Universidad de La Salle
Ciencia Unisalle

Maestría en Ciencias Veterinarias | Facultad de Ciencias Agropecuarias

1-1-2016

Estudio de la actividad acaricida in vitro del extracto acetónico de gliricidia sepium sobre Rhipicephalus microplus

Dumar Alexander Jaramillo Hernández
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias

Citación recomendada

Jaramillo Hernández, D. A. (2016). Estudio de la actividad acaricida in vitro del extracto acetónico de gliricidia sepium sobre Rhipicephalus microplus. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/52

This Tesis de maestría is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Maestría en Ciencias Veterinarias by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ACARICIDA *in vitro* DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *Gliricidia sepium* SOBRE *Rhipicephalus microplus*

Trabajo de Grado

DUMAR ALEXANDER JARAMILLO HERNÁNDEZ

Trabajo de grado como requisito para optar el título de:

Magister en Ciencias Veterinarias

Bogotá, Colombia

2016

UNIVERSIDAD DE LA SALLE

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ACARICIDA *in vitro* DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE *Gliricidia sepium* SOBRE *Rhipicephalus microplus*

Trabajo de Grado

DUMAR ALEXANDER JARAMILLO HERNÁNDEZ

76091205

Directora

GINA LORENA GARCÍA MARTÍNEZ, M.V.Z, Esp., M.Sc.

Bogotá, Colombia

2016

APROBACIÓN

DIRECTORA

_____

Dra. GINA LORENA GARCÍA MARTÍNEZ

JURADO

_____

Dra. YOHANA MARÍA VELASCO SANTAMARÍA

JURADO

_____

Dr. CÉSAR AUGUSTO GÓMEZ VELÁSQUEZ

JURADO

_____

Dr. ADOLFO VÁSQUEZ TRUJILLO

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA SALLE

Rector	Hno. Alberto Prada Sanmiguel
Vicerrector Académico	Hno. Carlos Enrique Carvajal Costa
Vicerrector De Investigación Y Transferencia	Dr. Luis Fernando Ramírez Hernández
Vicerrector De Promoción Y Desarrollo Humano	Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero
Vicerrector Administrativo	Dr. Eduardo Ángel Reyes
Decano Facultad de Ciencias Agropecuarias	Dra. Claudia Aixa Mutis Barreto
Secretario Académico	Dr. Alejandro Tobón González
Director De Posgrados	Dr. Ernesto Andrés Dalmau Barros

COMPROMISO

Los trabajos de grado no contienen ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la Universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial atención a mi hijo Salvador, esposa Margarita y hermanito Marco Andrés (q.e.p.d).

Al Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas y la Universidad de los Llanos; por la financiación de la propuesta de investigación dentro del Proyecto macro de investigación: “Alternativa terapéutica para el control de *Rhipicephalus microplus* en bovinos con base en plantas forrajeras del piedemonte del Meta” Código 1122-569-35063.

A la Universidad de los Llanos por su disponibilidad constante de ambientes de aprendizaje.

A la Universidad de la Salle por su disposición de formación en las Ciencias Veterinarias.

RESUMEN

La ganadería bovina es una actividad sobresaliente en el contexto económico nacional, generando el 3.5% del PIB nacional y el 56% del PIB pecuario; los ectoparásitos, específicamente la garrapata *Rhipicephalus microplus*, han sido asociados con grandes pérdidas económicas para este reglón productivo pecuario, desde sus efectos directos (estrés, anemia) hasta la posibilidad de ser vector de múltiples agentes etiológicos de enfermedades de importancia para la comercialización de los productos y subproductos animales. En la presente investigación se validó la información etnofarmacológica del uso del árbol matarratón (*Gliricidia sepium*) como antiparasitario externo en sistemas de producción bovina del trópico bajo. La marcha fitoquímica preliminar del extracto acetónico de *G. sepium* determinó la presencia de los grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, terpenoides, cumarinas, glucósidos cardiotónicos, saponinas y taninos; hallados a través de las técnicas de cromatografía en capa delgada y colorimetría. La actividad acaricida del extracto acetónico de hojas de *Gliricidia sepium* se llevó a cabo en larvas y teleoginas de *Rhipicephalus microplus*, utilizando la prueba de inmersión de larvas (LIT) y la prueba de inmersión de adultos (AIT), respectivamente. El extracto acetónico de *Gliricidia sepium* mostró una CL_{50} de 78 mg/mL (71 – 83 mg/mL) y una CL_{90} de 146 mg/mL (128 – 182 mg/mL) en el bioensayo LIT. Por otro lado, la prueba AIT demuestra el efecto acaricida de *G. sepium* sobre teleoginas de *R. microplus* con una CL_{50} de 100 mg/mL (82 – 118 mg/mL) y una CL_{90} de 143 mg/mL (123 – 164 mg/mL). Así mismo, este estudio permitió establecer la inhibición de la ovoposición

en un 56.7% de las teleoginas expuestas a la concentración de 100 mg/mL del extracto acetónico de *G. sepium* ($p<0.05$), además de un 100% en el control de reproducción y una eficiencia reproductiva del 0.0% para las teleoginas utilizadas dentro del estudio ($p<0.01$), expuestas a la misma concentración citada; todos los datos fueron organizados y procesados, utilizando el software OpenStat 4, de acuerdo a la prueba Probit para el cálculo de la concentración letal; las diferencias estadísticas citadas entre los niveles de tratamiento (extracto 5, 25, 50 y 100 mg/mL; control negativo -excipiente Tween 80 2.5% en agua destilada- y control positivo -Amitraz 0.025 mg/mL en agua destilada-) se obtuvieron a través de Chi-cuadrado para mortalidad y ANAVA de una vía, post hoc Tukey-Kramer, para índices reproductivos y afección de ciclo de vida de *R. microplus*. La anterior información es relevante para consolidar el cultivo del matarratón en los sistemas de producción bovino del piedemonte del departamento del Meta, con la finalidad de ser utilizada como método alternativo de control para la garrapata común del ganado, donde es evidente la necesidad de fortalecer los sistemas de producción animal con estrategias integradas para el control de parásitos a partir del uso de plantas medicinales promisorias del contexto.

Palabras clave: fitoterapéutica, etnofarmacología, control integrado de parásitos.

ABSTRACT

The cattle is an outstanding activity in the national economic context, generating 3.5% of GDP and 56% of livestock GDP; ectoparasites, specifically the tick *Rhipicephalus microplus*, has been associated with major economic losses to the livestock production screed from its direct effects (stress, anemia) until the possibility of vector multiple etiologic agents of diseases of importance for marketing and animal by-products. In the present research the ethnopharmacological information about the use of Matarratón tree (*Gliricidia sepium*) as external antiparasite in cattle production systems validated tropical. Preliminary phytochemical action of acetone extract of *G. sepium* determined the presence of groups of secondary metabolites: flavonoids, terpenoids, coumarins, cardiac glycosides, saponins and tannins; found by the technique of thin layer chromatography and colorimetry. The acaricide activity of acetone extract of leaves of *Gliricidia sepium* was held in larvae and engorged *Rhipicephalus microplus*, using the larval immersion test (LIT) and adult immersion test (AIT), respectively. The acetone extract *Gliricidia sepium* showed an LC_{50} of 78 mg/mL (71-83 mg/mL) and LC_{90} 146 mg/mL (128-182 mg/mL) in the bioassay LIT. Furthermore, the AIT test shows acaricidal effect on teleogines *R. microplus* with an LC_{50} of 100 mg/mL (82-118 mg/mL) and an LC_{90} of 143 mg/mL (123-164 mg/mL). Additionally, this study established inhibiting oviposition in 56.7% of teleogines exposed to concentration of 100 mg/mL of acetone extract of *G. sepium* ($p<0.05$), and a 100% control of reproduction and reproductive efficiency 0.0% for teleogines used

in the study ($p<0.01$), exposed to the same concentration above. All data were organized and processed using the software OpenStat 4, according to the Probit test to calculate the lethal concentration; the aforementioned statistical differences between treatment levels (extract 5, 25, 50 and 100 mg/mL, negative control -excipiente 2.5% Tween 80 in distilled water- and positive control -Amitraz 0.025 mg/mL in distilled water-) were obtained by Chi-square test for mortality and one-way ANOVA, post hoc Tukey-Kramer, for reproductive indices and condition of the life cycle of *R. microplus*. The above information is relevant to consolidate the growing matarratón in bovine production systems piedemonte of Meta department, in order to be used as an alternative control method for the common cattle tick where it is evident need to strengthen the animal production systems with integrated strategies for controlling pests from the use of promising medicinal plants on the context.

Keywords: phytotherapeutic, ethnopharmacology, integrated pest control.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Planteamiento del problema y justificación 2

1.2 Objetivo general y específicos 4

2. MARCO TEÓRICO 5

2.1 Generalidades de la planta *Gliricidia sepium* 5

2.2 Estudios fitofarmacológicos de *Gliricidia sepium*, planta promisoria para el control integrado de parásitos 6

2.3 Fisiología nutricional de *Rhipicephalus microplus* posible blanco fitofarmacológico de *Gliricidia sepium* 9

3. METODOLOGÍA 13

3.1 Localización 13

3.2 Población y muestra 13

3.2.1 Material Vegetal y preparación del extracto 13

3.2.2 Teleoginas y larvas de *Rhipicephalus microplus* 15

3.3 Métodos y procedimientos 17

3.3.1 Marcha fitoquímica preliminar 17

3.3.2 Pruebas *in vitro* del efecto del extracto acetónico de *Gliricidia sepium* sobre *Riphicephalus microplus* 23

3.3.2.1 Prueba de inmersión larvaria (LIT) 24

3.3.2.2 Prueba de inmersión de teleoginas (AIT) 29

3.4 Diseño y análisis estadístico 36

4. RESULTADOS 37

4.1 Clasificación taxonómica de la planta 37

4.2 Preparación del extracto acetónico y marcha fitoquímica preliminar de *Gliricidia Sepium* 37

4.3 Evaluación acaricida in vitro del extracto acetónico de *G.sepium* sobre *R. microplus* 47

5. DISCUSIÓN 50

6. CONCLUSIONES 55

7. LISTA DE REFERENCIAS 56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Bioactividad antiparasitaria y antimicrobiana de *Gliricidia Sepium* 6

Tabla 2. Fitoquímica de *Gliricida sepium* enfocada a las propiedades biocidas 8

Tabla 3. Reportes de extractos vegetales con capacidad acaricida 11

Tabla 4. Determinación de grupos de metabolitos secundarios del extracto acetónico de *G. sepium* 47

Tabla 5. Resultados de índice de ovoposición (IO), el porcentaje de inhibición de la ovoposición (IO%), el control de reproducción (CR) y la eficiencia reproductiva (ER) de la prueba AIT con extracto acetónico de *G. sepium* 49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *G. sepium* en condiciones agroclimáticas del piedemonte llanero 5

Figura 2. Teleoginas de *Rhipicephalus microplus* 9

Figura 3. Obtención del extracto 14

Figura 4. Mantenimiento de la colonia de *Rhipicephalus microplus in vitro* 24

Figura 5. Montajes asociados a las prueba de inmersión de larvas – LIT 26

Figura 6. Montajes asociados a la prueba LIT 27

Figura 7. Metodología de Klafke et al. (2006) para la prueba LIT 29

Figura 8. Organización de los montajes asociados a la prueba AIT 30

Figura 9. Organización de los montajes posterior a la prueba de AIT 32

Figura 10. Montajes de la prueba de AIT 14 días posincubación – inhibición de la ovoposición 33

Figura 11. Procedimiento para establecer los efectos reproductivos asociados a la prueba de AIT en *Rhipicephalus microplus* 36

Figura 12. Técnica de colorimetría para detección de flavonoides en el extracto acetónico de *G. sepium* (Ea Gs) 38

Figura 13. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de flavonoides. 39

Figura 14. Técnica de colorimetría para detección de alcaloides en el extracto acetónico de *G. sepium* (Ea Gs) 40

Figura 15. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de alcaloides 40

Figura 16. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de antracénicos 41

Figura 17. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de Glicósidos cardiotónicos 42

Figura 18. Prueba de la espuma para la detección de saponinas 43

Figura 19. Técnica de colorimetría reactivo de Liebermann-Burchard para detección de terpenoides 43

Figura 20. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de terpenoides 43

Figura 21. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de cumarinas 45

Figura 22. Prueba de Cloruro férrico 10% para detección de Taninos 45

Figura 23. Prueba de reactivo gelatina sal para detección de Taninos 46

Figura 24. Modelo de regresión logística a través del método Probit (IC 95%), resultados de las pruebas LIT del extracto acetónico de *G. sepium* 48

1. INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina es una actividad sobresaliente en el contexto económico nacional, generando el 3.5% del PIB nacional y el 56% del PIB pecuario; distribuyéndose más del 55% de la población bovina del país en siete departamentos, entre estos el Meta (CONPES 3676, 2010). Los ectoparásitos, específicamente la garrapata *Rhipicephalus microplus*, ha sido asociada con grandes pérdidas económicas para este reglón productivo pecuario, desde sus efectos directos (estrés, anemia) hasta la posibilidad de ser vector de múltiples agentes etiológicos de enfermedades de importancia para la comercialización de los productos y subproductos animales (Rachinsky et al., 2007).

En el marco de la apertura económica del reglón productivo primario o extractivo agrario nacional es evidente la necesidad de fortalecer los sistemas de producción animal con estrategias integradas para el control de parásitos a partir del uso de plantas medicinales promisorias del contexto, más aun, con productos como los extractos de plantas que generan el desarrollo de ganaderías sostenibles económicamente y ambientalmente; así mismo, incrementando la rentabilidad del proceso productivo al originar productos y subproductos de producciones animales limpias; siendo la inocuidad una falencia demostrada que impide la apertura comercial internacional, frente a carne y leche de origen bovino (CONPES 3675, 2010); donde el control desmesurado de ectoparásitos se convierte en uno de los

principales factores de la presencia de residuos por encima de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas permitidos en los procesos de introducción a mercados (Codex Alimentarius, 2015).

Colombia es un país megabiodiverso (cerca del 10% de las especies del mundo habitan en el territorio), el cual ocupa el segundo puesto mundial en biodiversidad vegetal, concentrando más de 55.000 especies de plantas vasculares en diferentes ambientes agroclimáticos (FAO, 1987; McNeely et al., 1990); recursos naturales que han sido utilizados ancestralmente por comunidades para solventar situaciones problémicas asociadas a estados de salud humana y animal; es imperante la aplicación del método científico que permita constatar reproduciblemente y mejorar, en dado caso, estas prácticas terapéuticas tradicionales. En ese orden de ideas, este proyecto determinó los metabolitos secundarios del extracto acetónico de la planta *Gliricidia sepium* (matarratón) a través de la marcha fitoquímica preliminar y validó la información etnofarmacológica con estudios *in vitro* de su posible efecto acaricida en los diferentes estadios de *Rhipicephalus microplus* en las condiciones de los sistemas de producción bovina del trópico bajo.

1.1 Planteamiento del Problema y justificación

La infestación por garrapatas de la especie *Riphicephalus microplus* constituye uno de los principales problemas de la ganadería bovina de los países del trópico, siendo el agente causal de bajos índices reproductivos y ganancia de pesos asociados al uso de xenobióticos con capacidad tóxica, a la transmisión de agentes patógenos e injuria directa de los tejidos; que llevan a una alteración del bienestar

animal y al desarrollo normal de las actividades fisiológicas (Rachinsky et al., 2007; Jonsson et al., 2008; Reck et al., 2009). El control de las garrapatas en bovinos a nivel mundial se ha venido realizando desde el siglo XIX con el uso de agentes químicos (fármacos alopáticos), pero dado al manejo irresponsable de dichos productos, estos organismos han sufrido un proceso de selección, generado resistencia a estos productos (Bianchi et al., 2003; Rajput et al., 2006).

Teniendo en cuenta estas inferencias, la FAO (2004) recomienda desarrollar estrategias de control de parásitos (garrapatas) en los sistemas de producción animal sustentables desde la perspectiva ambiental y efectivas desde la visión de la salud animal; es así que el uso de extractos de plantas medicinales para el control de parásitos, con bases en los reportes etnofarmacológicos, es una práctica científica ampliamente distribuida en la actualidad que ha demostrado buenos resultados en el manejo integrado de plagas (WHO, 1993; Montes-Molina et al., 2008; Rahila et al., 2008; Castelblanco et al., 2013), y resultan muy convenientes para los sistemas productivos dado a que dichos extractos son sostenibles desde la perspectiva ambiental debido a su corto tiempo de biodegradación en el suelo (Ribeiro et al., 2008).

En este orden de ideas, existe la necesidad de implementar dentro del manejo integral de parásitos de los sistemas de producción bovino, alternativas terapéuticas sostenibles desde la perspectiva ambiental y eficaces en los procesos de control de este ectoparásito; es así, que el uso de plantas medicinales con actividad acaricida, es una de las actividades que brinda una salida a la situación problémica de resistencia a productos alopáticos y sostenibilidad ambiental. La

planta *Gliricidia sepium* es una especie promisoria para hacer parte del manejo estratégico en el control de plagas.

1.2 Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto *in vitro* del extracto acetónico de *Gliricidia sepium* sobre diferentes estadios de la garrapata *Riphicephalus microplus*.

Objetivos específicos

1. Determinar los grupos de metabolitos secundarios de *Gliricidia sepium* colectada en la Universidad de los Llanos.

2. Evaluar el efecto *in vitro* del extracto acetónico de *Gliricidia sepium* sobre la inhibición de la ovoposición, el control de reproducción, eficiencia reproductiva y capacidad garrapaticida (larvas y teleoginas) en *Riphicephalus microplus*.

2. MARCO TEORICO

2.1 Generalidades de la planta *Gliricidia sepium*

La especie *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex. Walp (GS) fue inicialmente reportada en el año 1842 en Repertorium Botanices Systematicae; se describe como un árbol o arbusto caducifolio, es decir, que pierde sus hojas al momento de la floración, leguminoso, de 2 a 15 m de altura, con flores de color amarillo, distribuido naturalmente desde S7 30' hasta N25 30'. Posee una amplia capacidad de adaptación a suelos salinos, inundables con buen drenaje, con temperaturas entre 20 y 30 °C, de 500 a 2500 mm de precipitación/año y 4 a 5 meses de época seca (Figura 1). Son estas características las que han posicionado a GS como una de las plantas recomendadas en los sistemas silvopastoriles del trópico bajo, pues dada su condición caducifolia, permite la renovación y génesis de materia orgánica en el suelo (Galeano et al., 2015).

Figura 1. *G. sepium* en condiciones agroclimáticas del piedemonte llanero (Fuente: Autor).

Respecto al valor nutritivo de GS, Wood et al. (1998) evaluaron la calidad de la materia seca (MS) de diferentes estructuras de GS en países del trópico, determinando los niveles de proteína cruda (PC), Fibra Detergente Neutra (FDN) y Fibra Detergente Ácida (FDA) y cumarinas; esta investigación se desarrolló en el departamento de Córdoba y fueron estandarizados los diferentes componentes minerales del suelo, reportando que bajo las condiciones de Colombia, la MS poseía mejor degradabilidad *in vitro*, con niveles de PC de 25,6%, FDN 33,7 % y FDA de 22,7%.

2.2 Estudios fitofarmacológicos de *Gliricidia sepium*, planta promisoria para el control integrado de parásitos

Existen reportes en la literatura internacional sobre *Gliricida sepium* y su incorporación en los sistemas de producción agrícola desde la perspectiva de control de parásitos (Tabla 1); así como estudios de sus componentes de metabolitos secundarios con capacidad para alterar la biología de insectos (Tabla 2), como lo son: rotenoides, cumarinas, taninos condensados, flavonoides, triterpenos, entre otros (Rojas et al., 2006; Aragón-García et al., 2008; Beena y Joji, 2010).

Tabla 1. Bioactividad antiparasitaria y antimicrobiana de *Gliricidia sepium*

Extracto/ Metabolitos secundarios aislados	Bioactividad	Ref. bibliográfica
Planta	Alelopatia – aumento de biomasa del cultivo del arroz con reducción de insectos parásitos	MacLean et al., 2003

Extracto etanólico	Bactericida y Fungicida (Dimetilformamidina) a 20 mg/mL	Rahila et al., 2008
	No citotóxico y genotóxico para células cancérigenas AA8, A549, HCT116 and MCF-7 a concentración de 6.25 a 50 mg/mL	Alzeus y Jacinto, 2015
Extracto etil acetónico	Larvicida, ovicida y pupicida para *Anopheles stephensi,* desde 25 a 100 ppm.	Krishnappa et al., 2012
Aceites esenciales	Bactericida 1 al 25% (vehiculizado en DMSO)	Beena y Joji, 2010
Ácido 8,11,14-eicosatrienoico	Larvicida para *Culex quinquefasciatus* a una CL_{50} 0.011 mg/mL y CL_{90} 0.060 mg/mL	Thomas et al., 2014

Abreviaturas: CL_{50} concentración letal 50, CL_{90} concentración letal 90, DMSO Dimetilsulfóxido, ppm partes por millón.

Rahila et al. (2008) reportaron efectos antiparasitarios del extracto metanólico de hojas de GS sobre dípteros del genero *Anopheles spp.* (78% de repelencia) y *Meloidogyne incognita* (60% mortalidad). En el reporte realizado por Montes-Molina et al. (2008) se informa del efecto de repelencia para más de 20 insectos, en periodos tempranos del cultivo de maíz; donde la aplicación del extracto acuoso y etanólico de hojas de GS generó diferencias significativas ($p<0.05$) sobre las cantidades cosechadas de maíz. Así mismo, estos extractos alcanzaron un efecto insecticida para *Spodoptera frugiperda, Macrodactylus* spp y *Frankliniella* spp; entre otros insectos parásitos del cultivo objeto de estudio.

Tabla 2. Fitoquímica de *Gliricida sepium* enfocada a las propiedades biocidas

Partes de la planta estudiada	Determinación de Metabolitos secundarios	Fracciones - Compuestos identificados	Ref. bibliográfica
	Cumarinas	Ácido melilotico	Griffiths, 1962
	Fenoles	Ramnogalactosido de 13 Kaempferol	Rangaswami y Iyer, 1966
	Flavonoides	----------	Manners y Jurd, 1979
	Saponinas triterpenoides	3, 21,24-trihidroxi-22-oxooleano-12-ene (aglicano)	Rastrelli et al., 1999a
Hojas	Esteroles	Glucósido estigmasterol	Herath y deSilva, 2000
	Aceites esenciales	Propilenglicol (25.1%), Cumarina (18.2%), (Z)-3-Hexenol (17.7%), β-Farnesene (14.2%), (E)-2-Hexenol (6.5%), entre otros.	Beena y Joji, 2010
	Etil acetato y etanol	Fracciones Extracto acuoso:extracto etanólico 0.5:9.5	Krishnappa et al., 2012
	Éter de petróleo	Fracción acetonitrilo, Ácido 8,11,14- eicosatrienoico	Thomas et al., 2014
Flores	Aceites esenciales	Cumarina (45%), Hidroquinona (21.6%), Mirtenol (12.7%), Maltol (4.4%), entre otros.	Beena y Joji, 2010
Raíz	Saponinas triterpenoides y compuestos aromáticos	3, 21,24-trihidroxi-22-oxooleano-12-ene (aglicano)	Rastrelli et al., 1999a
Corteza	Rotenoides	12a- hidroxi rotenoides desde el extracto metanólico	Rastrelli et al., 1999b

Por otra parte, el extracto acuoso *Gliricidia sepium* ha sido estudiado desde su efecto nematodicida; Berger et al. (1998) reportaron su efecto sobre *Meloidogyne incognita,* parásito del cultivo de arroz, encontrando un 60% de actividad nematodicida en estudios realizados *in vitro*.

2.3 Fisiología nutricional de *Rhipicephalus microplus* posible blanco fitofarmacológico de *Gliricidia sepium*

Rhipicephalus microplus (Murrell y Barker, 2003), es la nueva clasificación taxonómica que se le asigna a *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887), es una garrapata Ixodida que se caracteriza por ser monoxena, completando su ciclo de vida en un solo hospedero, alimentándose de sangre por 21 días. Respecto a sus diferentes estadios de desarrollo están: las fases de larva, metalarva, ninfa, metaninfa, neogina, partenógina, y teleogina (Figura 2); siendo las 2 últimas hembras parcialmente regurgitadas y totalmente regurgitadas respectivamente (Gallardo y Morales, 1999; Bergamo et al., 2010).

Figura 2. Teleoginas de *Rhipicephalus microplus* (Fuente: autor).

R. microplus se encuentra ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales ubicadas entre las latitudes S30 y N40, tanto en América, como en

África y Oceanía, y fue erradicada de Estados Unidos (Jongejan y Uilenberg, 2004). En los aspectos fisiológicos de la nutrición de *R. microplus* se destacan las enzimas proteolíticas quienes son las encargadas de la digestión de la hemoglobina, el principal sustrato proteico de su dieta, estando presentes en el tracto digestivo del adulto así como en la larva y los huevos (actuando como proteínas de reserva durante la embriogénesis) (Fagotto, 1990a; Fagotto, 1990b); estas enzimas pertenecen a la familia de la endopeptidasas (serina, cisteina, aspartato y metaloproteasas) (Neurath, 1989) y durante el desarrollo embrionario y adulto de *R. microplus*, las catepsinas y asparato proteasas, son la iniciadoras de la digestión de la vitelina y hemoglobina respectivamente, y cumplen un papel organizador de otras endopeptidasas, principalmente cisteína proteasas, que entran a actuar sobre los péptidos resultantes para completar la digestión de la proteína (Sojka et al., 2007).

Existen varios reportes bibliográficos concernientes a validar la información etnofarmacológica sobre el uso de extractos vegetales utilizados para el control de garrapatas en sistemas de producción animal (Tabla 3); estructurando así la posibilidad de incursión de especies vegetales adaptadas a condiciones agroclimáticas propias de las zonas de influencia de este tipo de agente parasitario. Cada especie vegetal posee un arsenal de metabolitos secundarios que le han permitido su supervivencia y fenómenos reproductivos, compuestos que son de interés farmacológico; dentro de los grupos de metabolitos secundarios aislados de los diferentes extractos preparados a partir de *Gliricidia sepium*, con potencial para el control de insectos sobre sistemas de producción agrícola y animal, sobresalen las cumarinas, las cuales son potentes inhibidores de la coagulación, actuando sobre las serina proteasas envueltas en la activación del factor XII de coagulación, y en

general sobre todas las proteasas con serina en su sitio activo (Pochet et al., 2004); la tripsina y quimotripsina también hacen parte de este grupo de proteasas inhibidas por las cumarinas y se encuentran en el tracto digestivo de *R. microplus*, generando alteraciones en la digestión de la hemoglobina en la garrapata adulta (Bergamo et al., 2010). De igual forma, existen evidencias de la inhibición de catepsinas, específicamente en los residuos de glutamina de la catepsina B humana en su sitio activo (Sajid y McKerrow, 2001) alterando por otra vía enzimática el inicio del metabolismo de la hemoglobina en la garrapata.

Tabla 3. Reportes de extractos vegetales con capacidad acaricida

Partes de la planta estudiada	Planta/extracto	Agente parasitario y concentración (dosis)/efecto	Ref. bibliográfica
Hojas	*A. squamosa* /hexano, *G. superba* /metanol y *P. emblica* /metanol	*Haemaphysalis bispinosa* CL_{50} 145.39, 225.57 y 256.08 ppm; respectivamente.	Bagavan et al., 2009
	Calpurnia aurea /acetona y agua	*R. pulchellus* 10 – 20% pierden movilidad.	Zorloni et al., 2010
	Petiveria alliacea /metanólico 10 y 20%	*R. microplus* 23.3% y 26.6% mortalidad, 28.2% y 40.1% IO; 26% y 21.3% IE, respectivamente. CL_{50} 4.3 (IC 3.9 – 4.7).	Rosado-Aguilar et al., 2010
	Neoglaziovia variegata /hexano, cloroformo y etanol	*R. microplus* 94.1%, 33.2% y 84.56% IE, respectivamente.	Dantas et al., 2015
	Datura stramonium /etanólico y acuoso	*R. microplus* 20% mortalidad AIT	Ghosh et al., 2015
Tallos	*Petiveria alliacea* /metanólico 10 y 20%	*R. microplus* 40% y 86.6% mortalidad, 56.8% y 91% IO; 17% y 16%,	Rosado-Aguilar et al.,

		IE, respectivamente. CL_{50} 3.9 (IC 3.2 – 4.6)	2010
Partes aéreas	*Neoglaziovia variegata* / hexano, cloroformo y etanol	*R. microplus* 61.9%, 50.6% y 57.2% CR, respectivamente.	Dantas et al., 2015
Fruto	*Semecarpus anacardium* /etanólico 10%	*R. microplus* 50% mortalidad AIT, CL_{90} 13.5 (IC 12.1–15.1), 65% IO.	Ghosh et al., 2015
Raíz	*Chrysopogon zizanioides* /aceites esenciales	*Amblyomma cajennense* y *R. microplus* 26 a 95% y 17 a 100% desde 50 – 100 µL/mL; respectivamente.	de Santana et al., 2015

Abreviaturas: CL_{50} concentración letal 50, CL_{90} concentración letal 90, ppm partes por millón, IO inhibición de ovoposición, IE inhibición eclosión, CR control de la reproducción, AIT prueba de inmersión de teleoginas.

Otro de los grupos de metabolitos secundarios promisorios aislados de *Gliricidia sepium* para el control de insectos son los taninos condensados; Fernandez-Salas et al. (2011) evaluaron el efecto de 4 plantas tropicales ricas en taninos (*Acacia pennatula*, *Piscidia piscipula*, *Leucaena leucocephala* y *Lysiloma latisiliquum*) en la supervivencia de la garrapata *R. microplus* en diferentes estadios de su desarrollo, y obtuvieron resultados satisfactorios sobre el efecto acaricida de los extractos acetónicos de las hojas estas plantas (CL_{50} *L. latisiliquum* y *P. piscipula* 6.40 y 2.47 g/mL en la prueba de inmersión larvaria); se determinó que el efecto larvicida era debido a los taninos condensados al no observar tal efecto cuando se aplicaban inactivadores de taninos en la solución de dilución del extracto, como lo es el polietilenglicol. Se presume que el efecto acaricida de los taninos condensados radica en su capacidad de inducir proteólisis de diferentes enzimas digestivas utilizadas por *R. microplus* en su fisiología nutricional.

3. METODOLOGÍA

3.1 Localización

El presente estudio se realizó en la granja Barcelona 4° 04’ 32,91” Latitud Norte 73° 35’ 02,27 Latitud Oeste; en el laboratorio de parasitología y laboratorio de nutrición de la Universidad de los Llanos; a una altura de 440 msnm, precipitación de 3500 mm/año, Humedad Relativa de 87% y temperatura promedio de 27 ºC (IDEAM, 2015).

3.2 Población y muestra

3.2.1 Material Vegetal y preparación del extracto

Se recolectaron 50 Kg de hojas de *Gliricidia sepium* en la Granja Barcelona de la Universidad de los Llanos. Una muestra de hoja, tallo, fruto – florescencia fue enviada al Herbario Nacional con la finalidad de realizar su clasificación taxonómica. La elaboración del extracto acetónico se realizó tomando al material vegetal recolectado, éste se cortó y secó en una estufa de aire recirculante marca ESCO Isotherm® OFA-54-8 a 40°C durante 72 horas (ver figura 3 - A), luego el material seco fue molido hasta pulverización, obteniendo un cernido homogéneo, procedimiento que se realizó en el laboratorio de nutrición de la Universidad de los Llanos, usando un molino mecánico (ver figura 3 - B). Se tomó el material molido y se

realizó la técnica de percolación continua hasta agotamiento, con acetona al 70% (ver figura 2 - C). El líquido percolado se filtró y concentró a 56°C en un evaporador rotatorio, marca IKA® RV 10 control, a presión reducida; llevándose a sequedad finalmente en baño de María (ver figura 3 - D). El extracto resultante fue refrigerado (4°C) en frascos de vidrio color ámbar con tapa hermética; y reconstituido en agua destilada y Tween-80 2.5% a concentraciones de 5, 25, 50 y 100 mg/mL al momento de realizar las pruebas siguiendo la metodología de estudio propuesta para extractos de plantas con actividad (Castro et al., 2009).

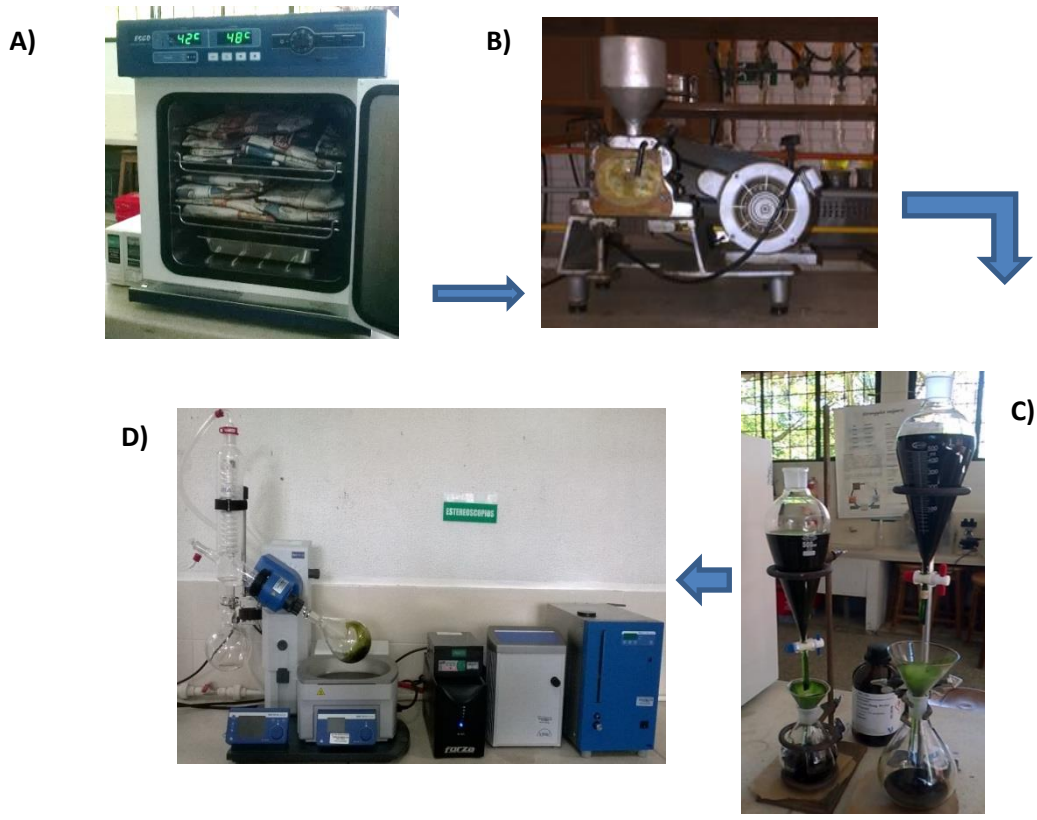


Figura 3. Obtención del extracto. A) Secado hojas; B) Molienda; C) percolación continua hasta agotamiento, solvente acetona 70%; D) Concentración del extracto en el evaporador rotatorio IKA® RV 10 control (Fuente: autor).

3.2.2 Teleoginas y larvas de *Rhipicephalus microplus*

Se recolectaron 500 teleoginas (garrapatas ingurgitadas con una longitud corporal entre 4 – 8 mm) de *R. microplus* de los animales seleccionados bajo infestación natural en la granja Barcelona de la Universidad de los Llanos (25 teleoginas por animal). Para la toma de la muestra de garrapatas se pasó la mano de modo suave sobre las diferentes regiones del cuerpo del hospedador, en las cuales habitualmente se localizan y se desprenden de manera directa con los dedos índice y pulgar, agarrándola lo más cerca posible del capítulo, volteándola hacia arriba y tirando suavemente de ella en contrapelo hasta desprenderlas completamente, evitando así que el hipostoma quede adherido a la piel del hospedador u ocasionar daño alguno (Gallardo y Morales, 1999). Posteriormente se realizó su caracterización a través de estereoscopia en el laboratorio de parasitología de la Universidad de los Llanos, además de evaluar su viabilidad (ausencia de mutilaciones y movimientos pediculares).

Las teleoginas se utilizaron directamente para las pruebas de inmersión o se direccionaron para el establecimiento del cultivo en condiciones *in vitro*, en el cual se lavaron con una solución de hipoclorito 2,5%, luego se lavaron con abundante agua destilada y fueron secadas con toallas de papel absorbente, para prevenir contaminación microbiológica (Castelblanco et al, 2013). Posteriormente fueron separadas en grupos homogéneos de 10 garrapatas, las cuales se pesaron y colocaron en una caja de Petri plástica, determinando el índice de eficiencia de la conversión (IEC), éste es un parámetro cuantitativo utilizado para determinar la conversión del peso de una hembra ingurgitada, se calculó dividiendo el peso de los

huevos producido por unidad experimental sobre el peso de las teleoginas, de acuerdo con la siguiente expresión propuesta por Drummond et al. (1971):

IEC = Peso de los huevos de la Unidad Experimental/ Peso de las hembras de la Unidad Experimental al inicio del ensayo.

Las garrapatas fueron colocadas sobre papel kraft en las respectivas cajas de Petri, rotuladas (fecha de recolección, fecha incubación y peso de las teleoginas en el grupo), posteriormente fueron colocadas en una caja plástica para generación de microambientes e incubadas a 27 – 28 ºC con una humedad relativa de 85% - 95% utilizando una Incubadora Refrigerada MEMMERT® IPP 110.

A los 14 días posteriores a la incubación, los huevos de los grupos de teleoginas fueron pesados, identificados y colocados en un vial de vidrio individual; tapado con un tapón de gasa estéril para permitir el intercambio de aire y humedad, y rotulado (fecha de incubación de teleoginas, fecha de pesaje e incubación de huevos y el peso de los huevos); posteriormente los viales fueron colocados en las cajas plásticas (microambiente) para su incubación a 27 a 28ºC con una humedad relativa de 85% al 95% utilizando una Incubadora Refrigerada MEMMERT® IPP 110. La eclosión se presentó a los 21 ± 3 días; una vez eclosionados, las larvas fueron utilizadas en las pruebas acaricidas *in vitro* descritas a continuación.

3.3 Métodos y procedimientos

3.3.1 Marcha fitoquímica preliminar

Se realizó el análisis fitoquímico preliminar de las hojas de *Gliricidia sepium*, siguiendo la metodología propuesta por Sanabria (1983) a través de métodos colorimétricos y cromatografía en capa delgada, los cuales permiten determinar la presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios del extracto acetónico de la planta, como lo son: alcaloides, esteroides o triterpenoides, flavonoides, naftoquinas o antraquinonas, saponinas, taninos, lactonas, cumarinas y cardiotónicos; así:

Detección de flavonoides:

Colorimetría: se tomaron 15 mL del filtrado del extracto acetónico de *Gliricidia sepium* y se agregaron 15 mL de etanol, llevándose a decantación, posteriormente se hace extracción con 2 porciones de 10 mL de acetato de etilo; la fase acuosa resultante se lleva nuevamente con 2 porciones de 10 mL de n-Butanol. La fase acuosa resultante se dividió en cinco porciones iguales, llevándose a sequedad en baño de María. Posteriormente se disolvió en 4 porciones de mezcla etanol:agua (1:1) para realizar pruebas colorimétricas en tubo. A un tubo de ensayo le adicionaron 2 gotas de HCl concentrado, más un trozo de cinta de Zn posterior a la dilución del Zn surgió una coloración rosada, naranja, roja azulosa, violeta, verde o azul; las cuales indicaban la presencia de flavonoides en la muestra. Los controles positivos utilizados en esta detección fueron: Quersetina, Rutina y Ácido clorogénico (Sanabria, 1983).

Cromatografía en capa delgada: se pesaron 2 g del extracto, disolviéndolo en metanol 98% para luego ser filtrado con óxido de aluminio 90 activo básico, adicionando primero cloroformo para extraer clorofilas; el filtrado obtenido se pasó por el rotaevaporador IKA® RV 10 de manera independiente en un balón de vidrio. Posterior se adicionó en una cámara de cromatografía 10 mL de cloroformo, en una placa de TLC silica gel 60 F_{254} impregnada de cada fracción clorofórmica y metanólica, además del extracto acetónico, y el patrón positivo para flavonoides: Rutina (Sanabria, 1983); se introdujo el cromatofolio de forma vertical hasta la formación de líneas de continuidad, posteriormente se reveló con el reactivo NPPEG (Polietilenglicol) y reactivo de Godin (Vainillina al 1% en etanol y Ácido sulfúrico (H2SO4) al 5 % en etanol).

Detección de Alcaloides

Colorimetría: se pesaron 5 gramos de material vegetal seco y molido; al cual le adicionaron 3 mL de NH_4OH y 50 mL de éter etílico-cloroformo (3:1), colocándolo a ebullición y luego filtración al vacío. El filtrado se trasvaso a un embudo de decantación, haciendo la extracción con 2 x 10 mL H2SO4 1N; la fase orgánica se descartó y a la fase acuosa fue alcalinizada con 2mL de NH_4 pH 8-9, posteriormente se hizo una nueva extracción con 2 x 10 mL de $CHCl_3$, de nuevo la fase acuosa se descartó y la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y colocó 1 mL de solución en cinco tubos de ensayo proveniente de la solución etanólica y otro con la solución clorofórmica, llevándose a sequedad para posteriormente disolverse en 1 mL de HCl 2N para realizar pruebas colorimétricas en tubo. A cada tubo se agregó 1 ml de HCl al 5%, además de 2 gotas de los siguientes reactivos: Reactivo

Dragendorff, Reactivo de Meyer, Reactivo Valser y Reactivo de Reinekato. Los tubos donde se formó precipitado indicaron una prueba positiva. El control positivo utilizado fue el extracto etanólico del árbol borrachero - EtOH B -(*Brugmansia spp*).

Cromatografía en capa delgada: para esta prueba se utilizó como patrones de referencia la Quinina y el extracto metanólico de *Brugmansia spp* del cual se pesó 5 mg al que se adicionó 1mL de metanol y cloroformo. En una placa de TLC silica gel 60 F_{254} se colocó una gota de cada preparado (extracto acetónico de *Gliricidia sepium*, fracción metanólica *G. sepium*, fracción clorofórmica *G. sepium* y extracto metanólico de *Brugmansia spp*), posteriormente se depositó en la cámara de cromatografía con eluente metanol cloroformo (1:1), para después ser expuesta en la cámara a rayos ultravioleta 366 nm y luego fue llevada al proceso de revelación química utilizando 2 soluciones del reactivo de Dragendorff. La coloración naranja es sinónimo de existencia de alcaloides en las muestras estudiadas.

Detección de Antracénicos

Colorimetría: se disolvió 1 g de extracto acetónico de *Gliricidia sepium* en 10 mL de H_2O: etanol (7:3) para posteriormente ser sometido a calentamiento a 60°C por 5 minutos, finalmente filtrándose y adicionando 1 mL de H_2SO_4 al 50% y 1 mL de H_2O_2 al 20%, luego esta preparación fue calentada en baño de maría por diez minutos, subsiguiente se enfrió y filtró de nuevo. El producto del filtrado fue trasvasado a un embudo de decantación donde se realizó extracción con dos porciones de 5 mL de tolueno. La fase acuosa se elimina y la fase orgánica se deshidrató con sulfato de sodio anhidro y posteriormente concentrándose hasta

aproximadamente 3-4 mL. Luego se realizó la prueba de reconocimiento denominada la reacción de Borntrager- Kraus, donde el control positivo fue el extracto etanólico de hojas de Sen (Sanabria, 1983).

Cromatografía en capa delgada: para esta prueba se utilizó como patrón de referencia la cáscara sagrada (antraquinona) del cual se pesó 1 mg al que se adicionó 1mL de metanol y cloroformo. En una placa de TLC silica gel 60 F_{254} se colocó una gota de cada preparado (extracto acetónico de *Gliricidia sepium*, fracción metanólica *G. sepium*, fracción clorofórmica *G. sepium* y cáscara sagrada en dilución) para luego ser colocada en la cámara de cromatografía con eluente metanol:cloroformo (1:1).

Detección de glicósidos cardiotónicos

Colorimetría: en un beaker se agregaron 1 g de *Gliricidia sepium* y 50 mL de agua destilada, luego se realizó extracción con dos porciones de 10 mL de Éter de petróleo; la fase orgánica se descartó y a la fase acuosa le adicionaron acetato de plomo, después se calentó por 15 minutos, filtrándose y trasvasándose el filtrado a embudo de decantación. Posteriormente se realizó extracción con dos porciones de 20 mL de cloroformo:metanol (90:10). La fase acuosa fue descarta y la fase orgánica adicionada con Sulfato de sodio anhidro y subsiguientemente filtrada. El filtrado es concentrado y dividido en porciones iguales; una de las porciones se expuso al reactivo de Kedde para la detección de núcleo esteroidal (Sanabria, 1983). La otra le fue agregada 2 gotas de anhidro acético y 2 gotas de H_2SO_4 concentrado. La prueba se consideró positiva cuando se observó un cambio de color rosado pasando en

cualquier tonalidad de rojo, violeta, azul o verde. El control positivo usado fue el extracto de *Digitalis purpurea*.

Cromatografía en capa delgada: inicialmente se pesaron 2 g del extracto acetónico de *G. sepium* el cual fue depositado en un beaker y disuelto con metanol para luego ser filtrado con óxido de aluminio 90 activo básico, adicionando primero cloroformo para extraer clorofilas y después metanol. Los filtrados obtenidos se pasaron por el rotaevaporador IKA® RV 10 de manera independiente en un balón de vidrio. Posterior fue adicionado 10 mL de cloroformo en una cámara de cromatografía tapada el cual fue la fase eluente del montaje respectivo. En una placa de TLC silica gel 60 F_{254} se colocó una gota de cada fracción del extracto acetónico de *G. Sepium,* además del control positivo: Digitoxina (Sanabria, 1983);. El cromatofolio se introdujo en la cámara, previamente impregnada, de forma vertical y se dejó allí por varios minutos hasta que se formaron líneas de continuidad de las gotas de cada fracción (clorofórmica y metanólica) del extracto acetónico y del patrón positivo Digitoxina; momento en el cual se sacó la placa para realizar su lectura respectiva.

Detección de Saponinas

Se pesó 2 g del extracto acetónico de la *Gliricidia sepium* los cuales se depositaron en un tubo de ensayo adicionándole 20 mL de agua destilada, tapando con papel aluminio la parte superior, subsiguientemente agitándose el tubo de ensayo por 10 minutos. La prueba resulta positiva sí se forma en la parte inmediatamente superior del preparado una solución espumosa que se debe mantener por más de 15 minutos.

Detección de Terpenoides

Colorimetría: se pesó 500 mg del extracto acetónico de la *Gliricidia sepium*, los cuales fueron depositados en un tubo de ensayo adicionándole 5 mL de acetona, posteriormente se agregó el reactivo de Liebermann-Burchard (acético anhídrido y ácido sulfúrico concentrado) (Sanabria, 1983); la formación de un color verde oscuro es indicativo de la presencia de grupos esteroles (colesterol – terpenoides) en la muestra.

Cromatografía en capa delgada: se utilizó una cromatoplaca de TLC silica gel 60 F_{254}, a la cual le fue colocada una gota de cada fracción del extracto acetónico de *G. Sepium* y el patrón positivo Lupeol, y cámara de fases con eluente metanol:cloroformo 75:25, revelador Liebermann-Burchard y dos soluciones, la solución A con Vainillina y la solución B con Ácido Perclórico 3% en Etanol. Se asperjo la cromatoplaca con la solución A seguida de la solución B posterior a la cámara de fases; se calentó a 100ºC y observación en la cámara de luz ultravioleta 254 y 366 nm.

Detección de cumarinas

Cromatografía en capa delgada: la fase estacionaria de este montaje estuvo asociada a la utilización de sílica gel G-60, a través de cromatofolios de 5 x 1 cm; a su vez la fase móvil de las cámaras de cromatografía se organizaron con una solución de tolueno:éter (1:1), saturado con ácido acético al 10%, posterior a la elución de las fases clorofórmica, metanólica, extracto acetónico de *G. sepium*, además del patrón positivo E-Umbeliferona; se utilizó como revelador la solución de

vainillina al 1% en ácido sulfúrico al 5%, además del uso de la cámara de luz ultravioleta 365 nm.

Detección de taninos

Prueba de Cloruro Férrico 10%: se utilizaron 3 diferentes montajes, el patrón positivo con ácido clorogénico diluido en agua destilada, el extracto respectivo con una concentración alta y el mismo extracto pero menos concentrado con el anterior montaje. A cada uno se le adicionó 3 gotas de cloruro férrico 10%.

Prueba reactivo de Gelatina sal: se colocó 1 mL del extracto acetónico de la *Gliricidia sepium* en un tubo de ensayo y se adicionó 1 mL del reactivo Gelatina sal (solución de gelatina al 1% y de cloruro de sodio al 10%); posteriormente se formó un precipitado que se llevó a centrifugación a 2000 rpm por 10 minutos, luego fue desechado el sobrenadante, al precipitado le fue adicionado 1 mL de solución de Urea al 2.5 M y luego 3 gotas de cloruro férrico 10%. La formación de un precipitado de color verde oscuro fue indicativo de la presencia de taninos.

3.3.2 Pruebas *in vitro* del efecto del extracto acetónico de *Gliricidia sepium* sobre *Riphicephalus microplus*

Para la evaluación del efecto *in vitro* del extracto acetónico de la planta sobre los diferentes estadios de *R. microplus* se desarrollaron las siguientes pruebas de inmersión larvaria e inmersión de adultas, en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad de los Llanos, bajo condiciones de temperatura de 25-27°C, Humedad Relativa de 85 - 92% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

3.3.2.1 Prueba de inmersión larvaria (LIT)

Se aplicó la LIT propuesta por Shaw (1966) en concentraciones de 5, 25, 50 y 100 mg/mL del extracto acetónico de la planta reconstituido en agua destilada y Tween-80 2.5%; un control negativo con agua destilada + Tween-80 2.5% y un control positivo con Amitraz 0.25mg/mL, concentración recomendada por el fabricante (Taktic®, 12.5% IA); se usaron larvas de garrapatas *R. microplus* de 7 a 14 días de edad obtenidas a partir de teleoginas colectadas de bovinos de la Universidad de los Llanos – colonia mantenida bajo condiciones *in - vitro*. Se seleccionaron para incubar viales con la tasa de eclosión de las larvas más alta (90-100 %). Para determinar la edad de las larvas a utilizar en la prueba, se comenzó a contar los días a partir de la subida de las mismas al tapón de algodón, que fue aproximadamente a los 21 días postincubación de los huevos. Una vez iniciado la emergencia de larvas se utilizaron hasta 21 días después de haber emergido (ver figura 4), después de este tiempo no se consideró conveniente usar larvas, pues podría estar alterada su viabilidad para el desarrollo de la prueba.

A) **B)**

Figura 4. Mantenimiento de la colonia de *Rhipicephalus microplus in vitro.* A) Vial con estadios embrionados (huevos) y algunas larvas de *Rhipicephalus microplus*

emergiendo B) Vial con larvas emergidas en su totalidad, útil dentro de las pruebas a desarrollar (Fuente: autor).

Para el bioensayo los viales con larvas se colocaron en el centro de una placa de Petri, la cual se llenó posteriormente con agua y jabón, lo que impidió el escape de las larvas desde el vial (Rosado-Aguilar et al., 2010), las larvas fueron distribuidas completamente al azar y de manera uniforme, en cajas Petri de vidrio de 15 cm de diámetro, se colocó papel filtro Whatman No. 1 de 12.5 cm de diámetro. Se tomaron 10 mL de Tween-80 (2.5%) para el grupo control negativo y se esparció el líquido sobre el papel; luego se continuó con el montaje, siguiendo la misma metodología del control negativo, para cada una de las concentraciones citadas del extracto acetónico de *G. sepium*, iniciando con la concentración más baja hasta la más alta, empleando el mismo volumen (10 mL) de la solución del extracto, y organizando por último el control positivo. Se colocaron 300-500 larvas en cada uno de los montajes, que fueron distribuidas en el papel con la ayuda de un pincel No. 4 (ver figura 5 - A), una vez colocadas las larvas sobre el papel filtro inmediatamente se cubrieron con otro papel de las mismas características y se empezó a contabilizar los 10 minutos que dura el periodo de inmersión.

El tiempo de inmersión se tuvo en cuenta teniendo la seguridad que las larvas se sumerjan y tengan contacto total con cada uno de los tratamientos. Cuando el periodo de inmersión fue concluido, los dos papeles filtro los cuales contienen en su interior las larvas, fueron extraídos de la caja Petri de vidrio con la ayuda de unas pinzas de disección y se colocaron sobre papel toalla para absorber el exceso de la solución de cada uno de los tratamientos (ver figura 5 - B).

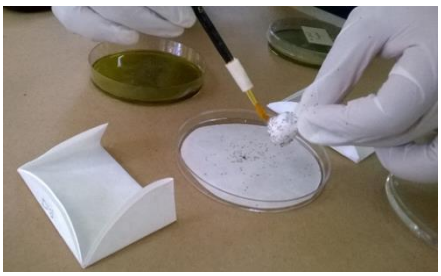
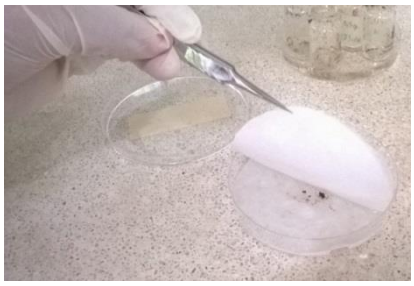
A)  **B)** 

Figura 5. Montajes asociados a las prueba de inmersión de larvas - LIT. A) Preparación de las 300 – 400 larvas de *R. microplus* próximas a ser expuestas a los niveles de tratamiento. B) Larvas de *R. microplus* próximas a ser extraídas de los respectivos montajes de la prueba LIT (Fuente: autor).

Posteriormente una cantidad aproximada de 100 larvas fueron extraídas de los dos papeles filtro con ayuda de un pincel del No. 4 y se transfiero en cada paquete los cuales fueron hechos previamente con papel filtro Whatman No. 1, de 7.5 x 8.5 cm, sujetados con tres clip metálicos (ver figura 6 - A). Los paquetes se identificaron con lápiz previamente con los datos de concentración, concentración del extracto o solución probada. Una vez se llenaron los paquetes con los controles y las larvas tratadas se colocaron en cajas plásticas y se llevaron a la incubadora a una temperatura de 27 a 28º C y 85-95 % de humedad relativa por un periodo de 24 horas, de acuerdo a la metodología propuesta por Castro-Silva et al. (2011) (ver figura 6 – B).

Trascurrido el periodo de incubación, se realizó la lectura de los paquetes determinando el número de larvas vivas y muertas en todas las concentraciones y los controles. Con ayuda de cinta adhesiva se atraparon las larvas vivas, las que tuvieron la capacidad de caminar, y se contabilizaron con la ayuda de un contador manual (Shaw, 1966). Se consideraron las larvas muertas: las que no se movieron,

las que presentaron ataxia o movimientos apendiculares únicamente al examen estereoscópico. Mientras se realizó el conteo se estimularon las larvas vivas pero inactivas, mediante una fuente de calor o espirando sobre estas (ver figura 6 – C y D).

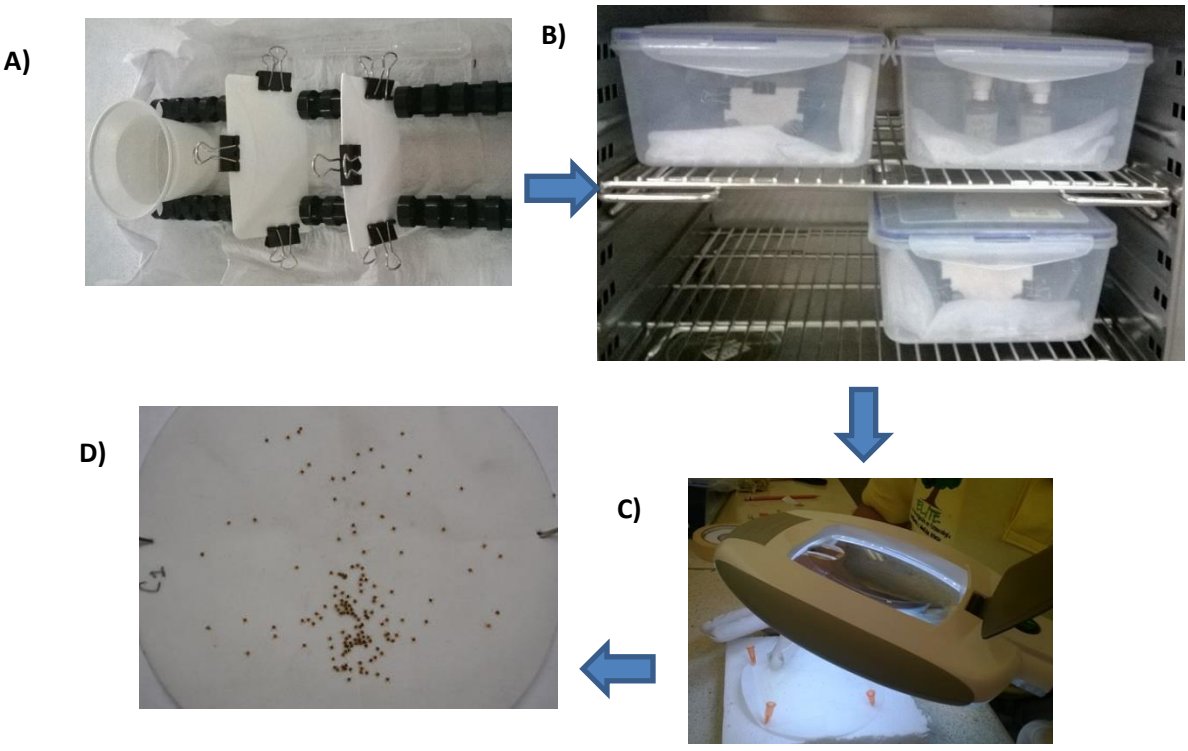


Figura 6. Montajes asociados a la prueba LIT. A) Uso del papel filtro tipo Whatman No. 1, de 7.5 x 8.5 cm para organizar cada nivel de tratamiento y sus repeticiones. B) Incubación de los microambientes en cámaras separadas por nivel de tratamiento. C) Lectura de las larvas muertas o vivas de *R. microplus* posterior a la incubación. D) Detalle de la lectura (Fuente: autor).

Para calcular la mortalidad se utilizó la fórmula propuesta por la FAO, Plan Protection Bulletin (1971):

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{Número de larvas muertas}}{\text{Larvas totales}} * 100$$

Debido al amplio volumen (10 mL) a utilizar en cada uno de los montajes y sus repeticiones, relacionado principalmente con el rendimiento del extracto acetónico de *G. sepium*, se decidió utilizar la metodología descrita por Klafke et al. (2006) y Klafke et al. (2012) para la prueba de inmersión de larvas para cada una de las repeticiones del experimeto, así: 1 mL de cada solución final de inmersión se distribuyó en tres tubos plásticos para microcentrífuga de 1,5 mL, y así se obtuvo tres repeticiones de cada solución. Con el uso de un pincel de nylon N° 4, aproximadamente 300 larvas se transfirieron suavemente a cada tubo, el cual fue cerrado y agitado vigorosamente hasta asegurar el hundimiento de las larvas en cada una de las soluciones asociadas a los niveles de tratamiento (control negativo, control positivo, diversas concentraciones del extracto).

Las larvas se sumergieron durante 10 minutos; posterior a la inmersión, los tubos se abrieron y las larvas se retiraron con un pincel limpio, y se transfirieron a un papel filtro, luego del secado, cerca de 100 larvas fueron trasladadas con el mismo pincel a un papel filtro Whatman # 1 (850mm × 750 mm) que se dobló y cerró sus lados con clips bulldog metálicos. Después de la adición de las larvas, el paquete se selló con un tercer clip y se incubaron utilizando una incubadora refrigerada MEMMERT® IPP 110 a una temperatura de 27-28 C y la humedad relativa 85-90% durante 24 horas (ver figura 7). La lectura y evaluación de la prueba se desarrolló tal cual se explicó con anterioridad.

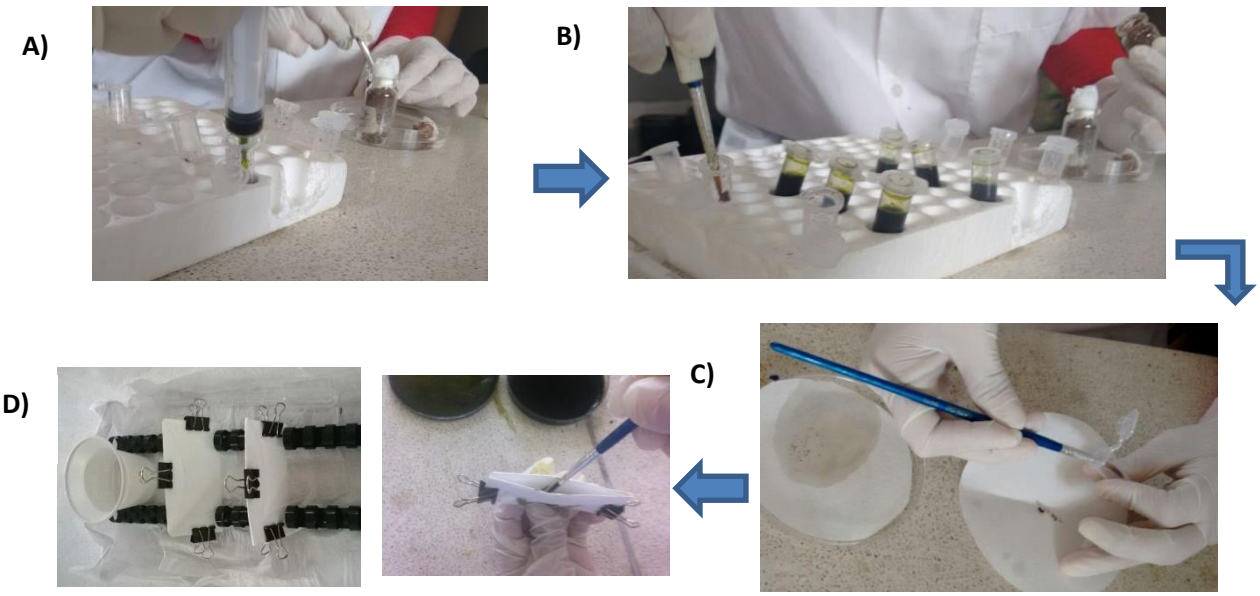


Figura 7. Metodología de Klafke et al. (2006) para la prueba LIT. A) y B) Llenado de los tubos para centrifuga con los niveles de tratamiento y larvas de *R. microplus*. C) y D) Organización de los montajes para incubar posterior al tiempo de inmersión (Fuente: autor).

3.3.2.2 Prueba de inmersión de teleoginas (AIT)

Se colectaron teleoginas (garrapatas ingurgitadas con una longitud corporal entre 4 – 8 mm) de *R. microplus* de bovinos parasitados en forma natural de la granja Barcelona en la Universidad de los Llanos, seleccionados aleatoriamente (aproximadamente 25 teleoginas por bovino), las teleoginas fueron lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 2,5%, para prevenir contaminación bacteriana y fúngica; y además se eliminaron aquellas que presentaron mutilaciones o malformaciones; al final escogiendo las de tamaño uniforme a las cuales se les aplicó la prueba de inmersión de adultas propuesto por Drummond et al. (1973), con adaptaciones como se describe a continuación: las teleoginas fueron pesadas, y

distribuidas completamente al azar y de manera uniforme, la unidad experimental trabajada son 10 teleoginas con pesos uniformes para cada uno de los diferentes tratamientos y controles, un peso aproximado de 200 mg. Las garrapatas adultas así como sus huevos fueron pesadas en una balanza electrónica Kern® EW 220 (Ver figura 8 – A). Para los tratamientos iniciales las teleoginas fueron sumergidas en concentraciones de 5, 25, 50 y 100 mg/mL del extracto de las hojas de la planta reconstituido en Tween-80 (2.5%) y agua destilada, un control negativo con Tween-80 2.5% en agua destilada, y un control positivo con Amitraz 0.025% concentración recomendada por el fabricante (Triatox®, 12.5%), empezando por el control negativo y continuando con la concentración más baja y terminando con la más alta del extracto vegetal, y por último el control positivo, con intervalo de un minuto entre cada inmersión (Ver figura 8 – B). En total se utilizaron 6 réplicas por concentración y 2 controles por prueba, es decir se utilizaron 60 teleoginas por concentración y 20 para los controles, para un total de 260 teleoginas por prueba.

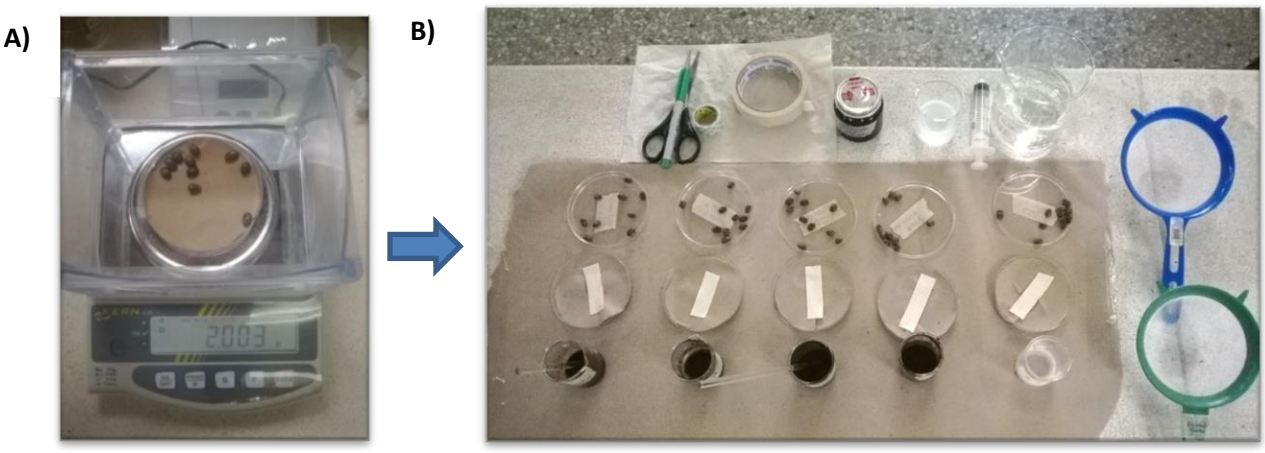


Figura 8. Organización de los montajes asociados a la prueba AIT. A) Uso de la balanza electrónica para la organización de grupos unificados de pesos de

teleoginas. B) Prueba de inmersión de adultas, montajes respectivos en cajas de Petri (Fuente: Autor).

Para cada nievl de tratamiento y sus repetciiones se efectuó lo siguiente: cada grupo de 10 teleoginas se colocaron en un beaker de 50 mL, a cada uno se le añadió la dilución del extracto de la planta reconstituido previamente, procedmiento descrito con anterioridad, hasta alcanzar un volumen total 10 mL por montaje y se sumergieron uniformemente a fin de permanecer expuestas en su totalidad. El proceso de inmersión fue de 10 minutos, durante este tiempo se agitó suavemente; completado el tiempo de inmersión se retiraron las garrapatas con ayuda del colador y luego se secan completamente con papel adsorbente, este procedimiento se realizó con la misma secuencia de inmersión y procurando que todos los grupos tuvieran el mismo tiempo de inmersión (Ver figura 9 - A y B). Posteriormente, las teleoginas fueron puestas en cajas de Petri plástica de 9 cm de diámetro, rotuladas con: la fecha respectiva de la prueba, el peso de la unidad experimental (10 teleoginas) y los diferentes niveles de tratamiento (extractos, controles positivo y negativo, replica). Previamente, las cajas de Petri fueron acondicionadas con un circulo de papel kraft del tamaño de la base de la caja, papel con un agujero en la mitad de 2.5 cm de diámetro, para poner un cuadrado de cinta pegante doble faz en el centro de la base de la caja de Petri, de forma tal que permitiera pegar tanto el papel como las garrapatas a la caja en forma concéntrica (Ver figura 9 – C).

Las teleoginas se colocaron con la parte ventral hacia arriba, orientando el opistosoma hacia el centro de la caja Petri, es decir, las teleoginas quedaron en contacto con la cinta por el idiosoma dorsal (posición dorsal), las patas le quedaron

absolutamente libres pero el cuerpo se fijó y quedó inmovilizado (Drummond et al., 1973). Luego, las cajas de Petri fueron colocadas en una caja plástica, colocando un papel absorbente húmedo en el fondo de la caja, además de un vaso plástico de 100 mL con agua destilada que ayudó a mantener la humedad del montaje respectivo (Ver figura 9 – D). Enseguida son incubadas utilizando la incubadora refrigerada MEMMERT® IPP 110 a 27 – 28 ºC con una humedad relativa de 85% al 95%, por un periodo de 14 días.

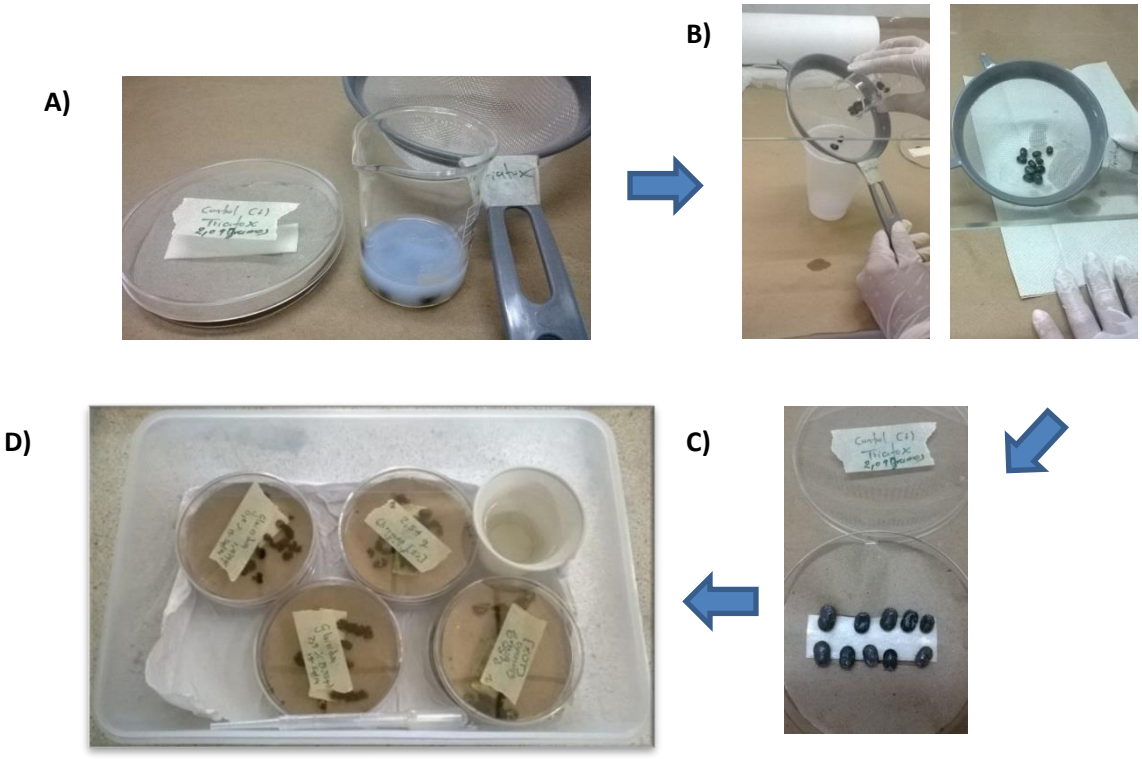


Figura 9. Organización de los montajes posterior a la prueba de AIT. A) Teleoginas sumergidas en los diferentes niveles de tratamiento del experimento. B) Extracción y secado de las teleoginas posterior a la prueba de AIT. C) Teleoginas organizadas en la caja de Petri posterior al secado. D) Montaje para Incubadora por niveles de tratamiento (Fuente: Autor).

La lectura de la prueba de inmersión de teleoginas se desarrolló mediante estereoscopia determinando el número de garrapatas muertas, las cuales fueron diagnosticadas por presentar lesiones cuticulares u oscurecimiento de la cutícula, además las que no presentaron movimiento de las patas o desplazamientos cuando se les realizó diferentes estímulos como: fuente luminosa (lámpara del estereoscopio), reacción al momento de ser tocadas con un puntero romo en la región cervical, estimulación con gas carbónico eliminado por respiración (Casteblanco et al., 2013). La mortalidad se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 horas, además a los 7 días y 14 días postratamiento. Mediante la siguiente formula se estableció el porcentaje de mortalidad de cada uno de los niveles de tratamiento, así:

$$\text{El porcentaje de mortalidad: } \frac{\text{Teleoginas muertas}}{\text{Total de teleoginas}} \times 100$$

Después de dos semanas se determinó el número de teleoginas que ovopositarón, además otro indicador de mortalidad manejado fue la incapacidad de ovoposición durante el periodo de observación mencionado con anterioridad (ver figura 10).

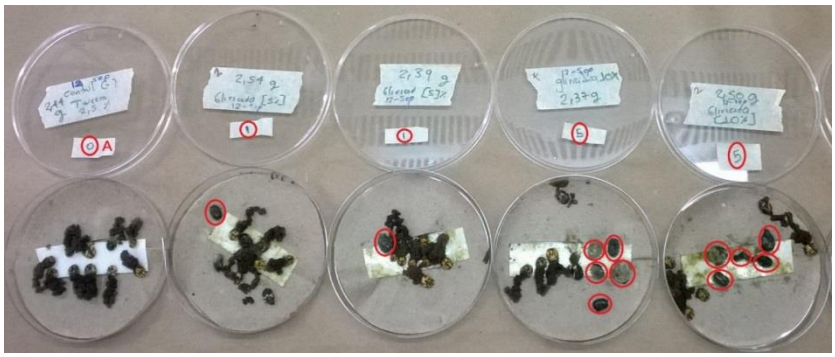


Figura 10. Montajes de la prueba de AIT 14 días posincubación – inhibición de la ovoposición, observe las teleoginas sin ovopositar en los diferentes niveles de tratamiento (círculos rojos) (Fuente: Autor).

El día 14 postinmersión los huevos fueron colectados y pesados; el índice de ovoposición (IO) y el porcentaje de inhibición de la ovoposición (IO%) fue determinado para cada tratamiento y controles, al igual que el control de reproducción (CR) y la eficiencia reproductiva (ER), a través de las fórmulas propuestas por Stendel (1980) y Castro-Silva et al. (2011):

- El Índice de ovoposición (IO): es un parámetro cuantitativo utilizado para determinar la conversión del peso de una hembra ingurgitada. Este parámetro se calculó dividiendo el peso de los huevos producido por las 10 teleoginas (unidad experimental) sobre el peso inicial de la unidad experimental (Ver figura 11 – A), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$IO = \frac{\text{Peso de los huevos (g)}}{\text{Peso inicial de las hembras (g)}}$$

- El porcentaje de inhibición de la ovoposición (IO%): este parámetro calcula el porcentaje de inhibición de la ovoposición de la unidad experimental tratada (diferentes concentraciones del extracto) con respecto al control negativo (excipiente Tween 80 2.5%) de acuerdo con la siguiente expresión.

$$IO\% = \frac{\text{IO control negativo} - \text{IO extracto}}{\text{IO control negativo}} \times 100$$

Posteriormente, se colocaron 100 huevos de cada unidad experimental en viales de vidrio tapados con un tapón de gasa y rotulados de la misma forma de la caja de Petri, los viales de vidrio se introdujeron en una caja plástica y se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación, descritas para las teleoginas, por 21 días hasta su eclosión (Rosado-Aguilar et al., 2010; Fernández-Salas et al., 2011) (ver figura 11 – B). Después se calculó el porcentaje de eclosión de larvas (E%) realizando el conteo mediante la ayuda de un estereoscopio y un contador manual.

Con los datos de la IO y el porcentaje de eclosión larval se calculó la:

- Eficiencia reproductiva (ER), indicador de la cantidad aproximada de larvas por grupo de 10 teleoginas, de acuerdo a la siguiente expresión:

ER = IO x E%

La ER de cada grupo de garrapatas tratado se comparó con la ER de los grupos control positivo (Amitraz 0.02%) y control negativo (Tween 80 2.5%), es decir, el:

- Porcentaje de control de la reproducción (CR%), denominado también eficiencia del producto (EP) (Sanchez et al., 2012), calculándolo de acuerdo a la siguiente expresión:

CR% = {(ER Grupo control negativo - ER del tratado) / ER Grupo Control negativo} x 100.

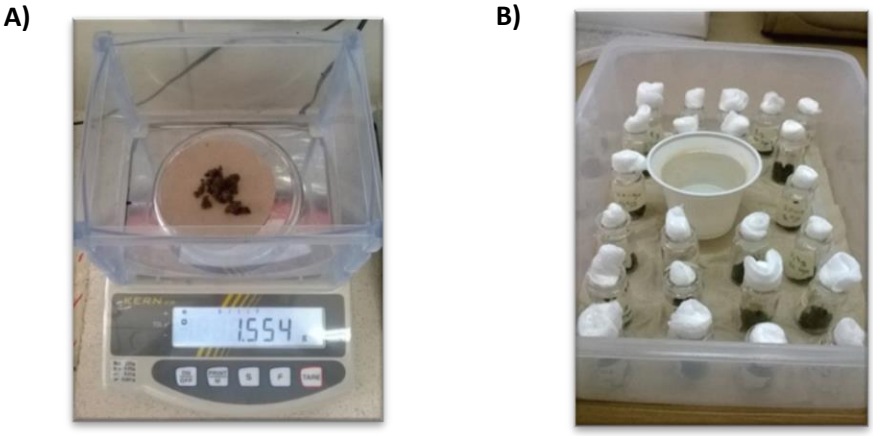


Figura 11. Procedimiento para establecer los efectos reproductivos asociados a la prueba de AIT en *Rhipicephalus microplus.* A) Pesaje de huevos en balanza electrónica, posterior al proceso de incubación de teleoginas. B) Organización de montajes de huevos para incubar, procedimiento que busca establecer la eficiencia reproductiva de los extractos (Fuente: Autor).

3.4 Diseño estadístico

Los resultados de mortalidad de larvas y teleoginas fueron sometidos a la prueba de homogeneidad de varianza, prueba de Bartlett, y prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov, verificando el cumplimiento de estos supuestos para su posterior análisis paramétrico a través del método Probit, para el cálculo de dosis letales 50 y 90; además de Chi-cuadrado para evidenciar diferencias entre tratamientos. Otros resultados obtenidos de las pruebas *in vitro* (% inhibición de la ovoposición, % eficiencia reproductiva, % control de reproducción) se sometieron a las pruebas de homogeneidad de varianza y normalidad descritas con anterioridad, para ser procesados a través del análisis de varianza de una vía (ANAVA) y comparación múltiple de promedios con la prueba Tukey-Kramer, con un rango de confiabilidad del 95% ($p<0,05$). Los datos fueron organizados y analizados en el programa estadístico OpenStat 4.0, versión 7.0.

4. RESULTADOS

4.1 Clasificación taxonómica de la planta

El Herbario Nacional de Colombia, el cual se ubica dentro del Instituto de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia en Bogotá, confirmó la clasificación taxonómica, así: *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp; lugar en el cual descansa un ejemplar bajo la numeración 576461.

4.2 Preparación del extracto acetónico y marcha fitoquímica preliminar de *Gliricidia Sepium*

El porcentaje de materia seca obtenido finalmente para *G. sepium* fue de 25,3%. La cantidad de extracto final que se obtiene después de haber sometido 450 gramos de cada planta a extracción con el solvente acetona 70% fue de 21.2 gramos de extracto puro, es decir, se obtuvo un rendimiento del proceso de extracción del 5% aproximadamente. Los resultados de la determinación de grupos de metabolitos secundarios del extracto acetónico a través de la marcha fitoquímica preliminar se encuentran consignados en la tabla 4. A continuación se describen los resultados en la caracterización de cada grupo de metabolitos secundarios del extracto acetónico de *G. sepium* (Ea Gs).

Detección de flavonoides:

Colorimetría: se observó un resultado positivo, al igual que los controles positivos de Qersetina, Rutina y Ácido clorogénico, como se observa en la figura 12.

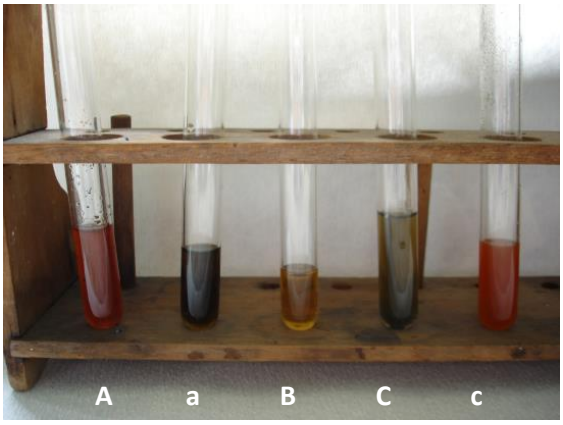


Figura 12. Técnica de colorimetría para detección de flavonoides en el extracto acetónico de *G. sepium* (Ea Gs). Flavonoles Patrón positivo Quercetina (A) y Ea Gs (a); Flavonoides Patrón positivo Rutina (B); y Leucoantocianidinas patrón positivo ácido clorogénico (C) y Ea Gs (c); obsérvese el cambio de coloración y formación de precipitado en los tubos, esto se relaciona con presencia de grupos gama-piridonas (Fuente Autor).

Cromatografía en capa delgada: confirmación de la existencia de flavonoides en la muestra, caracterizado por una coloración amarilla de este grupo de metabolito secundario. De la misma forma, para corroborar los resultados de positividad en la presencia de flavonoides dentro del extracto estudiado, se procedió a utilizar 1 patrón de flavonides: Rutina; tomando una placa de sílica gel en la cual se colocó una gota de cada una de las preparaciones, incluyendo también una gota del extracto acetónico de *Gliricidia sepium* puro, otra de la fracción con metanol y la otra con cloroformo, se realizó el mismo procedimiento llevado a cabo con anterioridad, con la diferencia que dentro del proceso de revelación fue empleado el reactivo de

Godin (Vainillina al 1% en etanol y Ácido sulfúrico (H2SO4) al 5 % en etanol); La prueba resultó también positiva para flavonoides mediante este método (ver figura 13).

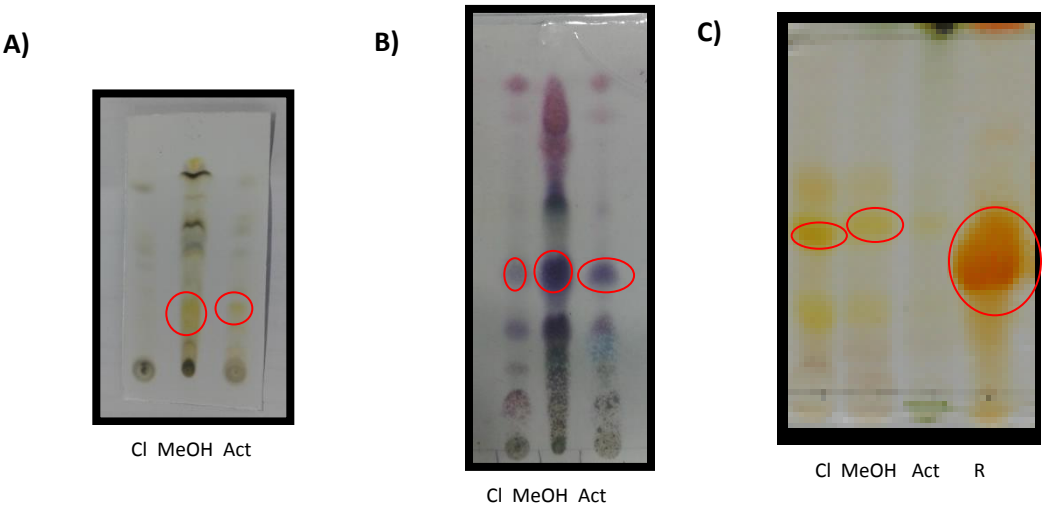


Figura 13. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de flavonoides. A) Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act) revelados con reactivo NPPEG. B) Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act) revelados con reactivo de Godin. C) Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act), Patrón Rutina (R) revelados con reactivo NPPEG (Fuente: Autor).

Detección de Alcaloides

Colorimetría: todos los cuatro montajes fueron negativos (Reactivo Dragendorff, Reactivo de Meyer, Reactivo Valser y Reactivo de Reinekato) a diferencia del control positivo utilizado, (EtOH B - *Brugmansia* spp) (ver figura 14).

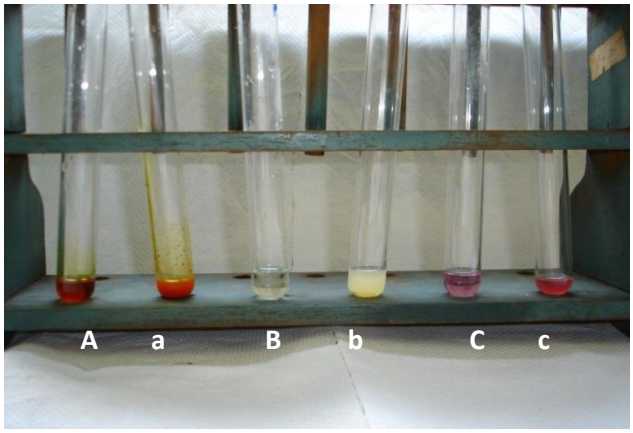


Figura 14. Técnica de colorimetría para detección de alcaloides en el extracto acetónico de *G. sepium* (Ea Gs). Reactivo Dragendorff: Ea Gs (A), Patrón positivo EtOH B (a); reactivo Mayer: Ea Gs (B), Patrón positivo EtOH B (b); y reactivo Valser: Ea Gs (C), Patrón positivo EtOH B (c); obsérvese el cambio de coloración y formación de precipitado en los tubos control positivo, esto se relaciona con presencia de alcaloides (Fuente: Autor).

Cromatografía en capa delgada: la prueba mostró un resultado negativo a alcaloides por no presentar la coloración amarillo - naranja característica de los mismos (ver figura 15).

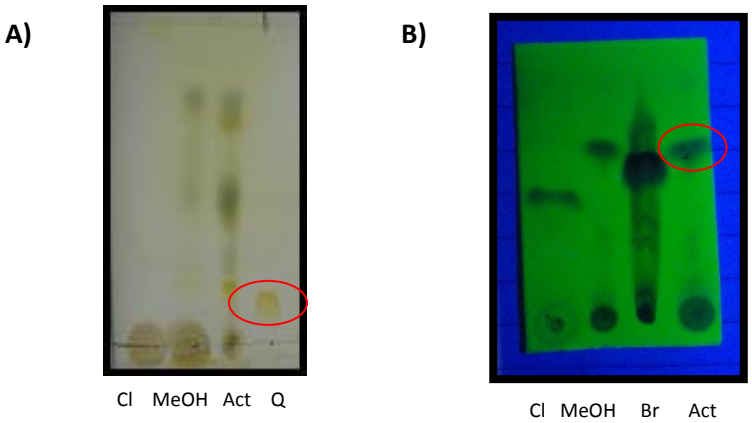


Figura 15. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de alcaloides. A) Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act), Patrón positivo Quinina (Q) revelados con reactivo de Dragendorff. B) Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto metanólico de *Brugmansia* spp (Br) y extracto acetónico de *G. sepium* (Act) inspeccionados en la cámara de luz ultravioleta 366 nm (Fuente: Autor).

Detección de Antracénicos

Colorimetría: resultado negativo al exponer el preparado a la reacción de Borntrager- Kraus, la cual fue positiva para el respectivo control extracto etanólico de hojas de Sen.

Cromatografía en capa delgada: La prueba mostró un resultado negativo a antraquinonas por no presentar la coloración característica de los mismos, vista en el patrón positiva de referencia (ver figura 16).

Figura 16. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de antracénicos. Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act) y Patrón positivo Antraquinona Cáscara Sagrada (CS) (Fuente: Autor).

Detección de glicósidos cardiotónicos

Colorimetría: la prueba fue positiva al observarse un cambio de color rosado pasando en tonalidad de rojo, violeta, azul o verde; así mismo se observó para el control positivo usado: extracto etanólico de *Digitalis purpurea*.

Cromatografía en capa delgada: resultando positiva la presencia de glicósidos cardiotónicos en las partes aéreas de la planta *G. sepium* (ver figura 17).

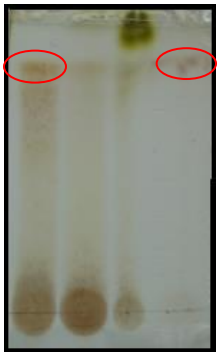


Figura 17. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de Glicósidos cardiotónicos. Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act) y Patrón positivo Digitoxina (Di) (Fuente: Autor).

Detección de Saponinas

Se demostró la presencia de éstos grupos de metabolitos secundarios en la muestra del extracto estudiado, al formarse en la parte inmediatamente superior al

nivel de la preparación una solución espumosa que se mantuvo por más de 15 minutos (Ver figura 18).

Figura 18. Prueba de la espuma para la detección de saponinas. Nótese la presencia de espuma estable en la parte superior de la solución que contiene extracto acetónico de *G. sepium* (Fuente: Autor).

Detección de Terpenoides

Colorimetría: la formación de un color verde oscuro en el montaje fue indicativo de la presencia de grupos esteroles (colesterol – terpenoides) en la muestra (Ver figura 19).

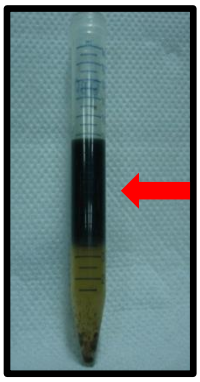


Figura 19. Técnica de colorimetría reactivo de Liebermann-Burchard para detección de terpenoides. Nótese el color verde oscuro en la parte superior del montaje respectivo (Fuente: Autor).

Cromatografía en capa delgada: se obtuvo una fluorescencia compatible con un resultado positivo a la presencia de Terpenoides en el extracto acetónico de *G sepium* en comparación con el patrón positivo utilizado Lupeol vistos en cámara de luz ultravioleta 254 nm (Ver figura 20).

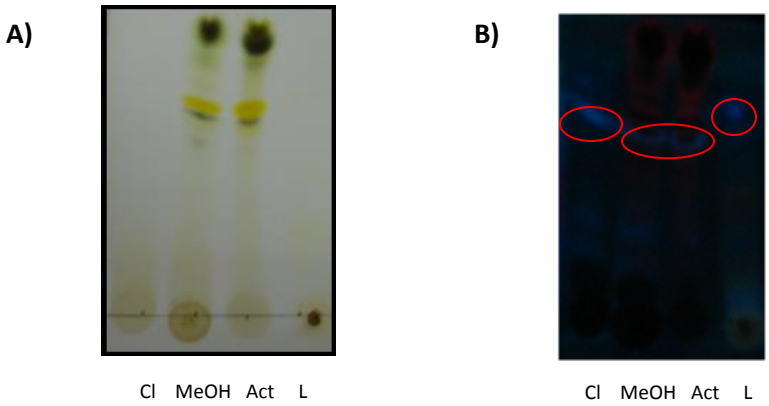


Figura 20. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de terpenoides. A) Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act), Patrón positivo Lupeol (L), revelados con reactivo Liebermann-Burchard. B) Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act), Patrón positivo Lupeol (L) vistos en cámara de luz ultravileta 254 nm (Fuente: Autor).

Detección de cumarinas

Cromatografía en capa delgada: la fracción clorofórmica del extracto acetónico de *G. sepium* mostró un comportamiento similar al patrón E-Umbeliferona posterior a la revelación con la solución de vainillina al 1% en ácido sulfúrico al 5%, vistos en cámara de luz ultravioleta 365 nm (ver figura 21), determinándose la presencia de cumarinas en la muestra analizada.

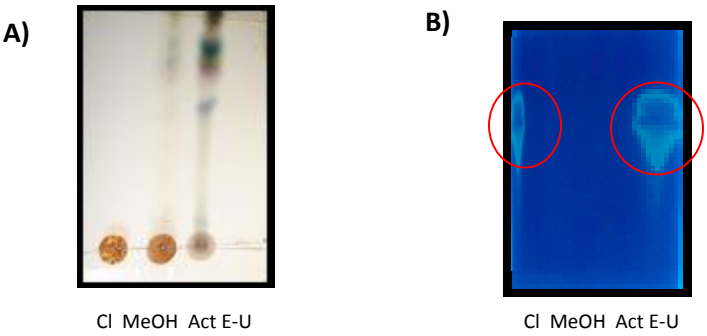


Figura 21. Técnica de cromatografía en capa delgada para detección de cumarinas. A) Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act), Patrón positivo E-Umbeliferona (E-U), revelados con solución de vainillina al 1% en ácido sulfúrico al 5%. B) Fracción clorofórmica de *G. sepium* (Cl), fracción metanólica de *G. sepium* (MeOH), Extracto acetónico de *G. sepium* (Act), Patrón positivo E-Umbeliferona (E-U), vistos en cámara de luz ultravileta 365 nm (Fuente: Autor).

Detección de taninos

Prueba de Cloruro Férrico 10%: los dos montajes del extracto (concentración alta y concentración baja del extracto en acetona) mostraron un resultado positivo a compuestos polifenólicos por la formación de un precipitado de color verde, similares a los resultados del patrón positivo utilizado (ver figura 22).

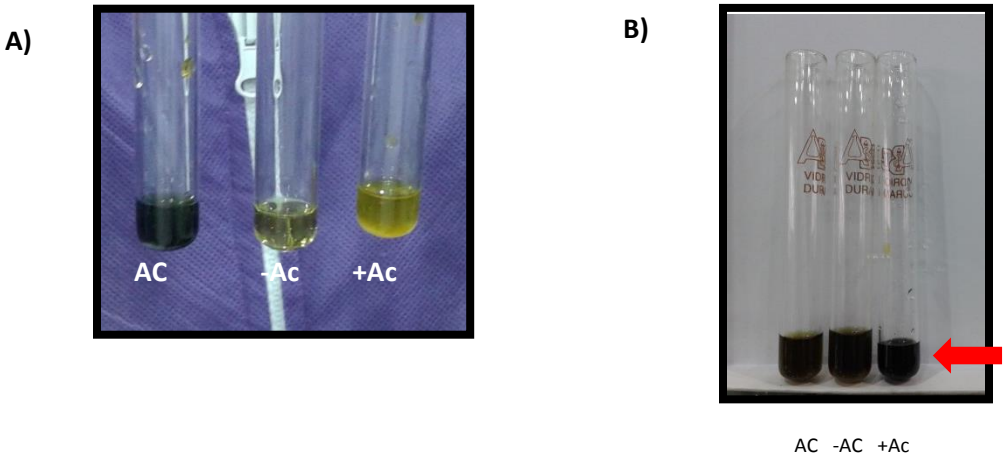


Figura 22. Prueba de Cloruro férrico 10% para detección de Taninos. A) Patrón positivo Ácido clorogénico (AC); Extracto acetónico de *G. sepium* menos concentrado en dilución con acetona (-Ac); Extracto acetónico de *G. sepium* concentrado en dilución con acetona (+Ac). B) Patrón positivo Ácido clorogénico (AC) más Cloruro Férrico 10%; Extracto acetónico de *G. sepium* menos concentrado en dilución con acetona más Cloruro Férrico 10%; (-Ac); Extracto acetónico de *G. sepium* concentrado en dilución con acetona más Cloruro Férrico 10%; (+Ac). Nótese el precipitado de color verde en los tres montajes, indicando la positiva a taninos (Fuente: Autor).

Prueba Reactivo de Gelatina sal: se formó un precipitado de color verde oscuro (ver figura 23), lo cual es indicativo de la presencia de taninos, al ser estos agentes causantes de la acción de precipitación de la gelatina farmacéutica.

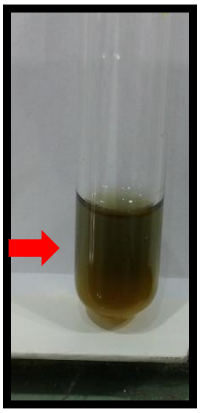


Figura 23. Prueba de reactivo gelatina sal para detección de Taninos. Se puede observar en el montaje presentado, la precipitación de color verde oscuro indicativa de la presencia de taninos (Fuente: Autor).

Tabla 4. Determinación de grupos de metabolitos secundarios del extracto acetónico de *G. sepium*.

Grupo de metabolitos secundario	**Prueba de colorimetría/resultado**	**Cromatografía en capa fina/patrón /resultados**
Flavonoides	HCl + Zn/+	Rutina/+
Alcaloides	Reactivo de Mayer/- Reineckato de Amonio/- Reactivo de Dragendorff/- Reactivo de Valser/-	Quinina/-
Cumarinas	No se realizó	E-Umbeliferona /+
Terpenoides	Liebermann-Burchard/+	Lupeol/+
Antraquinonas	Borntrager- Kraus/-	Cáscara sagrada/-
Glicósidos cardiotónicos	Reacción de Kedde/+	Digitoxina/+
Saponinas	Prueba de espuma/+	No se realizó
Taninos	Cloruro férrico 10%/+ y Gelatina farmacéutica/+	No se realizó

+ positivo, presencia del grupo de metabolitos secundarios

- negativo, ausencia del grupo de metabolitos secundarios

4.3 Evaluación acaricida *in vitro* del extracto acetónico de *G.sepium* sobre *R. microplus*

Prueba de inmersión de larvas (Larval Immersión Test - LIT)

Las concentraciones letales 50% (CL_{50}) y 90% (CL_{90}) con sus respectivos intervalos de confianza ($p<0.05$) se establecieron a partir de curvas de mortalidad

larvaria y mediante regresión Probit se definieron valores de CL_{50} y CL_{90} en mg extracto acetónico de *G. sepium*//mL para cada una de las pruebas (ver figura 24); tanto para concentraciones de extracto citadas con anterioridad, como controles positivos y negativo; previamente los datos de concentración fueron transformados a su Logaritmo Natural, los valores de totales de larvas expuestas y larvas muertas y concentración, se transformaron multiplicándolas por un factor que disminuye a una escala diez veces menor. La CL_{50} del extracto acetónico de *Gliricidia sepium* sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* fue de 78 mg/mL (71 – 83 mg/mL) y la CL_{90} de 110 mg/mL (101 – 125 mg/mL) bajo los lineamientos metodológicos propuestos en este trabajo.

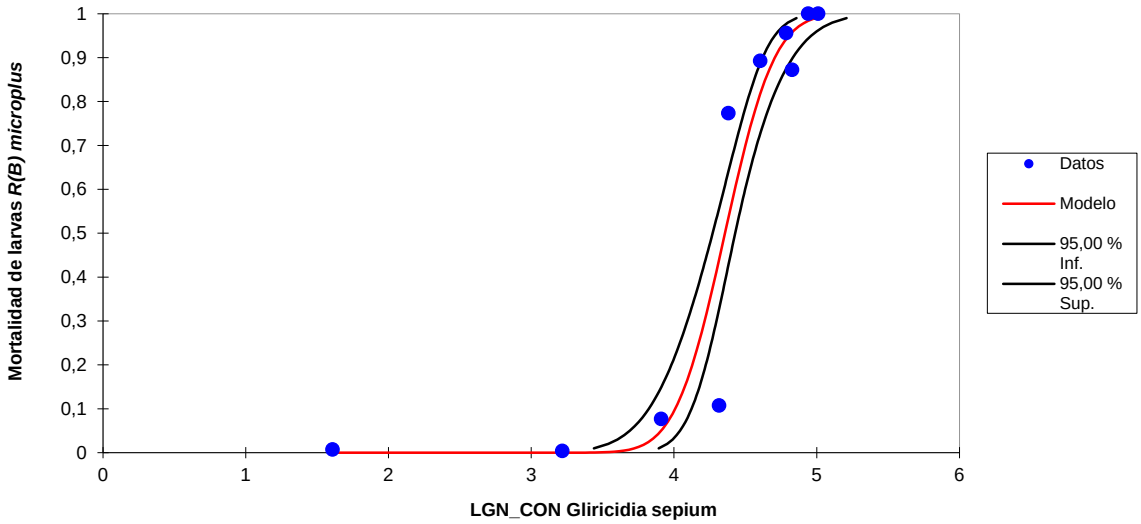


Figura 24. Modelo de regresión logística a través del método Probit (IC 95%), resultados de las pruebas LIT del extracto acetónico de *G. sepium.*

Prueba de inmersión en garrapatas adultas (Adult Immersión Test - AIT)

Los datos obtenidos de esta prueba fueron tratados de la misma forma que para la prueba LIT. La CL_{50} del extracto acetónico de *Gliricidia sepium* sobre

teleoginas de *Rhipicephalus microplus* fue de 100 mg/mL (82 – 118 mg/mL) y la CL_{90} fue de 143 mg/mL (123 – 164 mg/mL). Como se observa en la tabla 5, este estudio permitió establecer la inhibición de la ovoposición en un 56.7% de las teleoginas expuestas a la concentración de 100 mg del extracto acetónico de G. sepium /mL, además de un 100% en el control de reproducción y una eficiencia reproductiva del 0.0% para las teleoginas y sus huevos utilizados dentro del estudio, expuestas a la misma concentración citada.

Tabla 5. Resultados de índice de ovoposición (IO), el porcentaje de inhibición de la ovoposición (IO%), el control de reproducción (CR), eclosión (E) y la eficiencia reproductiva (ER) de la prueba AIT con extracto acetónico de *G. sepium*.

Niveles de tratamiento	% mortalidad 14 días postincubación	IO	% IO	ER	E%	CR%
Control – Tween 80 2.5%	0%	0.520^{A}	No aplica	52.03^{A}	100	No aplica
5 mg Ext. Ac. *G. sepuim*/mL	0%	0.487^{A}	6.3^{A}	12.17^{B}	25	76.6
25 mg Ext. Ac. *G. sepium*/mL	0%	0.478^{A}	8.1^{A}	8.6^{B}	18	83.47
50 mg Ext. Ac. *G. sepium*/mL	$10\%^{+}$	0.331^{B}	36.3^{B}	3.97^{B}	12	92.36
100 mg Ext. Ac. *G. sepium*/mL	$50\%^{+}$	0.225^{B}	56.7^{B}	0.0^{C}	0.0	100
Control + Amitraz 0.025%	$98\%^{++}$	0.037^{C}	96.3^{c}	0.05^{C}	43.58	99.9

$^{+}$ $p<0.05$ y $^{++}$ $p<0.01$ Chi cuadrado. ^{B} $p<0.05$ y ^{C} $p<0.01$ ANAVA, post hoc Tukey-Kramer.

5. DISCUSIÓN

Implicaciones de los grupos de metabolitos secundarios determinados en el extracto Acetónico de *G. sepium* y su efecto acarida sobre *R. microplus*

La incorporación de *Gliricida sepium* en los sistemas de producción bovina, desde la perspectiva de control de parásitos; acción basada en el estudio de sus componentes de metabolitos secundarios con capacidad para alterar la biología de ácaros e insectos, como lo son: cumarinas, taninos condensados, flavonoides, triterpenos, rotenoides, entre otros (Griffiths, 1962; Rangaswami y Iyer, 1966; Manners y Jurd, 1979; Rastrelli et al., 1999a; Rastrelli et al., 1999b; Herath y deSilva, 2000; Beena y Joji, 2010; Sivira et al., 2011; Krishnappa et al., 2012; Thomas et al., 2014); grupos de metabolitos secundarios encontrados en la marcha fitoquímica de la especie colectada en condiciones climáticas del piedemonte del Meta (ver tabla 4). A partir de la determinación de estos grupos químicos promisorios desde la perspectiva antiparasitaria externa e interna, se han desarrollado una variedad de estudios científicos que vinculan a la planta *Gliricidia sepium*; por ejemplo en pruebas realizadas con extractos de la leguminosa en mención se observó su efecto antihelmíntico *in vitro* reduciendo la motilidad de larvas estadio L_3 de *Haemonchus contortus*; este efecto se relacionó con metabolitos secundarios tales como taninos/compuestos polifenólicos (von Son-de Fernex et al., 2012),

terpenoides, flavonoides y lectinas (Puerto et al., 2014); también se ha demostrado que plantas ricas en estos mismos grupos de metabolitos secundarios han mostrado actividad acaricida sobre *Rhipicephalus microplus* (Bagavan et al., 2009; Zorloni et al., 2010; Rosado-Aguilar et al., 2010; Dantas et al., 2015; Ghosh et al., 2015).

Por otro lado, en el grupo de metabolitos secundarios tipo cumarinas, grupo determinado en el extracto Acetónico de *G. sepium*, se ha asociado su capacidad antiparasitaria sobre ácaros (Bahmani et al., 2014) a través de la inhibición de enzimas digestivas que pertenecen a la familia de las endopeptidasas tipo serina, cisteina, aspartato y metaloproteasas (Neurath, 1989); además de tripsina y quimotripsina (Bergamo et al., 2010) y catepsinas (Sajid y McKerrow, 2001), enzimas con capacidad proteolítica de *R. microplus* quienes son las encargadas de la digestión de la hemoglobina y actúan como proteínas de reserva durante la embriogénesis (Fagotto, 1990a; Fagotto, 1990b); posiblemente este mecanismo podría explicar los resultados obtenidos en la potente inhibición del ciclo de vida de *R. microplus* (inhibición de la ovoposición, control de reproducción y eficacia reproductiva) al afectar los estadios larvarios y adultos utilizados en el estudio; y las diferencias significativas sobre la mortalidad en los estadios larvarios y teleoginas; siendo estas enzimas vitales en la supervivencia de este acaro de interés parasitario.

Afección del ciclo de vida de *R. microplus* expuesta al extracto acetónico de *G. sepium*

Aunque la actividad acaricida sobre estadios larvarios y adultos (teleoginas) de *R. microplus* expuestos al extracto acetónico de *G. sepium* muestra resultados promisorios de la incursión de esta planta dentro del control integrado de parásitos

externos en sistemas de producción bovina del piedemonte del departamento del Meta (CL_{50} 100 mg/mL y la CL_{90} 143 mg/mL en AIT); el interés de este tipo de fitoterapéutico recae sobre la inviabilidad de los huevos de este parasito; encontrándose para este estudio, resultados de relevancia antiparasitaria externa, al obtener un 100% de control en la reproducción y una eficacia reproductiva del 0.0% dentro del ciclo de vida de la *R. microplus* a la CL_{50} establecida para teleoginas, es decir, el extracto acetónico de *G. sepium* genera un fenómeno de inhibición en el proceso de eclosión, en la totalidad de los huevos ovopositados por las teleoginas expuestas a este fitopreparado dentro de la pruebas antiparasitarias realizadas. Datos similares fueron reportados por Álvarez et al. (2008) donde el extracto alcohólico de *Gliricidia sepium* mostró un efecto sobre el porcentaje de la inhibición de la ovoposición en *R. microplus* del 94%; estudio desarrollado en Costa Rica. Así mismo sobre su capacidad acaricida se han publicado estudios donde el extracto etanólico al 5% de hojas de *Gliricidia sepium*, redujo en un 57% la ovoposición del acaro *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval), obtenido de plantas de frijol negro en Venezuela; además, concentraciones de 5, 10, 15, y 20% del extracto etanólico de la planta causaron 41.7, 80.6, 88. 9 y 100% de mortalidad, respectivamente (Sivira et al., 2011).

En otro estudio realizado en Guatemala en la Universidad de San Carlos de Guatemala (Rodríguez, 2012) se demostró actividad ixodicida e inhibidora de la ovopostura con la utilización de las tinturas de *G. sepium*. En este estudio se encontró una mortalidad del 36% en garrapatas adultas con la tintura de corteza y un 28% con la tintura de hoja de *G. sepium* demostrando una mayor efectividad *in vitro* la tintura de corteza; y además, se obtuvo una actividad inhibidora de la

ovopostura del 4.38% para la tintura de corteza, mientras que para la tintura de hoja tan solo un 0.50%, resultados distantes de los encontrados en esta investigación, probablemente debidos al uso de tinturas, donde el investigador no entra a detallar la forma de obtención de la misma, lo cual puede indicar dilución y perdida de grupos de metabolitos secundarios de interés antiparasitario.

En los hatos bovinos del trópico bajo la carga parasitaria de la población se establece en un 92% asociada al agroecosistema (fases preparasíticas o de vida libre) y tan sólo un 8% o menos está en su estadio parasitario obligado (Anderson y May, 1985), es decir en el hospedero; resaltando la importancia de vincular dentro del control integrado de parásitos la oportunidad de controlar las fases preparasíticas del agente parasitario a tratar; oportunidad que debe estar soportada en procesos y procedimientos sustentables desde la perspectiva ambiental tal y como lo establece la FAO (2004). Por esta razón, los resultados obtenidos del estudio *in vitro* desarrollado validan los reportes etnofarmacológicos del uso de la planta *G. sepium* (matarratón) como fitoterapéutico en sistemas de producción animal (García-Barriga, 1975; Cleaves, 2001; Brandão et al., 2008); con la finalidad, a posteriori, de ser utilizado en la disminución de carga parasitaria libre (zona de pastoreo) con mínimo impacto medio ambiental a partir del uso de extractos vegetales (Ribeiro et al., 2008); además de su posible uso sobre el bovino, acción que debe ser validada a través de futuros estudios *in vivo* e *in situ* que fortalezcan los resultados obtenidos en este estudio. La anterior información es relevante para consolidar el cultivo del matarraton en los sistemas de producción bovino del piedemonte del departamento del Meta, con la finalidad de ser utilizada como método alternativo de control para la garrapata común del ganado, fortaleciendo el desarrollo silvopastoril de la ganadería

colombiana en el marco de la apertura económica del reglón productivo primario o extractivo (CONPES 3797, 2014), donde es evidente la necesidad de fortalecer los sistemas de producción animal con estrategias integradas para el control de parásitos a partir del uso de plantas medicinales promisorias del contexto, más aun, con productos como los extractos de plantas, que generan el desarrollo de ganaderías sostenibles económicamente y ambientalmente, así mismo, incrementando la rentabilidad del proceso productivo al originar productos y subproductos sin residuos desde producciones animales limpias (CONPES 3675, 2010; CONPES 3676, 2010).

6. CONCLUSIONES

1. La marcha fitoquímica preliminar del extracto acetónico de *G. sepium,* colectada en condiciones del piedemonte del departamento del Meta, determinó la presencia de los grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, terpenoides, cumarinas, glucósidos cardiotónicos, saponinas y taninos; hallados a través de la técnica de cromatografía en capa delgada y colorimetría; grupos de metabolitos secundarios asociados al efecto acaricida de la planta.

2. El extracto acetónico de *Gliricidia sepium* mostró una CL_{50} de 78 mg/mL (71 – 83 mg/mL) y una CL_{90} de 146 mg/mL (128 – 182 mg/mL) en el bioensayo LIT (IC 95%) para las larvas de *Rhipicephalus microplus*. La CL_{50} de 100 mg/mL (82 – 118 mg/mL) y CL_{90} de 143 mg/mL (123 – 164 mg/mL) se halló para la prueba AIT (IC 95%). La inhibición de la ovoposición se determinó en un 56.7% a la concentración de 100 mg/mL del extracto acetónico de *G. sepium*, además de un 100% en el control de reproducción y una eficiencia reproductiva del 0.0% para las teleoginas y huevos utilizadas dentro del estudio ($p<0.05$).

7. LISTA DE REFERENCIAS

Álvarez, V., Loaiza, J., Bonilla, R., Barrios, M. (2008). Control in vitro tick (*Boophilus microplus* ; Acari: Ixodidae) through plant extracts. *Revista de Biología Tropical*. 56(1), 291–302.

Alzeus, O. y Jacinto, S. (2015). Cytotoxic activity of crude extracts and fractions from *Premna odorata* (Blanco), *Artocarpus camansi* (Blanco) and *Gliricidia sepium* (Jacq.) against selected human cancer cell lines. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine,* 5(12), 1037–1041.

Anderson, R., M., May, R.M. (1985). Herd immunity to helminth infection and implications for parasite control. *Nature*. 6-12; 315 (6019), 493-6.

Aragón-García, A., Torija-Torres, A., Avelleira-Cortés, R., Tapia- Rojas, A. M., Contreras-Mora, I.R. y López-Olguín, J. F. (2008). Control de plagas de la jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) con *Gliricidia sepium* (Jacq.) en Chiautla de Tapia, Puebla. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 12(3), 33-42.

Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M., Karamati, S.A., Bahmani, F., Bahmani, F., Bahmani, E., Asadzadeh, F. (2014). Antiparasitic herbs used in west regions of Ilam province located in west of Iran. *Asian Pacific Journal Tropical Disease*. 4(Suppl 2). S764-S769

Bagavan, A., Kamara, J.C., Elango, G., Zahir, A.A., Rahuman, A.A. (2009). Adulticidal and larvicidal efficacy of some medicinal plant extracts against tick, fluke and mosquitoes. *Veterinary Parasitology*. 166, 286–292.

Beena, J. y Joji, R.I. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of the volatile oil from the bark of Gliricidia sepium. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2(2), 20 - 22.

Bergamo, A., Seixasa, A., Nunes, V., Michel, A.F., Carlos Termignoni, C. (2010). Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in Rhipicephalus (Boophilus) microplus larvae and females. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 157(4), 326 – 335.

Berger, I., Barrientos, A.C., Caceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Passreiter, C.M., Kubelka, W. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against Trypanosoma cruz. *Journal of Ethnopharmacology*, 62(2), 107–115.

Bianchi, M.V., Barré, N. y Messad, S. (2003). Factors related to cattle infestation level and resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. *Veterinary Parasitology,* 112, 75-89.

Brandão, M.G.L., Zanetti, N.N.S., Oliveira, P., Grael, C.F.F., Santos, A.C.P., Monte-

Mór, R.L. (2008). Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists in the Official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*. 120, 141–148.

Castelblanco, L., Sanabria, O.J., Cruz, A., y Rodríguez, C.E. (2013). Reporte preliminar del efecto ixodicida de extractos de algunas plantas sobre garrapatas Boophilus microplus. *Revista Cubana Plantas Medicinales*. 18(1), 118-130.

Castro, S.W., Souza, M., Menezes, S., Heinzen, M. y Cesio, M. (2009). Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology,* 164, 267–274.

Castro-Silva, W., Souza, M.J., Cesio, M.V., Azevedo, J.L., Heinzen, H., Barros, N.M. (2011). Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Veterinary Parasitology*, 179, 189–194.

Cleaves, C. (2001). Etnobotánica médica participativa en el Parque Nacional Lachua (Tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Codex Alimentarius (2015). Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. Updated as at the 38 th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015). 1-41.

Consejo Nacional de Política Económica y Social. Documento CONPES 3675. Política nacional para mejorar la competitividad del sector lácteo colombiano. República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación. 2010. 8-23.

Consejo Nacional de Política Económica y Social. Documento CONPES 3676. Consolidación de la política sanitaria y de inocuidad para las cadenas láctea y cárnica. República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación. 2010. 7-12.

Consejo Nacional de Política Económica y Social. Documento CONPES 3797. Política para el desarrollo integral de la Orinoquia: altillanura - fase I. República de Colombia. Departamento Nacional de Planeación. Bogotá D.C., 2014. 18 – 32.

Dantas, A.C.S., Machado, D.M.R., Araujo, A.C., Oliveira-Junior, R.G., Lima-Saraiva, S.R.G., Ribeiro, L.A.A., Almeida, J.R.G.S., Horta, M.C. (2015). Acaricidal activity of extracts from the leaves and aerial parts of Neoglaziovia variegata (Bromeliaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Research in Veterinary Science,* 100, 165–168.

de Santana, R.N., Nascimento, C.B., Passos, A., Albano, N.A., Fitzgerald, A., Barreto, P., et al. (2015). Acaricidal properties of vetiver essential oil from Chrysopogon zizanioides (Poaceae) against the tick species Amblyomma cajennense and Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 212, 324 – 330.

Drummond, R.O., Glandey, W.J., Whetstone, T. y Ernest, S.E. (1971). Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. *Journal of Economic Entomology.,* 64, 686-688.

Drummond, R.O., de Ernest, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J. y Grahan, O.H. (1973). *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal Economy Entomology.* 66, 130–133.

Fagotto, F. (1990a). Yolk degradation in tick eggs: I Ocurrence of Cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Archives Insect Biochemistry Physiology.* 14, 217 - 235

Fagotto, F. (1990b). Yolk degradation in tick eggs: II Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Archives Insect Biochemistry Physiology.* 14, 237 – 252.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. (1997). Boletín Trimestral de Estadísticas, Vol. 10, No. 1 y 2, Roma.

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. (2004). Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants: Guidelines. Obtenido el 20 Octubre, 2014, desde: http://www.fao.org/ag/aga.html.

FAO Plant Protection Bulletin (1971). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pest to pesticides. Tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus microplus* spp. *FAO Method*. 19, 15–18.

Fernández-Salas, A., Alonso-Díaza, M.A., Acosta-Rodrígueza, R., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Rodríguez-Vivas, R.I. (2011). In vitro acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 175, 113–118.

Galeano, L., Gómez, M.J., Gómez, J.E. (2015). Caracterización de los sistemas de pastoreo de pequeños rumiantes en el sur del Tolima. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 6(1), 75 – 85.

Gallardo, J.S., Morales, J. (1999). Boophilus microplus (Acari: Ixodidae): preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo negativo. *Bioagro*, 11(3), 77-87.

García-Barriga, H. (1975). Flora Medicinal de Colombia. Tomos I y II. Talleres Editoriales de la Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá.

Ghosh, S., Shankar, S., Srivastava, S., kumar, S., Kumar, A., Nagar, G., et al. (2015). In vitro acaricidal properties of Semecarpus anacardium fruit and Datura stramonium leaf extracts against acaricide susceptible (IVRI-I line) and resistant (IVRI-V line) *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Research in Veterinary Science*, 101, 69–74.

Griffiths, L.A. (1962). On the co-occurrence of coumarin, o-coumaric acid and melilotic acid in Gliricidia sepium. *Journal Expt Botanic.* 13,169-175.

Herath, H.M.T.B. y deSilva, S. (2000). New constituents from *Gliricidia sepium*. *Fitoterapia*, 722 – 724.

IDEAM - Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. (2015). Atlas climatológico, radicación y de viento. Obtenido el 02 diciembre, 2015, desde: http://www.ideam.gov.co/web/tiempo-y-clima/clima

Jongejan, F. y Uilenberg, G. (2004). The global Importance of Ticks. *Parasitology*. 129(S), 3 - 14

Jonsson, N.N., Bock, R.E., Jorgensenc, W.K. (2008). Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on Bos indicus cattle and their crosses, and

the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary Parasitology.* 155 (2), 1 – 9.

Klafke, G.M., Sabatini, G.A., de Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., Schumaker,T.T., (2006). Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*.142, 386–390.

Klafke, G.M., Castro-Janer, E., Mendes, M.C., Namindome, A., Schumaker, T.T., (2012). Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology.184 (2-4), 212–220.

Krishnappa, K., Dhanasekaran, S., Elumalai, K. (2012). Larvicidal, ovicidal and pupicidal activities of Gliricidia sepium (Jacq.) (Leguminosae) against the malarial vector, Anopheles stephensi Liston (Culicidae: Diptera). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 598-604

MacLeana, R.H., Litsinger, J.A., Moodyc, K., Watson, A.K., Libetario, E.M. (2003). Impact of Gliricidia sepium and Cassia spectabilis hedgerows on weeds and insect pests of upland rice. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 94, 275–288.

Manners, G.D. y Jurd, L. (1979). Additional flavonoids in Gliricidia sepium. *Phytochemistry*, 18(6),1037-1042.

McNeely, J., Miller, K., Reid, W., Mittermeier, R. y Werner, T. (1990). Conserving the world's biological diversity. IUCN, WRI, CI, WWF-US, World Bank. 193.

Montes-Molina, J.A., Luna-Guidoa, M.L., Espinoza-Paz, M., Govaertsc, B., Gutierrez-Micelid, F.A. (2008). Dendoovena are extracts of neem (Azadirachta indica A. Juss. (L.)) and Gliricidia sepium (Jacquin) an alternative to control pests on maize (Zea mays L.). *Crop Protection*, 27, 763 – 774.

Murrell, A., Barker, S.C. (2003). Synonymy of Boophilus Curtice, 1891 with Rhipicephalus Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology,* 56, 169–172.

Neurath, H. (1989). The diversity of proteolytic enzymes. En Beynon, R., Bond, J. *Proteolitic enzymes: a practical approach* (pp 245 – 262). Oxford University Press.

Pochet, L., Frédérick, R., Masereel, B. (2004). Coumarin and isocoumarin as serine protease inhibitors. *Current Pharmaceutical Desing.* 10(30), 3781-96.

Puerto, M., Arece, J., López, Y., Roche, Y., Molina, M., Sanavria, A., da Fonseca, H.A. (2014). Efecto in vitro de extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* en el desarrollo de las fases exógenas de estrongílidos gastrointestinales de ovinos. *Revista Salud Animal*. 36(1), 28-34.

Rachinsky, A., Guerrero, F., Scoles, G. (2007). Differential protein expression in ovaries of uninfected and Babesia-infected southern cattle ticks, Rhipicephalus (Boophilus) *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(12), 1291-1301.

Rajput, Z., Hu, S., Chen, W., Arijo, A., Xiao, C. (2006). Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7(11), 912 - 921.

Rahila, N., Mussarat, A., Shagufta, A., Abdul, H.S., Nigath, S. (2008). Insecticidal, nematicidal and antibacterial activities of Gliricidia sepium. *Pakistan Journal of Botany.* 40(6), 2625 – 29.

Rangaswami, S. y Iyer V.S. (1966). Chemical examination of the leaves of Gliricidia maculata. *Current Science*,14, 364-365.

Rastrelli, L., Caceres, A., Simone, D.F., Aquino, R. (1999a). Studies on the constituents of Gliricidia sepium leaves and roots: Isolation and structure elucidation of new triterpenoid saponins and aromatic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1537- 1540.

Rastrelli, L., Berger, I., Kubelka, W., Caceres, A., Tommasi, D.N., Simone, D.F. (1999b). New 12a-Hydroxyrotenoids from Gliricidia sepium bark. *Journal Natural Products*. 62(1), 188-190.

Reck, J., Berger, M., Terra. R.M., Marks, F.S., da Silva, I., Guimarães, J.A., Termignoni, C. (2009). Systemic alterations of bovine hemostasis due to Rhipicephalus (Boophilus) microplus infestation. *Research in Veterinary Science,* 86(1), 56 – 62.

Ribeiro, V.L.S., Avancini, C., Gonçalves, K., Toigo, E., von Poser, G. (2008). Acaricidal activity of Calea serrata (Asteraceae) on Boophilus microplus and Rhipicephalus sanguineus. *Veterinary Parasitology*. 151(2-4), 351–354.

Rodríguez, D.C. (2012). Determinación de la eficacia in vitro de la tintura de *Gliricidia sepium* como ixodicida e inhibidora de la ovipostura en la garrapata *Rhipicephalus microplus* del ganado bovino. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Rojas, J.J. Ochoa, V.J. Ocampo, S.A. Muñoz, J.F. (2006, February 17). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(2), Obtenido el 24 de agosto, 2014, desde http://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-6-2

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

Sanabria A. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Bogotá, 1983, 1-61.

Sanchez, F.A., Mara, G., Mendez, A., Rodriguez, B., Camargo M.I., Juan, MP., Henrique, G., Campaner, L., Vilegas, W., Linhari R.C. (2012). Acaricidal activity of ethanolic extract from aerial parts of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) against larvae and engorged adult females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Parasites Vectors*. 5, 295.

Sajid, M. y McKerrow, J.H. (2001). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology,* 120(1), 1 - 21.

Shaw, R.D. (1966). Culture of an organophosphorus strain of Boophilus microplus (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bulletin Entomological Research.* 56, 389–405.

Sivira, A., Sanabria, M.E., Valera, N., Vásquez, C. (2011) Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia origanoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Neotropical Entomology.* 40(3). 375–379

Stendel, W. (1980). The relevance of different test methods for the evaluation of tick controlling substances. *Journal South African Veterinary Association.* 51, 147–152.

Thomas, J., Govindan, S., Kurup, M. (2014). Isolation and characterization of mosquito larvicidal compound from *Gliricidia sepium*^{Jacq}. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 2(2), 173 – 178.

von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M.A., Valles-de la Mora, B., Capetillo-Leal, C.M. (2012). In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*. 131(4), 413-8.

WHO - World Health Organization. (1993). Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *Herbal Gram*, 28, 13-14.

Wood, C.D., Stewart, J.L., Vargas, J.E. (1998). Genetic variation in the nutritive value of Gliricidia sepium.: 2. Leaf chemical composition and fermentability by an in vitro gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 75(2), 125 – 143.

Zorloni, A., Penzhorn, B.L., Eloff, J.N. (2010). Extracts of Calpurnia aurea leaves from southern Ethiopia attract and immobilize or kill ticks. *Veterinary Parasitology,* 168, 160–164.