en la resistencia de las esporas ante ambientes desfavorables.

Modo de acción

La micosis tiene lugar en una serie de pasos: adhesión y germinación de las conidias en la cutícula (unión de las esporas a la cutícula, en condiciones favorables se desarrollan los tubos germinativos y apresorios de 12 a 18 horas post inoculación), penetración (inserción del tubo germinativo por procesos mecánicos por presión y químicos por la acción enzimática, ramificación de hifas), invasión completa de la presa (3 a 4 días) y muerte (el hongo supera la barrera inmunológica, multiplicación de las conidias, dispersión rápida, protoplastos, toxinas. Muscardina verde, es la micosis causada por *Metarhizium anisopliae* la cual puede presentar síntomas en

larvas, ninfas o adultos de insectos y artrópodos infectados; en estadios inmaduros y adultos suele provocar pérdida de movimiento y capacidad de alimentarse, mientras que las hembras pierden la capacidad de ovipositar

Extracto vegetal:

Un extracto vegetal es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. El carácter especial de los extractos vegetales es que a partir de una misma planta se pueden obtener extractos diferentes con principios activos variados. También depende del solvente empleado para extraer una parte vegetal definida (Blanco, 2006).

Los extractos vegetales los componen múltiples ingredientes activos de origen natural y actúan bajo diversos modos de acción cuando son usados para el manejo de plagas y enfermedades (Cock *et al.* 2007).

Modos de acción del extracto vegetal:

Según Cock *et al.* (2007), los modos de acción son:

- Efecto repelente, se expresa cuando un extracto o sustancia tiene propiedades para que la plaga objeto del manejo se aleje, no llegue y permanezca fuera de la zona de interés en el sistema productivo (cultivo, potrero, establo, entre otros).
- Efecto deterrente, se refiere a la capacidad de una sustancia para evitar que una plaga cumpla su ciclo en una zona tratada, al interferir en su alimentación u ovoposición, sin importar si ésta se encuentra o no en la zona de interés.
- Por otro lado, algunas plantas tienen la capacidad de interferir en el normal desarrollo de otras plantas, este es el llamado efecto alelopático. A pesar de tratarse en su mayoría de efectos no letales, algunos extractos tienen la

posibilidad de eliminar insectos (insecticidas), hongos (fungicidas), y bacterias (bactericidas) entre otras actividades biocidas.

- **Tipos de extractos vegetales**

- **Extractos Etanólicos:**

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado (Pérez *et al.* 2002).

- **Extractos acuosos:**

Son extractos cuyo solvente es el agua, son menos concentrados que los extractos hidroalcohólicos. No presentan sedimento y su color y aroma son más suaves. Se obtienen inmediatamente a partir de una planta fresca, según el método descrito por (Pérez *et al.* 2002).

- **Extracción por centrifugación:**

Los extractos y aceites obtenidos por este proceso tienen características aromáticas superiores a las conseguidas por extracción por arrastre de vapor. Al no ser un proceso térmico, sus propiedades son más estables, por los antioxidantes naturales presentes. Aun así, la fricción interna de la materia prima provoca un aumento de temperatura no controlable que puede implicar una degradación térmica y un oscurecimiento del extracto. (Bisset, 1994).

Uso de Extractos Vegetales en el sector agrícola.

Los extractos vegetales son preparados que se obtienen de la extracción alcohólica de sustancias fotoquímicas de diferentes productos vegetales, alimentos o condimentos, tienen importantes aplicaciones en el sector agrícola. Los compuestos fotoquímicos presentes en extractos vegetales son de gran variedad y concentración, por lo que sus

beneficios son muchos: pueden servir para combatir plagas y enfermedades en diferentes cultivos, así como también funcionar como estimulantes en el desarrollo, igualmente favorecen su desarrollo vegetativo y la activación de sus ciclos bioquímicos para la producción de sustancias específicas en las plantas (Pérez *et al.* 2002).

Descripción de la planta utilizada:

MORERA (*Morus alba*)

Las plantas de morera pertenecen al género *Morus*, familia Moraceae, orden Urticales, subclase Dicotiledónea, clase Angiosperma y división Spermatophyta (Cifuentes y Kee-Wook, 1998). Son especies cosmopolitas y se ha hecho extremadamente difícil situar con seguridad su origen; sin embargo, varios autores señalan al Himalaya como el lugar más probable de origen

Por su parte, Li (2001), clasificó los lugares de origen de *M. alba* en cinco regiones: 1) Este del continente asiático, 2) Archipiélago de Malasia, 3) Suroeste de Asia, 4) Oeste de África y 5) Norte, Centro y Sur de América. Las hojas son caducas, simples, alternas, miden de 3 a 22 cm de largo y algo menos de ancho, de esta manera son muy variables en su forma: ovales, redondeadas o lobuladas, con dos o más lóbulos, pero siempre dentadas en su margen y con rabillos largos.

Dada su elevada adaptabilidad y grado de selección, se reportan más de una decena de usos en el mundo; y en la actualidad, más de 42 países la utilizan de una u otra forma. Del total de naciones que cultivan la morera, el desglose según su uso corresponde a 60% en actividades agrícolas; 48% en la fabricación de la seda y como forrajera; 26% en labores de jardinería, paisajismo y preparación de infusiones; 31% como alimento y 14% como frutal, además de emplearse para mejorar el ecosistema (Sánchez, 2002).

Taxonomía

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Moraceae

Tribu: Moreae

Género: *Morus*

Especie: *M. alba*



Figura 1: Planta de Morera (*Morus alba*)

La morera (*M. alba*) ha sido aprovechada en medicina humana para controlar patógenos fúngicos y bacterianos, y su composición química ha sido estudiada ampliamente Park *et al.* (2003) encontraron que un compuesto conocido como kuwanon extraído de raíces de morera inhibió significativamente el desarrollo de *Streptococcus sobrimus* y *S. sanguinnis* en infecciones bucales. Otros compuestos químicos que han sido identificados en hojas de esta misma especie son alcaloides, saponinas, taninos, compuestos fenólicos, terpenos, glucósidos y flavonoides, considerándose estos con actividad antimicrobial El 2-arilbenzofuran es un

compuesto encontrado en hojas de *M. alba* que se reporta como un agente efectivo de control de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* (Park *et al.* 2003).

METODOLOGÍA

Ubicación del área de estudio

El ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la UNELLEZ sede Guanare, situada en la carretera nacional vía Biscucuy, exactamente en la parroquia San Juan De Guanaguanare, sector Mesa de Cavacas, municipio Guanare del estado Portuguesa, Venezuela. Se ubica altitudinalmente entre los 269 msnm, y latitudinalmente entre las coordenadas UTM 19 Norte 1002178 y Este 411172. (Fig.02).

Las garrapatas fueron recolectadas sobre los animales en la unidad de producción Bovina de la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Ezequiel Zamora (UNELLEZ-Guanare).

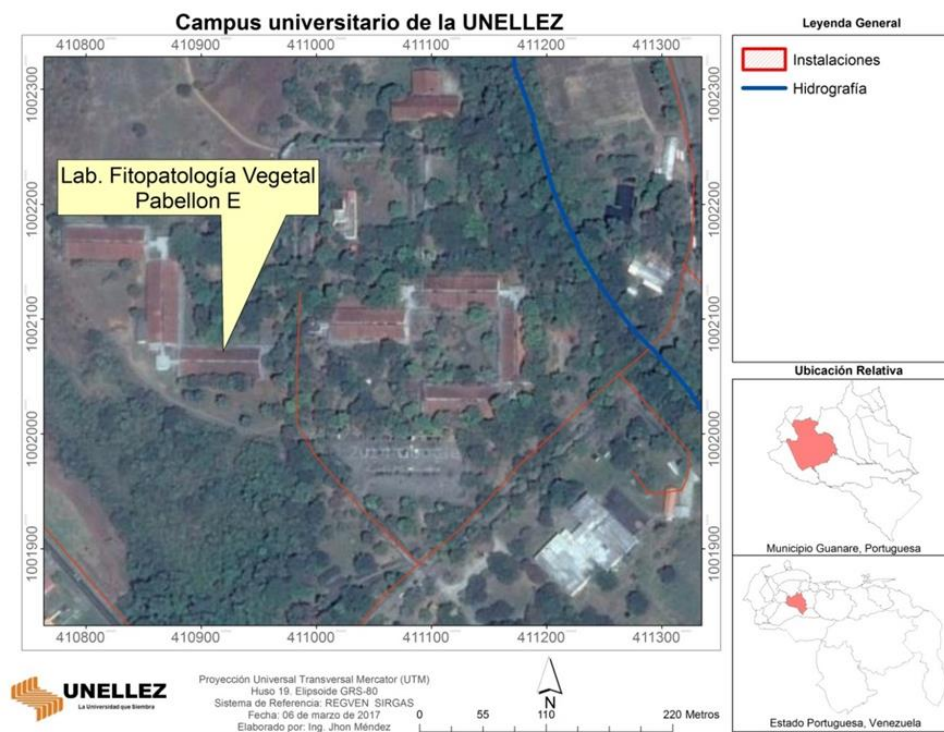


Fig. 2. Ubicación del área estudio. Fuente Google Maps (2023)

Características agroecológicas de la zona

Clima: Los terrenos de la UNELLEZ se ubican en la categoría de bosque seco tropical con clima estacional y con una precipitación promedio anual de 1836 mm; siendo junio el mes más lluvioso con 304 mm y enero el más seco con 19 mm, la temperatura media anual es de 26,7 °C; ésta varía poco durante el año, en un intervalo de 34,3 °C a 25 °C para el mes de marzo y julio respectivamente (Aymard *et al.* 2011)

Suelo: El sustrato ubicado en la UNELLEZ de Guanare del sector Mesa de Cavacas, es un suelo de textura franco arcilloso, con uniformes proporciones porcentuales: Arena 45%, Limo 40% y Arcilla 15%. La cualidad principal de este tipo de suelo es que no es demasiado arcilloso, ni muy arenoso. De esta forma, señalando el predominio de los órdenes Ultisoles y Alfisoles con extensiones menores de Inceptisoles y Entisoles.

Geomorfología: El área, está localizada en el piedemonte del flanco sur-oriental de la Cordillera, entre la base de las estribaciones de Biscucuy y Chabasquén del tramo sur de la Sierra de Portuguesa y los Llanos Altos Occidentales.

Forma de terreno: Como unidad elemental, solamente es subdividida arbitrariamente ya que no se manifiestan límites naturales visibles en el terreno. Por lo tanto, las dimensiones de las formas del mismo comúnmente varían de pocas decenas a centenas y de metros a varios kilómetros (Aymard *et al.* 2011).

Tipo de relieve: La asociación existente entre las formas de terreno guardan una relación de origen, por lo tanto, poseen dimensiones que comúnmente varían de centenares de metros a varios kilómetros.

Paisaje: Cuenta con una asociación entre tipos de relieve que guardan una relación de origen. Sus dimensiones generalmente se miden en decenas de kilómetros. El área, cubre parte de dos paisajes: El valle del río Guanare y el piedemonte (Aymard *et al.* 2011).

Vegetación: La flora presente en la UNELLEZ de Guanare, se ubica fundamentalmente en la zona de vida de Bosque seco Tropical, también, se identifican: Bosques Semi deciduos, Bosques ribereños, matorrales, pastizales arbolados y pastizales. el cual cumplen con funciones de gran importancia como son: protección de suelos en las vertientes, regulación del escurrimiento de las aguas y protección de la fauna silvestre; Algunas especies forestales denotadas en el recinto son las siguientes: Caobas (*Swietenia macrophylla*) Apamates (*Tabebuia rosea*), Saqui Saquis (*Pachira quinata*), Peonios (*Pouteria sp*), Mijaos (*Anarcadium excelsum*), Jabillos (*Hura crepitans*), Cañafistolas (*Cassia moschata*), Chaparros (*Curatella americana*), Araguanays (*Tabebuia chrysantha*), Ceibas (*Ceiba pentandra*), Pinos (*Pinus caribaea*), Matarratones (*Gliricidia sepium*), Higuerones (*Ficus aurea*), Caro Caros (*Enterolobium cyclocarpum*), Gazimos (*Guazuma ulmifolia*), Eucaliptos rojos (*Eucalyptus camaldulensis*) Cedros (*Cedrela odorata*) (Aymard *et al.* 2011).

Población y muestra

La población, es la totalidad de garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus*, como elementos u objetos que se quiere investigar y la muestra es el subconjunto de esa población (Párraga 2007) o una parte representativa de la población. En el presente trabajo se utilizará una muestra de 6 frascos de vidrio esterilizados, para cada tratamiento, a los que se les colocó un papel humedecido para hacer la función de cámara húmeda, cada frasco con 5 individuos de garrapatas cada uno.

Tipo de investigación

Esta investigación se clasifica como una investigación experimental con enfoque cuantitativo y nivel explicativo del efecto de la aplicación de los tratamientos sobre individuos de garrapatas recolectadas en los bovinos de la unidad de producción de la UNELLEZ Guanare.

Descripción y distribución de los tratamientos

El ensayo se estableció con 5 tratamientos (Tabla 1), cada uno con 6 repeticiones y un testigo absoluto sin inocular para todos los tratamientos

Tabla 1. Descripción de los tratamientos empleados en el ensayo

TRATAMIENTO	DESCRIPCION
1	Químico, Cipermetrina
2	Extracto vegetal, <i>Morus Alba</i>
3	<i>Metarhizium anisopliae</i>
4	<i>Beauveria bassiana</i>
5	TESTIGO

DISEÑO METODOLÓGICO

Con el fin de dar cumplimiento a los objetivos planteados, las actividades se cumplieron en 2 fases:

Fase de campo

Fase de laboratorio

I. FASE DE CAMPO

1-. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

1.1-. Recolección de los individuos (garrapatas):

Los individuos de garrapatas *Rhipicephalus microplus* se colectaron dentro de las instalaciones del campus universitario, en la unidad de producción bovina, durante el ordeño y se procedió a capturar adultos hembras y machos.

1.2-. Recolección de las muestras vegetales:

Las muestras vegetales para la preparación del extracto se colectaron de igual manera en las instalaciones del campus universitario, se tomaron partes del tejido foliar de la plantas de morera (*Morus alba*) ubicadas alrededor de la unidad de producción cunícola.

1.3-. Manipulación y traslado de los individuos:

En horas de la mañana se aprovechó que el ganado se encuentra en el corral y con guantes y pinzas se comenzó a extraer cada una de las garrapatas en diferentes zonas del cuerpo del animal (zona ventral, ubre, cola) colocando en unos frascos pequeños redondos para la fácil manipulación de estos ácaros entre machos y hembras, realizando la identificación y la numeración de las cantidades recolectadas y luego llevadas al laboratorio de fitopatología. Dicha recolección fue hecha en dos días para cubrir la cantidad de garrapatas necesarias para el ensayo

1.4-. Manipulación y traslado de las muestras:

Se previó todo lo concerniente al manejo adecuado de las muestras con el fin de preservar las mismas. Las partes vegetales para la preparación del extracto fueron colectadas, embaladas, identificadas y trasladadas al laboratorio de fitopatología para su procesamiento.

1.5-. Descripción del producto químico utilizado

Cipermetrina 6 % Pour-on, marca Calbos

Es un parasiticida del grupo de los piretroides, de uso externo, en forma de aplicación dorsal (Pour-on) para el control de garrapatas, piojos y moscas del ganado

Características:

Cipermetrina de aplicación dorsal (Pour On).

Para la eliminación de moscas y garrapatas.
Control de Garrapatas, Mosca de Cuernos y Establos.
Con la mayor concentración del mercado (6%).

Facilidad de aplicación

Con descarte de leche hasta las 24 horas.

Composición

Cada 100 ml contiene:

Cipermetrina 6,0 g

Vehículo c.s.p. 100.0 ml

Dosis

Aplicar 10 ml del producto para cada 100 kg de peso corporal, en dosis única.
Para animales con más de 500 kg, aplicar dosis máxima recomendada de 60 ml/animal.



Fig. 3. Cipermetrina, producto comercial (foto referencial)

II. Fase de laboratorio

1-. Reactivación de los entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metharizium anisopliae*

Para la reactivación de los entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae*, se seleccionaron ácaros adultos, los cuales se inocularon con una suspensión de concentración $6,4 \times 10^8$ de esporas de cada uno de los entomopatógenos. Posteriormente, se colocaron en una cámara húmeda (capsula de Petri con papel estéril) y humedecida con agua destilada estéril (ADE), finalmente se incubaron en el laboratorio durante 7 días a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Las anteriores condiciones garantizan la patogénesis (infección e invasión) por parte de los hongos y la evidencia de síntomas y signos en el insecto afectado. Una vez cumplido el tiempo de incubación, los ácaros con signos de los entomopatógenos, se sometieron a un proceso de desinfección, consistente en la inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante treinta segundos. Posteriormente, se eliminó el exceso de hipoclorito enjuagando con ADE (tres veces) y secando cada acaro con papel toallín estéril. Finalmente, cada ácaro se colocó en capsula de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) para permitir el crecimiento y multiplicación del hongo. Las capsula de Petri se mantuvieron en condiciones de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durante ocho días, tiempo aproximado para lograr el mayor crecimiento de los biológicos.



Fig 4. A) Adultos de *R. microplus*, B) Desinfección de *R. microplus*

1.1.- Multiplicación de los entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* en sustrato

Se procedió según el protocolo empleado en el laboratorio de Fitopatología de la UNELLEZ Guanare:

Se hidrató el sustrato (arroz, durante 2 horas aproximadamente), el exceso de agua se drenó con un colador, con ayuda de la balanza analítica se pesaron 100g del sustrato hidratado y se colocó en bolsas plásticas de polipropileno, luego se fueron enrollando en forma de tabaco y se envolvieron con papel de aluminio, seguidamente se colocaron en el auto clave (ALL AMERICAN, Tipo olla) para su esterilización (121°C, 15lbp, durante 15min), seguidamente se dejó enfriar para proceder a inocular los biológicos reactivados con anterioridad.

Seguidamente se desinfecto el área de trabajo con hipoclorito de sodio (cloro 3%) y se encendió el mechero, con la ayuda de una cuchara estéril, se tomó una pequeña porción de la capsula de Petri donde se reactivó *B. bassiana* y/o *M. anisopliae*, se introdujo en la bolsa plástica con el arroz estéril. Una vez inoculada se le hizo un nudo en la parte superior y moviendo suavemente para mezclarlos. Las bolsas

inoculadas se colocaron en un estante previamente desinfectado y se almacenaron durante 21 días (periodo de incubación) cumplido este lapso de tiempo se procedió a determinar la concentración de conidios y su viabilidad (parámetros de calidad)

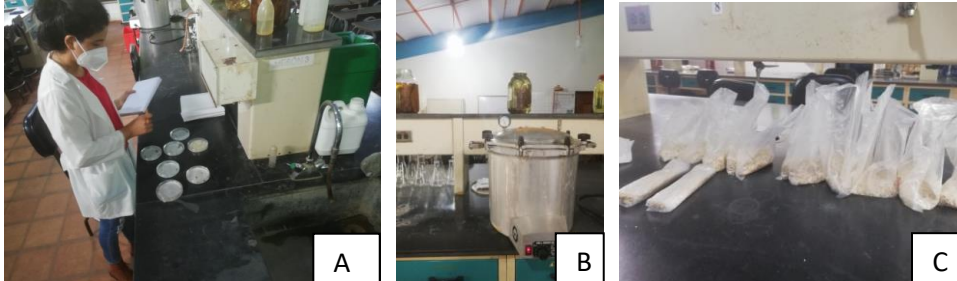


Fig. 5. Multiplicación de los entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisoplae*
A) Cámara húmeda con adultos de *R. microplus* B) auto clave C) Sustrato (arroz) para esterilizar

1.2.- Determinación de los parámetros de calidad

1.2.1.- Determinación de la concentración de conidios

Se desinfectó el área de trabajo con hipoclorito de sodio (cloro 3%) y se encendió el mechero, de manera aleatoria se procedió a tomar cuatro bolsas de las inoculadas para cada uno de los sustratos evaluados, las cuales representaron cuatro repeticiones. En un beaker se dispensaron 500 ml de agua destilada (AD) y se introdujo el sustrato inoculado, se removió hasta lograr que los conidios de cada uno de los *entomopatógenos* se desprendan del arroz y pasen a la solución de AD, seguidamente en una gradilla se colocaron 5 tubos de ensayo a los cuales se le agregaran 9ml de AD y se procedió a diluir, con una pipeta se tomó 1ml de la solución madre y se le agregó al primer tubo de ensayo y se procedió de la misma manera hasta la concentración 10^{-4} .



Fig. 6. Prueba de concentración de conidios

Para el conteo de conidios se utilizó la cámara de Neubauer o hemocitometro, la cámara está dividida en retículos y cada uno se subdivide en 9 cuadrados. El cuadrado central aparece de nuevo subdividido en 25 cuadrantes y estos en 16 cuadrantes más pequeño, el recuento se determinó sumando el total de esporas presente en los 25 cuadrantes centrales de la cámara. Es necesario realizar en promedio seis lecturas del tubo con la dilución que permita contar entre 8-10 conidios por cuadro, se localiza en el campo visual el cuadrante central se enfocó con el objetivo de 10X de tal forma que se observaran nítidamente los cuadrantes y luego se pasó al objetivo 40X para realizar el conteo.



Fig. 7. Cámara de Neubauer y conteo de conidios bajo microscopio óptico

1.2.2.- Determinación de la Viabilidad de conidios

En este caso se emplearon los tubos ya preparados en el punto anterior y se hizo la lectura de la viabilidad empleando el mismo tubo que se usó para la determinación de la concentración de los conidios. Previamente se preparó en capsulas de Petri Agar agua (AA), en estas capsulas se marcaron 5 puntos en la parte posterior, los cuales nos sirvieron como guía al momento de dispensar las gotas con la solución de los biológicos, se dejaron en reposo por 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación se agregó una gota de colorante (azul de anilina) con el propósito de detener la germinación y crecimiento del tubo germinativo, y a la vez teñir los conidios del hongo, luego se cortaron con un bisturí las alícuotas depositándolas sobre una lámina portaobjetos y se cubren con una cubreobjetos, la observación se hizo con el microscopio óptico (Leica Binocular CME ML23), con el objetivo de 40x contando un mínimo de 100 conidios (se registran germinados y no germinados).

2.- Preparación del extracto acuoso de Morera (*Morus alba.*)

Para la obtención del extracto acuoso se siguió la metodología utilizada por Widmer y Laurent (2006), que se describe a continuación:

- Se seleccionaron y lavaron las muestra vegetales colectadas (hojas). Para obtener el extracto se deberán pesar 20 gramos del órgano vegetal
- Seguidamente las hojas seccionadas en trozos más pequeños deberán ser vertidos en una licuadora (Oster) con 100 ml de agua destilada, licuándolos 3 veces por un periodo de 15 segundos separados en intervalos de 5 segundos consecutivamente.
- A continuación la solución que se obtendrá de las hojas, se colocara en un erlenmeyers de 500 ml (fiola) los cuales contendrán 200 ml de agua destilada.
- Luego estos erlenmeyer serán tapados, y se introducirán en el autoclave durante 45 minutos a 121°C y una atmósfera de presión (15lbp).
- Posteriormente se filtrará el líquido de cada uno a través de gasas estériles, y de este modo separar los residuos vegetales.

A continuación se reducirá el volumen del líquido filtrado por medio de calentamiento (mechero) hasta obtener 20 ml del extracto, se centrifugara, para eliminar los sólidos remanentes, a 5000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colocara en contenedores de vidrio (vial) que serán esterilizados durante 20 minutos a 121°C y una atmósfera de presión. Luego el extracto obtenido se almacenara a $\pm 20^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de usarse

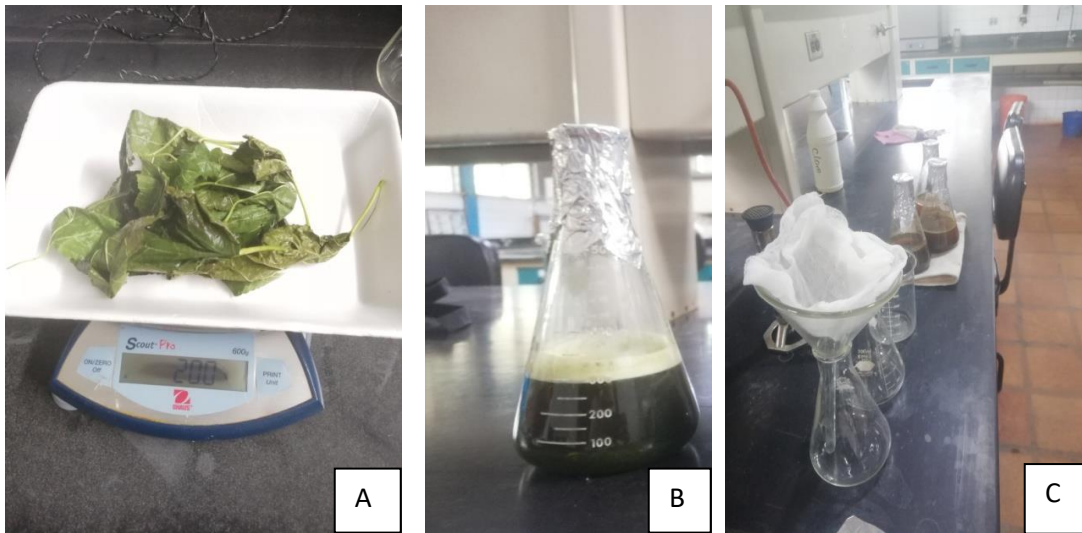


Fig. 8. Preparación del extracto vegetal de *M. alba*. A) pesaje ; B) extracto de hojas ya licuado; C) Filtrado

3-. Determinación del efecto in vitro, de cuatro tratamientos sobre el control de la fase adulta de la garrapata del bovino *R. microplus*

Para determinar el efecto o la capacidad de control de cuatro tratamientos sobre la garrapata *R. microplus*, se llevó a cabo la siguiente metodología:

- 1-. Se procedió a esterilizar envases de vidrio (frascos de compota) y discos de papel absorbente en un horno o estufa, por espacio de 3 horas a 180°C.
- 2-. A cada frasco estéril se le colocaron dos discos de papel estéril y se humedecieron con ADE
- 3-. Cada tratamiento consistió en seis frascos con cinco individuos de *R. microplus*, para un total de treinta insectos adultos por tratamiento
- 4-. Con la ayuda de una pinza, se colocaron en cada frasco cinco adultos de *R. microplus*, se inocularon con cada uno de los tratamientos y se cubrieron con un trozo de malla (tela Tul) la cual se sujetó con una banda elástica (liga).

- 5-. Se empleó un testigo absoluto, es decir, seis frascos con cinco individuos a los cuales se les aplicó solamente agua destilada
- 6-. Cada tratamiento se aplicó con la ayuda de un atomizador (bomba manual), previendo que todos los adultos de *R. microplus* fuesen inoculados suficientemente
- 7-. Las unidades experimentales (frascos), se colocaron en condiciones de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ y 50% de humedad relativa
- 8-. Las observaciones se realizaron cada 24 horas durante siete días, se contabilizaron individuos vivos, muertos y vivos sin movimiento
- 9-. Finalizadas las observaciones se procedió a sembrar en medio de cultivo PDAA, los individuos de *R. microplus* muertos para constatar la presencia de cada uno de los entomopatógenos usados en esta investigación.

Materiales y equipos

- Capsulas de Petri
- Medios de cultivo (PDA- AA)
- Extractos (Morera)
- Gasas
- Beaker 1000ml
- Fiolas de 1000ml
- Balanza
- Microscopio
- Papel parafilm
- Plancha de calentamiento y agitación
- Licuadora
- Autoclave
- Lápiz y cuaderno de nota
- Mechero

- Tubos de ensayo
- Marcador
- Papel absorbente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Comportamiento de las garrapatas durante la semana de aplicación de los tratamientos

DIA/TRAT	1			2			3			4			5			6			7		
	V	M	V S/M	V	M	V S/M	V	M	V S/M	V	M	V S/M	V	M	V S/M	V	M	V S/M	V	M	V S/M
1	04	25	01	05	25	0	03	27	0	02	28	0	02	28	0	01	29	0	01	29	0
2	15	08	07	14	09	07	10	12	08	08	14	08	07	20	03	05	23	02	05	25	0
3	20	01	09	05	13	12	0	13	17	0	30	0	0	30	0	0	30	0	0	30	0
4	17	03	10	03	16	11	01	16	13	0	16	14	0	30	0	0	30	0	0	30	0
TESTIGO	30	0	0	30	0	0	30	0	0	30	0	0	30	0	0	30	0	0	30	0	0

Leyenda:

V= Vivo; M= Muerto; V S/M= Vivo sin movimiento

Tratamientos:

1= Químico Cipermetrina; 2= Extracto vegetal de morera; 3= Metarhizium anisopliae; 4= Beauveria bassiana; 5= Testigo

A los datos obtenidos en el experimento se les aplicó la prueba estadística ANOVA para determinar la posible diferencia entre las medias de los tratamientos y de ésta manera, analizar los efectos de los diferentes tratamientos sobre la muestra de garrapatas. Para realizar este procedimiento se utilizó el SPSS ver. 25.

La tabla 03 muestra el análisis de la varianza de los resultados obtenidos de los tres grupos (vivos, muertos y vivos/sm), el P-valor < 0,05 en los 3 casos, de aquí se infiere que la cantidad de garrapatas vivas en cada tratamiento al final del experimento no es igual en todos los grupos.

Tabla 03. Análisis de la varianza

		Suma de cuadrados	gl	F	Sig.
Vivos	Entre grupos	3819.600	4	41.864	.000
	Dentro de grupos	684.286	30		
Muertos	Entre grupos	2953.143	4	12.407	.000
	Dentro de grupos	1785.143	30		
Vivos_sm	Entre grupos	285.314	4	3.400	.021
	Dentro de grupos	629.429	30		

Fuente: Creación propia

En la tabla nro. 04 se presentan los resultados finales de la cantidad de garrapatas tanto muertas como vivas que fueron sometidas a los tratamientos con los diferentes biorreguladores. En ella se puede observar claramente que *Metarhizium* y *Beauveria* tuvieron resultados similares entre ellos, pero diferentes a la Cipermetrina y al extracto de *Morus alba*. A pesar de estos resultados no se puede considerar que los resultados son concluyentes debido a que las diferencias entre ellos no son significativas.

Según lo anterior, el biorregulador vegetal fue el que tuvo el peor comportamiento con 5 garrapatas vivas al final y el resto tuvieron resultados similares, por lo tanto, se infiere que el efecto de estos 3 biorreguladores tienen la misma capacidad para el control de garrapatas en bovinos. El grupo testigo no mostró el mismo comportamiento durante todo el ensayo y su población no disminuyó en forma natural.

Tabla 05. Porcentaje de garrapatas muertas y vivas tras la aplicación de los tratamientos

	Vivos	Muertos	% mortalidad
Cipermetrina	1	29	96,66
Vegetal	5	25	83,33
Metarhizium	0	30	100
Beauveria	0	30	100
Testigo	30	0	0

Fuente: Creación propia

El grafico 1 ilustra la comparación entre los diferentes resultados de cada tratamiento. En él se puede observar que *M. anisopliae* y *el B. bassiana* tuvieron mayor efectividad en el control de garrapatas con un 100% de mortalidad al final del experimento. A pesar que la Cipermetrina no eliminó el total de las garrapatas, la diferencia con respecto a los tratamientos anteriores es muy similar, por lo tanto, estadísticamente se consideran resultados iguales. El extracto vegetal fue el que presentó menor efectividad pero hay que considerar que aun así logró eliminar 83,33% de las garrapatas

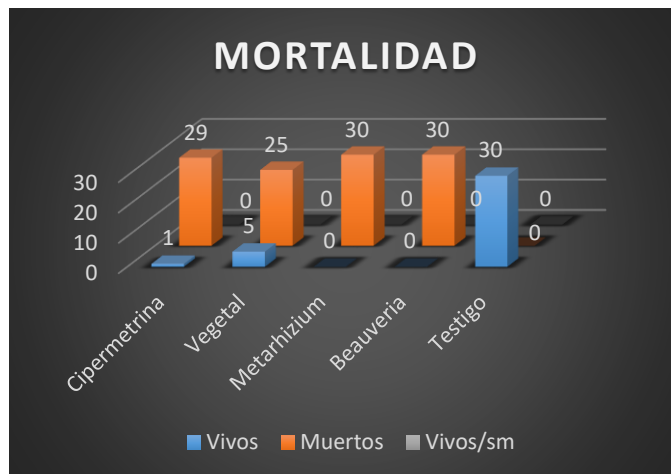


Gráfico 01. Comparación entre tratamientos

Costo de aplicación de los tratamientos para control de garrapatas, cálculo basado en 100 animales

- **Aplicación de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae***

Bolsa de 100 gr. de arroz inoculado con hongos entomopatógenos alcanza para una bomba de aspersión de 20 litros con lo cual se pueden bañar aproximadamente 5 animales vacas o toros de un peso promedio de 400 kg o menos

1 kilo de arroz, equivale a 10 bolsas de 100 gr. para un total de 50 animales por un costo: **1,5 \$**

Bolsa con inóculo, alcanza para inocular hasta 100 kg de arroz, costo: 15\$

Total de aplicación de *B. bassiana* y *M. anisopliae* para 100 animales = 45\$

- **Aplicación de *Morus alba***

Extracción casera y artesanal del extracto de las hojas, para un costo aproximado de 3\$ correspondiente al costo de la bombona de gas doméstico

Total de aplicación de extracto de *Morus alba* para 100 animales = 3\$

- **Aplicación de Cipermetrina en baño dorsal**

Según la etiqueta del producto, 1 litro rinde para aproximadamente 20 animales, el costo del litro del producto es de 20\$, por lo que para 100 animales el costo es de 100\$.

Total de aplicación de extracto de Cipermetrina para 100 animales = 100 \$

Tabla 6. Costo de aplicación de los tratamientos para 100 animales

Tratamientos	Entomopatógenos <i>B. bassiana</i> y <i>Metarhizium</i> <i>anisopliae</i>	Extracto de <i>Morus alba</i>	Cipermetrina
Costo aproximado para 100 animales (\$)	45	3	100

A pesar de que los entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* arrojaron resultados similares, desde el punto de vista estadístico, con respecto a la Cipermetrina, si se considera el costo de aplicación de cada tratamiento, el efecto tóxico sobre la salud del animal e incluso sobre la salud humana, así como el impacto ambiental y el efecto residual, se puede establecer que los biorreguladores son una mejor opción frente al producto químico

CONCLUSIONES

La Cipermetrina tuvo un efecto inicial muy marcado, ya que al día siguiente se contabilizó una mortalidad de 25 garrapatas (83,33%), pero en las observaciones siguientes disminuyó drásticamente el efecto, de tal manera que afectaba, en promedio, una garrapata a diario, confirmando así el efecto de resistencia frente a los garrapaticidas reportado por varios autores Pérez (2006), Herrera *et al.* (2015), Rodríguez *et al.* (2007).

Beauveria bassiana, al tercer día obtuvo un poco más del 50% mortalidad. Y el día 5 logró el 100%.

Al comparar *M. anisopliae* con *B. bassiana*, el primero obtuvo una mortalidad en un día menos que la segunda, es decir, eliminó el 100% de las garrapatas en 4 días, mientras que *B. bassiana* lo hizo en 5 días.

El extracto de *Morus alba* fue el que arrojó menos efectividad, no obstante, logró eliminar el 83,3% de la población de garrapatas de manera consecutiva y sostenida en el tiempo que duró el experimento

Los bioinsecticidas mencionados en este trabajo son una alternativa viable para ser utilizados dentro de esquemas de control biológico de plagas en los principales cultivos agrícolas. Su uso permite mantener la productividad del campo sin contaminarlo y sin poner en riesgo la salud de la población que entra en contacto directo o en forma indirecta con estos insumos.

RECOMENDACIONES

Continuar con la evaluación *in vivo* de los tratamientos empleados en esta investigación.

Realizar otros trabajos de investigación en la época con mayor proliferación de garrapatas (período de sequía).

Efectuar ensayos *in vitro* e *in vivo* con otros extractos vegetales y en otras unidades de producción de la región

Ampliar el tiempo de aplicación del experimento para tener una mejor tendencia de los resultados de cada tratamiento.

Aumentar la concentración del bioregulador vegetal, *M. alba*, porque a pesar de sus efectos pocos eficaces logró eliminar el 83,3% de la población de garrapatas de manera consecutiva y sostenida en el tiempo que duró el experimento

REFERENCIAS

- Abbas, R., Zaman, M., Colwell, D. y Gilleard, J. 2014. Resistencia a los acaricidas en garrapatas del ganado y enfoques para su manejo. 203(1-2), 6-20.
- Álvarez, V., Matamoros, T., Mena, A. 2017. Determinación, in vitro, de la eficacia de los hongos entomopatógenos, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, en el control de la garrapata común del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), Rev. Ciencias Veterinarias, 35(1): 43-57. [Citado 24 Mar 2023]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/318075016_Determinacion_in_vitro_dela_eficacia_de_los_hongos_entomopatogenos_Beauveria_bassiana_y_Metarhizium_anisopliae_en_el_control_de_la_garrapata_comun_del_ganado_Rhipicephalus_Boophilus_microplus_Acari_I
- Aymard, G., Farreras, J. y Schargel, R. (2011). Bosques secos macrotérmicos de Venezuela. *BioLlania Edición Esp.* 10, 155-177
- Arguedas, M. 2008. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metharrizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Revista Agronomía Costa Rica.* 32(2):137-147.
- Bautista, A., Pimentel, R., Gómez, A. 2021. Control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con hongos entomopatógenos. *Rev. iberoam. cienc. biol. agropecu.* 2017; 6(12). Disponible en: <https://www.ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/68/322>
- Bautista, L., Cardona, A., Soto, M. y P, Vélez. 2014. Actividad entomopatógena de tres hongos sobre *Hortensia similis* (Hemiptera: Cicadellidae) y *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae) en sistemas silvopastoriles. *Bol. Cient. Mus. Hist. Nat.* 18:188-196.
- Bisset, N. G. (1994). *Herbal drug and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientist basis.* Stuttgart, U. K.: Medpharm Scientific Publishers.
- Blanco, Y. (2006). La utilización de la aleopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *cultivos tropicales,* 27(3), 5–16. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215825001.pdf>
- Cifuentes, C. A. y Kee-Wook, S. 1998. *Manual Técnico de Sericultura.* 41 pp.

- Cock, L., Velásquez, M., Ayala, A. 2007. Efecto de la Ultrafiltración sobre las Propiedades Reológicas de Gelatina Comestible de Origen Bovino. Revista de Información Tecnológica Vol. 21(6), 91-102 (2010)
- Cortés- Vecino, J., Betancourt, A., Argüelles, J., Pulido, C. 2010. Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 11:73-84. [documento en línea]. En <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/564/694/3112>. [Consulta: Marzo 23, 2023].
- De Liñan, C. (2015), VADEMECUM de productos fitosanitarios y nutricionales. Ed: Ediciones Agrotécnicas
- Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R., Alonso, M. 2012. Primer informe de una población de garrapatas *Rhipicephalus microplus* multirresistente a acaricidas e ivermectina en el trópico mexicano. Revista Veterinaria Parasitol. 186 (3-4):338-342.
- Fernandes, E., Bittencourt, V. 2008. Hongos entomopatógenos para el control de especies de garrapatas de Suramérica. Acarol. 46 (1-4):71-93
- García, M., Cappello, S., Molina, R. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *metarhizium anisopliae*. Horiz. Sanitario [Internet]. 2011 [citado 01 nov 2023]; 10(2): 21-28. Disponible en: <https://revistas.ujat.mx/index.php/horizonte/article/view/229/170>
- González, A., Tapias, D., Pérez, M., Carvajalino, M., Velandia, D., Borges, R. 2011. Evaluación de acaricidas para el control de garrapatas (*Rhipicephalus* (*Boophilus* *Microplus*) que afectan al ganado bovino de doble propósito usando modelos lineales generalizados. Rev. Fac. Agron. 28: 487-502. [Internet]. [Citado 24 oct 2023]. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26895>
- Herrera A, Rudas A, Betancourt J, Grant W y Vilchez S. Distribución inusual y potencial de la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, en zonas tropicales de alta montaña de los Andes colombianos. Biota Colombiana. 2015; 16(2): 75-95. [Internet]. [Citado 01 nov 2023]. Disponible en: <http://revistas.humboldt.org.co/index.php/biota/article/view/376/374>
- Li, Y. 2001. An important topic to be discussed: Utilization of mulberry leaves and production of animal fibers (Eds. Jian, L.; Yuyin, C.; Sánchez, M. and Xingmeng, L.). Mulberry for Animal Feeding in China, Hangzhou, China. Pp. 1-7.

- López, E., López, G., Orduz, S. 2009. Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. *Rev. Colomb. Entomol.* 35(1):42-46.
- Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas* 63:95-103.
- Park, M., You, S., Lee, H., Baek, N. y Hwang, J. 2003. Kuwanon G: un agente antibacteriano de la corteza de la raíz de *Morus alba* contra patógenos orales. *Revista de etnofarmacología* 84:181-185.
- Pérez, L., Palma, C., Villegas, R., Vega, M., Pérez, R. 2006. Metodología analítica y detección de residuos de ivermectina en muestras de leche de rebaños de la provincia de Ñuble. Chile: *Archivos de medicina veterinaria*. 2006; 38(2):143-
- Pérez, C., Sanchez, W., Murillo, A., Méndez, J. 2002. Acción antioxidante conjunta de extractos etanólicos de *Mollinedia lanceolata*, *Croton leptostachyus* y *Siparuna sessiliflora*. *Revista academica colombiana ciencias exactas físico naturales* 41 (158)
- Párraga, C. 2007. Planeamiento y ejecución de diseños experimentales. Universidad Nacional experimental de los llanos occidentales Ezequiel Zamora, Mimeog. 22 pp.
- Polanco, D., Ríos, L. 2016 Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, Mosquera (Colombia), 17(1):81-95. 2016. 59 [Internet]. [Citado 25 mar 2023]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v17n1/v17n1a08.pdf>
- Pulido, M., Rodríguez, R., García, D., Díaz, A., Andrade, R. 2015. Evaluación de la eficacia de la CEPA MAF1309[®] de *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus* en Tunja, Colombia
- Raymond, K., Rojas, F., Benavides, E., Cotes, A., Villamizar, L., García, P. 2004. Efecto de hongos entomopatógenos sobre la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: ixodida): uso de activadores de patogenicidad
- Rodríguez-Vivas, R., Rivas, A., Chowell, G., Fragoso, S., Rosario, C., García, Z., Smith, S., Williams, J., Schwager, S. 2007. Distribución espacial de perfiles de acaricidas (cepas de *Boophilus microplus* susceptibles o resistentes a acaricidas) en el sureste de México

- Rodríguez-Vivas, R., Rosado-Aguilar, J., Ojeda, M., Pérez, L., Trinidad, I., Bolio, M. 2014. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Revista Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 1(3): 280-286.
- Rodríguez, C., Pulido, N., Rodríguez, A. 2015. Eficacia de extractos vegetales sobre la garrapata adulta *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y su oviposición. *Revista Cubana de plantas medicinales* 20 (4). Disponible en: <https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/230>
- Ruela, P., Barrios, R., Silva, R., Romero, G. 2019. Evaluación in vitro de hongos entomopatógenos en el control de la garrapata del ganado bovino. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/RennyBarrios/publication/341964945_EVALUACION_IN_VITRO_DE_HONGOS_ENTOMOPATOGENOS_EN_EL_CONTROL_DE_LA_GARRAPATA_DEL_GANADO_BOVINO/links/5ed5db25cd45851529453c0782/EVALUACION-IN-VITRO-DE-HONGOS-ENTOMOPATOGENOS-EN-EL-CONTROL-DE-LA-GARRAPATA-DEL-GANADO-BOVINO.pdf
- Sánchez, M.D. 2002. World distribution and utilization of mulberry and its potential for animal feeding. *Animal Production and Health Paper No. 147*. FAO, Rome. Pp. 1-8.
- Widmer, L. y Laurent N. 2006. “Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*”. *Revista europea de fitopatología* (115) 377–388