



**“Control de ninfas de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en combinación de *Beauveria spp.*  
con moléculas orgánicas y químicas”.**

Herrera Montero, Laura Mishelle y Romero Peláez, Ana Belén

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Agropecuaria

Msc. Gómez Mendoza, Gelacio Antonio

17 de agosto del 2022

## Reporte de verificación



Identical Words	226
Words with Minor Changes	1
Paraphrased Words	63
Created Words	3423

Firma:

GELACIO ANTONIO  
GÓMEZ MENDOZA

---

**Gómez Mendoza, Gelacio Antonio**

Director



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

#### CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Control de ninfas de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en combinación de *Beauveria* spp. con moléculas orgánicas y químicas" fue realizado las señoritas Herrera Montero, Laura Mishelle y Romero Peláez, Ana Belén, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 17 de Agosto del 2022

Firma:



GELACIO ANTONIO  
GÓMEZ MENDOZA

Gómez Mendoza, Gelacio Antonio

C. C.1708691645



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Nosotras, **Herrera Montero, Laura Mishelle** y **Romero Peláez, Ana Belén**, con cédulas de ciudadanía n° 0706452125 y 2350568982, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Control de ninfas de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en combinación de *Beauveria* spp. con moléculas orgánicas y químicas**" es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 17 de Agosto del 2022

**Herrera Montero, Laura Mishelle**

C. C. 0706452125

**Romero Peláez, Ana Belén**

C.C 2350568982



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA

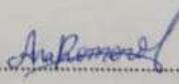
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Nosotras, **Herrera Montero, Laura Mishelle** y **Romero Peláez, Ana Belén**, con cédulas de ciudadanía n° 0706452125 y 2350568982, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Control de ninfas de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en combinación de *Beauveria* spp. con moléculas orgánicas y químicas"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 17 de Agosto del 2022

  
.....  
**Herrera Montero, Laura Mishelle**  
C. C. 0706452125

  
.....  
**Romero Peláez, Ana Belén**  
C.C 2350568982

## Índice de Contenidos

Carátula .....	1
Reporte de verificación.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Índice de Contenidos .....	6
Índice de figuras .....	9
Índice de tablas .....	10
Resumen.....	12
Abstract .....	13
Capítulo I: Introducción.....	14
Antecedentes .....	14
Justificación.....	15
Objetivos de la investigación.....	16
Objetivo General .....	16
Objetivos Específicos .....	16
Hipótesis.....	17
Capítulo II: Revisión de Literatura .....	17
Generalidades.....	17
Ciclo de vida .....	18
Ecología Parasitaria .....	19

Impacto económico.....	21
Resistencia a Acaricidas .....	21
Hongos Entomopatógenos.....	22
Descripción de Hongos Entomopatógenos .....	23
Beauveria bassiana .....	23
Mecanismo de acción .....	23
Hongos entomopatógenos en el control biológico .....	25
Extractos Orgánicos.....	25
Ajo .....	26
Cebolla .....	28
Eucalipto .....	29
Tomillo .....	30
Propóleo .....	31
Derribante (GARRATHION) .....	32
Efecto Golpe .....	33
Bioensayos .....	34
Dosis letal media DL50 .....	35
Clasificación Toxicidad según la OMS .....	36
DL50 Piretroides y Organofosforados.....	36
DL50 Hongo.....	37

Capítulo III: Materiales y métodos .....	38
Ubicación del Área de Investigación .....	38
Ubicación política .....	38
Ubicación Geográfica .....	38
Ubicación Ecológica .....	39
Materiales.....	39
Métodos .....	40
Capítulo IV .....	63
Resultados y Discusión .....	63
Pruebas de Antagonismo de Beauveria spp. en PDA combinado con extractos orgánicos .....	63
Prueba de Antagonismo de Beauveria spp. en PDA combinado con extracto orgánicos de Ajo fresco .....	65
Ensayo preliminar .....	66
Ensayo definitivo .....	71
Fase 1, dosis letal media (DL50) individual.....	74
Porcentaje de Germinación .....	79
Fase 2 Dosis letal media (DL50) del hongo entomopatógeno en combinación de Cipermetrina más Ethion y extracto de ajo.....	81
Capítulo V .....	85
Conclusiones .....	85

Recomendaciones .....	87
Bibliografía .....	87

### Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Taxonomía de las Garrapatas .....	18
<b>Figura 2</b> Ciclo de vida de la Garrapata .....	19
<b>Figura 3</b> Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos .....	24
<b>Figura 4</b> Ubicación geográfica donde se desarrolló el Proyecto de integración curricular .....	38
<b>Figura 5</b> Distribución de las unidades experimentales del ensayo .....	45
<b>Figura 6</b> Recolección de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	47
<b>Figura 7</b> Producción de ninfas de garrapatas. ....	48
<b>Figura 8</b> Conteo y almacenamiento de huevos.....	49
<b>Figura 9</b> Secado de ajo en estufa. ....	50
<b>Figura 10</b> Preparación de medio de cultivo a base extractos botánicos en sólido. ....	50
<b>Figura 11</b> Pruebas de antagonismo .....	51
<b>Figura 12</b> Prueba Fase 1 con extractos sólidos .....	52
<b>Figura 13</b> Obtención de extractos botánicos en fresco. ....	53
<b>Figura 14</b> Pruebas de mortalidad con extractos orgánicos en fresco. ....	54
<b>Figura 15</b> Proceso para la realización de las disoluciones seriadas.....	55
<b>Figura 16</b> Reactivación de cepas de <i>Beauveria</i> spp. ....	56
<b>Figura 17</b> Conteo de conidios de <i>Beauveria</i> spp. ....	57
<b>Figura 18</b> Repique de cepas de <i>Beauveria</i> spp. ....	58

<b>Figura 19</b> Siembra de <i>Beauveria</i> spp para determinación del porcentaje de conidios germinados. .....	59
<b>Figura 20</b> Características físicas de la muerte causada por diferentes agentes sobre ninfas de garrapatas.....	60
<b>Figura 21</b> Ejecución del efecto golpe de <i>Beauveria</i> spp con extracto de ajo y derribante. ....	62
<b>Figura 22.</b> Toma de Datos .....	63
<b>Figura 23</b> Evaluación del tercer día de crecimiento de <i>Beauveria</i> spp en PDA combinado con extractos orgánicos.....	64
<b>Figura 24.</b> Evaluación día tres del crecimiento de <i>Beauveria</i> spp. en cada medio de cultivo .....	64
<b>Figura 25.</b> Porcentaje de garrapatas muertas a las 144 horas de aplicación de extractos orgánicos en molindas secas en concentraciones del 2% al 10%. ....	68
<b>Figura 26.</b> Porcentaje de garrapatas muertas a las 144 horas de aplicación de extractos orgánicos en molindas secas en concentraciones del 20% al 50%. ....	70
<b>Figura 27.</b> Porcentaje de Mortalidad con extractos frescos a las 144 horas .....	73
<b>Figura 28.</b> DL50 de Extracto de Ajo .....	74
<b>Figura 29.</b> Dosis letal media individual de Derribante.....	76
<b>Figura 30.</b> DL50 de <i>Beauveria</i> spp. ....	78
<b>Figura 31.</b> Porcentaje de germinación de conidios en 24 hora .....	80
<b>Figura 32.</b> DL50 de <i>Beauveria</i> spp en combinación con extracto de ajo. ....	82
<b>Figura 33.</b> DL50 de <i>Beauveria</i> spp en mezcla con Derribante .....	84

### Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Garrapatas Reportadas en Ecuador .....	20
---	----

<b>Tabla 2</b> Insumos, Materiales y Equipos utilizados en laboratorio.....	39
<b>Tabla 3</b> Tratamientos establecidos al inicio de la investigación .....	41
<b>Tabla 4</b> Tratamientos evaluados Fase 1. ....	42
<b>Tabla 5</b> Tratamientos evaluados combinación con ajo fresco, Fase 2. ....	44
<b>Tabla 6.</b> Tratamientos evaluados en combinación con derribante, fase 2 .....	44
<b>Tabla 7.</b> Tratamientos evaluados en fase preliminar .....	66
<b>Tabla 8.</b> Tratamientos evaluados con extractos en molienda seca del 20% a 50% .....	68
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos evaluados con extractos en molienda fresca del 10% a 50%.....	71
<b>Tabla 10.</b> Fase 1, concentración de conidios de <i>Beauveria</i> spp.....	77
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de germinación de conidios de <i>Beauveria</i> spp en 24 horas .....	79
<b>Tabla 12.</b> Fase 2, concentración de conidios de <i>Beauveria</i> spp en mezcla con extracto de ajo ...	81
<b>Tabla 13.</b> Fase 2, concentración de conidios de <i>Beauveria</i> spp en mezcla con Derribante .....	83

## Resumen

Las garrapatas son consideradas como ectoparásitos de gran importancia en el ganado bovino por ser vectores de diferentes enfermedades de interés económico, las moléculas químicas de los acaricidas con el pasar de los años han creado resistencia, siendo necesario buscar nuevas alternativas para su control. En el presente estudio se evaluó el control de ninfas de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en combinación de *Beauveria spp*, con moléculas orgánicas y químicas en fase de laboratorio. Para la producción de ninfas, se recolectó garrapatas en fase teleogina en una finca ubicada en la Vía Valle Hermoso- Los Bancos, Recinto San Cristóbal Colón. La única molécula orgánica evaluada fue la del ajo debido a que provocó la muerte de las ninfas de garrapatas, mientras que el resto de moléculas no representaron muertes significativas, el producto fue macerado en fresco y utilizado en concentraciones 2%, 4%, 6%, 8% y 12% obteniendo una DL50 individual de 45 ml/l. Las dosis evaluadas para la cipermetrina fueron; 0,3 ml/l, 0,4 ml/l, 0,5 ml/l, 0,6ml/l, 0,8ml/l y 1ml/l teniendo como resultado una DL50 individual de 0,5 ml/l; para el caso de las cepas de *Beauveria spp* las concentraciones evaluadas fueron  $2.44 \times 10^7$  esporas/ml,  $2.44 \times 10^6$  esporas/ml,  $2.44 \times 10^5$  esporas/ml,  $2.44 \times 10^4$  esporas/ml,  $2.44 \times 10^3$  esporas/ml y  $2.44 \times 10^2$  esporas/ml, resultando ser  $1.29 \times 10^4$  esporas/ml la DL50 individual del hongo entomopatígeno. En la segunda fase, la DL50 de *Beauveria spp* en conjunto con el ajo fue de  $1,63 \times 10^4$  esporas/ml, mientras que en combinación con el Derribante se obtuvo una dosis letal media de  $1,18 \times 10^3$  esporas/ml concluyendo que la mejor combinación es la de *Beauveria spp* más Derribante.

*Palabras clave:* DL50, cipermetrina, *Rhipicephalus microplus*, extractos orgánicos, *Beauveria spp*.

### Abstract

Ticks are considered an important ectoparasite in cattle because they are vectors of different diseases of economic interest. The use of chemical acaricides has created resistance, making it necessary to look for new alternatives for their control. In the present study, the control of tick nymphs (*Rhipicephalus microplus*) in combination with *Beauveria spp.* was evaluated with organic and chemical molecules in the laboratory phase. For the production of nymphs, ticks were collected in the teleogynous phase on a farm located on the Valle Hermoso-Los Bancos road, San Cristobal Colon precinct. The only organic molecule evaluated was garlic because it caused the death of the tick nymphs, while the rest of the molecules did not represent significant deaths. The product was macerated fresh and used in concentrations of 2%, 4%, 6%, 8% and 12%, obtaining an individual LD50 of 45 ml/l. The doses evaluated for cypermethrin were 0.3 ml/lit, 0.4 ml/lit; 0.5 ml/lit; 0.6ml/lit and 0.8ml/lit and 1ml/l resulting in an individual LD50 of 0.5 ml/lit, for the case of *Beauveria spp* strains the concentrations evaluated were  $2.44 \times 10^7$  spores/ml,  $2.44 \times 10^6$  spores/ml,  $2.44 \times 10^5$  spores/ml,  $2.44 \times 10^4$  spores/ml,  $2.44 \times 10^3$  spores/ml and  $2.44 \times 10^2$  spores/ml, resulting in  $1.29 \times 10^4$  spores/ml the individual LD50 of the entomopathogenic fungus. In the second phase the LD50 of *Beauveria spp* in conjunction with garlic was  $1.63 \times 10^4$  spores/ml, while in combination with Derribant a mean lethal dose of  $1.18 \times 10^3$  spores/ml was obtained, concluding that the best combination is that of *Beauveria spp* plus Derribant.

*Key words:* LD50, cypermethrin, *Rhipicephalus microplus*, organic extracts, *Beauveria spp.*

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

El control de garrapatas en el ganado bovino de leche demanda de mucho esfuerzo y dinero, sobre todo, en aquellas zonas con mayor índice de infestación. *Rhipicephalus microplus* es comúnmente conocida como la garrapata del ganado bovino y parasita con mayor frecuencia en el centro y Sudamérica abarcando zonas subtropicales y tropicales, causando importantes perjuicios socioeconómicos, sin embargo, con el pasar de los años las plagas desarrollan resistencia a las moléculas utilizadas por los agroquímicos propios para combatirlas, motivo por el cual las casas comerciales estiman un lapso de duración molecular, dando cabida a la existencia de nuevos productos que reemplacen a los anteriores (Benavides et al., 2016)

Ecuador basa un porcentaje de su economía en la actividad ganadera, además, sus productos y subproductos forman parte de la canasta básica, según (Guillén & Muñoz, 2013) más del 75% de ganaderías se encuentran en zonas potencialmente infestadas por garrapatas, así mismo, (Pérez & Rodríguez, 2019) en su trabajo Resistencia a Alfa-Cipermetrina, Ivermectina y Amitraz en garrapatas *Rhipicephalus microplus* colectadas en cuatro localidades documenta el estado de resistencia de las garrapatas hacia los acaricidas más utilizados en el país.

Para ello, el uso de hongos entomopatógenos más extractos orgánicos forman una buena alternativa porque representa tecnología de fabricación local, no depende de una cadena de suministro, por otro lado, no genera toxicidad o residualidad, además, al ser un ser vivo no se da adaptación por parte de las garrapatas como se ha observado en las moléculas químicas de los garrapaticidas comerciales (Sepúlveda et al., 2017).

El uso de hongos entomopatógenos es una alternativa que ha venido siendo estudiada en nuestro país, reportando varios trabajos como el de; (Piguave, 2016) (Fajardo et al., 2017); (Morocho, 2019), así mismo, en el Informe Anual de la Estación Experimental Santo Domingo publicado en el 2021

por Navarrete et al (2021), se ha documentado la selección de cepas de hongos entomopatógenos sobre ninfas de garrapatas, por otro lado, (Bravo & Carranza, 2022) demostraron la aplicación de hongos *Beauveria spp* para baño de ganado, e *Isaria spp* para control de ninfas a nivel de potrero.

### **Justificación**

Actualmente existe un rechazo a nivel mundial ante el uso de insecticidas y acaricidas debido a su resistencia, residualidad en el ambiente e intoxicaciones que incluyen efectos en la salud humana y en los ecosistemas agrícolas, lo que ha permitido nuevas investigaciones para la creación de tecnologías que puedan sustituirlas (Sepúlveda et al., 2017).

Debido a las investigaciones para la creación de alternativas a los químicos usados en la agricultura y ganadería, nacen los marcos regulatorios para el registro de bioplaguicidas y uso de biocontroladores, emitidos por Agrocalidad como el “Manual técnico de procedimientos para el registro y control de agentes de control biológico, extractos vegetales, preparados minerales, semioquímicos y productos afines de uso agrícola” aprobada el 17 de julio del 2019 (MAG, 2020).

Uno de los acaricidas mayormente usados en el Ecuador es el Alfa-Cipermetrina, el cual ya ha sido demostrado que ha perdido su efectividad sobre *Rhipicephalus microplus* desarrollando una resistencia del 65.22% en la Costa y 63.64% en el Oriente (Pérez & Rodríguez, 2019).

Hoy en día se han desarrollado nuevas tecnologías para la implementación de biocontroladores a base de hongos entomopatógenos para el control de garrapatas, lo que ha permitido desplazar el uso de agroquímicos y además, permite al ganadero evitar la pérdida de días de ordeño por el uso de acaricidas, debido a que esta tecnología no genera residuos en la leche (Bautista et al., 2017)

La Estación Experimental Santo Domingo del INIAP dispone de aislados de hongos entomopatógenos *Beauveria spp.* combinados para el control de garrapatas, los cuales han dado excelentes resultados causando la muerte a los cuatro días y el desprendimiento hasta el noveno día (Bravo & Carranza, 2022).

En base a lo expuesto por (Bravo & Carranza, 2022) la presente investigación pretende dar una respuesta disminuyendo las infestaciones causadas por garrapatas mediante una combinación *Beauveria spp.* junto con moléculas orgánicas y químicas para el control de ninfas de garrapata *Rhipicephalus microplus* por aspersión en base a la dosis letal media (DL50) teniendo sinergia entre extracto y hongo, permitiendo trabajar con una menor concentración de hongo, debido a que su elaboración es más costosa.

Con el empleo de este trabajo se espera disminuir efectos adversos como la resistencia de las garrapatas, contaminación a los productos derivados del ganado y menos gastos en el uso de moléculas químicas del mercado determinando la dosis letal media de *Beauveria spp.* y de extractos botánicos sobre ninfas de garrapatas.

### **Objetivos de la investigación**

#### **Objetivo General**

Evaluar el control de ninfas de garrapata (*Rhipicephalus microplus*) en combinación de *Beauveria spp.* con moléculas orgánicas y químicas en fase de laboratorio.

#### **Objetivos Específicos**

- Determinar la Dosis Letal Media (DL50) de *Beauveria spp.* y de extractos botánicos sobre ninfas de garrapatas.
- Determinar la mejor combinación hongo –cipermetrina para control de ninfas de garrapata.
- Seleccionar en base a la DL50 una combinación de dos extractos para control de ninfas de garrapata.
- Determinar en base a la DL50 la mejor combinación hongo –extractos para control de ninfas de garrapata.

## Hipótesis

### Hipótesis nula

Ho: La interacción entre los hongos entomopatógenos INIAP EESD con otros acaricidas (cipermetrina, extractos orgánicos) no incrementa su eficacia para el control de ninfas de garrapatas en laboratorio.

### Hipótesis alternativa

H1: La interacción entre los hongos entomopatógenos INIAP EESD con otros acaricidas (cipermetrina, extractos orgánicos) incrementa su eficacia para el control de ninfas de garrapatas en laboratorio.

## Capítulo II: Revisión de Literatura

### Generalidades

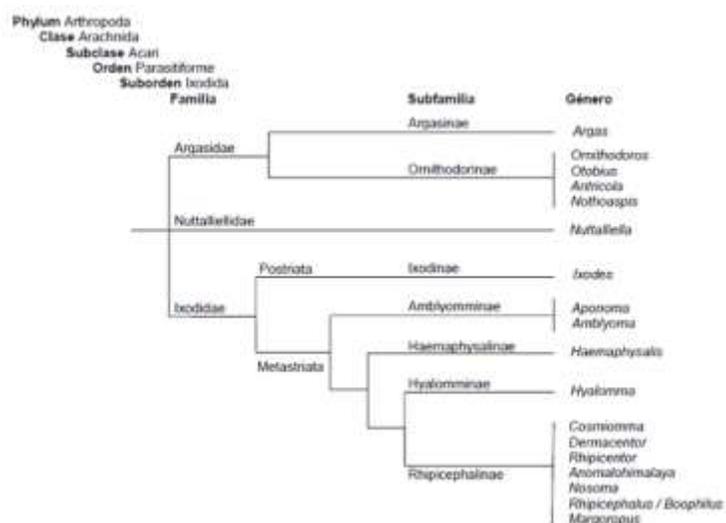
Las garrapatas son ectoparásitos que consumen sangre de mamíferos, aves, reptiles, etc. Aproximadamente 850 especies de garrapatas han sido descritas en todo el mundo (Furman & Loomis, 1984). Se dividen en dos familias: Ixodidae que son las garrapatas duras y Argasidae garrapatas blandas. Estos artrópodos que se encuentran taxonómicamente en la clase Arachnid actúan como vectores de enfermedades para animales como humanos entre las cuales se encuentran: virales, bacterianas (*Rickettsia sp*, *Ehrlichia sp*, *E. ruminantium*, *Anaplasma marginale*, *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*) y parasitarias (*Babesia sp*, *Theileria cervi*) (Pulido et al., 2016).

Entre los efectos más importantes que producen las garrapatas al ganado bovino se encuentra la disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso, anemias producidas por pérdida de sangre, irritación por picaduras y depreciación de las pieles afectadas. El género *Rhipicephalus microplus* es la

garrapata de mayor frecuencia e importancia en la industria ganadera, puede conducir a enfermedades agudas, crónicas o incluso, a la muerte de los animales (Polanco & Ríos, 2016).

**Figura 1**

*Taxonomía de las Garrapatas*



*Nota.* Tomado de *Review on the biology of Rhipicephalus sanguineus (Arthropoda, Chelicerata)*(Latreille,1806) (pag.11-16), por R. Álvarez, 2017, Sustainability Agri Food and Environmental Research.

### **Ciclo de vida**

Las garrapatas son clasificadas como artrópodos hemimetábolos, requieren alimentarse de fluidos sanguíneos para poder desarrollarse durante todos sus estadios. El proceso de alimentación inicia cuando la garrapata se une al hospedador, corta su piel con los quelíceros o estructuras bucales y después se ancla o sujeta en el tejido de la piel con una órgano llamado hipostoma, que se encuentra ubicado en el capitulum (Benavides et al., 2016).

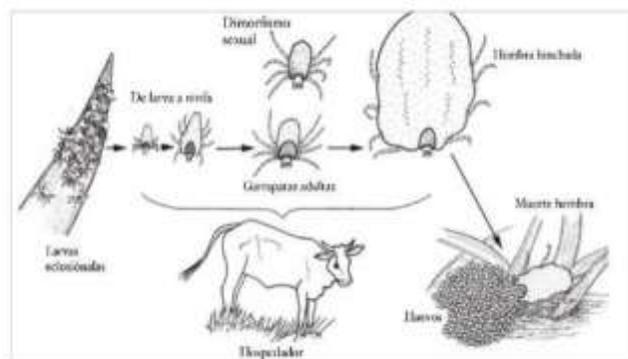
El desarrollo de las garrapatas cuenta con cuatro estadios: huevo, larva con 6 patas, ninfas con 8 patas y sexualmente inmaduras, adultos con 8 patas y sexualmente maduros. La última etapa ocurre cuando la garrapata se desprende del hospedador (Cortinas & Jones, 2006). Después de un periodo de

alimentación de 19 a 25 días, la hembra ingurgitada (llena de sangre) cae al suelo y he inicia la oviposición (La garrapata produce hasta 3.000 huevos) (Benavides et al., 2016).

El ciclo de vida de la garrapata sobre el animal es constante, ya que la velocidad de desarrollo ocurre en los potreros y depende de la temperatura del suelo. La temperatura más óptima para la fase adulto-huevo es de entre 24 °C y 28 °C, bajo estas condiciones el período de desarrollo es más corto, 30 días aproximadamente, cuando la temperatura se descende, la fase se alarga (Benavides et al., 2016).

## Figura 2

### Ciclo de vida de la Garrapata



*Nota.* Tomado de *Ticks of Domestic Animals in Africa*, por A. R Walker et al., 2007, A guide to identification of species.

## Ecología Parasitaria

*Rhipicephalus microplus* se distribuye en mayor frecuencia en zonas subtropicales y tropicales, también existen registros sobre los 2600 m.s.n.m. En Ecuador la información sobre garrapatas es muy limitada, por lo cual no hay datos de importancia que traten sobre su ecología o dinámica poblacional. En especie tiene la característica de presentar una fase de diapausa en su ciclo biológico que depende del hospedero, para la búsqueda de este, utiliza sus sentidos que responden al NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> y al calor corporal (SENASA, Garrapatas, 2006).

En zonas tropicales que contienen lluvias regulares, altas humedades junto a climas cálidos, se prestan condiciones óptimas para que haya un desarrollo de generaciones de garrapatas, de este modo se nota su presencia constantemente. En climas con temporadas de lluvias y sequías fluctuantes, la garrapata tiene una dinámica de población inestable (SENASA, Garrapatas, 2006).

**Tabla 1**

*Garrapatas Reportadas en Ecuador*

Familia	Especie
Ixodidae	<i>Amblyomma maculatum</i>
	<i>Amblyomma cajennense</i>
	<i>Amblyomma naponense</i>
	<i>Amblyomma multipunctum</i>
	<i>Amblyomma triste</i>
	<i>Anocentor nitens</i>
	<i>Ixodes boliviensis</i>
	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>
	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
Argasidae	<i>Ornithodoros furcosus</i>
	<i>Ornithodoros talaje</i>

*Nota.* La tabla muestra las especies de garrapatas que se encuentran presentes en el Ecuador, Recuperado de *A review of Neotropical Amblyomma Species (Acari: Ixodidae)*, por Voltzit, 2007, Zoological Museum of Moscow State University.

El Ecuador es un país tropical que tiene condiciones climatológicas que son ideales para las garrapatas, en la parroquia San José de Alluriquín, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas se encontró *Rhipicephalus microplus* con un porcentaje del 97,53 ; *Amblyomma* 2,25% e *Ixodes* en un 0,21% (Guillén & Muñoz, 2013). En el Ecuador existen más de 40 especies pertenecientes a los géneros *Amblyomma spp.*, *Dermacentor spp.*, *Haemaphysalis spp.*, *Ixodes spp.*, *Rhipicephalus spp.*, documentadas por ser relevantes veterinaria y medicamento (Tipás, 2020).

### **Impacto económico**

El impacto económico que se genera por la presencia de ectoparásitos está relacionado a la epidemiología y se distribuye de forma directa e indirecta. En las pérdidas directas se puede ver una proporcionalidad con la ocurrencia de la enfermedad, lo cual corresponde al incremento de la población de garrapatas, junto con los animales parasitados que desarrollan la enfermedad. El efecto negativo ocurre cuando la población aumentan, con el primer contacto hemoparásito (Benavides et al., 2016).

Los animales susceptibles predomina la pérdida directa, puede terminar en mortalidad, también se considera el retardo en el crecimiento, abortos en el último periodo de gestación, daño a la piel y afecta la conducta junto con el bienestar del animal (Tipás, 2020).

### **Resistencia a Acaricidas**

El mecanismo más usado para el control de garrapatas es a base de productos acaricidas, dentro de los grupos químicos que se usan con mayor frecuencias están: amidinas, fluzuron, organoclorados, piretroides sintéticos, lactonas macrocíclicas (Rodríguez-Vivas y otros, 2014). En el Ecuador los productos más usados son la ivermectina, alfacipermetrina y amitraz (EDIFARM, 2017).

Por presentar una alta toxicidad tanto para el animal como el operario, se ha prohibido el uso de organoclorados, carbamatos y organofosforados (AGROCALIDAD, 2016).

La resistencia de las garrapatas es un mecanismo de supervivencia, en el cual la dosis letal recomendada, no surge efecto. Entre los mecanismo de resistencia que más resaltan se encuentran: cambio de localización, migran hacia áreas en las cuales el químico no llegue; resistencia metabólica, hace posible que la garrapata metabolice con mayor rapidez el compuesto químico-tóxico; cutícula impermeable, se producen cambios en la permeabilidad, lo cual provoca que el acaricida no tenga un contacto directo hacia el interior de la garrapata (Coronado & Mujica, 1997).

Los factores externos que generan resistencia se deben al manejo del ser humano, dentro de los cuales está la dosis, la frecuencia y el método de aplicación de los acaricidas, también el tipo de acaricida que se selecciona y otros factores que tiene que ver con el manejo de la finca (Ruiz & Blanco, 2009).

En Ecuador, por región se ha encontrado que los mayores porcentajes de resistencia corresponden a: el Oriente con el producto amitraz alcanza 86,4% de resistencia; la Costa para ivermectina y alfacipermetina tiene el 73.9% y 65,2% respectivamente. La prevalencia de resistencia a acaricidas en las fincas evaluadas en Ecuador fue de 71.9% para amitraz; 69.8% ivermectina y 63.5%, alfacipermetrina (Rodríguez-Molano et al., 2020).

### **Hongos Entomopatógenos**

Los hongos entomopatógenos tienen la característica de proveer diversos servicios a los sistemas agroecológicos. Pueden regular plagas y con ello mantenerlas en un nivel normal, existe aproximadamente 750 especies, presentes en el medio ambiente, los géneros más conocidos y de importancia son: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Rhizopus* y *Fusarium* (Motta & Murcia, 2011).

Para el control biológico se debe obtener la destrucción total o parcial de patógenos e insectos plaga, para esto se usan sus enemigos naturales, los hongos entomopatógenos. Su particularidad es infectar artrópodos, usando la penetración de su cutícula, después emplea diferentes mecanismos de acción, en la cual la víctima no puede generar resistencia (Pucheta et al., 2006)

Los aspectos ecológicos como la humedad relativa, temperatura, grado de patogenicidad, virulencia, hospederos, son necesarios conocer para poder usarlos de forma eficiente. Por lo cual es necesario desarrollar investigaciones, donde se estudie la patología, genética, ecología y fisiología, así mismo técnicas de producción masiva, formulación y aplicación (Butt et al., 2001).

### **Descripción de Hongos Entomopatógenos**

#### **Beauveria bassiana**

Hongo deuteromiceto perteneciente a la familia *Moniliaceae*, distribuido ampliamente en suelos, plantas e insectos. Se los usa en la rama de biocontroladores biológicos, su mecanismo de acción, se emplea adhiriéndose al insecto, germina, penetra y esporula. La beauverina es la toxina que contiene y provoca permeabilidad en la membrana de los insectos, causándole la muerte. El insecto infectado presenta inapetencia, hinchazón, parálisis, muerte y por último, momificación; se conoce que el hongo produce enzimas que degradan la cutícula del insecto, entre las que se puede mencionar se encuentran las proteasas y quitinasas; en la garrapata su uso se ve ligado como alternativa para la disminución del uso de moléculas químicas (Fernández, 2006).

#### **Mecanismo de acción**

Los hongos entomopatógenos tienen diversos mecanismos de invasión, infectan por contacto y adhesión, las esporas se esparcen a diferentes partes del cuerpo del insecto como: boca, espiráculos, entre otros) (Motta & Murcia, 2011).

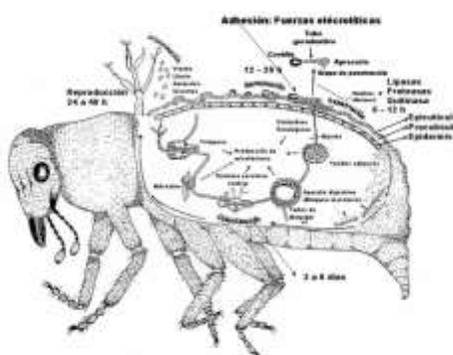
Para iniciar la infección patógeno-hospedero, mediante las esporas germinadas, se forman tubos germinativos y hasta el apresorio; después inician tres fases:

- 1.- Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto
- 2.- Penetración
- 3.- Desarrollo del hongo

Durante la penetración del hongo al insecto, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos (Barranco & Alatorre, 2002).

### Figura 3

*Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos*



*Nota.* El inicio de la infección del hongo se da cuando las conidios penetran la cutícula del huésped. Tomado de *Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos*, por Ramírez et al., 2014, SENASA.

Existen compuestos que pueden inhibir el crecimiento del hongo, el insecto al activar su defensa, inicia procesos como: melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (Barranco & Alatorre, 2002).

Cuando ocurre la penetración cuticular, hay una proliferación dentro del insecto, en donde inicia el crecimiento micelar, de tal forma que las hifas terminan penetrando la cutícula, y se las puede visualizar en la superficie con esporas (Motta & Murcia, 2011).

### **Hongos entomopatógenos en el control biológico**

En los agroecosistemas, las enfermedades naturales, son producidas por microorganismos, que muchas veces dependen del grado de susceptibilidad del hospedero. En asociación patógeno-hospedero, el insecto ejerce una selección natural, de esta forma, los microorganismos se especializan respecto al hospedero (Alves, 1998).

### **Reactivación del hongo**

Para hacer uso de hongos entomopatógenos se debe de contar con un organismo reactivado, de esta manera se asegura su eficacia y viabilidad. Para realizar la reactivación es necesario que se lo haga sobre el insecto en estudio, con el fin que conserve sus propiedades virulentas y patogénicas (Aizawa, 1971). Un entomopatógeno por virulencia y especificidad se puede aislar mediante el uso de cultivos multiespóricos (Antía et al., 1992).

### **Extractos Orgánicos**

Los aceites esenciales, extractos, moliendas e infusiones de diferentes especies de plantas pueden tener efectos insecticidas, fungicidas, bactericidas, herbicidas entre otros; esto debido a los compuestos que contienen en su estructura como lo son los alcoholes, aldehídos, ésteres, moléculas volátiles y las bioactivas como los terpenos y más; su uso se ve incrementado debido al impacto positivo que se obtiene, debido a que no genera efectos adversos en otras especies, tampoco resistencia, ni contaminación por residualidad (Reyna-Fuentes et al., 2021).

Dentro de los métodos de extracción empleados para conseguir la esencia o aceite esencial de los compuestos bioactivos de las plantas, destacan: lixiviación usando etanol; maceración, en donde el líquido de extracción depende del compuesto que se requiere extraer; la destilación por arrastre de vapor, común para compuestos volátiles (López E. , 2008).

Cada metodología empleada, manifiesta una variación en la propiedades del compuesto que se extrae, influyendo en concentración y calidad de los extractos, además, se debe mencionar que cada planta tiene diferentes compuestos algunos son aromáticos, solubles en agua o alcohol, otros pueden degradarse por acción de la luz solar, dependiendo esto, se debe realizar la mejor metodología para su extracción (Eckert & Wubker, 1991).

Para la obtención de los extractos orgánicos se emplean diversas metodologías; (Venskutonis, 1997) menciona que el someter una muestra de la planta al calor, para su secado, puede disminuir o aumentar la calidad, en el caso de plantas aromáticas, ciertos componentes pueden aumentan después del secado, por ejemplo, en la hoja de laurel aumenta el eugenol, en tomillo el timol.

Debido al uso excesivo y dosificaciones incorrectas de productos sintéticos químicos se ha creado resistencia en la población del insecto, en el caso de los productos acaricidas; se toma de ejemplo al ácaro *Varroa destructor*, considerado la garrapata de la abeja, este insecto pertenece al Phylum: Arthropoda, Clase: Arachnida y Subclase: Acari; comparte taxonomía con la garrapata *Rhipicephalus microplus* de esta forma se pretende transferir la tecnología del ácaro *Varroa* hacia la garrapata del bovino (Punina, 2022).

El ácaro *Varroa* (*Varroa destructor*) es considerado un ectoparásito de importancia en la abeja (*Apis mellifera*), se ha podido demostrar que el uso de extractos orgánicos y químicos, sirven para control del acaro, basado en el desprendimiento y muerte de los individuos, además su uso conlleva una mínima contaminación en los productos de las abejas y no hay resistencia, por lo cual se considera que dentro de un plan de manejo integrado, el uso de los extractos es efectivo (Ahumada et al., 2018)

## **Ajo**

El ajo (*Allium sativum*) es una planta herbácea que pertenece a la familia Alliaceae, es de origen asiático y se ha distribuido por todos los continentes, se caracteriza por la presencia de un bulbo

compuesto que tiene hojas fértiles y en sus axilas se forman los dientes. El ajo tiene una gran demanda por su uso en propiedades insecticidas, culinarias y medicinales debido a sus compuestos azufrados con actividades antimicrobianas, antifúngicas y antibacterianas; en el mercado mundial el principal abastecedor es China con una participación del 80% de la producción mundial (Sinavimo, 2020).

La esencia de ajo contiene alicina, un compuesto que se forma después de la interacción aliína-aliinasa; la alicina tiene efectos antibacteriales y antimicóticos, en pruebas in vitro, se pudo ver cómo actúa contra *Candida albicans*, evitando completamente su crecimiento. Los efectos descritos sobre el crecimiento del hongo, detallan que el ajo disminuye la absorción de oxígeno, daña membranas, inhibe lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Ankri & Mirelman, 1999).

En su estado fresco contiene diversos componentes los cuales se encuentran: carbohidratos, proteínas, aminoácidos, minerales. (Greco, 2011) indica que se debe destacar la presencia de compuestos organoazufrados por ser responsables del sabor, olor y pungencia característica del ajo; los componentes azufrados tienden a estar presentes cuando la célula ha sufrido un cambio; la aliína es un compuesto que se encuentra estable en el diente de ajo, al ser este cortado o machacado la enzima aliinasa actúa sobre el compuesto, liberando ácido sulfénico y otros tiosulfinatos entre los cuales destaca la alicina ya que representa hasta un 75% del total de tiosulfinatos (Lawson et al., 1991).

Existe en el mercado diferentes presentaciones de ajo, la deshidratación es parte del proceso que se realiza para conseguir el polvo conservando el sistema aliína-aliinasa con el objetivo que al ser nuevamente hidratado el producto pueda llevar a cabo la reacción y se generen los compuestos tiosulfinatos; a elevadas temperaturas la enzima aliinasa decrece y se inactiva (Greco, 2011).

Para la obtención de polvo de ajo a escala de laboratorio e industrial, conservando niveles altos de alicina (Greco, 2011) realizó una investigación evaluando diferentes metodologías, estableciendo como base que la enzima aliinasa, contenida en el ajo, decrece en temperaturas aproximadas a los 40°, y

a medida que aumentan los grados, puede llegar a inactivarse; de los ensayos realizados, destacó el proceso de deshidratación Spray a escala industrial porque preserva la alicina en mejores niveles, usando una temperatura elevada en un corto periodo de tiempo.

En una investigación realizada en Costa Rica se evaluaron diferentes dosis de aceite esencial de ajo para el control de varroa, se comprobó que existe un efecto acaricida alto con una eficiencia del 70% utilizando un 10% de concentración durante un mes, así mismo se evidenció que tiene efectos adversos sobre la población de la colmena como el cese de la postura de cría y la mortalidad de las abejas (Van & Umaña, 2017).

Existen pocos estudios acerca del ajo como agente de control en garrapatas, (Martinez-Velazquez et al., 2010) realizaron una investigación sobre el Efecto acaricida de aceites esenciales de orégano, romero y ajo contra *Rhipicephalus microplus*, en este se emplearon diferentes dosis que fueron aplicadas en larvas de 10 días de edad, como resultado se mostró una alta mortalidad (90%-100%) en las esencias de ajo y orégano en todas las concentraciones, la esencia de romero produjo una mortalidad más baja (85%) en concentraciones altas; en el caso del ajo se evidenció que a una concentración baja (2.5%) se obtiene el 90% de mortalidad debido a su contenido de trisulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo y trisulfuro de metil alilo.

### **Cebolla**

La cebolla (*Allium cepa*) pertenece a la familia *Alliaceae*, la cual comprende aproximadamente más de 700 especies, su origen está en el norte del continente asiático, es una planta que cuenta con la presencia de un bulbo y hojas largas en forma cilíndrica, su uso es extenso, pero principalmente está ligado con su sabor como condimento. Es una de las hortalizas más cultivada en el mundo, abarcando una producción de 99.968.016 toneladas (MAGYP, 2019)

La cebolla se caracteriza por tener un bajo contenido de materia seca y un alto porcentaje de agua, en su composición destaca la presencia de carbohidratos, lípidos, proteínas, minerales, vitaminas, el oligoelemento azufre es el más abundante (Herrera et al., 2007).

Los compuestos azufrados que contiene son característicos del olor y sabor, se forman cuando la planta absorbe sulfatos desde el suelo que después ayudan a sintetizar aminoácidos que dan origen a los péptidos de azufre, estos últimos posteriormente contribuyen a formar aminoácidos ACSOs (S-alquenilsulfóxidos de cisteína ) que no poseen sabor ni olor en su estado de reposo (Rose et al., 2005).

Cuando se produce un corte en el tejido, la enzima aliinasa hidroliza a los ACSOs dando origen al amonio, ácido pirúvico y otros compuestos organoazufrados como los tiosulfinatos (Lancaster & Collin, 1981). En la cebolla el ACSOs, isoalliina es el que produce el efecto lacrimógeno (óxido de tiopropanal) (Berretta, 2015); el olor singular que se produce es debido al ácido sulfhídrico y otros compuestos como el dipropildisulfuro o alilpropildisulfuro (Herrera et al., 2007)

Se han realizado investigaciones en la cual se ha comprobado el poder insecticida de la familia Alliaceae, (Mazeed & El-Solimany, 2020) evaluaron el ajo y la cebolla en distintas presentaciones: fresco individualmente, ambos combinados y aceite esencial individual, con una aplicación cada 3 días , de esta forma se pretendió controlar el ácaro varroa en la abeja melífera, como resultado, el ajo fresco tuvo el mayor porcentaje de mortalidad con 94.29%, seguido de la combinación de ajo+cebolla con 93,60%; respecto a la cebolla el aceite esencial obtuvo el 89,91% y en fresco 85,33% del total de varroa presentado en la colmena, siendo este el tratamiento con el registro más bajo.

### **Eucalipto**

El Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) es un árbol que pertenece a la familia Myrtaceae, nativo de Australia, su expansión y cultivo en el mundo se debe al valor comercial de su madera y a su uso en el desarrollo de medicamentos. Se ha reportado que el aceite esencial usado en forma de vapor es tóxico para diversos patógenos microbianos (bacterias y hongos) como también para insectos, esto se debe a

su componente principal eucaliptol o 1,8 cineol, otros componentes que también se encuentran son:  $\alpha$ -pineno, aromadendreno, D-limoneno, varidifloreno y gurjuneno (Nolazco et al., 2020).

Dentro de los métodos de extracción del aceite esencial de eucalipto, se encuentra la destilación por arrastre con vapor de agua, la hoja fresca se corta y se coloca en una cámara, posteriormente se somete a una corriente caliente de vapor de agua, la esencia obtenida se condensa y es recolecta. Este método es uno de los más usado por su alto rendimiento de pureza en el aceite (Moreno y otros, 2010).

Para el control del ectoparásito varroa en abejas se ha empleado el eucalipto de diferentes formas, (Ahumada et al., 2018) mencionan el uso del aceite esencial de *Eucalypto radiata* en diluciones con glicerina vegetal líquida al 2,5%; 5% , 7,5% , como resultado la concentración al 5% tuvo el efecto más significativo para el desprendimiento y muerte del ácaro, destacando que el desprendimiento se mantuvo en 24 días.

En el trabajo realizado por (Cueto & Estevez, 2020) se usó infusiones de *Cymbopogon sp.*, *Eucalyptus sp.*, *Citrus aurantium* y *Menta sp.* para control de varroa, estas fueron aplicadas directamente al panal obteniendo que, el tratamiento más eficaz respecto a la mortalidad del ácaro fue naranja agria con una aplicación por cuadro con el 65,8%; respecto al eucalipto se encontró el 51,6% de mortalidad, además se pudo evidenciar una reducción del parasitismo para ambos tratamientos.

### **Tomillo**

El tomillo (*Thymus vulgaris*) es una planta aromática herbácea que pertenece a la familia: Lamiaceae, se caracteriza por su tamaño pequeño (40 cm) y sus numerosas ramificaciones. El uso de la planta se aplica en diferentes ámbitos entre los cuales se destaca: condimento, medicinal, aromático y pesticida. Dentro los componentes que se encuentran en el tomillo están los terpenos como el timol y carvacrol que tienen un mayor porcentaje (Loeza et al., 2020).

(Rahimmalek & Hossein-Golib, 2013), estudió el efecto de diferentes tipos de secado sobre el aceite esencial del tomillo, determinando que a temperaturas elevadas de 70° incrementa el contenido

de timol y carvacrol. Los compuestos volátiles antioxidantes que tiene el tomillo son los encargados de que se produzca esta particularidad, que a su vez depende del tiempo y la temperatura de secado.

Dentro de la composición del aceite esencial se encuentran flavonoides como apigenina, luteolina, eriodictol; también destacan otros componentes como los ácidos fenólicos derivados del ácido cafeico y rosmarínico, saponinas y la serpilina que le da un principio amargo. Se ha podido comprobar que tiene efectos antibacterianos y esto se deben a la presencia del timol, carvacrol y compuestos fenólicos, que actúan sobre la membrana plásmática, causando alteraciones en la permeabilidad (López T. , 2006).

Tiene actividad antimicótica en Cepas del género *C. albicans*, actúa rompiendo la membrana celular, (Dias et al., 2015) y (Brito et al., 2015) comprobaron que cepas del genero *C. albicans* en presencia de timol, reducen su morfogénesis e impide el crecimiento de hifas. El timol y carvacrol inhiben hasta en un 100% el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*, en concentraciones de 40 y 50 ppm; también altera la capacidad germinativa y reproductiva (Velásquez et al., 2014).

El timol sintético es un acaricida de bajo impacto ambiental debido a que no presenta toxicidad ni resistencia, ha sido usado como control de Varroa en la apicultura, entre otras propiedades que se la atribuye esta su efecto inhibitor contra hongos y bacterias (Loeza et al., 2020).

### **Propóleo**

El propóleo es una resina natural elaborada por las abejas, para su producción la abeja recolecta diferentes partes de plantas tales como : cortezas, exudados y hojas; posteriormente la abeja mezcla estos componentes con cera y sus glándulas salivales, de tal forma que se produce una hidrólisis de flavonoides glucosilados que liberan agliconas, el color y la composición del propóleo es variable, pues depende de las características geográficas, climáticas y de su fuente vegetal, específica del lugar de recolección (Bastos & Orantes Bermeo, 2021).

El uso del propóleo en la colmena es esencial, se coloca sobre grietas y agujeros con el fin de proteger la colmena de insectos intrusos, patógenos microbianos, etc (Vargas-Sánchez et al., 2014).

De forma general se conoce que la composición química se basa de un 50-55% de resinas, 30-40% de cera, 5-10% de aceites esenciales, 5% polen y 5% de materiales orgánicos. Los principales compuestos bioactivos que se han identificados son los fenólicos como los flavonoides, ésteres, ácidos aromáticos, etc. Dentro de las propiedades que destacan está su efecto antibacteriano debido a los flavonoides (galangina, pinocembrina) y los ácidos (benzoico, caféico, ferúlico) que causan múltiples efectos negativos a la bacteria como desactivar la membrana citoplasmática y pared celular, inhibir síntesis proteicas, etc (Vargas-Sánchez et al., 2014).

Su actividad antimicótica se ha comprobado en distintas investigación en hongos filamentosos o levaduriformes, en el caso de este último, cepas de *C. albicans* se ha demostrado que existe un daño celular, inhibiendo la formación del tubo germinativo, así también destrucción de las envolturas externas (Londoño et al., 2008).

Entre los múltiples usos que se le ha dado se encuentra como una molécula insecticida, en la apicultura se lo ha utilizado para el control de varroa en la presentación de tintura de propóleo, (Barrios et al., 2019) realizaron una investigación donde se evaluó el efecto de tinturas de propóleos de distintas localidades con una concentración al 15% aplicado por aspersion, como resultado se pudo observar que el mejor tratamiento fue la dosis de 50 ml/colmena porque tuvo una efectividad del 44.36 % con relación a la mínima toxicidad que presentó ante las abejas, mortalidad de los ácaros y el efecto positivo que tuvo en la colmena.

### **Derribante (GARRATHION)**

Es un antiparasitario externo de toxicidad moderada grado II, usado para el control de ectoparásitos como las moscas, pulgas, piojos y garrapatas, tiene presentación de emulsión, su modo de uso es a través de baños de inmersión o aspersion, en cada animal se usa aproximadamente de 2 a 3

litros de agua; dosis establecida para baños de aspersión es diluir 1 ml por cada litro de agua, para baños de inmersión 1 litro por cada 1000 litros de agua. 100 ml de producto contiene 10g de Cipermetrina y 40g de Ethion (Brown, 2010).

La cipermetrina es un insecticida piretroide sintético, se caracteriza su efecto residual, amplio espectro y eficacia derribante, su mecanismo de acción es por contacto directo o ingestión, atacando el sistema nervioso, causando un agotamiento muscular y celular que termina con la descoordinación y parálisis del insecto hasta su muerte. Actualmente se conoce que los vectores de enfermedades como la garrapata, han desarrollado mecanismo de resistencia (SENASA, 2013).

Ethion pertenece al grupo químico de los organofosforados, actúa por contacto, inhibiendo la actividad de la colinesterasa, alterando el impulso nervioso de tal forma que provoca parálisis y muerte del insecto. El antídoto debe incluir atropina de forma intravenosa (SENASA, 2013).

### **Efecto Golpe**

La aplicación de hongos entomopatógenos junto con dosis reducidas de productos químicos, han demostrado en diversas investigaciones, que existe sinergismo, potenciación y buena interacción; dando como resultados que esta combinación tenga efectos superiores que la suma de los efectos individuales (Cazorla & Morales, 2010).

En el caso particular de la enfermedad del mal de Chagas, comúnmente se usan insecticidas químicos para su control, en un inicio se usó productos organofosforados y posteriormente piretroides. Las epizootias que se han presentado después de usar insecticidas, han dado la idea de plantearse una alternativa de control, en la cual se usan subdosis de insecticidas, que debilitan o estresan al insecto, tornándolo más susceptible, en este caso a los hongos entomopatógenos, que tienen la particularidad potencial para el control de este insecto (Alazogaray et al., 1998).

(Alazogaray et al., 1998), evaluó el efecto de la deltametrina (piretroide) en la germinación y virulencia de *Beauveria bassiana* sobre *Triatoma infestans* (vector de la enfermedad de chagas), en

donde se comprobó que el porcentaje de germinación de conidios disminuye en función de concentraciones altas del piretroide, en cuanto a la virulencia del hongo, al exponer ninfas de *T. infestans* a concentraciones bajas del químico, no hubo alteración significativa.

Dentro de la compatibilidad de *Beauveria bassiana* con productos químicos para el control de Plagas de Triatominae, se evaluó insecticidas piretroides (cipermetrina, deltametrina) y organofosforados (Malatión, fenitrotión) a dos concentraciones, en la dosis recomendada por la casa comercial, la germinación fue afectada en más del 90% en todos los tratamientos; en la mitad de la dosis recomendada, la deltametrina tuvo el mayor grado de compatibilidad, en el caso de los organofosforados hubo efectos inhibitorios pero no en todos los aislados del hongo, la Cipermetrina en ambas dosis probadas, reflejo la mayor inhibición, por su alto grado esporocida (Cazorla & Morales, 2010).

### **Bioensayos**

El bioensayo se define en el usar a un organismo vivo con el objetivo de hallar algún compuesto químico presente en una superficie evaluada o si existe un efecto ambiental. El uso de un organismo vivo es primordial debido a que puede detectar concentraciones menores, que en un método analítico no se podría encontrar, además a través del organismo vivo, se puede evaluar el daño biológico al ecosistema durante y después de la exposición (Correa-Díaz, 2006).

El detectar el efecto que se produce en un organismo mediante el monitoreo es de gran ayuda cuando: se está inspeccionando el antes y después del uso de dosificación de algún compuesto, evaluar la efectividad de un proceso de remediación, y para asegurar el cumplimiento de parámetros de calidad ambiental; las actividades de monitoreo descritas antes, sirven para tomar decisiones como: Desarrollo y comercialización de nuevos productos, evaluación de riesgos ambientales, entre otras (Correa-Díaz, 2006).

Los bioensayos sirven para evaluar compuestos, ya que se pueden tener resultados positivos y negativos, por esta razón se considera realizar estas pruebas antes de decidir el uso de alguna sustancia o compuesto. Los bioensayos comúnmente son usados para evaluar el potencial tóxico, de tal forma que se expone un organismo a una determinada sustancia, se evalúan los daños y lesiones que este presenta, la muerte se considera como un valor de mortalidad o letalidad (Ávila et al., 2019).

Existen diferentes organismos usados como modelo en los bioensayos *in vitro*, dentro de estos se pueden encontrar desde células hasta organismo complejos como plantas, insectos, microorganismo, etc.

En el caso de los insectos, existen muchas investigaciones, ya que se los considera vectores de enfermedades, en humanos, animales y plantas. Por ejemplo, las garrapatas en los bovinos, pueden producir numerosas pérdidas económicas a causa de enfermedades que transmiten al animal; en los bioensayos son usadas para evaluar los efectos antiparasitarios que presentan bajo una exposición a productos comerciales convencionales o extractos de plantas, evaluando mediante un monitoreo la supervivencia, reproducción y mortalidad (Rosado et al., 2010).

Mediante el uso de los bioensayos se puede calcular concentraciones que manifiesten algún efecto significativo sobre el organismo vivo, al evaluar la letalidad o mortalidad, la concentración que se requiere encontrar para matar el 50 % de los organismos se denomina Concentración Letal 50 % (CL50); la CL50% permite comparar diferentes sustancias, cuando se busca el efecto de la mortalidad sobre un organismo, se espera que este efecto se logre a la concentración más baja (Ávila et al., 2019).

### **Dosis letal media DL50**

La dosis letal media (DL50) se desarrolló para poder estandarizar agentes farmacológicos activos, de esta forma se puede demostrar que el efecto que se produce está relacionado con la dosis administrada (Vega y otros, 2000). El valor que se obtiene de la DL50 es la toxicidad aguda de una sustancia, lo cual representa la dosis que causa la muerte del 50% de una población experimental. La

experimentación actual que se usa para evaluar la toxicología se lleva a cabo con técnicas *in vitro*, como nuevas alternativas económicas (González, 2012). Para el cálculo de la DL50 se usan técnicas de estimación de punto, como los métodos de Probit.

### **Clasificación Toxicidad según la OMS**

Los plaguicidas se definen como sustancias con cierto grado de toxicidad, se controlan con el fin no causar daños en otros organismos (OMS, 2019). La clasificación realizada por la OMS en intervalos de DL50 oral o dermal en mg/kg, se encuentra de la siguiente manera:

- Clase I-a: Sumamente peligroso: <5 oral, <50 dermal
- Clase I-b: Muy peligroso: 5 - 50 oral, 50 - 200 dermal
- Clase II: Moderadamente peligroso: 50 - 2000 oral, 200 - 2000 dermal
- Clase III: Ligeramente peligroso: >2000 oral, >2000 dermal
- Clase U: Improbable que presente peligro agudo >5000

Además, los productos químicos deben llevar un pictograma, símbolo o color que permita identificar rápidamente su nivel de concentración, los colores indicativos son: Rojo para clase I; Amarillo: Clase II y Azul Clase III. Se debe tener en cuenta que existe la toxicidad aguda y la crónica, la primera hace referencia que (OMS, 2019).

### **DL50 Piretroides y Organofosforados.**

(Romero et al., 1997), evaluó la resistencia de la garrapata *Rhipicephalus microplus* a acaricidas organofosforados y piretroides, usó pruebas larvarias con cepa de referencia a distintas concentraciones, la mortalidad de Diazinón fue de 102 y 905 ppm; Coumafos 155 y 415 ppm; Deltametrina 66 y 135 ppm; Cipermetrina 153 y 326 ppm; Flumetrina 3 y 10 ppm, para DL50 y DL99 respectivamente. De las fincas que se avaluó, en organofosforados, el Diazinón tuvo mortalidad entre 0

y 100%, Coumafós en cambio resistencia moderada, concluyendo que hubo distintos grados de resistencia en la población; en la Cipermetrina y Deltametrina hubo mayor resistencia.

Según (Rodríguez-Molano et al., 2020), en el uso de deltametrina se ha documentado resistencia en *R. microplus* al usar la dosis recomendada por la casa comercial (200 ppm), obteniendo de resultado solo el 33,33% de muertes y al usar el doble de la dosis causó el 56. La cipermetrina que pertenece al mismo grupo de los piretroides, ha tenido numerosos resultados en los cuales se confirma un alto porcentaje de resistencia, en pruebas realizadas en campo y laboratorio.

En el bioensayo realizado por (Salari et al., 2008), la aplicación de la DL50 promedio para garrapatas blandas en diferentes provincias de Irán, fue de 0.03, 0.04, 1,7, 0,7 y 1,7  $\mu\text{g/garrapatas}$ , también se presentó dentro de la pendiente dosis-respuesta que las poblaciones en campo son homogéneas respecto al efecto de la cipermetrina.

#### **DL50 Hongo.**

(Tipás, 2020), realizó una investigación en la que evaluó el efecto acaricida de hongos entomopatógenos en *Rhipicephalus microplus* adultas, se obtuvo la mortalidad del 100% con una concentración de  $1,003 \times 10^8$  esporas/ml a los 14,5 días. La CL50 fue  $6,7670 \times 10^4$  esporas/ml sobre *R. microplus* en estado adulto.

Se investigó la susceptibilidad de garrapatas frente a *Beauveria bassiana* en laboratorio, usando garrapatas adultas, se logró obtener concentración letal media (CL50) que corresponde a la concentración de  $2,30 \times 10^8$  conidios/ml; con una mortalidad del 34,5 % (Cahuari, 2017).

El uso del hongo *Beauveria bassiana* tiene la capacidad de ser usado en diversas plagas, en este trabajo se evaluó su potencial en el defoliador de la maracuyá; en el cual registró una mortalidad de entre 20% y 84% al cuarto día; determinado la CL50 con de  $9.39 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup> y la CL95 fue de  $1.42 \times 10^8$  conidios mL<sup>-1</sup>, demostrando su efectividad sobre larvas de lepidópteros (Malpartida-Zevallos et al., 2013)

## Capítulo III: Materiales y métodos

### Ubicación del Área de Investigación

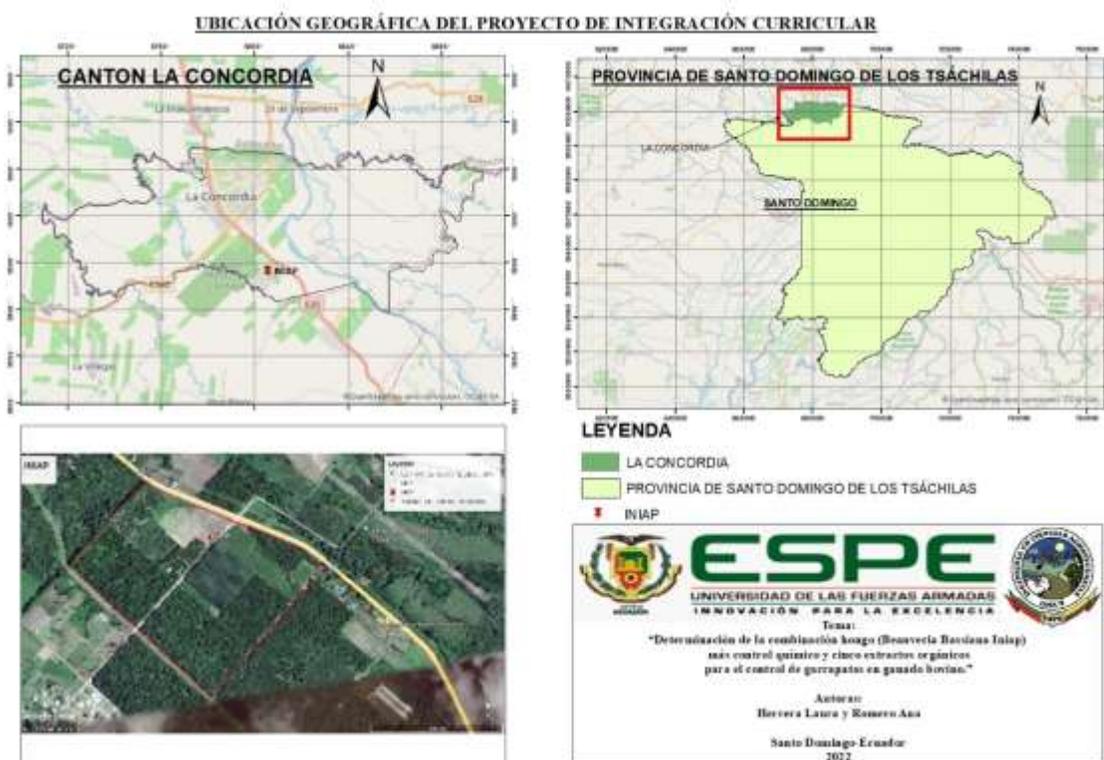
#### Ubicación política

El proyecto de Integración Curricular se llevó a cabo en la Estación Experimental Santo Domingo INIAP, ubicado en la provincia de Santo Domingo en el Km 38 de la vía Santo Domingo-Quinindé, cantón la Concordia.

#### Ubicación Geográfica

#### Figura 4

Ubicación geográfica donde se desarrolló el Proyecto de integración curricular



*Nota:* Elaboración Propia

- Oeste: 79°22'
- Norte : 00°01'
- Altitud: 300 msnm

Fuente: (Bravo & Carranza, 2022)

### **Ubicación Ecológica**

- Temperatura media anual : 24.7 °C
- Precipitación media anual : 2704.3 mm/año
- Heliofanía media anual : 705.1 horas luz/año
- Humedad relativa : 87 %.
- Altitud : 300 msnm
- Topografía : Regular
- Suelos : Franco Arenosos.
- Zona de vida Holdridge : Bosque Húmedo Tropical (bh-T).

Fuente: (INIAP, 2020).

### **Materiales**

**Tabla 2**

*Insumos, Materiales y Equipos utilizados en laboratorio.*

<b>Insumos</b>	<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>
Papa Dextrosa Agar	Vidriería de laboratorio	Cámara de flujo Laminar
Alcohol	Asas	Autoclave
Cepas de Beauveria	Micropipetas	Microondas

Insumos	Materiales	Equipos
Tween	Puntas	Microscopio
Tetraciclina	Guantes	Estereoscopio
Agua destilada	Mascarillas	Estufa
Extractos de ajo, cebolla, tomillo, eucalipto y propóleo	Cofia Cubre zapatos Cámara de Neubauer Mechero Algodón Papel Atomizadores Filtro de tela	Balanza analítica Centrífuga

## Métodos

### Factores a probar.

El factor que se estudió en el proyecto de integración curricular fue la muerte causada por los extractos de moléculas orgánicas bajo diferentes concentraciones más la combinación del hongo entomopatógeno.

### Tratamientos a comparar.

#### Fase 1 (DL50 individual)

**Tabla 3***Tratamientos establecidos al inicio de la investigación*

<b>Tratamiento</b>	<b>Denominación</b>
1	Ajo al 2%
2	Ajo al 5%
3	Ajo al 8%
4	Ajo al 10%
5	Cebolla al 2%
6	Cebolla al 5%
7	Cebolla al 8%
8	Cebolla al 10%
9	Tomillo al 2%
10	Tomillo al 5%
11	Tomillo al 8%
12	Tomillo al 10%
13	Eucalipto al 2%
14	Eucalipto al 5%
15	Eucalipto al 8%
16	Eucalipto al 10%
17	Propóleo al 2%
18	Propóleo al 5%
19	Propóleo al 8%
20	Propóleo al 10%
21	Hongo $1 \times 10^6$
22	Hongo $1 \times 10^7$
23	Hongo $1 \times 10^8$
24	Hongo $1 \times 10^9$

<b>Tratamiento</b>	<b>Denominación</b>
25	Cipermetrina+Ethion 0.2ml/ltr
26	Cipermetrina+Ethion 0.3ml/ltr
27	Cipermetrina+Ethion 0.4 ml/ltr
28	Cipermetrina+Ethion 0.5ml/ltr
29	Testigo (Agua)

*Nota:* Los tratamientos fueron modificados según las pruebas preliminares realizadas al inicio de la investigación. Elaboración propia

#### **Tratamientos realizados.**

En las pruebas de antagonismo, se demostró que el extracto de propóleo y tomillo inhibieron el crecimiento del hongo, además se realizaron pruebas previas para determinar las dosis letales de los extractos obteniéndose que el extracto de cebolla y eucalipto, a pesar de no inhibir el crecimiento del hongo, no mata a las ninfas de garrapatas en ninguna dosis ni presentación (seco y fresco) teniendo como tratamientos a evaluar en la primera fase, los siguientes:

#### **Tabla 4**

*Tratamientos evaluados Fase 1.*

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>
1	Ajo 2%
2	Ajo 4%
3	Ajo 6%
4	Ajo 8%
5	Ajo 10%

Tratamientos	Descripción
6	Ajo 12%
7	Hongo $1 \times 10^2$
8	Hongo $1 \times 10^3$
9	Hongo $1 \times 10^4$
10	Hongo $1 \times 10^5$
11	Hongo $1 \times 10^6$
12	Hongo $1 \times 10^7$
13	Cipermetrina+Ethion 0.3 ml/l
14	Cipermetrina+Ethion 0.4 ml/l
15	Cipermetrina+Ethion 0.5 ml/l
16	Cipermetrina+Ethion 0.6 ml/l
17	Cipermetrina+Ethion 0.8 ml/l
18	Cipermetrina+Ethion 1 ml/l
19	Testigo (Agua)

*Nota:* Tratamientos evaluados para calcular la DL50 individual. Elaboración Propia

**Fase 2. DL50 en combinación Cipermetrina, Ethion (Derrivante) + Hongos entomopatógenos**

**Tabla 5**

*Tratamientos evaluados combinación con ajo fresco, Fase 2.*

Tratamiento	Denominación
1	4.3% de Ajo+ $7.81 \times 10^6$ esporas/ml
2	4.3% de Ajo+ $7.81 \times 10^5$ esporas/ml
3	4.3% de Ajo+ $7.81 \times 10^4$ esporas/ml
4	4.3% de Ajo+ $7.81 \times 10^3$ esporas/ml
5	4.3% de Ajo+ $7.81 \times 10^2$ esporas/ml
6	4.3% de Ajo+ $7.8 \times 10^1$ esporas/ml
7	Agua

*Nota:* Tratamientos evaluados en la segunda fase para obtener la DL50 del hongo en combinación con ajo fresco. Elaboración propia.

**Tabla 6.**

*Tratamientos evaluados en combinación con derribante, fase 2*

Tratamientos	Descripción
1	0,5 ml/l de Derribante + $1.61 \times 10^8$ esporas/ml
2	0,5 ml/l de Derribante + $1.61 \times 10^7$ esporas/ml
3	0,5 ml/l de Derribante + $1.61 \times 10^6$ esporas/ml
4	0,5 ml/l de Derribante + $1.61 \times 10^5$ esporas/ml

Tratamientos	Descripción
5	0,5 ml/l de Derribante +1.61x10 <sup>4</sup> esporas/ml
6	0,5 ml/l de Derribante +1.61x10 <sup>3</sup> esporas/ml
7	Agua

*Nota:* Tratamientos evaluados en la segunda fase para obtener la DL50 del hongo en combinación con Derribante. Elaboración propia.

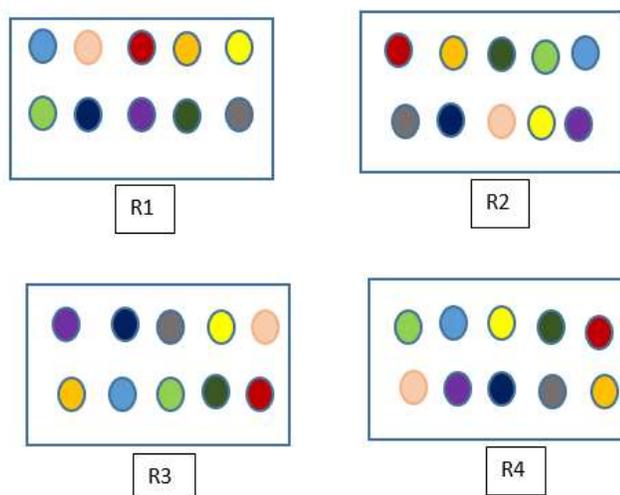
### Repeticiones.

Cada tratamiento tuvo cuatro observaciones, teniendo un total de 76 cajas Petri como unidades experimentales en la primera fase y 56 en la segunda fase.

### Croquis del diseño.

**Figura 5**

*Distribución de las unidades experimentales del ensayo*



*Nota:* Cada color corresponde a un tratamiento. Elaboración propia.

### **Análisis estadístico.**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un Diseño Completamente al Azar con cuatro observaciones, analizado con un modelo de regresión lineal Probit en ambas fases, en la segunda fase se analizó con Probit y se aplicó un análisis de varianza. Las fuentes de variación fueron dosis y tiempo, aplicándose 4 dosis y 3 tiempos de monitoreo correspondiente a; 48, 96 y 144 horas. Los datos para la dosis letal media del hongo entomopatógeno se evaluará hasta las 216 horas, por lo tanto, la segunda fase se observará hasta el noveno día.

### **Variable a medir.**

#### ***Mortalidad.***

La mortalidad de ninfas de garrapatas se evaluó mediante observación continua a las 48, 96, 144 horas en caso de los extractos, 24 horas para los tratamientos con cipermetrina y 216 horas en las disoluciones del hongo entomopatógeno. Se determinó la mortalidad contando el número de ninfas muertas por cada tratamiento, fue necesario hacer pequeños movimientos y punciones suaves con un objeto punzante previamente esterilizado para asegurar que no exista movimiento locomotor en el insecto.

### **Manejo de la investigación.**

#### ***Recolección de Garrapatas.***

Se colectaron garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* en fase teleogina directamente de la piel del animal de la finca seleccionada, ubicada en la vía valle hermoso los bancos, recinto San Cristóbal Colón. Se procedió a identificar las zonas más afectadas en el animal que, comúnmente son las ubres, ancas y patas traseras, para luego, con ayuda de nuestras manos, desprenderlas y colocarlas en recipientes con tapa agujereada permitiendo la aireación. Dentro del frasco se colocó una torunda de algodón humedecido con agua para luego ser transportadas al laboratorio de protección vegetal INIAP.

**Figura 6**

*Recolección de garrapatas Rhipicephalus microplus*



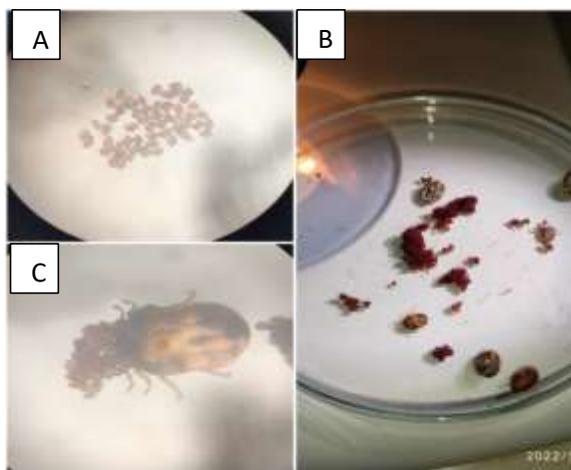
*Nota:* (A) Recolección manual de garrapatas en fase teleogina. (B) Desprendimiento de garrapatas directamente de animales infestados. (C) Almacenamiento de garrapatas a nivel de campo. (D) Finca ubicada en la vía Valle Hermoso Los Bancos.

***Producción de ninfas de garrapatas.***

Para la producción de ninfas de garrapata en laboratorio se empleó la metodología realizada por (Bravo & Carranza, 2022) , se colocó 20 garrapatas por caja Petri durante una semana, dejando incubar a temperatura ambiente (26 a 27°C) en el laboratorio de protección vegetal de la EESD con humedad relativa del 70%. Transcurrido el tiempo se observó la ovoposición de las garrapatas.

**Figura 7**

*Producción de ninfas de garrapatas.*

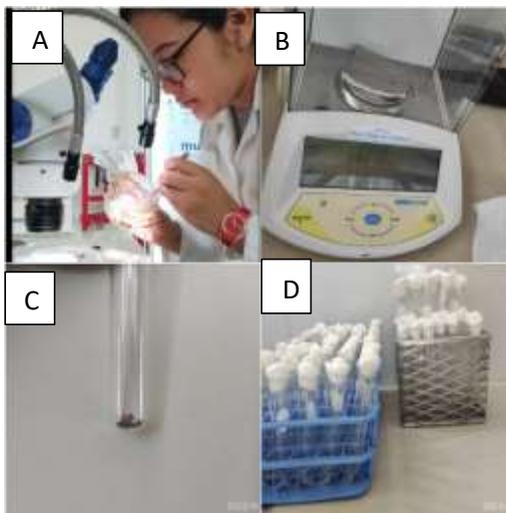


*Nota:* (A) Huevos de garrapatas vistas a través del estereoscopio. (B) Ovoposición de garrapatas en fase teleogina. (C) Ovoposición vista a través del estereoscopio.

Una vez puesto los huevecillos, se contó bajo el estereoscopio 100 huevos, los cuales fueron pesados en una balanza analítica y trasladados a un tubo de ensayo taponado con algodón como muestra referencial, para el proceso de incubación, los huevos restantes se transfirieron tomando en cuenta la referencia del peso de los 100 huevos y se pasó a llenar cada tubo, así mismo fueron taponados con algodón, se colocaron en rejillas a temperatura de 26.5 °C aproximadamente, cada semana se fueron humedeciendo los algodones con agua destilada estéril, procurando mantener la humedad. Se esperó cuatro semanas para disponer de sus ninfas y proceder con las pruebas, de tal forma se humedecieron los algodones con agua azucarada para procurar la vitalidad de las ninfas.

**Figura 8**

*Conteo y almacenamiento de huevos.*



Nota: (A) Conteo de huevos de garrapatas. (B) Peso de 100 huevos de garrapatas. (C) 100 huevos de garrapatas en un tubo de ensayo. (D) Almacenamiento de huevos de garrapatas.

***Obtención de extractos botánicos en sólido.***

Todos los productos seleccionados ajo, cebolla, tomillo, eucalipto a excepción del propóleo, por motivos de venta, se secaron en la estufa durante 24 horas a una temperatura de 70°C, en el caso del ajo se lo colocó en láminas y la cebolla por capas sobre papel periódico sellado, el tomillo se lo colocó por ramas cubierto de papel y el eucalipto se dispuso en hojas, y al igual que el resto, se llevó a secar a la estufa. El propóleo fue usado directamente como viene en su presentación al público, diluido con alcohol.

**Figura 9**

*Secado de ajo en estufa.*



*Nota:* Proceso de secado para el ajo laminado en estufa.

Una vez deshidratados los productos, se procedió a moler cada uno por separado en un molino de mano, una vez obtenido el polvo se pesó 20g para ser utilizado en las pruebas de antagonismo al 10%, para ello se pesó 20g de cada uno, se añadió un poco de agua hasta formar una pasta espesa y se colocó en los tubos de ensayo de centrifuga, se centrifugó durante 15 minutos a 700 rpm para separar la molécula y obtener el líquido para ser utilizado en los medios de cultivo con PDA.

**Figura 10**

*Preparación de medio de cultivo a base extractos botánicos en sólido.*



Nota: (A) Triturado de los productos en seco. (B) Separación de la molécula orgánica en centrífuga. (C) Líquido obtenido de la centrífuga. (D) Adición de la molécula en medio PDA.

### ***Pruebas de antagonismo.***

Para descartar la existencia del extracto que inhiba el crecimiento del hongo se realizaron pruebas de Antagonismo en su mayor concentración. Se preparó 100 ml de PDA con agar estimado para 200 ml los cuales fueron completados con el 10% de la extracción de la molécula de 20 g de cada extracto, obtenido en la centrífuga, se mezclaron y se dispensaron en cajas Petri. Ya solidificado el medio se sembró el hongo y en la parte posterior de las cajas se marcó una cruz como guía para tomar las medidas del crecimiento del micelio hasta los 10 días, pasado ese tiempo se determinó que los extractos de tomillo y propóleo inhibían el crecimiento del hongo entomopatógeno.

### **Figura 11**

#### *Pruebas de antagonismo*



Nota: Cada prueba se realizó con PDA más la molécula del extracto orgánico.

### ***Ensayos preliminares***

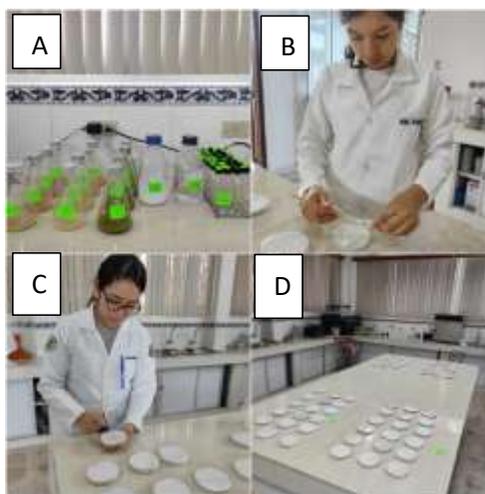
Con la obtención de los extractos botánicos se realizaron diferentes concentraciones, las que estaban previstas al inicio del ensayo, 2%, 5% 8% y 10%. En 49 ml de agua destilada estéril (ADE) se colocó 1g de cada extracto que no inhibió el crecimiento del hongo para obtener una concentración al

2%, luego, en 47.5 ml se colocó 2.5 g del extracto para llegar a una concentración del 5 %, en otros 46ml se dispuso 4g para lograr el 8 % y para el 10% se añadió 5g del extracto en 45 ml de ADE.

En cada unidad experimental correspondiente a cada caja Petri se colocarán discos de papel de 9cm de diámetro en la base y en la tapa de la caja, y dentro de cada caja se colocaron 100 ninfas de garrapatas criadas en laboratorio. Se dispensaron 12 unidades experimentales, cuatro por cada extracto. Para el primer extracto se colocaron 100 ninfas de garrapatas y se asperjó tres “chisgueteadas” (3ml) de la concentración de ajo al 2%, así mismo en una segunda caja se asperjó la solución al 5%, en una tercera al 8% y en la cuarta al 10%, los mismo se realizó para el extracto de cebolla y eucalipto, luego de la observación a las 48, 96 y 144 horas no se obtuvo muertes significantes de las ninfas, por lo tanto, se realizaron pruebas a altas concentraciones del 20%, 30%, 40% y 50%. Debido a que no hubo mayor diferencia con las concentraciones más bajas se descartó los extractos en molienda seca.

### Figura 12

#### *Prueba Fase 1 con extractos sólidos*



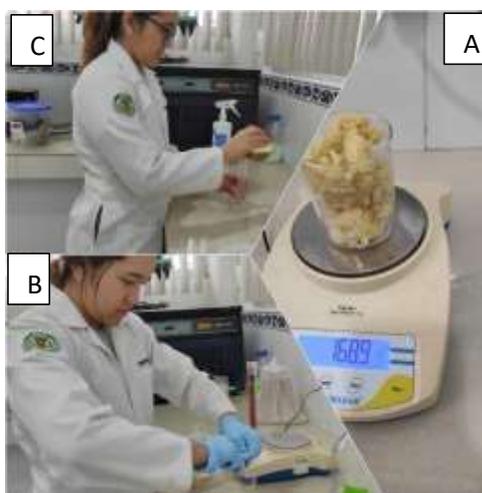
Nota: (A) Preparación de los extractos con diferentes concentraciones. (B) Traslado de ninfas de garrapatas a cajas Petri. (C) Asperjado de los extractos según los tratamientos. (D) Establecimiento de los tratamientos.

### ***Obtención de extractos botánicos en fresco.***

Se tomaron todos los productos frescos del ajo, cebolla y eucalipto, se molieron por separado con ayuda de un molino de mano hasta obtener una pasta cremosa, sobre un filtro de tela se colocó la pasta y con las manos previamente desinfectadas se hizo presión para conseguir únicamente el líquido, separado de las fibras.

### **Figura 13**

*Obtención de extractos botánicos en fresco.*



*Nota:* (A) Peso del producto en fresco. (B) y (C) Obtención del extracto líquido

### ***Ensayo Definitivo***

Con la obtención de los extractos frescos se procedió a realizar diferentes concentraciones 10, 20, 30, 40 y 50% para obtener el rango de la DL50. En 18ml de ADE se colocó 2ml de extracto para el 10%, para el 20% se añadió 4ml en 16ml de ADE, 6ml de extracto en 14ml de ADE para obtener un 30% de concentración, 8ml de extracto en 12 ml para un 40% y para el 50 % se mezcló 10 ml de extracto más 10ml de ADE.

Se dispensaron 15 unidades experimentales con el papel absorbente en la base y en la tapa, posterior se transfirieron las 100 ninfas y se asperjó cada extracto por cada concentración. Luego de 144 horas se determinó que el extracto que mata las ninfas de garrapatas fue el de ajo, mientras que la

cebolla y eucalipto no mostraron muertes significativas para el propósito del ensayo, además, se encontró que el rango de la DL90 del ajo estaba entre el 10% al 20% de concentración. Luego se hicieron pruebas con concentraciones del 10%, 12%, 14%, 16%, 18% para determinar la DL90 más precisa y obtener un rango más exacto para la DL 50. Se observó una mortalidad del 100 % en la concentración al 12%, y una menor en la concentración al 10%, por lo tanto, se realizaron los tratamientos con concentraciones del 2, 4, 6, 8, 10 y 12% para hallar la dosis letal media.

#### **Figura 14**

*Pruebas de mortalidad con extractos orgánicos en fresco.*



*Nota:* Cajas Petri con diferentes concentraciones de ajo.

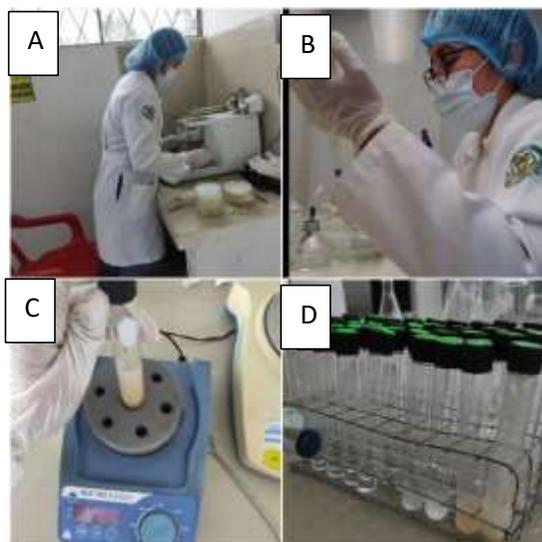
#### ***Disoluciones seriadas de hongos entomopatógenos.***

Se preparó una solución de Tween 80 al 0.1%, en un litro de agua destilada se colocó 8 gotas de Tween, se vertió 9 ml de la solución por cada tubo de ensayo, completando 10 en total, posterior a ello se colocaron las tapas con una ligera vuelta, evitando que quede muy ajustada para luego llevarlas a esterilizar a la autoclave durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo determinado se coloca el material en la cámara de flujo laminar junto a una gramera y un vortex. De las cepas ya incubadas se pesó 1g, a continuación, se preparó una suspensión de esporas colocando el gramo del contenido del hongo en un tubo de ensayo con 9ml de solución de Tween 80, para luego ser agitado en el vortex durante un minuto, con la ayuda de una micropipeta se tomó 1ml de la solución madre y se pasó a un segundo tubo

el cual fue agitado durante un minuto en el vortex para luego tomar 1ml de esa solución y pasar a un tercer tubo, eso se realizará en los nueve tubos, siendo agitado cada uno de ellos durante un minuto.

### Figura 15

*Proceso para la realización de las disoluciones seriadas.*



*Nota:* (A) Peso de 1g de *Beauveria spp* (B) Toma de 1ml de solución con micropipeta. (C) Agitación durante 1minuto en vortex. (D) Disoluciones seriadas de *Beauveria spp*.

### ***Activación de hongos entomopatógenos.***

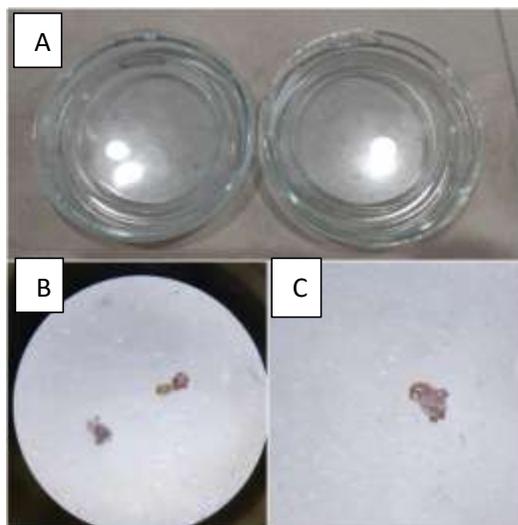
De cada dilución realizada de las cepas *Beauveria spp* se rociaron 3ml por cada unidad experimental, así mismo, se colocó 100 ninfas de garrapatas por caja, a los nueve días se observó el número de muertes con resultados no favorables, por lo tanto, se necesitó activar las cepas.

De las pruebas realizadas, se tomó las pocas ninfas de garrapatas muertas y se colocó en cámara húmeda. Dentro de un plato Petri con agua se dejó posar otra caja de menor tamaño con las ninfas muertas en seco y con la tapa de la caja más grande se cerró con normalidad, esto con el objetivo de crear un espacio saturado de humedad relativa. A los 8 días se pudo observar el crecimiento del hongo entomopatógeno sobre las ninfas. En seguida, en una cámara de flujo laminar se ejecutó la siembra de

la ninfa con los signos sobre PDA y se dejó incubar a temperatura ambiente. Ya esporulado el hongo se realizaron disoluciones y se aplicó nuevamente en las ninfas para comprobar su acción letal.

### Figura 16

*Reactivación de cepas de Beauveria spp.*



*Nota:* (A) Cámara húmeda. (B) y (C) Ninfas de garrapata esporuladas

#### ***Determinación de la concentración de esporas mediante conteo de conidios***

El conteo de conidios para determinar la concentración de esporas se realizó sobre la cámara de Neubauer colocando 10  $\mu\text{l}$  de una dilución seriada de la cepa *Beauveria spp*  $10^{-2}$  se cubrió con un cubreobjetos y se dejó reposar por dos minutos antes de realizar las lecturas en el microscopio. Con objetivo 40X se realizaron dos repeticiones de las lecturas de los cuatro cuadrantes, se cuantificaron los conidios presentes en 5 cuadrantes obteniendo un total de 20 datos. Por último, se aplicó la fórmula ajustada por (Gómez et al., 2013).

$$\text{Concentración de conidios} \left( \frac{\text{conidios}}{\text{ml}} \right) = \bar{X} * 10000 * 25 * FD$$

Donde:

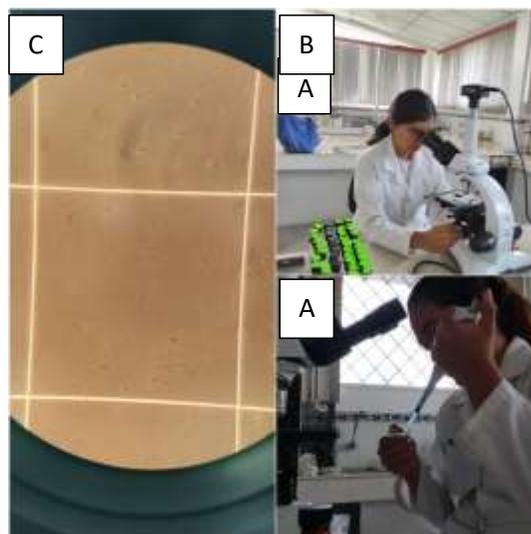
$\bar{X}$  : Promedio de las 20 lecturas por área de conteo

FD: Factor de dilución (inverso de la dilución cuantificada)

25 y 10 000: Constantes para cuadrantes laterales

### Figura 17

*Conteo de conidios de Beauveria spp.*



*Nota:* (A) Colocación de 10  $\mu$ l de disolución sobre cámara de Neubauer. (B) Observación en microscopio.

(C) Conidios de *Beauveria spp* observados en microscopio óptico a 40x

#### ***Repique de cepas de hongos entomopatógenos.***

De las mejores cepas del hongo entomopatógeno activo, se tomó pequeñas muestras de cada una de ellas para ser sembradas en un nuevo medio de cultivo (PDA), para ello, previamente se limpió correctamente la cámara de flujo laminar y se procedió a colocar todos los materiales, se hizo uso de un mechero encendido, un asa, un vaso de precipitado con alcohol, cajas Petri con PDA y se continuó con el proceso de repique. Cerca del mechero se abrió la primera cepa, con el asa se tomó un poco de micelio y se colocó en una nueva caja Petri con PDA hasta completar las cajas necesarias.

**Figura 18**

*Repique de cepas de Beauveria spp.*



*Nota:* Proceso para repicar cepas de hongos entomopatógenos.

### ***Germinación de conidios***

Para determinar el porcentaje de germinación se realizaron diluciones seriadas de cepas de *Beauveria spp*, de las cuales se utilizó la dilución  $10^{-2}$ . Para ello se sembró en 24 cajas Petri con Agar-Agua (AA) 0,1 ml de la dilución en cinco puntos previamente marcados al reverso de cada caja, las evaluaciones se realizaron cada hora. Pasado el tiempo se adicionó azul de lactofenol en cada punto, luego se cortó con una espátula la porción de agar de cada punto y se colocó en un portaobjeto cubierto por un cubreobjeto, se observó en un microscopio realizándose cinco lecturas por caja. Para considerar un conidio germinado, se tomó como parámetro que el tubo germinativo sea del mismo tamaño o mayor al conidio. Una vez contabilizado el número de conidios germinados hasta las 24 horas se procedió a calcular el porcentaje de germinación utilizando la fórmula establecida por (Berlanga & Hernández, 2006).

$$\text{Germinación \%} = \frac{\text{Número de conidios germinados}}{\text{Total de conidios evaluados}} * 100$$

**Figura 19**

*Siembra de Beauveria spp para determinación del porcentaje de conidios germinados.*



*Nota:* (A) Cajas Petri con medio de cultivo agar-agar (B) siembra del hongo entomopatógenos en los círculos de referencia.

***Fase I, dosis letal media (DL50) individual.***

En las pruebas preliminares se obtuvo que el único extracto que mata a las ninfas de garrapatas sin inhibir el crecimiento del hongo fue el extracto de ajo fresco, por lo tanto, los tratamientos en la primera fase se redujeron.

Se colocó un total de 40 cajas o unidades experimentales previamente adecuadas con el papel absorbente, así mismo, se preparó el extracto de ajo al 2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 12%, los cuales fueron asperjados por cada caja con 100 garrapatas por cuatro repeticiones, a cada repetición se sumó un testigo absoluto de agua, cada tratamiento fue rociado con 3ml de su líquido correspondiente representado por tres “chisgueteadas”.

Haciendo uso del mismo proceso se calculó la dosis letal media individual del hongo entomopatógeno hasta el noveno día evaluando diferentes dosis:  $2.44 \times 10^7$  esporas/ml,  $2.44 \times 10^6$  esporas/ml,  $2.44 \times 10^5$  esporas/ml,  $2.44 \times 10^4$  esporas/ml,  $2.44 \times 10^3$  esporas/ml y  $2.44 \times 10^2$  esporas/ml resultando  $1.29 \times 10^4$ . Para comprobar la acción letal del hongo entomopatógeno se llevó a cámara húmeda las garrapatas muertas, a los ocho días se observó la esporulación del hongo sobre las ninfas.

Para determinar la DL50 de la cipermetrina se realizó el mismo procedimiento a excepción de que se utilizó una tela con filtro como tapa de la caja Petri permitiendo la aireación, simulando la aplicación en campo, de allí el proceso fue igual, se asperjó Derribante en cinco dosis 0,3 ml/l; 0,4 ml/l; 0,5 ml/l; 0,6ml/l y 0,7ml/l por cada caja, repitiendo cuatro veces, así mismo se dispuso de un testigo absoluto. En total se prepararon 24 unidades experimentales.

Para calcular la dosis letal media se hizo uso de la fórmula de la ecuación de la recta, añadiendo el antilogaritmo del resultado.

$$X = mx + b$$

$$X = \frac{y - b}{m}$$

$$X = \text{Antilog} \left( \frac{y - b}{m} \right)$$

Donde:

$y = 5$  (50% para Probit)

$b =$  Variable independiente

$m =$  Variable dependiente

### Figura 20

*Características físicas de la muerte causada por diferentes agentes sobre ninfas de garrapatas.*



*Nota:* (A) Característica de la muerte causada por *Beauveria spp.* (B) Esporulación del hongo entomopatógeno sobre la garrapata días después de su muerte. (C) Muerte causada por extracto orgánico de ajo y (D) Ninfa de garrapata muerta por acción del Derribante.

***Fase 2, Dosis letal media (DL50) del hongo entomopatógeno en combinación de Cipermetrina más Ethion y extracto de ajo.***

El establecimiento del bioensayo en su segunda fase se realizó de manera similar que en la primera, con la particularidad de sus combinaciones, es decir, se mezcló la DL50 del extracto de ajo más siete concentraciones diferentes de *Beauveria spp* ordenado de la siguiente manera; 4,3% de Ajo +  $7.81 \times 10^7$  esporas/ml, 4,3% de Ajo +  $7.81 \times 10^6$  esporas/ml, 4,3% de Ajo +  $7.81 \times 10^5$  esporas/ml, 4,3% de Ajo +  $7.81 \times 10^4$  esporas/ml, 4,3% de Ajo +  $7.81 \times 10^3$  esporas/ml, 4,3% de Ajo +  $7.81 \times 10^2$  esporas/ml y 4,3% de Ajo +  $7.81 \times 10^1$  esporas/ml. Para ello se calculó el 4,3% del contenido de las disoluciones seriadas (9ml), obteniendo 0,38 ml de extracto de ajo por cada disolución.

De esta manera se combinó 0,38 ml de extracto de ajo más 8,69 ml de disolución de hongo entomopatógeno, la misma combinación se realizó para cada concentración de *Beauveria spp.* En cada caja Petri se colocó papel absorbente tanto en la base como en la tapa, todo previamente esterilizado, por cada caja se transfirieron 100 ninfas de garrapatas y se asperjó 2ml de cada concentración, repitiendo en cuatro ocasiones.

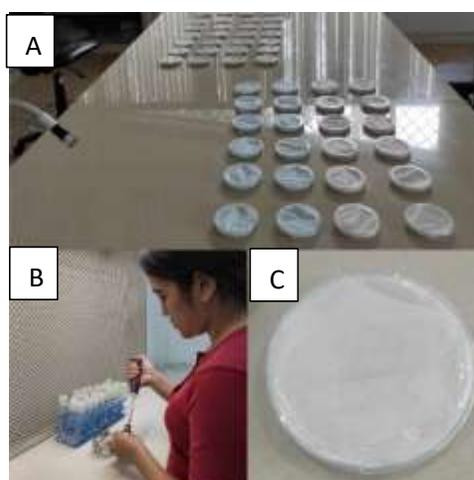
Con respecto a la mezcla con Derribante, se utilizó su dosis letal media 0,5 ml/l y una solución madre de *Beauveria spp.* de  $1.61 \times 10^9$  esporas/ml, de la misma manera se realizaron las combinaciones; 0,5 ml/l +  $1.61 \times 10^8$  esporas/ml, 0,5 ml/l +  $1.61 \times 10^7$  esporas/ml, 0,5 ml/l +  $1.61 \times 10^6$  esporas/ml, 0,5 ml/l +  $1.61 \times 10^5$  esporas/ml, 0,5 ml/l +  $1.61 \times 10^4$  esporas/ml, 0,5 ml/l +  $1.61 \times 10^3$  esporas/ml y 0,5 ml/l +  $1.61 \times 10^2$  esporas/ml. Por cada tubo de 9ml de las disoluciones seriadas se agregó 4,5  $\mu$ l del producto Derribante por concentración.

Al igual que en el proceso de la combinación anterior, por cada caja o unidad experimental se pasó a rociar las 100 garrapatas con 2ml de la mezcla, así mismo, realizando cuatro repeticiones, la diferencia en esta metodología radica, que, en lugar de ocupar la misma tapa de la caja Petri se utilizó una tela de filtro correctamente sellada y esterilizada.

Para esta fase se realizaron las tomas de datos a las 96 horas y 216 horas de haber asperjado las ninfas considerando que el ciclo biológico del hongo alcanza su letalidad a los nueve días (Bravo & Carranza, 2022).

### Figura 21

*Ejecución del efecto golpe de Beauveria spp con extracto de ajo y derribante.*



*Nota:* (A) Establecimiento del bioensayo en el laboratorio de Protección Vegetal EESD. (B) Mezcla de Derribante con diferentes concentraciones de *Beauveria spp.* (C) Unidad experimental de la mezcla de Derribante con *Beauveria spp.*

### **Toma de datos**

A las 48, 96 y 144 horas de haber establecidos los tratamientos se registró el número de ninfas de garrapatas muertas por cada tratamiento y repetición. Se tomó cada unidad experimental, se destapó y se contabilizó el número de garrapatas muertas con ayuda del estereoscopio, observando que

las garrapatas vivas, en su mayoría, se agrupaban en la tapa de la caja Petri y las muertas se posaban sobre la base. Para Determinar el porcentaje de mortalidad en aquellos tratamientos con el hongo entomopatógeno se contabilizó a partir del cuarto hasta el noveno día. En el caso de extracto de ajo fresco se observó el 50% de ninfas muertas a las 48 horas y para la dosis letal media individual de la cipermetrina se consideró 24 horas.

### Figura 22.

*Toma de Datos*



*Nota:* Recolección de datos mediante conteo de ninfas muertas

## Capítulo IV

### Resultados y Discusión

#### Pruebas de Antagonismo de *Beauveria* spp. en PDA combinado con extractos orgánicos

En los diferentes medios de cultivo se evidenció un crecimiento desigual, en la Figura 1 se muestra que, en el día tres, los medios de cultivo de ajo y cebolla obtuvieron el mayor crecimiento en comparación con los demás extractos orgánicos y el testigo, en los siguientes días evaluados, se mantuvo el mayor crecimiento en las mismas especies, con la diferencia que en el medio de cebolla

hubo incremento de colonias en toda la caja Petri y un mayor esporulado; el ajo mantuvo una sola colonia de crecimiento; en el caso de cipermetrina se vio un menor crecimiento respecto al testigo, lo cual indica que el crecimiento es lento pero no hay antagonismo.

**Figura 23**

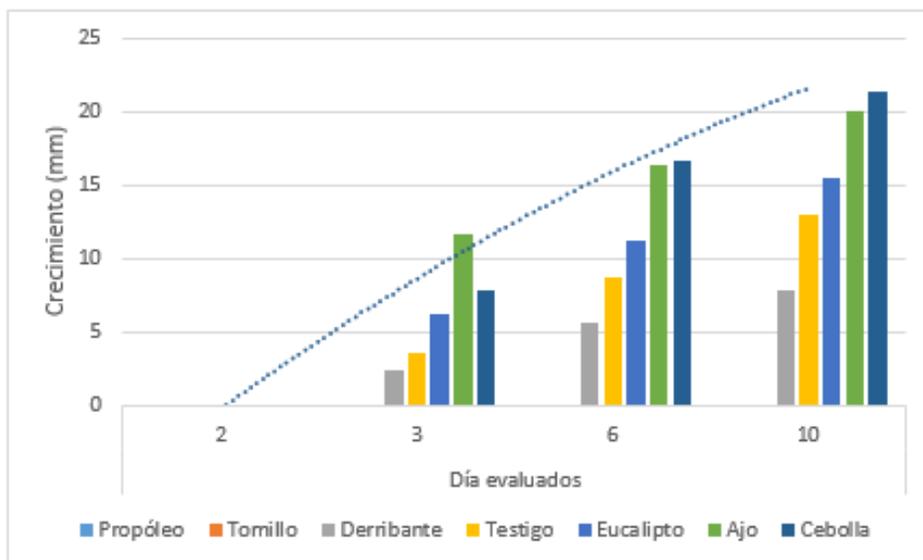
*Evaluación del tercer día de crecimiento de Beauveria spp en PDA combinado con extractos orgánicos*



*Nota:* Evaluación del crecimiento antagónico de *Beuaveria spp.* en PDA combinado con extractos orgánicos; la primera fila corresponde al día tres, donde se refleja un crecimiento normal del hongo en los extractos de ajo, cebolla, eucalipto y derribante en comparación al testigo, en los extractos de tomillo y propóleo no hubo crecimiento.

**Figura 24.**

*Evaluación día tres del crecimiento de Beauveria spp. en cada medio de cultivo*



*Nota:* Elaboración propia

En la figura 24, se presentan los promedios de crecimiento de *Beauveria spp.* de cada uno de los medios de cultivo. Se aprecia que a partir del día tres existe diferencia entre los tratamientos, el medio de cultivo de propóleo y tomillo presentó nulo crecimiento, esto debido a que el tomillo contiene compuestos como el timol y carvacrol que evitan la capacidad reproductiva y germinativa de la espora (Velásquez et al., 2014); en el caso del propóleo, (Londoño et al., 2008) señala que el extracto puede causar daño al conidio inhibiendo la formación del tubo germinativo. El ajo tuvo el mayor crecimiento respecto al testigo, con 11,26 mm; el derribante presentó el menor crecimiento, lo cual se le atribuye a la presencia de la molécula química que posee, de esta forma actúa retrasando la germinación del hongo, pero no inhibiéndola (Cazorla & Morales, 2010).

Al sexto día se pudo observar que los mayores promedios de crecimiento respecto al testigo se presentaron en los tratamientos de cebolla (21,33 mm) y ajo (20 mm), ambas con compuestos organoazufrados, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento del hongo, en este caso no se le atribuye este efecto ya que al usar moliendas secas que han pasado por temperaturas superiores a los 70° provocan que la enzima que genera los efectos inhibitorios decrezca o se inactive (Greco, 2011). En el día diez la cebolla siguió dominando el mayor rango de crecimiento promedio respecto al testigo y los demás tratamientos, por lo cual se puede concluir que los tratamientos de cebolla, ajo, eucalipto y el derribante químico no tiene antagonismo con el hongo *Beauveria spp.*, en el caso del tomillo y el propóleo, debido a que su molécula inhibe su germinación cesa el desarrollo.

#### **Prueba de Antagonismo de *Beuaveria spp.* en PDA combinado con extracto orgánicos de Ajo fresco**

A partir de la evaluación de efectividad de los extractos orgánicos frescos para control de ninfas de garrapatas se procedió a realizar la prueba de antagonismo, se usó el extracto de ajo en concentración del 12%, en los días evaluados, no hubo crecimiento, lo cual se le atribuye a sus

compuestos organoazufrados que inhiben la germinación de los conidios, pero que sin embargo, no mata al hongo (Sinavimo, 2020). Por ello, una vez germinadas los conidios del hongo como recomienda (SENASA, 2017) se sembró sobre PDA con extracto de hongo y se logró observar el crecimiento de las hifa confirmando lo antes mencionado.

### **Ensayo preliminar**

Debido a que las pruebas de antagonismo arrojaron resultados negativos en el crecimiento micelar del hongo entomopatógeno para los extractos de tomillo y propóleo se los descartó automáticamente de las pruebas y tratamientos, teniendo como únicos extractos a evaluar; ajo, cebolla y eucalipto en diferentes concentraciones junto con el testigo, los mismo que se evaluaron en tres diferentes tiempos, 96 horas, 48 y 144 horas.

**Tabla 7.**

*Tratamientos evaluados en fase preliminar*

Tratamientos	Descripción
1	Ajo 2%
2	Ajo 5%
3	Ajo 8%
4	Ajo 10%
5	Cebolla 2%
6	Cebolla 5%
7	Cebolla 8%

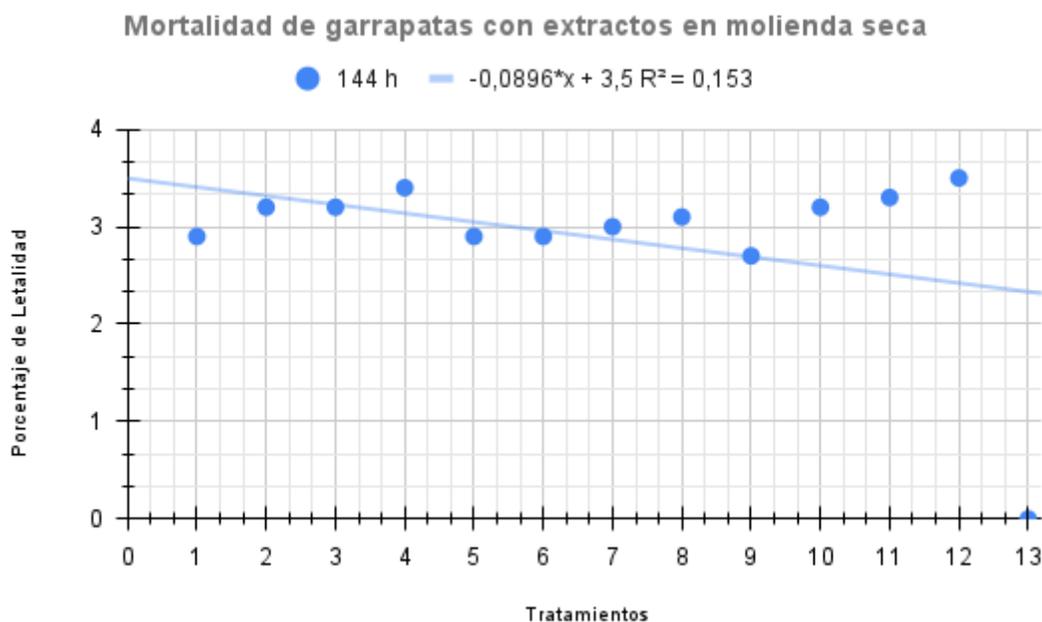
Tratamientos	Descripción
8	Cebolla 10%
9	Eucalipto 2%
10	Eucalipto 5%
11	Eucalipto 8%
12	Eucalipto 10%
13	Agua

*Nota:* Elaboración propia.

Debido a que el grado de significancia es mayor que el 5% no existe buena correlación entre el rango de las variaciones y las concentraciones ensayadas, por lo tanto, no influye significativamente en la tasa de mortalidad, lo que se representa en la siguiente figura.

**Figura 25.**

*Porcentaje de garrapatas muertas a las 144 horas de aplicación de extractos orgánicos en molindas secas en concentraciones del 2% al 10%.*



*Nota:* Elaboración propia

En la figura 25 de respuestas transformadas por Probit se puede analizar que ningún extracto en ninguna concentración (2,5,8 y 10%) alcanza un porcentaje cercano al 50% para determinar su poder acaricida, obteniendo 3.5% como el mayor porcentaje de letalidad a las 144 horas del extracto de Eucalipto en una concentración al 10% lo que indica en efecto lo dicho anteriormente en la tabla 7, por lo tanto, se realizaron nuevas pruebas en concentraciones más altas representadas a continuación.

**Tabla 8.**

*Tratamientos evaluados con extractos en molienda seca del 20% a 50%*

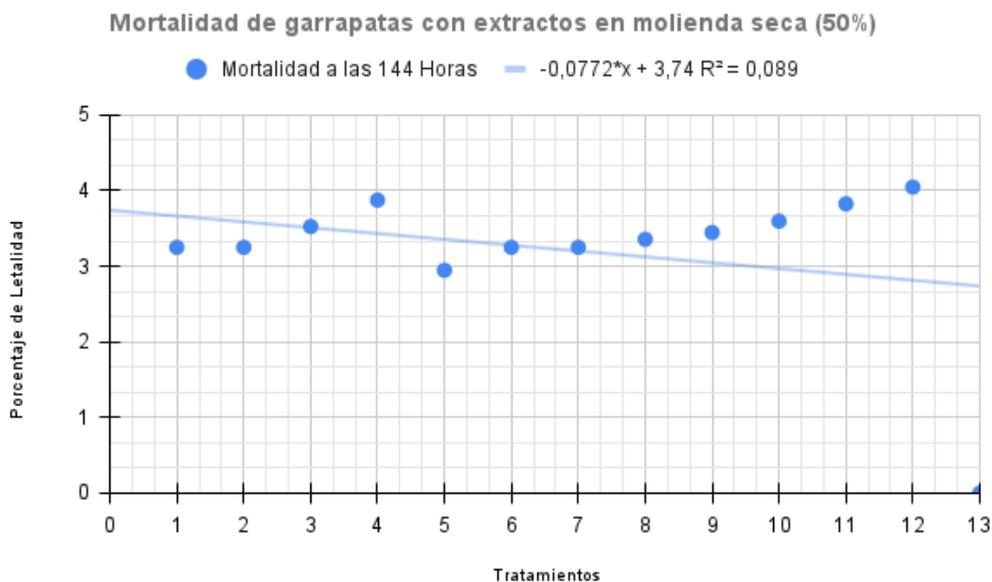
Tratamientos	Descripción
1	Ajo 20%

Tratamientos	Descripción
2	Ajo 30%
3	Ajo 40%
4	Ajo 50%
5	Cebolla 20%
6	Cebolla 30%
7	Cebolla 40%
8	Cebolla 50%
9	Eucalipto 20%
10	Eucalipto 30%
11	Eucalipto 40%
12	Eucalipto 50%
13	Agua

*Nota:* Elaboración propia.

**Figura 26.**

*Porcentaje de garrapatas muertas a las 144 horas de aplicación de extractos orgánicos en moliendas secas en concentraciones del 20% al 50%.*



*Nota:* Elaboración propia

En la Figura 26 se determina que no existe una DL50 para los extractos en concentraciones del 20, 30, 40, y 50% debido a que no alcanza un porcentaje adecuado, no hay mayor diferencia con los extractos de menores concentración, concluyendo anular los extractos en molienda seca.

Para la obtención de las moliendas secas de los extractos orgánicos, se sometió a secado en la estufa a 70°C por un lapso de tiempo de 48 horas; se conoce que un tejido vegetal al ser sometido a temperaturas altas, sufre cambios en sus propiedades bioquímicas.

En la aplicación de los tratamientos sobre las ninfas de garrapatas a concentraciones de 2%, 5%, 8% y 10%, no se obtuvo un porcentaje relevante de mortalidad en ningún tratamiento, posteriormente se realizó pruebas en concentraciones más elevadas de 20%, 30%, 40%, 50%, en las cuales tampoco se logró obtener la mitad de la población de ninfas muertas.

La baja eficiencia de mortalidad en ninfas de garrapatas, podría deberse a la metodología empleada para la extracción de los extractos orgánicos en molienda seca corroborando lo antes mencionado. (Greco, 2011) indica que en el caso del ajo, la enzima allinasa, al ser sometidas a temperaturas mayores de los 40° por periodos de tiempo largo, se inactiva o decrece su actividad; otro factor importante es el método de deshidratación utilizado, la estufa de laboratorio no funciona igual que un secador industrial, ya que los hornos que se usan son especializados, controlan la humedad y el flujo de aire en diferentes periodos de tiempo, lo cual garantiza una mayor preservación de la enzima.

Se logró determinar que, la técnica de extracción que se usó, tuvo niveles bajos en calidad y concentración de los compuestos bioactivos, de tal forma que esto repercutió en la ineficiente mortalidad de las ninfas de garrapatas. (López E. , 2008), indica que los aceites esenciales son lípidos, que se pueden extraer usando diversas metodologías, como ejemplo, la destilación por arrastre de vapor se usa con mayor frecuencia para plantas con compuestos volátiles; Para la extracción de otros compuestos se puede usar solventes volátiles como alcoholes, con estas metodologías y sabiendo el tipo de compuesto que se requiere extraer, se puede conseguir porcentajes más puros de concentración y calidad de las sustancias bioactivas.

### **Ensayo definitivo**

Al no obtener resultados favorables con los extractos en moliendas secas se procedió a preparar extractos con los productos frescos, para ello se evaluaron los siguientes tratamientos.

**Tabla 9.**

*Tratamientos evaluados con extractos en molienda fresca del 10% a 50%*

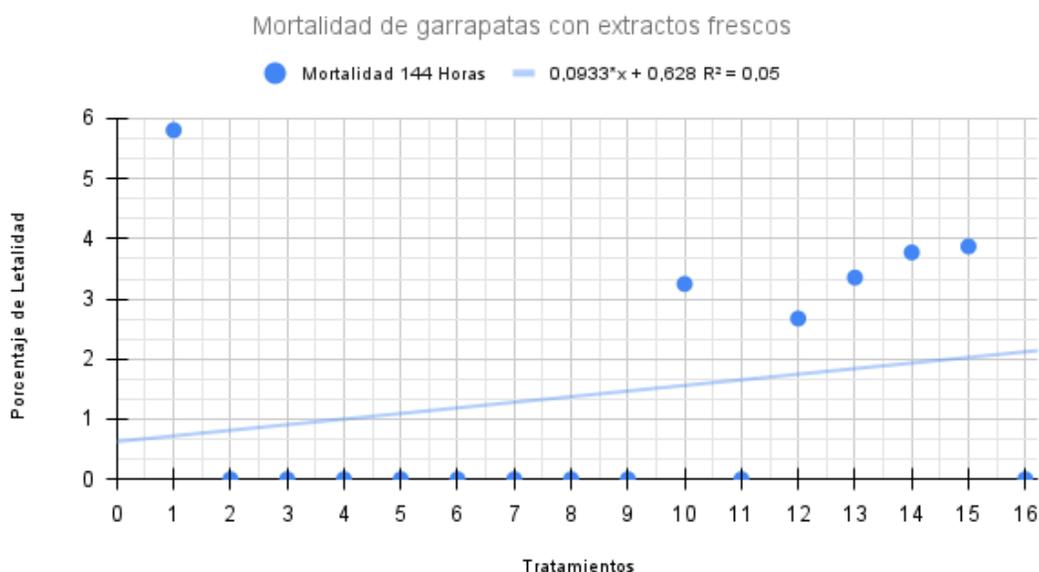
Tratamientos	Descripción
1	Ajo 10%

Tratamientos	Descripción
2	Ajo 20%
3	Ajo 30%
4	Ajo 40%
5	Ajo 50%
6	Cebolla 10%
7	Cebolla 20%
8	Cebolla 30%
9	Cebolla 40%
10	Cebolla 50%
11	Eucalipto 10%
12	Eucalipto 20%
13	Eucalipto 30%
14	Eucalipto 40%
15	Eucalipto 50%
16	Agua

*Nota:* Elaboración propia.

**Figura 27.**

*Porcentaje de Mortalidad con extractos frescos a las 144 horas*



*Nota:* Elaboración propia

En la figura 27 se muestra que el único extracto que logra matar más del 50% de garrapatas es el extracto de ajo fresco a una concentración del 10% mientras que para el resto de concentraciones no se alcanzó mortalidades cercanas al 50% ni en sus concentraciones más elevadas, además, se puede observar que el resto de extractos no cumplen con la función acaricida en las 144 horas de evaluación, es decir, el único tratamiento que ha mostrado un porcentaje de mortalidad entre el 50% y 90% es el extracto de ajo, por lo tanto, fue el único extracto evaluado en diferentes rangos para obtener la DL50.

Para el resto de extractos no se pudo demostrar un rango de mortalidad adecuada para establecer una dosis letal con la metodología implementada en molienda de productos frescos, (Eckert & Wubker, 1991) indica que se debe realizar una metodología adecuada de extracción para cada planta, puesto que cada una de ellas tienen una composición diferente y pueden variar por diferentes factores.

Las moléculas orgánicas fueron seleccionadas por su aplicación para controlar los ácaros en la abeja melífera, en el caso de la cebolla, (Mazeed & El-Solimany, 2020) documentaron un trabajo de

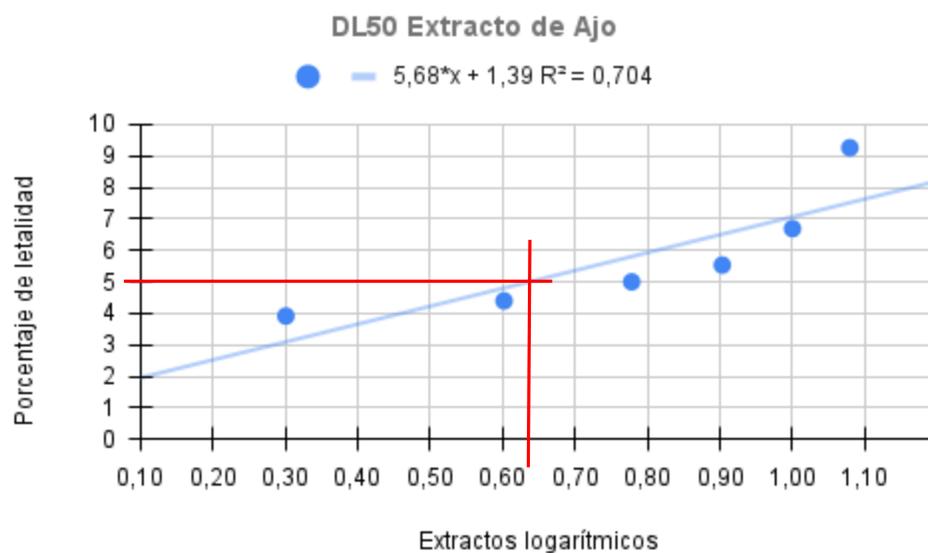
investigación donde la combinación ajo-cebolla alcanzó un porcentaje de mortalidad elevado, mientras, que el aceite esencial de cebolla, actúa en un 89,91% y en fresco 85,33% difiriendo de nuestros resultados, sin embargo, se trata de diferentes especies. Con respecto al Eucalipto, en molienda fresca no actúa como antiparasitario, no obstante, (Ahumada et al., 2018) registra investigaciones haciendo uso del aceite esencial con resultados significativos para el desprendimiento y muerte del ácaro durante 24 días.

### Fase 1, dosis letal media (DL50) individual

#### Dosis Letal media individual de Extracto de ajo.

Figura 28.

DL50 de Extracto de Ajo



Nota: Elaboración propia

$$X = \frac{y-b}{m}$$

$$X = \frac{5-1,39}{5,68}$$

$$X = 0,64$$

$$X = \text{Antilog}(0,6)$$

$$DL\ 50 = 4,3\ \%$$

$$DL50 = 45\text{ml/l}$$

Con base al análisis Probit se observa en la figura 28 que la DL50 del extracto de ajo fresco a las 48 horas de su aplicación se da a una concentración de 4,3% obteniendo el 50% de mortalidad.

En una investigación realizada por (Martinez-Velazquez et al., 2010), la aplicación de aceite esencial de ajo sobre ninfas de garrapatas a una concentración baja (2.5%) ,obtuvo el 90% de mortalidad, de tal forma se puede comprobar la eficacia del ajo, al tener un extracto con alta concentración.

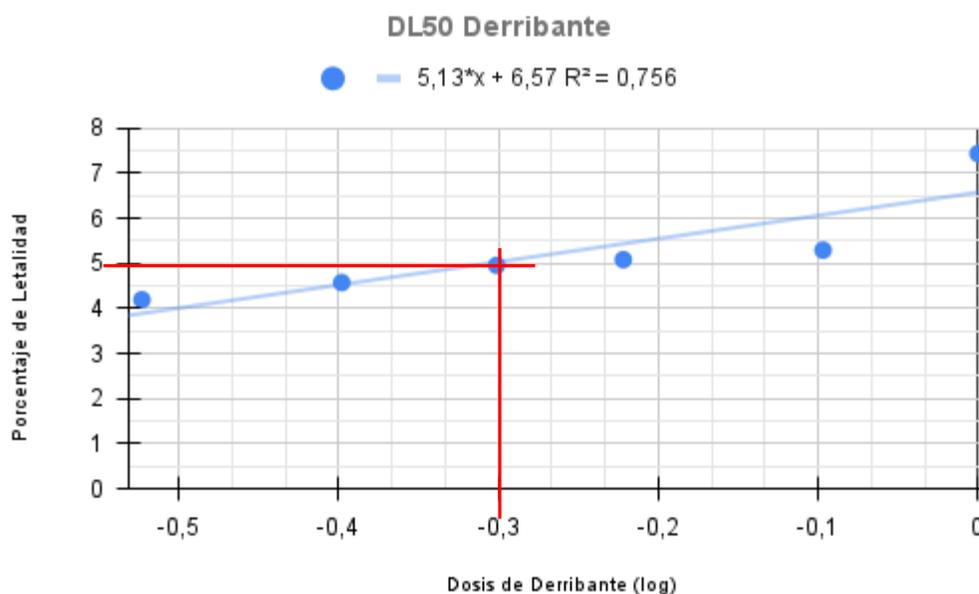
La elevada mortalidad que se obtuvo en el tratamiento de ajo fresco, se debe a sus compuestos organoazufrados, tóxicos para los insectos, (Greco, 2011), explica que el ajo fresco al ser cortado, activa la enzima allinasa, la cual reacciona con otros compuestos liberando tiosulfatos y otros compuestos organosulfurados.

Con estos resultados se ha logrado comprobar la mortalidad de las ninfas de garrapatas con la aplicación de la dosis letal media de extracto de ajo fresco, por lo tanto, se puede utilizar en un manejo integrado de plagas, además, forma parte de las alternativas para contrarrestar la resistencia hacia los acaricidas químicos y sus efectos adversos.

### Dosis letal media individual de Cipermetrina.

Figura 29.

*Dosis letal media individual de Derribante*



*Nota:* Elaboración propia

$$X = \frac{y-b}{m}$$

$$X = \frac{5-5,1}{6,75}$$

$$X = \text{Antilog} - 0,3$$

$$DL50 = 0,5 \text{ ml/l}$$

Se puede observar en la figura 29 que la dosis logarítmica -0,3 a las 24 horas de su evaluación alcanza un porcentaje de letalidad del 50%, es decir, mata la mitad de la población de garrapatas siendo su DL50 0,5 ml/l o 500 ppm de derribante (cipermetrina + ethion). (Brown, 2010) indica que el derribante es un antiparasitario de toxicidad moderadamente peligroso grado II, por lo tanto, según la clasificación por la OMS, aquellos productos que contengan este grado de toxicidad alcanzan una dosis

letal media de 200 a 2000 ppm. En igual forma, existen otros datos como los publicados por (Romero et al., 1997) y (Salari et al., 2008) con dosis letales media registradas de 1,53 ppm hasta 40000 ppm, existiendo diferencias abismales. Sin embargo, se debe considerar los años en los cuales se desarrollaron las investigaciones, y que dichos productos a base de piretroides y organofosforados son de diferentes casas comerciales.

El objetivo de buscar la dosis letal media de la cipermetrina, al igual que el ajo, radica en su utilización para la evaluación del efecto golpe en la segunda fase, todo lo que mate más de la mitad de la población será por efecto del hongo entomopatógeno.

#### **Dosis Letal media *Beauveria spp.***

##### ***Conteo de conidios.***

**Tabla 10.**

*Fase 1, concentración de conidios de Beauveria spp.*

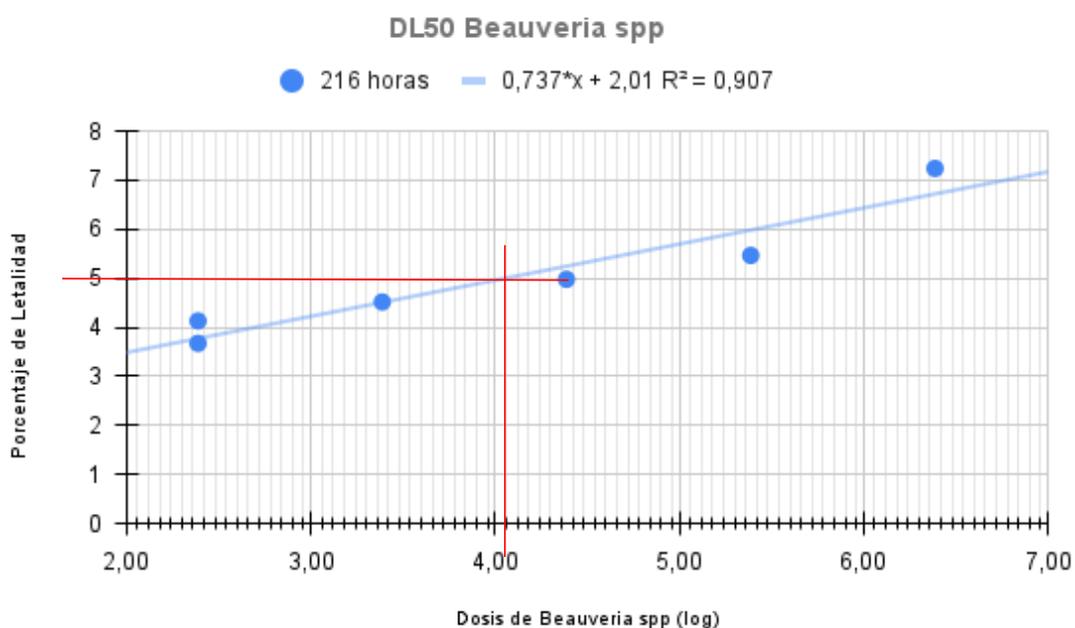
<b>Diluciones</b>	<b>Concentración</b>
Solución Madre	2.44x10 <sup>8</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-1</sup>	2.44x10 <sup>7</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-2</sup>	2.44x10 <sup>6</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-3</sup>	2.44x10 <sup>5</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-4</sup>	2.44x10 <sup>4</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-5</sup>	2.44x10 <sup>3</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-6</sup>	2.44x10 <sup>2</sup> esporas/ml

*Nota:* Concentración de las disoluciones seriadas a partir del contenido de la solución madre.

Elaboración propia.

**Figura 30.**

*DL50 de Beauveria spp.*



*Nota:* Elaboración propia

$$X = \frac{y-b}{m}$$

$$X = \frac{5-2,01}{0,737}$$

$$X = \text{Antilog}(4,06)$$

$$X = 1,14E + 04$$

La dosis letal media (DL50) observada en la figura 30 corresponde a una dosis logarítmica de 4,06

equivalente a  $1,14 \times 10^4$  esporas/ml de una solución madre de  $2,44 \times 10^8$  esporas/ml (Tabla 10). (Tipás,

2020) en su investigación evaluó el efecto acaricida de una cepa de *Beauveria bassiana* obteniendo una

DL50 de  $6,76 \times 10^4$  esporas/ml sobre *Rhipicephalus microplus*, así mismo, en otro trabajo realizado por (Malpartida-Zevallos et al., 2013) con el uso de *Beauveria bassiana* sobre el defoliador de la maracuyá registró una mortalidad del 50% en una dosis letal media de  $9,39 \times 10^6$  esporas/ml, los datos pueden variar según el tipo de cepa y el país de origen, a pesar de ello, la dosis encontrada permanece dentro del rango de otras dosis ya evaluadas.

En esta fase, evaluar la dosis letal media del hongo entomopatógeno fue de suma importancia para comprobar su acción en el efecto golpe, y, comparar si combinado mata la mitad de garrapatas con la misma dosis o en menor concentración.

### Porcentaje de Germinación

**Tabla 11.**

*Porcentaje de germinación de conidios de Beauveria spp en 24 horas*

Hongo Entomopatógeno	Porcentaje de Germinación				
	1 Hora	5 Horas	6 Horas	12 Horas	24 Horas
<i>Beauveria spp.</i>	0	0	0,8	12,6	99,2

*Nota:* La tabla indica el porcentaje de germinación que alcanzó los conidios de *Beauveria spp* durante 24 horas.

**Figura 31.**

Porcentaje de germinación de conidios en 24 hora



*Nota:* Curva de crecimiento de la germinación de conidios de *Beauveria spp* durante 24 horas.

Elaboración propia.

El porcentaje de germinación se determinó para conocer la hora en que empiezan a germinar los conidios de la cepa *Beauveria spp* y la hora que alcanza el total de su germinación con el propósito de primero dejar germinar y luego aplicar en las combinaciones realizadas en la segunda fase, tal y como recomienda (SENASA, 2017) debido a que (Greco, 2011) indica que los compuestos organoazufrados del ajo en fresco inhiben la germinación de conidios y (Alazogaray et al., 1998) menciona que los insecticidas piretroides y organofosforados afectan la germinación de los conidios de *Beauveria spp*, por lo tanto, se debe primero germinar los conidios para ser mezclado con el ajo y lo mismo para la combinación con el derribante.

En la figura 31 se puede notar la curva de crecimiento que genera la germinación de conidios en 24 horas, a partir de las 15 y 19 horas se muestra un pico en la germinación de los conidios, considerando

dejar germinar durante estas horas para la mezcla con derribante y extracto de ajo fresco respectivamente.

La tabla 11 indica que la germinación de la cepa de *Beauveria spp* utilizada en esta investigación empezó a las seis horas con un porcentaje de 0,8%, y alcanza su mayor porcentaje de germinación a las veinticuatro horas con un 99,2%.

**Fase 2 Dosis letal media (DL50) del hongo entomopatógeno en combinación de Cipermetrina más Ethion y extracto de ajo.**

**Dosis letal media de *Beauveria spp* en combinación con extracto de ajo.**

**Tabla 12.**

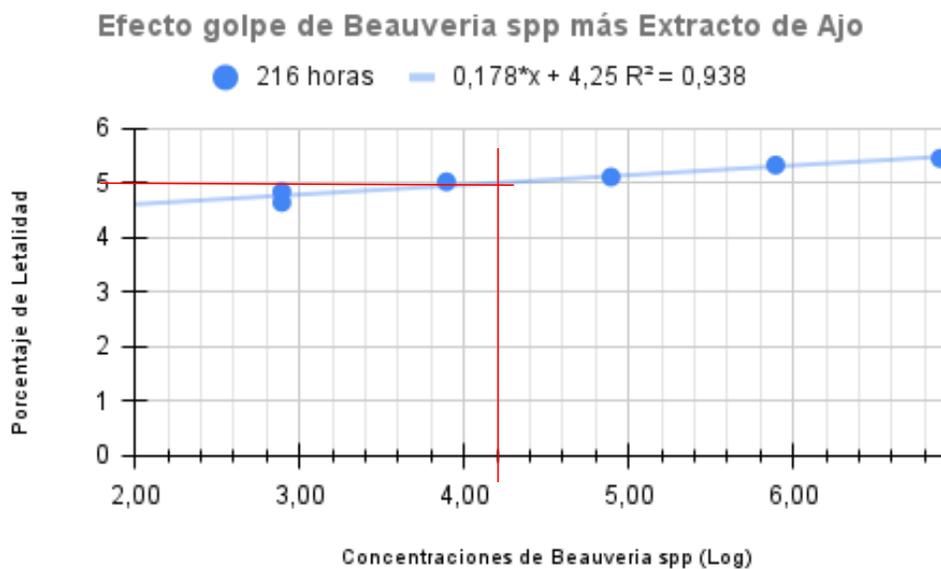
*Fase 2, concentración de conidios de Beauveria spp en mezcla con extracto de ajo*

Diluciones	Concentración
Solución Madre	7.81x10 <sup>8</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-1</sup>	7.81x10 <sup>7</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-2</sup>	7.81x10 <sup>6</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-3</sup>	7.81x10 <sup>5</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-4</sup>	7.81x10 <sup>4</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-5</sup>	7.81x10 <sup>3</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-6</sup>	7.81x10 <sup>2</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-7</sup>	7.81x10 <sup>1</sup> esporas/ml

*Nota:* Concentración de disoluciones seriadas utilizadas en mezcla con extracto de ajo.

Figura 32.

*DL50 de Beauveria spp en combinación con extracto de ajo.*



*Nota:* Elaboración propia

$$X = \frac{y-b}{m}$$

$$X = \frac{5-4,25}{0,178}$$

$$X = \text{Antilog } 4,2$$

$$DL50 = 1,63 \text{ E} + 04$$

El 50% de la muerte poblaciones en la combinación de extracto de ajo fresco más hongo entomopatógeno, tal y como indica la figura 32, es provocada por una dosis logarítmica analizada mediante método probit de 4,2 equivalente a  $1,63 \times 10^4$  esporas/ml de *Beauveria spp* similar a su dosis letal media individual  $10 \times 10^4$  esporas/ml. El p-valor 0,0016 del análisis nos indica que existe una influencia significativa de la dosis con respecto al porcentaje de mortalidad, rechazando la hipótesis nula que indica que la interacción entre los hongos entomopatógenos INIAP EESD con otros acaricidas (extracto

de ajo) no incrementa su eficacia para el control de ninfas de garrapatas en laboratorio, sin embargo, al usar la misma concentración de esporas que en su dosis letal individual, lo más recomendable es trabajar con ambos de manera individual, por lo tanto se concluye que la sinergia de la combinación funciona. Hasta la fecha no existen publicaciones donde se registren datos sobre la DL50 de *Beauveria spp* en combinación con extracto de ajo fresco ni la dosis letal media para el ajo fresco sobre *Rhipicephalus microplus*.

#### Dosis letal media de *Beauveria spp* en combinación con cipermetrina.

**Tabla 13.**

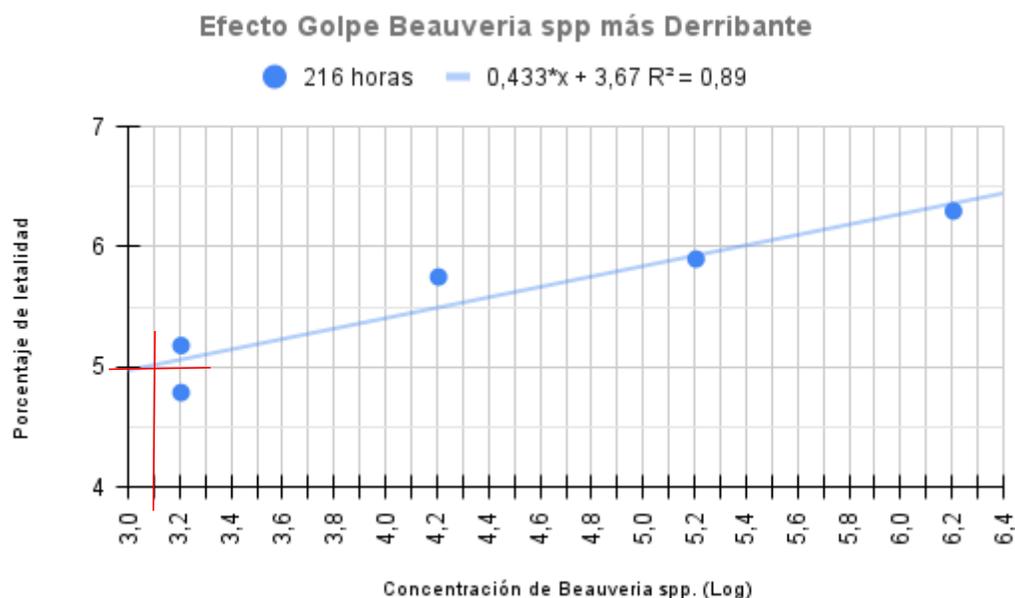
*Fase 2, concentración de conidios de Beauveria spp en mezcla con Derribante*

Diluciones	Concentración
Solución Madre	1.61x10 <sup>9</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-1</sup>	1.61x10 <sup>8</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-2</sup>	1.61x10 <sup>7</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-3</sup>	1.61x10 <sup>6</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-4</sup>	1.61x10 <sup>5</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-5</sup>	1.61x10 <sup>4</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-6</sup>	1.61x10 <sup>3</sup> esporas/ml
1x10 <sup>-7</sup>	1.61x10 <sup>3</sup> esporas/ml

*Nota:* Concentraciones de las diluciones seriadas de *Beauveria spp* utilizadas en combinación con Derribante. Elaboración propia.

Figura 33.

DL50 de *Beauveria spp* en mezcla con Derribante



$$X = \frac{y-b}{m}$$

$$X = \frac{5-3,67}{0,433}$$

$$X = \text{Antilog } 3,1$$

$$DL50 = 1,18 \text{ E} + 03$$

Según lo observado en la figura 33, la dosis logarítmica de *Beauveria spp* en combinación con derribante es de 3,1 dicho de otra manera, la dosis letal media DL50 del hongo entomopatígeno en combinación es  $1,18 \times 10^3$  esporas/ml, que, en comparación con la combinación con ajo fresco, es menor, es decir, se necesita de menor concentración del hongo en combinación con el derribante para alcanzar el 50% de la mortalidad de las garrapatas.

(Cazorla & Morales, 2010) mencionan en un estudio sobre la compatibilidad de *Beauveria bassiana* con productos químicos para el control de plagas de Triatominae que los compuestos

organofosforados e insecticidas piretroides afectan la germinación en más del 90%, destacando que no sucede en todos los aislados del hongo y que la cipermetrina fue el producto químico que mayor inhibición mostró, en este caso es importante tomar en cuenta que el producto seleccionado está compuesto por 10 g de cipermetrina y 40g de ethion, además, el hongo entomopatógeno fue germinado con 16 horas de anticipación antes de ser mezclado con el producto químico.

Las garrapatas muertas recuperadas de la combinación fueron colonizadas por *Beauveria spp* confirmando que el hongo sobrevivió a la mezcla con el compuesto químico, por lo tanto, aquellas garrapatas que sobreviven ante el químico, a los nueve días mueren por efecto del hongo, de esta manera se evita que las garrapatas sobrevivientes creen resistencia ante el químico, en cuanto al análisis, se obtuvo un p-valor de 0,015 confirmando la hipótesis alternativa para el incremento eficaz de la interacción entre hongo entomopatógeno con producto químico para el control de ninfas de garrapatas.

## Capítulo V

### Conclusiones

De los datos obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- Dentro de las pruebas de antagonismo de los extractos orgánicos en moliendas secas, se pudo determinar que el medio de cebolla y ajo presentaron el mayor rango de crecimiento promedio respecto al testigo y los demás extractos; en el derribante, el crecimiento fue más lento pero no se inhibió el desarrollo del hongo; para los extractos de tomillo y propóleo se determinó que sus moléculas son tóxicas para el hongo, causando la muerte de este; de tal forma se concluyó que no existe antagonismo en los

extractos de ajo, cebolla, eucalipto, derribante a una concentración del 10% en moliendas secas.

- Dentro de la efectividad de los extractos orgánicos en moliendas secas para el control de ninfas de garrapatas, se evaluaron concentraciones pequeñas de 2%, 5%, 8% 10% y altas de 20%, 30%, 40%, 50 %, en las cuales se determinó su nula eficacia, atribuyendo esto a la metodología usada.
- Se estableció que la efectividad del ajo fresco para el control de ninfas de garrapatas se debe a sus compuestos organosazufrados: estos mismos compuestos tienen la capacidad de inhibir la germinación de conidios, sin causar la muerte del hongo *Beauveria spp.*
- Se determinó que la dosis letal media para *Beauveria spp* es de  $1,14 \times 10^4$  esporas/ml y para el extracto de ajo fresco 45 ml/l.
- La mejor combinación hongo-cipermetrina más ethion resultó ser 0,5 ml/l de derribante más  $1,18 \times 10^3$  esporas/ml de *Beauveria spp.*
- En base a la DL50 se seleccionó únicamente un extracto orgánico para el control de ninfas de garrapatas.
- La combinación 45ml/l de ajo fresco más  $1,63 \times 10^4$  esporas/ml de *Beauveria spp* resultó la mejor, pero no la más recomendada, para el control de ninfas de garrapatas.
- Se aceptó la hipótesis alternativa, La interacción entre los hongos entomopatógenos INIAP EESD con otros acaricidas (cipermetrina, extractos orgánicos) incrementa su eficacia para el control de ninfas de garrapatas en laboratorio.
- Las cepas INIAP de *Beauveria spp* empiezan a germinar a partir de la sexta hora y alcanza un 99.2 % a las 24 horas.

## Recomendaciones

- Se recomienda germinar los conidios de hongo por 19 horas aproximadamente antes de su aplicación, para posteriormente usarlo junto al ajo y la cipermetrina, con el fin de no inhibir la germinación de los conidios.
- Se sugiere el uso del DL90 del ajo fresco de forma individual, como una estrategia para formar parte de un manejo integrado en el control de garrapatas.
- Para la extracción de las moléculas bioactivas, se debe emplear diferentes metodologías que se adapten a la molécula orgánica a evaluar, de esta forma se pueden obtener porcentajes altos de concentración del compuesto bioactivo.
- Debido a que existe un crecimiento mayor en las pruebas de antagonismo con respecto al PDA en combinación con cebolla, es recomendable usar este medio para incrementar la producción de conidios y acelerar su esporulación.
- A pesar de que la mejor combinación para el control de ninfas de garrapata es Derribante más *Beauveria spp*, se recomienda un MIP de extracto de ajo y hongo por separado debido a que no todos los insecticidas a base de organofosforados están aprobados para el empleo sobre vacas lecheras.

## Bibliografía

AGROCALIDAD. (2016). *Agrocalidad*.

[http://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/images/pdfs/registro\\_de\\_insumos/LISTADOPLA](http://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/images/pdfs/registro_de_insumos/LISTADOPLA)

Ahumada, M., Marcos, J., & Bañares, G. (2018). Determinación del Efecto de Tres Concentraciones de Aceite Esencial de Eucalipto, para el Control Ecológico de la Varroasis en Colmenas en Producción, en Los Molles, Región de Valparaíso, Chile. *Investigación en Ciencia Animal*, 2, 642-643.

<https://repositorio.uvm.cl/xmlui/bitstream/handle/20.500.12536/1551/Ahumada2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Aizawa, K. (1971). Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. *Microbial control of insects and mites*, 655-672.

Alazogaray, R., Luz, C., Ionizete, G., Silva, I., Lecuona, R., & Tigano, M. (1998). Effect of Deltamethrin on Germination and Virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill on *Triatoma infestans* (Klug). *Un. Soc. Entomol. Brasil* 27(4), 663-667.

Alves, B. (1998). Hongos Entomopatógenos. *Control Microbiano de insectos*, 289-381. .

Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). Antimicrobial Properties of Allicin from Garlic and Infection. *Microbes*, 125-129.

Antía, P., Posada, F., Bustillo, A., & González, M. (1992). Producción en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. *Avances Técnicos Cenicafé*, 1-12.

Ávila, R., Mancilla, G., González, P., Sandoval, C., & Torres, F. (2019). Bioensayos in vitro de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. *Bioagrobiencias*, 34-41.

Barranco, F., & Alatorre, R. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi. 910-915. <http://dx.doi.org/10.1016/S0141->

Barrios, C., Contreras, J., & Pérez, W. (2019). Efectos de tintura de propóleos para el control de *Varroa destructor* en *Apis mellifera*. *Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas*.

<https://www.icta.gob.gt/publicaciones/Informes%20Finales%20IICA-CRIA%202020/10%20MIEL/Propoleos%20varrosas-CUSAM-J%20Contreras/CRIA.pdf>

- Bastos, E. M., & Orantes Bermeo, J. (2021). *Manual de producción de propóleo*. Asociación Provincial de Apicultores de Granada. [https://apinevada.com/media/files/news/PROPOLEOS\\_08web.pdf](https://apinevada.com/media/files/news/PROPOLEOS_08web.pdf)
- Bautista, A., Pimentel, R., & Gómez, A. (2017). *Control biológico de Rhicephalus (Boophilus) microplus con hongos entomopatógenos*. Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias.: <https://www.ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/download/68/322/>
- Benavides, E., Romero, J., & Luis, V. (2016). *Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático*. <http://repiica.iica.int/>: <http://repiica.iica.int/docs/B4212e/B4212e.pdf>
- Berlanga, P., & Hernández, V. (2006). Parámetros de Calidad de hongos entomopatógenos. En *Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Colima México* (pág. 43 p).
- Bravo & Carranza. (2022). *Uso de hongos entomopatógenos como alternativa en el control biológico de garrapatas en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas*. Portoviejo: Universidad Técnica de Manabí.
- Bravo, B., & Carranza, K. (2022). *Uso De Hongos Entomopatógenos Como Alternativa En El Control Biológico De Garrapatas En La Provincia De Santo Domingo De Los Tsáchilas. [Tesis doctoral, Universidad Técnica de Manabí]*. Repositorio de la Universidad Técnica de Manabí: <http://repositorio.utm.edu.ec:3000/server/api/core/bitstreams/56a8700c-dc1f-44c0-88e5-d2fa529b650a/content>
- Brito, D., Morais, M., Cunha, F., Albuquerque, R., Carneiro, J., & Lima, M. (2015). Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Rev. Bras*, 836-844.
- Brown, J. (2010). *James Brown Pharma*. <https://jamesbrownpharma.com/producto/derribante/>

- Butt, T. M., Jackson, C. W., & Magan, N. (2001). Fungi as biological control agent: progress, problems and potencial. *CABI*, 78.
- Cahuari, L. (2017). *Evaluación de la Beauveria bassiana en el control de Boophilus in vitro en el departamento de Madre de Dios*. Perú: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna.
- Camacho, C., & Peralta, H. (2019). *INCLUSIÓN DE ORÉGANO (ORIGANUM VULGARE) Y ROMERO (ROSMARINUS OFFICINALIS) SOBRE LA INFESTACIÓN DE GARRAPATAS (RHIPICEPHALUS BOOPHILUS) EN BOVINOS DEL MUNICIPIO DE LOS SANTOS, SANTANDER*. Repositorio UNAD: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/25394/%20%09hrperaltat.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cazorla, D., & Morales, P. (2010). Compatibilidad de 13 aislamientos de Beauveria bassiana patógenos para Rhodnius prolixus (Triatominae) con insecticidas químicos. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50(2), 261-270. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1690-46482010000200010&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482010000200010&lng=es&tlng=es).
- Coronado, A., & Mujica, F. (1997). Resistencia a acaricidas en Boophilus microplus en Venezuela. *Gaceta de Ciencias Veterinarias* (25), 5-14.
- Correa-Díaz, F. (2006). *Manual de Laboratorio de bioensayos*. Universidad Autónoma de Baja California. [https://www.researchgate.net/publication/328492843\\_MANUAL\\_DE\\_LABORATORIO\\_DE\\_BIOENSAYOS](https://www.researchgate.net/publication/328492843_MANUAL_DE_LABORATORIO_DE_BIOENSAYOS)
- Cortinas, R., & Jones, C. (2006). Ectoparasites of cattle and small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 22, 673-693.

Cueto, J., & Estevez, J. (2020). *Biblioteca Digital Zamorano*.

<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/e66b4ab3-ee3c-40d8-b519-d56259292968/content>

Dias, R., Pereira, T., Dornelas, L., Silva, G., Melo, E., & Leite, A. (2015). Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity : an in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2-7.

Eckert, S., & Wubker, S. (1991). Control natural de plagas del Paraguay y Asunción. *CECTEC*, 79.

EDIFARM. (2017). Vademecum Veterinario XV. Ecuador. <https://www.edifarm.com.ec/vademecum-veterinario-2017/>.

Fajardo, P., Alcivar, F., Navarrete, J., & Noles, P. (2017, Noviembre 14). *Determinacion de la dosis de los hongos entomopatógenos (beauveria bassiana y lecanicillium lecanii) para el control de garrapata, en ganado vacuno in vitro e in vivo*. Engormix.:

<https://www.google.com/url?q=https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/determinacion-dosis-hongos-entomopatogenos-t41154.htm&sa=D&source=docs&ust=1658041452699393&usg=AOvVaw0wl-o0bfUgootrcZPZrbvf>

Fernández, J. (2006). *Zamorano*. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/803/1/T2239.pdf>

Furman, D., & Loomis, E. (1984). *The Ticks of California*. California: Bulletin of the California Insect Survey.

Gómez, H., Soberanis, W., Tenorio, M., & Torres Del Águila, E. (2013). *Manual de Producción y Uso de Hongos Entomopatógenos*.

<https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>

González, J. (2012). *Principios de la Toxicología*. Colombia: Laboratorios Erma S.A.

Greco, F. (2011). Estudio de procesos de deshidratación industrial de Ajo con la finalidad de preservar Alicina como principio bioactivo. *Universidad Nacional de Cuyo*.

[https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/4202/tesis-florenciagreco.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/4202/tesis-florenciagreco.pdf)

Guillén, N., & Muñoz, L. (2013). *Estudio taxonómico a nivel de género de garrapatas en Ganado Bovino de la Parroquia Alluriquín-Santo Domingo de los Tsáchilas*. Santo Domingo de los Tsáchilas: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/7264/T-ESPE-002686.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Herrera, J., Noreña, E., & Vallejo, S. (2007). *Obtención de cebolla de bulbo Allium cepa L. con bajo nivel de aceite volátil propanotial*. Redalyc: <https://www.redalyc.org/pdf/4137/413740746009.pdf>

INIAP. (2020). *Datos actualizados de la Estación Experimental La Concordia*. Santo Domingo .

Lancaster, J. E., & Collin, H. (1981). Presence of alliinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters*, 22(2), 169-176. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304421181901395>

Lawson, L., Wang, Z., & Hughes, B. (1991). Identification and HPLC quantitation of sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Med*, 363-370.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1775579/>

- Loeza, C., Salgado, M., Avila, R., Escalera, V., & Carmona, C. (2020). Eficacia del timol sobre *Varroa* sp y *Nosema* sp en colmenas utilizadas para fecundación en México. *Revista Veterinaria* 31:2, 202-205. <http://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/4747>
- Londoño, A., Penieres, J., García, C., Liborio, M., & Quintero, M. (2008). Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto mexicano de propóleo y de tres plantas que la *Apis mellifera* usa para su producción. *Tecnología en marcha*, 49-55.
- López, E. (2008). Producción de Bebida Alcohólica de Alta Calidad. *UDLAP*.  
[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lpro/lopez\\_a\\_e/](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/lopez_a_e/)
- López, T. (2006). Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. *ELSEVIER*, 25, 74-77.  
[https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-tomillo-13083626#:~:text=El%20aceite%20esencial%20\(1%2C0,%2C%20limoneno%2C%20borneol%20y%20linalol.](https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-tomillo-13083626#:~:text=El%20aceite%20esencial%20(1%2C0,%2C%20limoneno%2C%20borneol%20y%20linalol.)
- MAG. (Mayo de 2020). *Regulación y Control Fito y Zoonosanitario. Resolución 0143*. Agrocalidad:  
<https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/cc2.pdf>
- MAGYP. (2019). *Producción de cebolla en la Argentina*. Argentina.gob.ar:  
<https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/cultivo-cebolla-argentina-ministerio-agricultura.pdf>
- Malpartida-Zevallos, J., Narrea-Cango, M., & Dale-Larraburre, W. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* a (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12(2), 75-81.
- Martinez-Velazquez, M., Castillo-Herrera, G., Rosario-Cruz, R., Iores-Fernandez, J., Lopez-Ramirez, J., Hernandez-Gutierrez, R., & Lugo-Cervantes, E. d. (2010). Acaricidal effect of Essential Oils From

- Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 822-827.
- Mazeed, A. R., & El-Solimany, E. A. (2020). Garlic, *Allium sativum* L. and Onion, *Allium cepa* L. as a Potent Anti-mite *Varroa destructor*, Parasited on Honey Bee, *Apis mellifera* L. in Egypt. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 11, 25-28. [https://journals.ekb.eg/article\\_82425.html](https://journals.ekb.eg/article_82425.html)
- Moreno, J., López, G., & Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria*, 147-154.
- Morocho, D. (16 de Julio de 2019). *Evaluación in vivo de Metarhizium anisopliae (Metchnikoff) y Beauveria bassiana (Balls) sobre garrapatas (Acari: Ixodidae) que parasitan el ganado vacuno, en El Chaco, Ecuador*. Repositorio ESPE.: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/21029>
- Motta, P., & Murcia, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente y Agua*, 77-90. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas
- Nolazco, D., Villanueva, E., Hatta, B., & Tellez, L. (2020). Extracción y caracterización química del aceite esencial de Eucalipto obtenido por microondas y ultrasonido. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 274-284. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.661>
- OMS. (2019). *Clases de toxicidad*. <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789240005662>
- Pérez & Rodríguez, R. (2019). *Distribución de la resistencia a los acaricidas amitraz, ivermectina y alfacipermetrina en garrapatas Boophilus microplus y posibles factores de riesgo asociados, en*

*la zona  $\pm 0.5$  grados de latitud de la línea equinoccial de Ecuador. .*

<http://200.12.169.19/bitstream/25000/19532/1/T-UCE-0014-MVE-071.pdf>

Piguave, R. D. (26 de Diciembre de 2016). *Evaluación del efecto acaricida del hongo entomopatógeno (*Lecanicillium lecanii*) en el control de las garrapatas en el ganado vacuno*. Repositorio Universidad de Guayaquil.: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/20793>

Polanco, D., & Ríos, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Scielo*, 85-87.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v17n1/v17n1a08.pdf>

Pucheta, M., Flores, A., Rodríguez, S., & Torre, M. (2006). Mecanismo de Acción de los hongos Entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&tlng=es).

Pulido, A., Castañeda, R., Ibarra, H., Gómez, L., & Barbosa, A. (2016). Microscopía y Principales Características Morfológicas de Algunos Ectoparásitos de Interés Veterinario. *RIVEP*, 98.  
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/11449>

Punina, A. (2022). Prevalencia de Parásitos externos en Abejas (*Apis mellifera*).  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21703/1/UPS-CT009528.pdf>

Rahimmalek, M., & Hossein-Golib, S. (2013). Evaluation of six drying treatments with respect to essential oil yield, composition and color characteristics of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*. *Industrial Crops and Products*, 613-619.

Reyna-Fuentes, J., Martínez-González, J., Silva-Contreras, A., López-Aguirre, D., & Castillo-Rodríguez, S. (2021). *Fitoterapia una alternativa de control de plagas y enfermedades de abejas*. Portal AmeliCA: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/198/1982763012/html/>

- Rodríguez-Molano, C., Ulloa, S., & Niño, L. (2020). Background on the control of the cattle tick *R. (B.) microplus* and the use of coumarin substances as an alternative. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 215-232.
- Rodríguez-Vivas, R., Pérez-Cogollo, L., Rosado-Aguilar, J., Ojeda-Chi, M., Trinida-Martinez, I., Miller, R., Li, A., Pérez, A., Guerrero, F., & Klafke, G. (2014). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology*, 113–22.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054487>.
- Romero, A., Benavides, E., Herrera, C., & Parra, H. (1997). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas organofosforados y piretroides sintéticos en el departamento del Huilo. *Revista Colombiana de Entomología*, 9-17.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001200006&lng=es&tlng=es).
- Rosado, J., Aguilar, A., Rodríguez, R., Borges, R., García, Z., & Méndez, M. (2010). Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (acari: ixodidae) by larval immersion test. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 417-422. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/358/386>
- Rose, P., Whiteman, M., Moore, P. K., & Yi, Z. (2005). Bioactive Salk( en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Natural Product Reports*, 22, 351-368.  
[https://www.researchgate.net/publication/250463530\\_Bioactive\\_SAlkenyl\\_Cysteine\\_Sulfoxide\\_Metabolites\\_in\\_the\\_Genus\\_Allium\\_The\\_Chemistry\\_of\\_Potential\\_Therapeutic\\_Agents](https://www.researchgate.net/publication/250463530_Bioactive_SAlkenyl_Cysteine_Sulfoxide_Metabolites_in_the_Genus_Allium_The_Chemistry_of_Potential_Therapeutic_Agents)

- Ruiz, A., & Blanco, R. (2009). *Grado de resistencia Rhipicephalus (Boophilus) microplus a productos ixodicidas y su residualidad en leche en 20 predios de sistema doble propósito de piedemonte llanero*. Bogotá: Universidad de La Salle. [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria/295](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/295)
- Salari, S., Vatandoost, H., Telmadarraiy, Z., Entezar, R., & Kia, E. (2008). Seasonal Activity of Ticks and their Importance in Tick-Borne Infectious Diseases in West Azerbaijan, Iran. *Iranian J Arthropod-Borne Dis*, 28-34.
- SENASA. (2006). Garrapatas. *Producción animal*. [https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/Bovinos\\_garrapatas\\_tristeza/85-garrapata.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/85-garrapata.pdf)
- SENASA. (2013). <https://www.agrovetmarket.com/productos-veterinarios/ultrametrin-600-cypermethrin-ethion-butoxide-antiparasitic>
- SENASA. (2017). *Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin Ceba CCB-LE265*. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Ficha-T%C3%A9cnica-Beauveria-bassiana.pdf>
- Sepúlveda, A. L., Pulido, M. O., & García, D. J. (2017). *Eficiencia in vitro de hongos entomopatógenos y productos químicos sobre Rhipicephalus microplus*. *Revista Veterinaria y Zootecnia*: <http://vetzootec.ucaldas.edu.co/index.php/english-version/91-coleccion-articu>
- Sinavimo. (02 de 10 de 2020). *Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas*. <https://www.sinavimo.gob.ar/cultivo/allium-sativum>
- Tipás, J. (01 de 10 de 2020). *Respositorio ESPE*. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/23153/1/T-ESPE-044092.pdf>

- Van, J., & Umaña, E. (2017). Eficacia de aceite esencial de *Allium sativum* en colmenas de *Apis mellifera* para control de ácaro *Varroa destructor*, en Costa Rica. *Universidad Nacional de Costa Rica*.  
[https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/18256/TFG\\_Ellery%20Rivera%20Hernandez.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.una.ac.cr/bitstream/handle/11056/18256/TFG_Ellery%20Rivera%20Hernandez.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, R. G., Acedo-Félix, E., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Sánchez-Escalante, J., & Peñalba-Garmendia, M. C. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biotecnia*, 16(1), 32-37.  
<https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/view/31/27>
- Vega, R., García, G., Freman, M., Bentacourt, J., Rodeiro, I., & Arteaga, M. (2000). Estudio de validación del método de Clase Tóxica Aguda en Cuba. *Revista de Toxicología*, 127-132.
- Velásquez, M., Álvarez, R., Tamayo, P., & Carvalho, P. (2014). Evaluación in vitro de la actividad fungistática del aceite esencial de mandarina sobre el crecimiento de *Penicillium* sp. *Corpoica Cienc. Tecno*, 7-13. <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a02.pdf>
- Venskutonis, R. (1997). Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). *Food Chem*, 219-227.