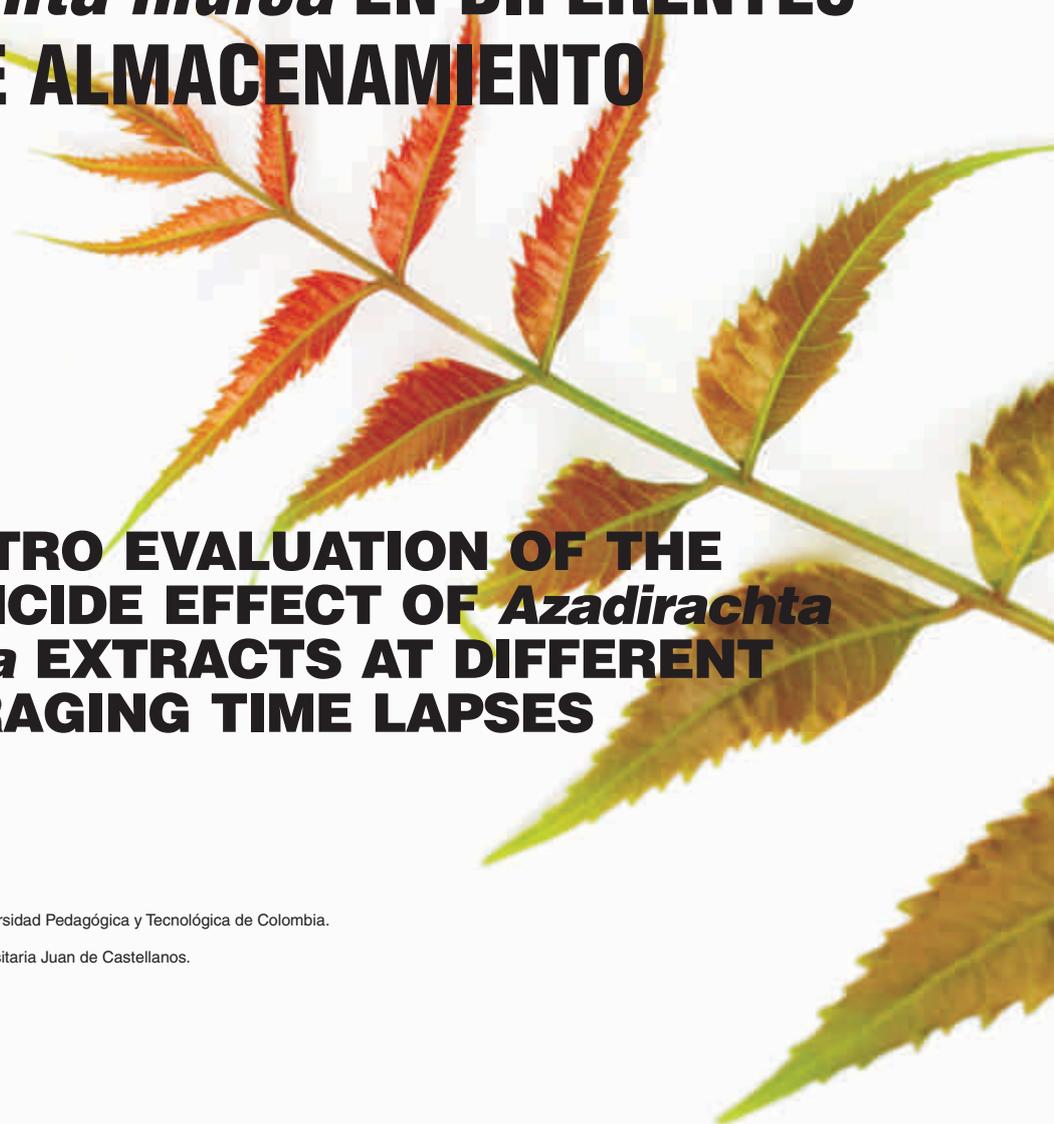


POR: CRUZ CARRILLO, Anastasia Catalina¹ / MORENO FIGUEREDO, Giovanni²

EVALUACIÓN

DEL EFECTO IXODICIDA DE EXTRACTOS DE *Azadirachta indica* EN DIFERENTES TIEMPOS DE ALMACENAMIENTO



IN-VITRO EVALUATION OF THE IXODICIDE EFFECT OF *Azadirachta indica* EXTRACTS AT DIFFERENT STORAGING TIME LAPSES

¹MV. MSc. Esp Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
Email: anastasia.cruz@uptc.edu.co

²MV.PhD. MSc Medicina Veterinaria. Fundación Universitaria Juan de Castellanos.
Email: giov_anny@hotmail.com

Recibido: 08 de abril de 2015
Aprobado: 30 de septiembre 2015
Tipo: Investigación

in-vitro



RESUMEN

Azadirachta indica es una planta reconocida como insecticida e ixodocida, se encuentran reportes de la eficacia de los extractos elaborados en laboratorio a partir de las semillas y las flores pero se desconoce si los extractos "rústicos" preparados a partir de las hojas, son eficaces. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia de extractos, acuoso y etanólico, sobre garrapatas adultas *Ripicephalus (Boophilus) microplus*, utilizados en diferentes períodos de tiempo después de su preparación, sabiendo que los extractos naturales al no tener preservantes ni sustancias estabilizadoras, pueden perder composición y actividad bioquímica con el paso del tiempo. Se utilizaron garrapatas obtenidas de bovinos naturalmente parasitados, se dividieron en diferentes grupos los cuales fueron expuestos a extractos puros, extractos diluidos y se incluyeron grupos control, positivo y negativo. Los ensayos se hicieron por triplicado usando la técnica de inmersión de garrapatas adultas y se hicieron con los extractos de 14 horas, 30 días, 60 días y 90 días de preparación para determinar la eficacia de los mismos. Se encontró efecto ixodocida con los dos extractos puros frescos (14 horas); sin embargo, esta fue inferior al 60%; con el extracto de 30 días de preparación, se redujo notablemente y fue ausente con los extractos de 60 y 90 días de preparación. Se concluye que hubo efecto ixodocida pero que el método de extracción no permitió la obtención del principio activo y que el extracto se descompone químicamente con el paso del tiempo.

PALABRAS CLAVE: Neem, fitofarmacología, garrapata, *Ripicephalus (Boophilus) microplus*

ABSTRACT

Azadirachta indica is a plant known as an insecticide and an ixodocide. There are reports about the effectiveness of extracts prepared from its seeds and flowers in the laboratory; but the effectiveness of "rustic" extracts prepared from its leaves remains unknown. Therefore, the aim of this study was to determine the efficacy of aqueous and ethanolic extracts on adult female ticks *Ripicephalus (Boophilus) microplus*, used at different time periods after its preparation, knowing that the natural extracts do not have any preservatives nor stabilizing substances, and can lose composition as well as biochemical activity through time. The ticks used in this study were obtained from naturally infected cattle. They were divided into different groups which were exposed to pure extracts, and diluted extracts. They were also included in positive and negative control groups. We did the assays in triplicate using the immersion technique on adult ticks. The assays were carried out with 14-hour preparation, 30-day preparation, 60-day preparation, and 90-day preparation extracts, in order to determine their efficacy. We found ixodocide effect at the two fresh-pure extracts (14-hour preparation) though; it was lower than 60%. The ixodocide effect was notably reduced at the 30-day preparation extract, and it was absent at the 60-day preparation, and 90-day preparation extracts. The conclusion is that there was ixodocide effect; but the extraction method did not allow the obtaining of the active principle, and that the extract decomposes through time.

KEYWORD: Neem, phytopharmacology, tick, *Boophilus microplus* *Ripicephalus*.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas constituyen un grupo de parásitos que genera impacto negativo en la salud y la producción bovina, por ser un parásito hematófago y vector de varios agentes infecciosos (Raymond *et al.*, 2004). Su capacidad de adaptación frente a condiciones adversas, les permite sobrevivir por mucho tiempo en ambientes diversos. En su control se han usado productos químicos de síntesis, que han generado problemas en la salud de animales y humanos y en el equilibrio del ecosistema, por lo que dentro de las recientes tendencias de control está el manejo racional de plagas, usando insecticidas de origen natural (García-Gutiérrez *et al.*, 2012; Rodríguez *et al.*, 2010; Cruz *et al.* 2010; Cruz *et al.*, 2010a). Extractos de *Azadirachta indica*, elaborados en laboratorio, muestran una alta eficacia insecticida y garrapaticida (Arias *et al.*, 2009). Sin embargo, se encuentra menos información sobre la actividad antiparasitaria de extractos rústicos ("caseros") de la planta. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* de dos extractos de hojas de *Azadirachta indica* (árbol de Neem) en diferentes tiempos de preparación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

La colecta del material vegetal se realizó en el municipio de Cunday, Tolima, la de garrapatas en Granada, Meta y la elaboración de los extractos y prueba de eficacia, en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) en la ciudad de Tunja, Boyacá.

Animales experimentales

Las garrapatas fueron obtenidas de bovinos mantenidos en un sistema de pastoreo extensivo y naturalmente parasitados; se identificaron como *Ripicephalus (Boophilus) microplus*. Las garrapatas fueron colectadas manualmente y enviadas al laboratorio de Parasitología de la UPTC. Las garrapatas muertas o mutiladas fueron eliminadas.

Diseño metodológico

El total de garrapatas seleccionadas para el estudio, se dividió al

azar en 10 grupos con 11 animales cada uno y cada tratamiento se hizo por triplicado. Las garrapatas de los grupos 1, 2, 3 y 4, fueron expuestas a extracto puro acuoso, puro etanólico, extracto acuoso diluido 1:10 y extracto etanólico diluido 1:10, respectivamente. Por su parte, las de los grupos 5, 6 y 7 se expusieron a insecticidas comerciales a base de ethión (1:1300), cipermetrina (1:1000) y amitraz (1:1000) respectivamente; los grupos 8, 9 y 10, actuaron como controles negativos, ya que se expusieron, en su orden a agua destilada, a las condiciones ambientales del laboratorio y a etanol de la misma concentración del que se utilizó en la elaboración de las diluciones. El mismo modelo se repitió a los 30, 60 y 90 días de elaborado el extracto.

Elaboración de extractos

Para la elaboración del extracto acuoso se usó un promedio de las relaciones planteadas por Dublin *et*

Figura 1: Prueba de inmersión de garrapatas adultas



al. (2012), 1 g de polvo de hojas con 3 ml de agua destilada y por Chacin *et al.* (2013) quien utiliza 1 g de polvo por 5 ml de agua, fue así como en este trabajo se usó 1g/4 ml de agua destilada. Se mezclaron 200 g de polvo de hoja de Neem con 800 ml de agua destilada, se homogenizó y se mantuvo en un lugar fresco y oscuro. El extracto etanólico se hizo siguiendo el mismo procedimiento utilizando etanol al 70% (Chacin *et al.*, 2013). En uno y otro caso los extractos estuvieron tapados y cubiertos por bolsa negra. Los extractos que se evaluaron a los 30, 60 y 90 días se mantuvieron en el laboratorio en un lugar oscuro y fresco (temperatura de 12 grados aproximadamente y humedad promedio de 75%).

Identificación de metabolitos

Se realizaron pruebas cualitativas para establecer la presencia de metabolitos en los dos extractos evaluados y en los tres tiempos de



estudio, así: Shinoda, gelatina, Zinc HCl, Rosenheim, cloruro de Fe, gelatina-sal, Lieberman-Buchard, Dragendorff y saponinas (Martínez *et al.*, 2008; Marcano y Hasegawa, 200; Domínguez, 1993).

Prueba de Inmersión de teleoginas Adultas

Se realizó la prueba de inmersión de garrapatas adultas (Drummond, *et al.*, 1967) en todos los grupos de tratamiento. Las garrapatas y sus réplicas se colocaron por separado en un vaso de precipitado con 30 ml de extracto, dejándolas sumergidas durante 30 minutos. Al cabo del tiempo, el extracto se desechó y las garrapatas fueron colocadas sobre papel de filtro para secarlas y verificar el número de garrapatas muertas respecto al total de cada grupo. Posteriormente, fueron ubicadas en la cajas de petri y en la incubadora (Figura 1). A las 24, 48, 72 y 96 horas de exposición a cada tratamiento, fueron evaluadas desechando cada vez, aquellas que se encontraran muertas. Este procedimiento se repitió con cada uno de los extractos evaluados en este estudio (fresco, 30 días, 60 días y 90 días de preparación).

Fórmulas aplicadas

%Mortalidad = Total de garrapatas muertas / Total garrapatas expuestas x 100

% Supervivencia = 100% - % Mortalidad

Eficacia = %supervivencia del GC.%supervivencia del GT / % supervivencia del GC x 100

GC= Grupo Control; GT= Grupo Tratado

RESULTADOS Metabolitos Secundarios

Se confirmó la presencia de flavonoles y flavonoides en los dos tipos de extractos desde las 24 horas de preparación y hasta los 30 días, a partir de los 60 días no fueron identificados. Se encontró mayor presencia de este tipo de metabolitos en los extractos etanólicos en los dos primeros tiempos que, aparentemente, se descomponen con el paso de los días. Por otra parte, se identificó la presencia de saponinas en los extractos acuosos hasta los 30 días, pero fueron ausentes a partir de los 60 días. Con las pruebas utilizadas, no se identificó la presencia de compuestos hidroxifenólicos ni de taninos. Se encontraron triterpenos en el extracto alcohólico pero no en el acuoso, hubo hallazgo de este metabolito hasta el día 30, pero no a los 60 ni 90 días post preparación. Finalmente, se encontraron alcaloides en ambos extractos que estuvieron presentes a las 24 horas y 30 días de preparado, pero a partir de los 60 días no fueron observados (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de las pruebas cualitativas para identificación de metabolitos secundarios

PRUEBA	METABOLITO	EXTRACTO 24 H		EXTRACTO 30 DÍAS		EXTRACTO 60 DÍAS	
		Acuoso	Alcohol	Acuoso	Alcohol	Acuoso	Alcohol
Shinoda	Flavonoles	+	+	+	+	-	-
Hidroxidación 10%	Flavonoide	+	+	+	+	-	-
	Flavona	+	+	-	-	-	-
Zinc HCl	Dihidroflavonoles	-	+	-	+	-	-
Rosenheim	Lecoantocianidina, proantocianidina	+	NA	-	NA	-	NA
Cloruro de Hierro	Compuestos hidroxifenólicos	- cambio no significativo	- cambio no significativo	-	-	-	-
Gelatina-Sal	Taninos	-	-	-	-	-	-
Lieberman-Buchard	Triterpenos, esteroides dieno conjugados	-	+	-	+	-	-
Dragendorff	Alcaloides	+	+	+	-	-	-
Saponinas	Saponinas	Moderado	NA	Leve	NA	Ausente	NA

Prueba de Eficacia de los Extractos (Inmersión de Adultas)

En los dos tipos de extractos frescos, se encontró una eficacia inferior a 60%, considerando que aunque aparece mortalidad, no fue un extracto ixodicida eficaz (Tabla 2). A pesar que los extractos puros no mostraron la eficacia suficiente, se evaluó el efecto ixodicida de las diluciones realizadas a partir de estos, sin encontrar ninguna mortalidad. En los grupos expuestos a amitraz y ethión, la mortalidad fue de 100% hacia las 96 horas y en ningún caso fue inmediata y con cipermetrina fue 80%. En los grupos control negativo la mortalidad no superó 3% en los tiempos de medición. Una vez se cumplieron los 30 días de elaborados los extractos y repetida la prueba de inmersión de garrapatas adultas, se encontró que la mortalidad fue inferior a la encontrada a las 14 horas de elaborados los mismos. Se identificó un total de 3 garrapatas muertas, con el extracto acuoso y solo una con el etanólico. El extracto etanólico diluido 1:10 no produjo ninguna mortalidad en el tiempo de evaluación y con el acuoso en la misma dilución fue de 3,03%. Los grupos controles, negativos y positivos, tuvieron el mismo comportamiento encontrado con el ensayo realizado a 14 horas.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad encontrada con los extractos acuoso y etanólico, puros a las 24 horas de preparación

Tiempo (Hora)	Porcentaje de Mortalidad en las Réplicas							
	EXTRACTO ACUOSO				EXTRACTO ETANÓLICO			
	1	2	3	X	1	2	3	X
0	0	0	0	0	9,09	0	0	0
24	9,09	0	18,08	9,09	9,09	9,09	9,09	3,03
48	18,18	18,18	18,18	18,18	9,09	18,18	27,27	18,18
72	18,18	18,18	18,18	18,18	9,09	18,18	27,27	18,18
96	18,18	27,27	18,18	21,21	9,09	27,27	36,36	24,24
Mortalidad Total	21,21%				24,24%			

A los 60 días de preparado el extracto, se logró mortalidad de 6,06% con el extracto acuoso y 3,03% con el etanólico; en los grupos expuestos a los extractos diluidos y grupos control no hubo mortalidad. Con los controles positivos se encontró mortalidad de 100% con cipermetrina y amitraz y con ethión fue de 72,72%. El mismo ensayo se realizó a 90 días de elaborado el extracto, montando los grupos control de igual manera; sin embargo, los resultados obtenidos fueron iguales a los del ensayo de 60 días. De acuerdo con la mortalidad encontrada en los diferentes grupos y del porcentaje de eficacia calculado, se encontró para los extractos evaluados, que esta fue muy baja y que donde la hubo en mayor proporción, fue en los extractos puros.

DISCUSIÓN

De acuerdo con lo reportado por Dublin, *et al.* (2012), a partir de 14 horas de preparado el extracto se espera la liberación de los principios activos, lo cual se pudo establecer con los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas para la identificación de los metabolitos. Fue así como en el presente estudio, bajo las condiciones de elaboración de los extractos, se encontraron flavonoides tanto en el extracto acuoso como en el etanólico, resultado que coincide con lo reportado por Dublin, *et al.* (2012). En ninguno de





los dos extractos hubo presencia de compuestos fenólicos, aunque hay reportes que indican que este metabolito está presente en las hojas. Sin embargo, los resultados son variables, dependiendo del método usado para identificarlos. La prueba para la identificación de taninos resultó negativa, indicando que no se encontraban estos metabolitos en ninguno de los dos extractos; en algunos trabajos se reporta su hallazgo en los extractos etanólicos, de semillas y hojas (Vásquez, 2007).

El Neem posee alcaloides, principalmente en la epidermis de las hojas coincidiendo con lo que indica la literatura sobre la capacidad repelente e insecticida de dichos metabolitos que se caracterizan por conferir un sabor amargo (Briceño, *et al.* 2011 y Vásquez, 2007). La presencia de saponinas fue moderada en el extracto acuoso. Se ha indicado que los metabolitos activos del árbol de Neem son inestables, al calor, el pH y la temperatura, lo cual conduce a que se pierda la actividad biológica que tiene con el paso de los días (Vásquez, 2007).

Lo anterior puede explicar que las pruebas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios resultaron negativas después de los 60 días, con lo que se infiere que la presencia de metabolitos se mantuvo en las dos primeras mediciones (24 horas y 30 días), pero para los 60 días muchos de ellos no se encontraron, en los 90 días, todas las pruebas fueron negativas, lo cual coincide solo parcialmente con Martínez, *et al.* (2012), quien indica que los extractos se mantienen estables por mucho tiempo, incluso durante seis meses.

En este estudio la eficacia del extracto acuoso de las hojas de Neem, contra las garrapatas estu-

diadas, fue baja, contrario a lo que se encuentra cuando se usan la semillas de la planta para la elaboración del mismo tipo de extracto, en donde la eficacia del extracto es equivalente a diferentes productos comerciales ixodicidas, eficacia que se ha justificado por la acción repelente e ixodicida (Isea, *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2005; Schwalbach *et al.*, 2003). De manera similar a lo encontrado en el presente trabajo, Ramzam, *et al.* (2008), no reporta eficacia en bovinos tratados con extracto acuoso de hojas de Neem en los días 7 y 14; sin embargo, en otro trabajo realizado *in vivo*, con extracto acuoso de hojas del árbol, se logró mortalidad de 68%. Fue inferior a la lograda con el uso de ivermectina y cipermetrina pero los autores lo interpretaron como eficaz Ramzam, *et al.* (2008). Puede resultar importante destacar que en el estudio mencionado, el polvo obtenido de las hojas de Neem, una vez mezclado con el agua se tuvo a temperatura constante de 40°C durante varias horas, lo que podría explicar la mayor eficacia.

En este estudio, hubo mayor mortalidad 24,24% con el extracto etanólico que con el acuoso; a las 14 horas de preparado, resultado similar a lo encontrado por Giglioti *et al.*, (2011), quienes con semillas de Neem, obtuvieron una mortalidad de 32%. El uso de diferentes solventes determina diferencias en la obtención de los metabolitos activos, por tal razón y de acuerdo con varios reportes, el etanol parece no extraer eficientemente los metabolitos secundarios del Neem como sí lo hace el hexano (Forti, *et al.*, 2009; Forti *et al.*, 2009a). En un estudio realizado con extractos etanólicos de hojas de Neem, hubo eficacia ixodicida de 65% (Isea *et al.*, 2013), la cual fue superior a lo encontrado, posiblemente porque

en dicho trabajo, las hojas se mantuvieron en infusión durante 72 horas. Por el contrario, los extractos etanólicos elaborados con las semillas de Neem, muestran mortalidad de 70-80% en estudios *in vivo* e *in vitro* (Isea *et al.*, 2013), lo cual supera lo encontrado en este trabajo.

La mayor concentración de azaridactina se logra en la semilla de los frutos inmaduros, identificando eficacia para más de 500 insectos, sin afectar aquellos considerados benéficos. Fuera del efecto insecticida, una acción reductora de la ovoposición y de la eclosión, así como de la capacidad de mudar de un estadio al otro (Villar *et al.*, 2012). Es posible que la acción ixodicida reducida que se encontró en este estudio, se deba a que las hojas concentran menos azaridactina que las semillas y que los métodos de extracción utilizados aquí no hayan permitido una mayor concentración de los principios activos. Los resultados obtenidos en los grupos control negativo, indican que las condiciones de laboratorio, el agua usada para el extracto acuoso y para las diluciones y el etanol con el que se hizo el extracto alcohólico, no causaron la muerte.

CONCLUSIONES

Azadirachta indica es una planta con acción insecticida e ixodicida por la presencia de metabolitos secundarios. En este estudio, a pesar de observar efecto ixodicida, la mortalidad lograda bajo las condiciones planteadas fue baja, probablemente porque los métodos de extracción rústicos dificultan la obtención de una alta concentración del metabolito activo. Adicionalmente, se demostró que el tiempo de almacenamiento de los extractos influye notoriamente en



su estabilidad por lo que la reducida eficacia lograda, se obtuvo con los extractos frescos (14 horas de preparación), pero esta se fue reduciendo de manera proporcional al tiempo de almacenamiento con los extractos almacenados con el paso de los días, de manera que hacia los 60 y 90 días de preparación, no hubo acción ixodicida y no se encontraron metabolitos en los extractos.



BIBLIOGRAFÍA

- ARIAS, D.VÁSQUEZ, G., MOTÁÑEZ, L., ÁLVAREZ, R., PÉREZ, V. (2009). Determinación del Azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (Azadirachta Indica). Ingeniería UC. 16 (3):22-26
- BRICEÑO, G., GARCÍA, J., MASELI, A., ROSALES, L.C. (2011). Efecto de extractos etanólicos de Ruda y Neem, sobre el control de bacterias fitopatógenas del género Erwinia1. Agronomía Trop. 61 (2):141-148.
- CHACIN, Z.C.A., BLANCO, M.M.L., SÁNCHEZ, G.S.C., ACEVEDO, I.C. (2013). Evaluación a nivel de laboratorio del efecto de 7 extractos vegetales para el control de Colletotrichum sp, agente causal de la antracnosis en el cultivo de tomate de árbol. Innovaciencias. 1 (1): 30-35.
- CRUZ, C.A., MARTELO, J.A.F., MARTÍNEZ, R.A.P. 2010. Evaluación In vitro de los Extractos de tres plantas, utilizando Tween-80 como solventes sobre garraptas Rhipicephalus-Boophilus microplus. Revista Ciencia y Agricultura

FMVZ-UPTC. 8 (2)66

CRUZ, C.A., LEGUIZAMÓN, N.P., CUEVAS, H.J. (2010^a). Evaluación de Efecto Ixodocida de la Diatomea Comercial, usando detergente Tween como Solvente. Revista Ciencia y Agricultura FMVZ-UPTC. 8 (2)66

DOMINGUEZ, X. A. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México.

DRUMMOND, R.O., O.H. GRAHAM, S.E. ERNST, J.L. TREVIÑO. J.L. (1967). Evaluation of insecticides for the control of Boophilus annulatus (Say) and Boophilus microplus (Canestrini) (Acari: ixodidae) on cattle. In Proceedings, 2nd international Congress of Acarology. Akademia Kiado, Budapest, Hungría. P. 493-498.

DUBLIN, D.R., ROQUE, L.E., ESTRADA, O.J. (2012). Eficacia del extracto de las hojas del Neem Azadirachta indica A. Juss en el control de nemátodos gastrointestinales en ovino Pelibuey. REDVET Revista Electrónica. Veterinaria. 13 (7)1-16

FORTI, S.M., NEVES, E.C., ALVES, L., Da Silva, N., Giron, K., Prêdes, R.C. (2009). Control de Rhipicephalus (Boophilus) microplus(Acari: Ixodidae) con extractos vegetales. Rev Colombiana Entomología. 35(2). 145-9.

FORTI, S.M., NEVES, E.C., ALVES, L., DA SILVA, N., NASCIMENTO, A.M. (2009a). Extratos de plantas no controle de Rhipicephalus(Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae) em laboratorio. Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria. 18(4). 44-8.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, C., GÓMEZ-PERAZA, R.L., LÓPEZ-AGUILAR, C.E., LEÓN-VÁLDEZ, A. (2012). Insecticidas biorracionales para el control de mosquitos y moscas negras en el Sinaloa. Ra Ximhai. 8 (3b).47-55.

GIGLIOTI, R., FORIM, M.R., OLIVEIRA, H.N., CHAGAS, A.C, FERREZINI, J., BRITO, L.G. (2011). In vitro acaricidal activity of NET (Azadirachta indica) seed extracts with know azadirachtin concentrations against Rhipicephalus microplus. Veterinary Parasitology. 181. 309-15.

GUERRA, J.E., CORRALES, J.L., SOTO, L.E., MORENO, J., RODRÍGUEZ, J., GASTELÚM, M.A. (2005). Dairy cattle tick (Boophilus microplus) control with Azadirachta indica A. 1. 248-51

ISEA, F. G. A., RODRÍGUEZ, R.I.E., HERNÁNDEZ, P. A. J. (2013). Actividad garrapaticida de Azadirachta indica A. Juss. Rev. Cubana de Plantas Medicinales. 18(2).327-340

MARCANO, D., HASEGAWA, M., (2002). Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humano. Editorial Torino.

MARTÍNEZ, A., VALENCIA, G.A., JIMÉNEZ, U.N., MESA, M., GALEANO, J.E. (2008). Manual de Prácticas de Laboratorio, Farmacognosia y Fitoquímica. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia: Facultad de Química Farmacéutica.

RAYMOMD, K.C., ROJAS, B.F, BENAVIDES, O.E., COTES, A.M., VILLAMIZAR, L., RONDERO, J.V, GARCÍA, M.P. (2004). Efecto de hongos entomopatógenos sobre la garrapata del ganado Boophilus microplus (Acari: Ixodida): uso de activadores de patogenicidad. Revista. Colombiana de Entomología. 30 (1)1-6.

RAMZAN, M., KHAN, M.S., AVAIS, M., KHAN, J.A., PERVEZ, K., SHAHZAD, W. (2008). Prevalence of ectoparasites and comparative efficacy of different drugs against tick infestation in cattle. J Animal Plant Science. 18(1). 17-9.

RODRÍGUEZ, A., RODRÍGUEZ, M.C.E., CRUZ, C.A. (2010). Efecto ixodocida de los extractos etanólicos de algunas plantas sobre garraptas Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Rev.MVZ Córdoba. 15 (3). 2175-2184.

SCHWALBACH, L.M.J., GREYLING, J.P.C. (2003). The efficacy of a 10 % aqueous Neem (Azadirachta indica) seed extract for tick control in Small East African and Toggenburg female goat kids in Tanzania. South African Journal of Animal Science. 33(2)83-8.

VÁSQUEZ, H.A. (2007). Utilización del extracto alcohólico de Azaridachta indica A. Juss, contra las bacterias de importancia médica Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis. Minerva. 1.1-10

VILLAR, C.C. (2012). El parasitismo en bovinos y el cambio climático en países tropicales con énfasis en investigaciones de Colombia. Disponible en <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulos/parasitismo-bovinos-cambio-climatico-t4313/165-p0.htm>. Consultado el 18 de marzo de 2014.