

Artículo científico

Actividad acaricida *in vitro* del aceite de *Jatropha curcas* L. en teleoginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

In vitro acaricidal activity of the oil from *Jatropha curcas* L. in engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Maykelin Fuentes-Zaldívar¹, Mildrey Soca-Pérez², Javier Arece-García² y Yuniel Hernández-Rodríguez³

¹Estudiante de Doctorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte. Minas Gerais, Brasil

²Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey. Universidad de Matanzas. Ministerio de Educación Superior. Matanzas, Cuba

³Laboratorio Nacional de Parasitología Veterinaria. San Antonio de los Baños, Artemisa, Cuba

Correo electrónico: maykelin.fuentes@gmail.com

Resumen

Con objetivo de evaluar la eficacia *in vitro* del aceite del fruto de *Jatropha curcas* L. en teleoginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (cepa certificada Cayo Coco), se realizó un test de inmersión de garrapatas adultas con base en un diseño totalmente aleatorizado y nueve tratamientos: control negativo de Tween-80 al 5, 10, 15 y 25 %; control positivo con Butox® (Deltametrina); y diferentes concentraciones de aceite de *J. curcas*: 5, 10, 15 y 25 %. Se determinó la reducción de la eclosión, la reproducción estimada y la eficacia garrapaticida. Mediante un análisis de varianza se determinó la eficacia de los tratamientos, y a través de un análisis Probit, la concentración efectiva media (CE₅₀) y la concentración efectiva máxima (CE₉₀). El aceite inhibió significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de eclosión de huevos, con valores de 9,74; 11,40; 11,95 y 13,75 % para las concentraciones de 5, 10, 15 y 25 %, respectivamente. No se apreciaron efectos significativos en el peso del huevo, pero sí en la reproducción estimada ($p < 0,05$) para los tratamientos experimentales con respecto al control negativo. El aceite del fruto de *J. curcas* presentó una marcada eficacia como acaricida en el control de *R. (B.) microplus*, con valores superiores al 91 %; los mejores resultados se hallaron con la menor concentración (5 %). La curva dosis-respuesta mostró una CE₅₀ de 88,90 mg/mL, mientras que la CE₉₀ fue de 37,22 mg/mL. Se concluye que el aceite de *J. curcas* posee actividad acaricida *in vitro*.

Palabras clave: eclosión, garrapatas, huevos.

Abstract

In order to evaluate the *in vitro* efficacy of the oil from the *Jatropha curcas* L. fruit in engorged females of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (certified Cayo Coco strain), an immersion test of adult ticks was conducted, based on a completely randomized design and nine treatments: negative control of Tween-80 at 5, 10, 15 and 25 %; positive control with Butox® (Deltametrina) and different concentrations of *J. curcas* oil: 5, 10, 15 and 25 %. The hatching reduction, estimated reproduction and acaricidal efficacy were determined. Through a variance analysis the efficacy of the treatments was determined and by a Probit analysis, the mean effective concentration (EC₅₀) and maximum effective concentration (EC₉₀). The oil significantly inhibited ($p < 0,05$) the egg hatching percentage, with values of 9,74; 11,40; 11,95 and 13,75 % for the concentrations of 5, 10, 15 and 25 %, respectively. No significant effects were observed in the egg weight, but they were appreciated in the estimated reproduction ($p < 0,05$) for the experimental treatments with regards to the negative control. The oil of the *J. curcas* fruit showed marked efficacy as acaricide in the control of *R. (B.) microplus*, with values higher than 91 %; the best results were found with the lowest concentration (5 %). The dose-response curve showed an EC₅₀ of 88,90 mg/mL, while the EC₉₀ was 37,22 mg/mL. It is concluded that the *J. curcas* oil has *in vitro* acaricidal activity.

Keywords: hatching, ticks, eggs

Introducción

Las garrapatas se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta y se han especializado en alimentarse de sangre de mamíferos, aves y reptiles. Aunque se presentan diferentes especies en

distintas regiones ecológicas, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es una de las de mayor importancia para la ganadería en las regiones tropicales y subtropicales del planeta (Cortés, 2010; Fernandes *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2016).

Por otra parte, los escenarios actuales se caracterizan por una crisis económica sostenida del sector agropecuario y mercados cada vez más regionalizados, competitivos y exigentes. En este contexto económico-productivo, si no ocurre un cambio drástico en el enfoque del control, cabe esperar un aumento progresivo de casos de resistencia múltiple en distintas especies-géneros de parásitos que afectan la producción animal (Domínguez *et al.*, 2010; Amaral *et al.*, 2011; Fernández-Salas *et al.*, 2012; Grisi *et al.*, 2014).

Durante los últimos años, existe en el mundo un gran interés por investigar la presencia de principios farmacológicos en aquellas plantas que, por tradición popular, son reconocidas en estudios de etnobotánica como antiparasitarias y también utilizadas por los campesinos. Los extractos de estas plantas presentan una mayor seguridad, bajo costo y eficacia; además no causan daño a los ecosistemas ni a la salud humana (Silva *et al.*, 2011; Isea *et al.*, 2013; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014).

Se reconocen, en varios países tropicales, muchas especies que presentan acciones insecticidas; dentro de estas se encuentra *Jatropha curcas* L., considerada como el cultivo agroenergético del futuro. Estudios con diferentes partes de la planta señalan los siguientes efectos: anticonceptivo, antimicótico, acaricida, antiinflamatorio, cicatrizante y coagulante (Carrasco-Rueda *et al.*, 2013). Además, sus semillas son tóxicas, por lo que su aceite no es comestible y no compite con la alimentación humana.

Considerando lo antes expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia *in vitro* del aceite del fruto de *J. curcas* L. en teleoginas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*.

Materiales y Métodos

Localización. La investigación se realizó en el laboratorio de parasitología de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey (Perico, Matanzas, Cuba), y en el laboratorio de parasitología animal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria –CENSA– (San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba).

Obtención del material biológico. Se utilizó la cepa Cayo Coco de *R. (B.) microplus*, obtenida por el Laboratorio Nacional de Parasitología Veterinaria (San Antonio de los Baños, Artemisa, Cuba).

Para la obtención del material biológico se utilizó la metodología descrita en la Resolución 48 de 1997, del Ministerio de Agricultura, Pecuaria

y Abastecimiento de Brasil, que describe la infestación artificial de animales donadores en condiciones de aislamiento. Una vez recolectadas, las garrapatas fueron lavadas con agua destilada clorada al 1 %, durante un minuto, y secadas con toallas de papel. Se procedió a la selección de las teleoginas (hembras repletas o ingurgitadas) que cumplirían con las características recomendadas por Farias *et al.* (2007): apariencia y motilidad normal, cuerpo íntegro y máximo ingurgitamiento.

El aceite se obtuvo de los frutos maduros, secados al sol y descascarados; posteriormente las semillas se prensaron, según la metodología descrita por Sotolongo *et al.* (2007).

Tratamientos y diseño experimental. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con doce réplicas para cada tratamiento y 10 garrapatas por cada una, para un total de 120 garrapatas por tratamiento.

Los tratamientos fueron los siguientes:

T1: Butox® –Deltametrina– (control positivo)

T2: Tween-80 5 % (control negativo)

T3: Tween-80 10 % (control negativo)

T4: Tween-80 15 % (control negativo)

T5: Tween-80 25 % (control negativo)

T6: aceite de *jatropha* 5 % + Tween-80

T7: aceite de *jatropha* 10 % + Tween-80

T8: aceite de *jatropha* 15 % + Tween-80

T9: aceite de *jatropha* 25 % + Tween-80

Procedimiento experimental. Se utilizó el test de inmersión de teleoginas ingurgitadas de *R. (B.) microplus*, según las técnicas de eficacia descritas por Drummond *et al.* (1973), modificadas por Chagas *et al.* (2012).

Después de colectadas, las garrapatas fueron pesadas individualmente y agrupadas según su peso (entre 0,20 y 0,29 g). Estas se ubicaron en tubos de ensayo, numerados e identificados por tratamiento, número de réplica y fecha de inicio del experimento. A cada tubo de ensayo se le añadió 5 mL de la solución a evaluar. Transcurridos cinco minutos se escurrió el líquido a través de un colador y las garrapatas fueron colocadas sobre servilletas de papel para retirar el líquido residual, y a continuación, fijadas sobre papel adherente en placas Petri previamente identificadas.

Estas placas Petri se colocaron en incubadora a 27 °C y con humedad relativa de 80 %. Concluida la fase de postura, los huevos fueron colectados de manera independiente y depositados en tubos de ensayo identificados con la misma clave. Los tubos

fueron tapados con algodón y colocados en la incubadora durante 18 días hasta finalizar el proceso de eclosión.

Mediciones experimentales. Durante el experimento se registró el peso inicial de las teleoginas, el día de inicio y de finalización de la postura, el número de garrapatas muertas y el peso de la postura. Con estas mediciones se determinaron los indicadores: duración del período de postura, mortalidad de las teleoginas, porcentaje de eclosión, período de eclosión y porcentaje de control o eficacia. Las variables estudiadas fueron transformadas en: reducción de la eclosión, reproducción estimada y eficacia del garrapaticida.

Reducción de la eclosión (%) (ER)

$$ER = \frac{[(\text{eclosión media del grupo control} - \text{eclosión media del grupo tratado}) / \text{eclosión media del grupo control}] * 100}{}$$

Reproducción estimada (RE)

$$RE = \frac{[(\text{peso de la masa de huevos} * \text{eclosión} (\%)) / \text{peso de la teleogina}] * 20\,000}{}$$

Eficacia del garrapaticida (EC) (%)

$$EC = \frac{[(ER \text{ del grupo control} - ER \text{ del grupo tratado}) / ER \text{ del grupo control}] * 100}{}$$

Análisis estadístico. Los datos fueron registrados en hojas de cálculo de Microsoft® Excel® para realizar sus respectivos análisis. Se efectuó un análisis de varianza con el fin de determinar las diferencias entre las medias. Los datos porcentuales (eficacia) fueron transformados para lograr una distribución aproximada a la normal; los resultados se presentan con las medias aritméticas y se empleó un nivel de significación de un 5 %.

Se utilizó la dócima de comparación de rangos múltiples de Duncan para el establecimiento de las diferencias entre medias, mediante el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics versión 22. El cálculo de las concentraciones efectivas (CE_{50} y CE_{90}) se realizó mediante un análisis Probit con el paquete estadístico SAS® 9.3.

Resultados y Discusión

El aceite del fruto de *J. curcas* L. inhibió de manera significativa ($p < 0,05$) el porcentaje de eclosión de huevos de las teleoginas tratadas de *R. (B.) microplus*, con valores de 9,74; 11,40; 11,95 y 13,75 % para las concentraciones de aceite de 5, 10, 15 y 25 %, respectivamente (tabla 1). Por su parte, el control negativo (solvente Tween-80) no interfirió de manera significativa en la eclosión de los huevos, ya que se registraron porcentajes de eclosión superiores al 88 % para las mismas concentraciones, lo cual demostró que el solvente utilizado puede ser empleado para este tipo de ensayos.

En este sentido, Chagas (2008) demostró que los solventes de bajo peso molecular y poca viscosidad no interfieren en la eficacia de los productos para los test biológicos con *R. (B.) microplus*, y que pueden ser utilizados en concentraciones inferiores al 76 %.

Por otra parte, se pudo apreciar que el aceite no tuvo efecto significativo ($p < 0,05$) en el peso del huevo. Sin embargo, se constató que la reproducción estimada (cantidad de huevos ovipositados de las teleoginas tratadas) se afectó de manera significativa ($p < 0,05$) en los tratamientos que incluían

Tabla 1. Efecto del aceite del fruto de *J. curcas* L. en el peso del huevo, el porcentaje de eclosión y la reproducción estimada de teleoginas de *R. (B.) microplus*

Tratamiento	%	Peso huevo (g)	% de eclosión	RE (h/g)
Butox®		0,005	0 ^f	0 ^a
Tween-80	5	1,349	91,12 ^{ab}	698 285 ^{cd}
	10	1,352	90,50 ^b	727 415 ^e
	15	1,318	89,62 ^b	687 404 ^d
	25	1,269	88,63 ^b	675 530 ^d
Aceite de <i>J. curcas</i>	5	0,415	9,74 ^c	24 947 ^b
	10	0,521	11,40 ^d	35 587 ^b
	15	0,736	11,95 ^d	52 807 ^e
	25	0,755	13,75 ^e	59 051 ^e

Valores con superíndices diferentes en una misma columna difieren a $p < 0,05$.

aceite del fruto de *J. curcas* L., con respecto al grupo control.

Los mejores resultados se correspondieron con la menor concentración, lo cual pudiera estar relacionado con una mejor emulsión del aceite a esa concentración, que permitió una mayor adhesión en la cutícula de la teleogina, facilitando su biodisponibilidad y penetración. Según Chagas *et al.* (2012) a partir de esta fase se aprecian efectos en el sistema reproductivo de la teleogina, con la consecuente inhibición en el porcentaje de puesta y en la fertilidad de los huevos. Por otra parte, Castillo *et al.* (2016) señalaron que los aceites pueden actuar como inhibidores de la actividad enzimática del tubo digestivo, afectando la función alimentaria.

La tabla 2 muestra los resultados de la eficacia del aceite del fruto de *J. curcas* L. en las teleoginas de *R. (B.) microplus*. Se apreciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos y las concentraciones (96,06; 94,65; 91,54 y 91,04 % para 5, 10, 15 y 25 %, respectivamente). El control negativo, como era de esperar, mostró una eficacia nula; mientras que la eficacia de Butox® fue de 99,49 %.

Estos resultados son similares a los reportados por Santos y Vogel (2012), al evaluar los efectos *in*

vitro de aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*; y por Farias *et al.* (2007), quienes hallaron eficacia *in vitro* del aceite de *Carapa guianensis* (entre 70 y 100 %) para todas las diluciones evaluadas, con una mortalidad en las teleoginas entre el segundo y el tercer día pos tratamiento. Las posturas de huevos fueron infértiles, y los mejores resultados se hallaron en la concentración del aceite al 5 %.

Por su parte, Martínez-Velázquez *et al.* (2011a; 2011b) reportaron efectos acaricidas con valores de eficacia entre 85 y 100 %, para esta especie de garrapata, cuando utilizaron aceites esenciales extraídos de *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica*, *Lippia graveolens*, *Rosmarinus officinalis* y *Allium sativum*.

Aunque en la literatura no hay reportes sobre las propiedades acaricidas del aceite del fruto de *J. curcas* L., en un estudio Rugama (2003) evaluó tres concentraciones de glicerol –obtenidas a través de los procesos de este aceite– para el control de la garrapata *R. (B.) microplus*, y encontró resultados significativos para las concentraciones de 20 y 30 %, con valores entre 90 y 95 % de eficacia a las 60 h de aplicado el producto.

La figura 1 muestra la curva dosis-respuesta del aceite en las teleoginas tratadas. Ello permitió

Tabla 2. Eficacia del aceite del fruto de *J. curcas* L en las teleoginas de *R. (B.) microplus*.

Tratamiento	Butox®	Tween-80	Aceite de <i>J. curcas</i>
Concentración %		Eficacia (%)	
5		0,00 ^a ±0,00	96,06 ^c ± 1,24
10	99,49 ^d ± 0,09	0,00 ^a ±0,00	94,65 ^c ± 0,92
15		0,00 ^a ±0,00	91,54 ^b ± 1,70
25		0,00 ^a ±0,00	91,04 ^b ± 1,75

Valores con superíndices diferentes difieren a $p < 0,05$.

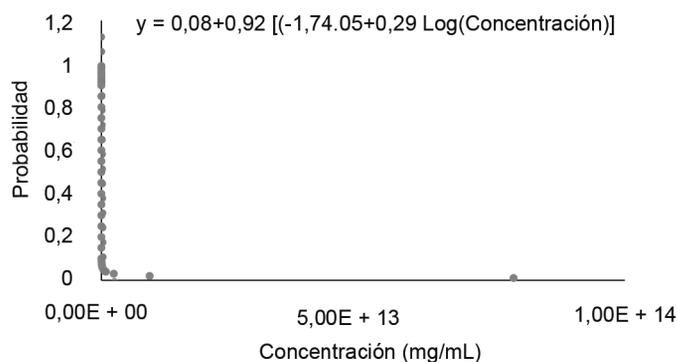


Figura 1. Curva dosis-respuesta del aceite de fruto de *J. curcas* en teleoginas de *R. (B.) microplus*.

obtener una CE_{50} de 88,90 mg/mL y una CE_{90} de 37,22 mg/mL. Estos valores son inferiores a los reportados por Heimerdinger *et al.* (2014), quienes obtuvieron una CE_{50} de 91,8 mg/mL; sin embargo, son similares a los informados por Chagas *et al.* (2012), cuando evaluaron aceites esenciales de *C. guianensis*, *Cymbopogon martinii* y *Cymbopogon schoenanthus* sobre adultos de esta especie.

Varios estudios *in vitro* han demostrado el potencial que tienen las plantas, sus aceites y otras sustancias aisladas para el control de la garrapata *R. (B.) microplus* (Chagas *et al.*, 2012; Isea *et al.*, 2013). Los aceites son mezclas complejas que contienen decenas o incluso cientos de sustancias con amplia actividad química, y su eficacia puede variar en función de múltiples factores (Fourie *et al.*, 2013). Sin embargo, la baja dilución empleada en este estudio sugiere que la concentración de principios activos en el aceite puede ser mayor a la encontrada en extractos acuosos, de ahí la importancia de darle continuidad a estos estudios.

Conclusiones

El aceite del fruto de *J. curcas* L. presentó una marcada eficacia acaricida *in vitro*, así como sobre la eclosión de huevecillos y la reproducción estimada, con una concentración efectiva CL_{50} de 88,90 mg/mL y CL_{90} de 37,22 mg/mL.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los proyectos internacionales «La biomasa como fuente renovable de energía para el medio rural (COSUDE)» y «Diagnóstico y estrategias de control de hemoparásitos transmitidos por garrapatas de bovinos y bubalinos (CAPES-MES/Brasil-Cuba)» por el apoyo para desarrollar las investigaciones. A los doctores Argemiro Sanavria y Adivaldo Henrique da Fonseca, de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro en Brasil; y a los técnicos de laboratorio del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Enrique Pérez y Harosqui Martínez, por su colaboración durante la investigación.

Referencias bibliográficas

- Amaral, M. A.; Rocha, C. M.; Faccini, J. L.; Furlong, J.; Monteiro, C. M. & Prata, M. C. Strategic control of cattle ticks: milk producers perceptions. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20 (2):148-154, 2011.
- Carrasco-Rueda, J. M.; Fartolino-Guerrero, A.; Sánchez-Chávez, Ángela; Lujan-Reyes, J.; Pachas-Quiróz, Alessandra; Castilla-Candela, Lucía del C. *et al.* Efecto sobre la motilidad intestinal del extracto de alcaloides de semilla de *Jatropha curcas* L. *Rev. cubana Plant. Med.* 18 (1):84-91, 2013.
- Castillo, C. del; Pinedo, Rosa; Rodríguez, L. & Chávez, Amanda. Evaluación de tres formulaciones comerciales de aplicación pour on bajo condiciones de campo y su efecto *in vitro* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en bovinos de Ceja de Selva. *RIVEP.* 27 (1):145-157, 2016.
- Cortés, J. A. Cambios en la distribución y abundancia de garrapatas y su relación con el calentamiento global. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 57:65-75, 2010.
- Chagas, Ana C. de S. Metodologías *in vitro* para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. *Memorias del XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária.* Curitiba, Brasil: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/110199/1/AACMetodologiasinvitro.pdf>, 2008.
- Chagas, Ana C. de S.; de Barros, L. D.; Cotinguiba, F.; Furlan, Maysa; Giglioti, R.; de Sena Oliveira, Márcia C. *et al.* *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 110 (1):295-303, 2012.
- Domínguez, Delia I.; Rosario, R.; Almazán, Consuelo; Saltijeral, J. A. & De la Fuente, J. *Boophilus microplus*: biological and molecular aspects of acaricide resistance and their impact on animal health. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 12:181-192, 2010.
- Drummond, R. O.; Ernst, S. E.; Trevino, J. L.; Gladney, W. J. & Graham, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66 (1):130-133, 1973.
- Farias, M. P. O.; Sousa, D. P.; Arruda, A. C.; Arruda, M. S. P.; Wanderley, A. G.; Alves, L. C. *et al.* Eficácia *in vitro* do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 9:68-71, 2007.
- Fernandes, E. K.; Bittencourt, V. R. & Roberts, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of tick. *Exp. Parasitol.* 130:300-305, 2012.
- Fernández-Salas, A.; Rodríguez-Vivas, R. I. & Alonso-Díaz, M. A. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 186:338-342, 2012.
- Fourie, J. J.; Ollagnier, C.; Beugnet, F.; Luus, H. G. & Jongejan, F. Prevention of transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs treated with a combination of fipronil, amitraz and (S)-methoprene. *Vet. Parasitol.* 193:223-228, 2013.

- Grisi, L.; Leite, R. C.; Martins, J. R. S.; Barros, A. T. M.; Andreotti, R. & Cançado, P. H. D. *et al.* Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23 (2):150-156, 2014.
- Heimerdinger, A.; Olivo, C. J.; Molento, M. B.; Agnolin, C. A.; Ziech, M. F.; Scaravelli, Luciene F. B. *et al.* Extrato alcoólico de Capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do *Boophilus microplus* em bovinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 15 (1):37-39, 2014.
- Isea, G. A.; Rodríguez, Ilse E. & Hernández, A. J. Actividad garrapaticida de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim). *Rev. cubana Plant. Med.* 18 (2):327-340, 2013.
- Martínez-Velázquez, M.; Castillo-Herrera, G. A.; Rosario-Cruz, R.; Flores-Fernández, J. M.; López-Ramírez, J.; Hernández-Gutiérrez, R. *et al.* Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 108 (2):481-487, 2011a.
- Martínez-Velázquez, M.; Rosario-Cruz, R.; Castillo-Herrera, G. A.; Flores-Fernández, J. M.; Álvarez, A. H. & Lugo-Cervantes, E. C. 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). *J. Med. Entomol.* 48 (4):822-827, 2011b.
- Rodríguez-Vivas, R. I.; Rosado-Aguilar, J. A.; Ojeda-Chi, Melina M.; Pérez-Cogollo, L. C.; Trinidad-Martínez, Iris & Bolio-González, M. E. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recur. agropecuarios.* 1 (3):295-308, 2014.
- Rugama, Nubia Z. *Evaluación in vitro e in vivo de tres concentraciones de fase glicerol de tempate (Jatropha curcas) de 20, 25 y 30 % como garrapaticida bovino.* Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo. Managua: Universidad Nacional Agraria, 2003.
- Santos, F. C. C. & Vogel, F. S. F. Avaliação *in vitro* da ação do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 14 (4):712-716, 2012.
- Silva, W. C.; Martins, J. R.; Cesio, M. V.; Azevedo, J. L.; Heinzen, H. & de Barros, N. M. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet. Parasit.* 179 (1-3):189-194, 2011.
- Sotolongo, J. A.; Beaton, P.; Díaz, A.; Montes de Oca, Sofía; Del Valle, Yadiris; García-Pavón, Soraya *et al.* *Jatropha curcas* L. as a source for the production of biodiesel: a Cuban experience. *15th European Biomass Conference and Exhibition.* Berlin: European Biomass Industry Association. p. 2631-2633, 2007.

Recibido el 2 de marzo del 2016

Aceptado el 11 de noviembre del 2016