

EVALUACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA DE *PLECTRANTHUS SP.* MEDIANTE LA PRUEBA *IN VITRO* DE PAQUETE LARVAL (LPT) PARA EL CONTROL DE *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

EVALUATION OF THE ACARICIDAL EFFECT OF *PLECTRANTHUS SP.* THROUGH THE *IN VITRO* LARVAL PACKET TEST (LPT) TO CONTROL *RHIPICEPHALUS MICROPLUS*

Luis David Muñoz Contreras
Octavio Roldán Padrón
Iván Gómez Sánchez
Gabriela Aguilar Tipacamú
Alma Rosa Martínez Ramos*

Universidad Autónoma de Querétaro, México

*alma.rosa.martinez@uaq.mx

Resumen

El control de garrapatas es una actividad fundamental para la producción bovina en pastoreo. Actualmente las garrapatas han desarrollado resistencia a diferentes ixodicidas, provocando cuantiosas pérdidas en la producción ganadera, contaminación ambiental y afectaciones a la salud de quienes aplican estos productos. Por tal razón, es importante explorar alternativas como el uso de extractos naturales para el control de este ácaro. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto acaricida del extracto de la planta comúnmente conocida como "vaporub" (*Plectranthus* spp) en el control de garrapata *Rhipicephalus microplus*. Se obtuvo el extracto de la planta con un rotavapor para su posterior evaluación mediante una prueba *in vitro* de paquete larval (LPT, por sus siglas en inglés) durante 24 hrs. Asimismo, se valoraron los tratamientos con las siguientes concentraciones del extracto: T1, 0.05 %; T2, 0.50 % y T3, 5.00 %, más el control (tricloroetileno y aceite de oliva en una relación 2:1). A partir de 4.30 kg de materia fresca vegetal se consiguieron 38 ml de extracto de *Plectranthus*, lo que representó un rendimiento del 0.97 %. El tratamiento T3 mostró el porcentaje de mortalidad de larvas más alto (9.64 ± 0.88 %); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). A partir de los resultados, se propuso evaluar el extracto en mayores concentraciones durante diferentes estadios de la garrapata y a un mayor tiempo de exposición, para lograr un mayor porcentaje de mortalidad.

Palabras clave: acaricida natural, ganado bovino, *Plectranthus* spp, prueba de paquete larval (LPT), *Rhipicephalus microplus*, salud animal.

Tick control is a fundamental activity for cattle grazing production. Currently, ticks have developed resistance to different ixodicides, causing substantial losses in cattle production, environmental contamination and health problems for those who apply these products. For this reason, it is important to explore alternatives such as the use of natural extracts for the control of this mite. The objective of this work was to evaluate the acaricidal effect of the extract of the plant commonly known as "vaporub" (*Plectranthus* spp) in the control of the tick *Rhipicephalus microplus*. The plant extract was ob-

tained with a rotary evaporator for subsequent evaluation by means of an *in vitro* larval package test (LPT) for 24 hrs. Treatments with the following concentrations of the extract were also evaluated: T1, 0.05 %; T2, 0.50 % and T3, 5.00 %, plus the control (trichloroethylene and olive oil in a 2:1 ratio). From 4.30 kg of fresh vegetable matter, 38 ml of *Plectranthus* extract were obtained, which represented a yield of 0.97 %. Treatment T3 showed the highest percentage of larval mortality (9.64 ± 0.88 %); however, no significant differences were found among treatments ($P \leq 0.05$). Based on the results, it was proposed to evaluate the extract at higher concentrations during different tick stages and at a longer exposure time, in order to achieve a higher mortality rate.

Keywords: animal health, cattle, *Rhipicephalus microplus*, *Plectranthus* spp, larval packet test (LPT), natural acaricidal.

Introducción

La garrapata *Rhipicephalus microplus* y las enfermedades que transmite causan ingentes pérdidas económicas a la producción bovina, por lo que son una de las mayores amenazas que enfrenta la ganadería bovina [1]. Las pérdidas económicas causadas por este ácaro están calculadas en México y el mundo en el orden de los 573 millones y 2.5 billones de dólares anuales, respectivamente [2]. Los daños que provocan las garrapatas sobre la salud de los animales se clasifican en directos e indirectos, siendo las primeras lesiones en la piel, pérdida de sangre y muerte por toxicidad, como reacción a la mordedura. También pueden ocasionar disminución de los parámetros productivos (leche y carne) y reproductivos. Por otro lado, los daños indirectos se deben a la transmisión de agentes patógenos como *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*, causantes de la babesiosis y anaplasmosis bovina [3]. Los métodos para el control de garrapatas se fundamentan en el



El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto acaricida del extracto de la planta comúnmente conocida como “vaporub” (*Plectranthus* sp) en el control de garrapata *Rhipicephalus microplus*.

uso intensivo de acaricidas sintéticos, como los organofosforados y piretroides [4]. El mercado mexicano dispone de productos acaricidas, donde uno de los principales es la ivermectina (lactonas marocíclicas), que se obtiene por la fermentación de *Streptomyces spp.*; posee efectos de actividad tanto nematicida como acaricida [5]. Dentro de sus funciones se encuentra la de combatir garrapatas y moscas, aunque el riesgo de generar poblaciones de garrapatas resistentes es mayor. Asimismo, se ha demostrado que la aplicación de lactonas macrocíclicas tiene un impacto ambiental negativo: en fincas donde los animales han sido tratados con estas, disminuye la diversidad y abundancia de las poblaciones de escarabajos estercoleros, fundamentales por desin-

tegrar la materia fecal, la cual posteriormente se reintegra al suelo [6]. Hoy en día los productos sintéticos son los principales autores en la problemática del medio ambiente, debido a que los residuos generan daños al planeta como la contaminación del suelo, aire y agua. Además, si son empleados de forma incorrecta pueden intoxicar al aplicador.

Por otro lado, los extractos de diversas plantas han manifestado un efecto acaricida. Estos no afectan al medio ambiente y disminuyen el desarrollo de resistencia por parte de la garrapata. Además, los productores han recurrido a opciones de bajo costo en prácticas de higiene animal por lo que el uso de estos extractos se convierte en una alternativa para el control de este ácaro [7], [8], [9], [10]. En este sentido, *Plectranthus spp.* es un arbusto carnoso, de hojas suculentas y aromáticas que se encuentra de forma silvestre en varias regiones de Jalpan de Serra, Querétaro. La planta contiene una mezcla de compuestos bioactivos, como esteroides, triterpenos, sesquiterpenos y monoterpenoides [11], [12], [13]. De acuerdo con Ochoa *et al.* el mecanismo de acción de los monoterpenoides en larvas de garrapata es la neurotoxicidad, similar a la producida por los organofosforados tras la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. El efecto neurotóxico se produce cuando, en la transmisión del impulso nervioso, las vesículas de las terminales nerviosas liberan acetilcolina, que después ingresa a la sinapsis a través de la unión a su receptor. La inhibición de la enzima acetilcolinesterasa genera una acumulación de acetilcolina y en consecuencia ocurre una alteración en el impulso nervioso [15], [16]. Esto sugiere que *Plectranthus* podría tener un efecto acaricida en el estadio larval, aunque las investigaciones al respecto

son inexistentes. Sumado a lo anterior, se realizaron pruebas empíricas en la localidad de Jalpan de Serra que consistieron en crear extractos de agua con las hojas frescas de la planta para su posterior aplicación en la piel de los animales con la ayuda de una mochila aspersora. Las pruebas mostraron el potencial de esta planta para el control de garrapatas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto acaricida de *Plectranthus* mediante una prueba de paquete larval contra *Rhipicephalus microplus*.

El presente proyecto se llevó a cabo mediante una colaboración entre la Facultad de Ingeniería campus Conca y la Facultad de Ciencias Naturales campus Juriquilla de la Universidad Autónoma de Querétaro. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro (clave CEAIFI-158-2019-TL).

Materiales y Métodos

Materia vegetal

Se recolectaron de forma manual las hojas sanas de plantas de vaporup (*Plectranthus spp.*) a las 8:00 horas aproximadamente. El material vegetal se obtuvo de la finca El Tigre, ubicada en la comunidad Embocadero, en Jalpan de Serra, Querétaro.

Obtención del extracto de *Plectranthus spp.*

Se deshidrataron 4.30 kg de materia vegetal en una estufa a 40 °C durante 3 días. Posteriormente, el resultante se maceró con metanol al 80 % en una relación de 1:10 (w/v). La solución se agitó por 16 horas y se filtró con un papel de 0.22 µm. Finalmente, la muestra se colocó en un rotavapor a una temperatura de 40 °C, una presión de 180 milibares y una temperatura del agua de 2-5 °C. De acuerdo con Jyoti et al. [7], se evaluaron tres concentraciones del extracto obtenido (T1: 0.05 %, T2: 0.50 %, T3: 5.00 %) más el control (tricloroetileno y aceite de oliva en una relación 2:1).



Modelo *in vitro*: prueba de paquete larval (LPT)

Las larvas de *Rhipicephalus microplus* utilizadas en el experimento pertenecen a la cepa media joya (referente nacional susceptible a ixodicidas), proporcionada por el Laboratorio de Artropodología del CENID-PAVET del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) al Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. La prueba de paquete larval se realizó de acuerdo con [7]. Brevemente, se recortaron 12 cuadros (para los tratamientos y sus repeticiones) de papel filtro de 8.5 cm de largo por 7.5 cm de ancho. Los tratamientos se prepararon al diluir tricloroetileno y aceite de oliva en una relación 2:1 para el control, y el extracto a las concentraciones ya mencionadas. Se agregó un volumen de 0.7 ml de cada dilución preparada a los cuadros de papel filtro y se dejaron evaporar con los tratamientos durante 2 horas. Posteriormente éstos se doblaron por la mitad y se colocaron clips metálicos a los lados, formando paquetes para la recepción de las larvas. Se colocaron 100 larvas en cada paquete, y la parte superior se selló con un tercer clip. Los paquetes con larvas se incubaron a 28 ± 1 °C y 85 ± 5 % de humedad relativa durante 24 horas.

Conteo de larvas

Transcurridas 24 horas, se abrieron los paquetes y se contaron las larvas vivas y muertas con un contador manual de 4 dígitos. Las larvas que movían las patas, pero no caminaban fueron consideradas muertas. Los resultados se compararon con el tratamiento control (tricloroetileno y aceite de oliva). De acuerdo con [17], el porcentaje de mortalidad corregido de larvas (*MC* %) se realizó aplicando la fórmula de Abbott [18]:

$$MC \% = \frac{Mortalidad_t - Mortalidad_c}{100 - Mortalidad_c} \times 100$$

Donde, $Mortalidad_t$ denota el porcentaje de mortalidad del tratamiento y $Mortalidad_c$ indica la mortalidad del control.

Análisis estadístico

Los datos experimentales se sometieron a un análisis ANOVA y a una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar.

Resultados y discusión

Obtención del extracto

A partir de 4.30 kg de materia fresca vegetal se obtuvieron 38 ml de extracto de *Plectranthus*, lo equivalente a un rendimiento del 0.97 %. Esta tasa de los aceites esenciales adquiridos a partir de las plantas varía según el método utilizado para la extracción. Comúnmente se emplea el de hidrodestilación para obtener el aceite esencial de *Plectranthus*; sin embargo, existen otros, como la destilación por arrastre de vapor, extracción con CO₂ supercrítico y extracción con hexano, cuyos rendimientos son de 0.55, 1.40 y 6.52 %, respectivamente [13]. Por otro lado, Dao et al. [19] realizaron la extracción de los aceites esenciales de esta misma planta mediante la hidrodestilación asistida por microondas, alcanzando un rendimiento de 0.1374 %. Adicionalmente, Samad et al. [20] también aprovecharon la tecnología de microondas para optimizar el rendimiento de la extracción, así como el equipo rotavapor y el etanol como solvente, llegando a un rendimiento de hasta 39.81 %. El método empleado en el presente trabajo fue la destilación mediante un equipo rotavapor y metanol como solvente. El funcionamiento de este mecanismo consiste en evaporar sustancias que luego serán condensadas y separadas en sus diferentes componentes. El equipo reduce la presión atmosférica para separar los solventes del soluto y luego destilarlos en el tubo de condensación a baja temperatura; posteriormente son recolectados en el matraz correspondiente. Es similar a la destilación por arrastre de vapor, pero con la reducción de presión. De acuerdo con lo anterior, es posible que con el equipo rotavapor asistido por la tecnología de microondas y hexano como solvente se obtenga un mayor rendimiento en la extracción de los aceites esenciales de *Plectranthus*.



TABLA 1.

Porcentaje de mortalidad de larvas en la prueba de paquete larval.

| TRATAMIENTO | CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO (%) | PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LARVAS |
|-------------|--------------------------------|------------------------------------|
| T1 | 0.05 | 8.36a ± 4.35 |
| T2 | 0.50 | 7.12a ± 1.20 |
| T3 | 5.00 | 9.64a ± 0.88 |
| Control | 0.00 | 0.22b ± 0.37 |

Los resultados se presentan como la media ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Porcentaje de mortalidad a partir de la prueba *in vitro* de paquete larval

Los resultados de la prueba *in vitro* se calcularon a partir de la Ecuación (1). Las concentraciones evaluadas resultaron diferentes al control. El tratamiento T3 con una concentración de 5.00 % representó la mortalidad más alta, aunque fueron inexistentes diferencias significativas entre los tratamientos.

La especie *Plectranthus* contiene una mezcla de esteroides y triterpenos, campesterol, α -amirina y β -amirina, así como mono y diterpenoides, involucrados en la resistencia de esta planta contra insectos y microorganismos [12], [21]. Más del 85 % de la literatura de *Plectranthus* se basa en los valores terapéuticos de este género, sus propiedades nutricionales y hortícolas atribuidas a su naturaleza aromática, así como su capacidad productiva de aceite esencial [22]; sin embargo, a pesar de que sus componentes monoterpenoides causan una neurotoxicación similar a la de los organofosforados contenidos en acaricidas comerciales, son inexistentes los estudios que reporten actividad plaguicida sobre esta planta.

Un estudio de la Universidad de Nuevo León evaluó la actividad acaricida de extractos metanólicos de la semilla de *Litchi chinensis* y de las hojas de *Artemisia ludoviciana* y *Cordia boissieri* [10]. La evaluación se realizó en dos poblaciones de garrapatas, una del estado de Nuevo León y otra de Veracruz, a través de una prueba *in vitro* con concentraciones al 5.00, 10.00 y 15.00 %. Como parte de sus resultados, el extracto de *L. chinensis* mostró porcentajes de mortalidad del 99.44 y 99.73 %; el de *A. ludoviciana*, de 89.34 y 89.21 %; el de *C. boissieri*, 33.04 y 10.33 % para las poblaciones de Nuevo León y Veracruz, respectivamente. Además, Pajuelo

[9] reportó porcentajes de mortalidad del 78.30, 82.50, 88.30 y 100 %, aplicando concentraciones de 6.00, 8.00, 10.00, 15.00 y 25.00 % del extracto de *Sapindus saponaria*. Ambos estudios experimentaron con dosis más altas que las utilizadas en el presente, además de haber empleado la prueba de inmersión de larvas, muy similar a la prueba LPT, pero con un paso adicional: las larvas se colocan en tubos tipo Eppendorf, a los que se les agrega la solución del extracto y se mantienen en agitación durante 10 min. Es posible que este paso adicional, así como las concentraciones evaluadas, permitieran mayores porcentajes de mortalidad en aquellos estudios.

Otros autores evaluaron los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Cymbopogon citratus* en una prueba LPT a concentraciones en un rango de 0.05-5.00 %, mismas concentraciones utilizadas en el presente estudio. Entre sus resultados reportaron valores LC50 de 0.301, 0.086 y 0.246 %, respectivamente. El LC50 determina la concentración letal de una sustancia para cierto organismo en un 50 % de la población total expuesta a dicha sustancia. Dicho de otro modo, a concentraciones de 0.301, 0.086 y 0.246 %, lograron alcanzar el 50 % de mortalidad de las larvas. Además, observaron una mortalidad dependiente de la concentración [7]. Otros estudios como el elaborado por Thorsell et al. [23], evidencian una acción repelente de algunas plantas contra ninfas de garrapata. Los autores evaluaron extractos etanólicos de abedul, citronella, trébol, eucalipto, geranio, lavanda, hierbabuena y girasol a una concentración del 10.00 %, obteniendo un rango de mortalidad del 80 al 90 %, 8 horas después de la aplicación. Para este estudio, además de usar una concentración más alta, también se contempló un estadio distinto de la garrapata.

Previo a la evaluación *in vitro* realizada en este trabajo, se había observado de manera empírica un efecto acaricida potencial de *Plectranthus* spp. en las cepas de garrapatas localizadas en Jalpan de Serra, Querétaro; sin embargo, fue en un estadio distinto al de esta evaluación, no sobre el larvario. Así, los bajos porcentajes de mortalidad obtenidos en este análisis están relacionados tanto en la concentración como con el estadio de las garrapatas evaluado. El efecto acaricida de los extractos de una planta depende de factores como la concentración, el estadio de la garrapata, la especie vegetal y tipo de compuestos bioactivos que contiene, el método de evaluación y el tiempo de exposición a los tratamientos.



Por otro lado, la eficiencia en la extracción de compuestos bioactivos es un aspecto crítico en el estudio de los mismos. Resulta de la interacción de la capacidad de solubilización del solvente con la solubilidad relativa de los compuestos en la muestra. En este sentido, los solventes deben establecer puentes de hidrógeno, específicamente para lograr la solvatación y liberación de las especies unidas a la matriz. La polaridad de los solventes rige la selectividad del sistema de partición y, por lo tanto, determina las especies fenólicas que se pueden distribuir en el extracto [24], [25]. El uso de otros solventes, como el hexano, podría no solamente mejorar el rendimiento del extracto, sino también la biodistribución de los compuestos, por lo que podría resultar en un mayor índice de mortalidad sobre las garrapatas.

Conclusiones

En la evaluación del efecto acaricida de los extractos de las plantas y sus compuestos bioactivos, es importante considerar los factores que influirán en el resultado, como las técnicas y el extractante utilizado en la obtención de dichos compuestos. Después, resulta imprescindible prestar atención a las concentraciones de los extractos y el estadio de la garrapata. Los resultados de este estudio sugieren que *Plectranthus* spp. blande un efecto acaricida, debido a una diferencia significativa en comparación con el control. No obstante, en estudios posteriores será necesario evaluar condiciones adicionales en los factores mencionados. La presente investigación establece una pauta para el análisis del comportamiento de esta planta contra las garrapatas, pero además ofrece una alternativa accesible para los productores en la región de la Sierra Gorda de Querétaro, ya que la especie se encuentra disponible de manera silvestre.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Ingeniería campus Conca y al laboratorio de microbiología veterinaria de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, por su apoyo para llevar a cabo este estudio.

Fuentes de financiamiento

Este proyecto fue solventado por la Facultad de Ingeniería campus Con-cá, el laboratorio de microbiología veterinaria de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro y la SEDESU a través del Corredor Regional de Formación Integral para la Sustentabilidad en el Estado de Querétaro (CORESU) con clave **06/01-COPROADESUQ-05-08-2021**.



Referencias

- [1] L. Mayahua Quiahua, "Actividad acaricida de la semilla del árbol de neem (*Azadirachta indica*) sobre garrapatas (*Rhipicephalus microplus*)", Tesis de maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 2015. <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/39514>
- [2] R. I. Rodríguez Vivas, L. Grisi, A. A. P. De León, H. S. Villela, J. F. Torres Acosta, H. F. Sánchez, D. R. Salas, R. R. Cruz, F. Saldierna y D. G. Carrasco, "Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico", *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, vol. 8, no. 1, pp. 61-74, 2017. Doi: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>
- [3] D. I. Domínguez García, R. Rosario Cruz, C. Almazán García, J. A. Saltijeral Oaxaca y J. De la Fuente, "*Boophilus microplus*: Aspectos Biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal", *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 12, no. 2, pp. 181-192, 2010.
- [4] A. Araque, S. Ujueta, R. Bonilla, D. Gómez y J. Rivera, "Resistencia a acaricidas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de algunas explotaciones ganaderas de Colombia", *U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, vol. 17, no. 1, pp. 161-170, 2014.
- [5] O. Olmedo, E. E. Bohrer de Azevedo y C. Tobal, "Efecto de la concentración de ivermectina sobre el control de parásitos internos y el desempeño productivo de bovinos", *Ciencia Veterinaria*, vol. 17, no. 1, pp. 19-34, 2015. <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/170>
- [6] G. Basto Estrella, R. I. Rodríguez Vivas, H. Delfín González, E. Reyes Novelo, "Escarabajos estercoleros (*Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae*) de ranchos ganaderos de Yucatán, México", *Revista Mexicana de Biodiversidad*, vol. 83, no. 2, pp. 380-386, 2012.
- [7] Jyoti, N. K. Singh, H. Singh, N. Mehta y S. S. Rath, "In vitro assessment of synergistic combinations of essential oils against *Rhipicephalus*

- (*Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)", *Experimental Parasitology*, vol. 201, pp. 42-48, 2019.
- [8] G. N. Njoroge y R. W. Bussmann, "Herbal usage and informant consensus in ethnoveterinary management of cattle diseases among the Kikuyus (Central Kenya)", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 108, no. 3, pp. 332-9, 2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16879938/>
- [9] P. D. Pajuelo, "Evaluación *in vitro* de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* sobre huevos y larvas *Boophilus microplus*", Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú, 2012.
- [10] G. Romario, "Evaluación de alternativas fitoterapéuticas y acaricidas sintéticos sobre *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae)", Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, 2020. <http://eprints.uanl.mx/19988/1/1080314471.pdf>
- [11] C. W. Lukhoba, M. S. Simmonds y A. J. Paton, "*Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 103, no. 1, pp. 1-24, 2006. pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16289602/
- [12] A. R. Osman, "Genetic variability and total phenolic compounds among six *Coleus blumei* varieties using RAPD", *Analysis Journal of Applied Sciences Research*, vol. 9, no. 3, pp. 1395-1400, 2013.
- [13] G. Arumugam, M. K. Swamy y U. R. Sinnia, "*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance", *Molecules*, vol. 21, no. 4, pp. 369, 2016. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27043511/>
- [14] S. A. Ochoa, L. E. Sánchez Torres, G. V. Nevárez Moorilón, A. D. Camacho y B. Noguera Torres, "Essential oils and their components as an alternative in the control of mosquito vectors of disease", *Biomedica*, vol. 37, no. 0, pp. 224-243, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29161495/>
- [15] M. Orias Vásquez, "Intoxicación por organofosforados", *Revista Médica Sinergia*, vol. 5, no. 8, 2020. Doi: <https://doi.org/10.31434/rms.v5i8.558>
- [16] P. J. Houghton, Y. Ren y M. J. Howes, "Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi", *Natural Product*



Reports, vol. 23, no. 2, pp. 181-199, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1039/b508966m>

- [17] B. Avinash, R. Venu, M. Alpha Raj, K. Srinivasa Rao, C. Srilatha y T. N. Prasad, "In vitro evaluation of acaricidal activity of novel green silver nanoparticles against deltamethrin resistance *Rhipicephalus (Boophilus) micropalus*", *Veterinary Parasitology*, vol. 237, pp. 130-136, 2017. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28246003/>
- [18] W. S. Abbott, "A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide", *Journal of Economic Entomology*, vol. 18, no. 2, pp. 265-267, 1925. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265>^a
- [19] T. P. Dao, D. C. Nguyen, D. T. Nguyen, T. H. Tran, P. T. Nhan Nguyen, N. T. Hong Le, X. T. Le, D. H. Nguyen, D. V. Vo y L. G. Bach, "Extraction Process of Essential Oil from *Plectranthus amboinicus* Using Microwave-Assisted Hydrodistillation and Evaluation of it's Antibacterial Activity", *Asian Journal of Chemistry*, vol. 31, no. 5, pp. 977-981, 2019. DOI: <https://doi.org/10.14233/ajchem.2019.21667>
- [20] N. A. Samad, D. N. A. Zaidel, E. Salleh, A. H. M. Yusof, D. J. Dailin y D. N. A. Zaidel, "Optimization of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng extraction process using microwave-assisted technique", *Chemical Engineering Transactions*, vol. 72, pp. 397-402, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1972067>
- [21] J. Grayer, M. R. Eckert, A. Lever, N. C. Veitch, G. C. Kite y A. J. Paton, "Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*", *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 38, no. 3, pp. 335-341, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.01.014>
- [22] R. H. Alasbahi y M. F. Melzig, "Plectranthus barbatus: a review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology - Part 1", *Planta Med*, vol. 76, no. 7, pp. 653-661, 2010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20178070/>
- [23] W. Thorsell, A. Mikiver y H. Tunón, "Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L", *Phytomedicine*, vol. 13, no. 1-2, pp. 132-134, 2006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16360943/>
- [24] O. R. Alara, N. H. Abdurahman y C. I. Ukaegbu, "Extraction of phenolic com-

pounds: A review", *Current Research in Food Science*, vol. 4, pp. 200-214. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33899007/>

- [25] E. Gil Martín, T. Forbes Hernández, A. Romero, D. Cianciosi, F. Giampieri y M. Battino, "Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products", *Food Chemistry*, vol. 1, no. 378. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35085901/Referencias>

