

Efecto del extracto acuoso de Neem (*Azadirachta indica*) en el control de garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) en perros

Guillermo Nolasco Rodríguez, Esther Albarrán Rodríguez, Manuel Rosales Cortés

División de Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100 La Venta del Astillero, Zapopan, 45110, Jalisco, México.

Autor de correspondencia:
nrg08783@cucba.udg.mx

Resumen

Introducción: Las hojas de Neem (*Azadirachta indica*) posee principios activos como la azadiractina, salanina, meliantról, nimbina y nimbidina. La azadiractina es la más importante ya que se asocia con una actividad ectoparasiticida. **Objetivo:** Evaluar el efecto del extracto acuoso de Neem sobre los estadios de las garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) presentes en perros (*in vivo*), y comparar los resultados con los provocados por un producto comercial a base de cumafos al 1%. **Material Métodos:** El extracto de Neem se preparó con 150 g de hojas secas por cada 100 mL de agua destilada, y 10 mL de alcohol de 96° para obtener una infusión y preparar un shampoo. El experimento se realizó con 50 perros de talla mediana de diferentes razas, alojados en jaulas individuales con

Effect of the aqueous extract of Neem (*Azadirachta indica*) in the control of ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in dogs

diferentes grados de infestación natural por garrapatas, se dividieron al azar en dos grupos de 25 perros cada uno: grupo 1(G1), baño con un garrapaticida comercial en forma de jabón y grupo 2 (G2), baño con el extracto de Neem en shampoo. El número de garrapatas se evaluó a los 0, 7, 14, 21 y 28 días. La comparación estadística se realizó con la Prueba de Suma de Rangos de Mann-Whitney (Sigma Stat 3.2). **Resultados:** Los rangos (G1, 161 & G2, 149) y promedios (36.9 & 31.6) iniciales no presentan diferencia estadística. A partir de la primera semana (mediana: 12 & 3) y hasta la cuarta semana (mediana: 1 & 0) la reducción de garrapatas fue importante para ambos grupos, con diferencia estadística. **Conclusión:** El extracto de Neem presentó un efecto garrapaticida en menor tiempo y de mayor duración que el producto comercial.

Palabras clave: Garrapatas, Azadiractina, extracto acuoso Neem

Abstract

Introduction: The leaves of Neem (*Azadirachta indica*) have active principles such as azadirachtin, salanin, meliantról, nimbin and nimbidin. Azadirachtin is the most important since it is associated with an ectoparasiticidal activity. Objective: To evaluate the effect of the aqueous extract of Neem on the stages of ticks (*Rhipicephalus san-*

guineus) present in dogs (*in vivo*), and compare the results with those caused by a commercial product based on coumaphos 1%. Material Methods: The Neem extract was prepared with 150 g of dried leaves per 100 ml of distilled water, and 10 ml of 96 ° alcohol to obtain an infusion and prepare a shampoo. The experiment was carried out with 50 dogs of medium size of different breeds, housed in individual cages with different degrees of natural infestation by ticks, were divided at random into two groups of 25 dogs each: group 1 (G1), bath with a tick rats, commercial in the form of soap and group 2 (G2), bath with the Neem extract in shampoo. The number of ticks was evaluated at 0, 7, 14, 21 and 28 days. The statistical comparison was made with the Mann-Whitney Rank Sum Test (Sigma Stat 3.2). Results: The initial ranges (G1, 161 & G2, 149) and averages (36.9 & 31.6) show no statistical difference. From the first week (median: 12 & 3) and up to the fourth week (median: 1 & 0) the reduction of ticks was important for both groups, with statistical difference. Conclusion: The Neem extract had a tick effect in shorter time and longer duration than the commercial product.

Key Words: Ticks, Azadirachtin, Neem aqueous extract.

Introducción

El Neem (*Azadirachta indica*) es un árbol perteneciente a la familia Meliaceae originario de los países tropicales del sudeste asiático conocido comúnmente como margosa, lila de la India y como Neem en inglés, el término tiene su origen en el sánscrito *Nimba Sarva roja nivarini* (curador de todas las enfermedades), es un árbol de tamaño de mediano a grande pudiendo alcanzar una altura de 30 m, caracterizado por su fuste corto y recto, una corteza arrugada de color de marrón oscuro a gris y una copa densa y redondeada con hojas pinnadas que se ha adaptado a zonas de clima semiáridas, tolera temperaturas de 0 a 49°C, actualmente, se cultiva en más de 50 países, manteniendo sus características y teniendo una gran variedad de usos (National Research Council., 2002) (Parrotta & Chaturvedi, 1994).

Ha sido introducida a varias de las islas del Caribe, en donde se le cultiva para sombra, combustible y numerosos productos no madereros que se obtienen de las hojas, la fruta y la corteza. La margosa o siempre verde, como es conocida en algunos países, es resistente al daño por las plagas de más de 300 especies de insectos patógenos (Parrotta & Chaturvedi, 1994) (Mordue & Nisbet, 2000), excepto en las áreas susceptibles a las heladas y las sequías.

El Neem posee muchos ingredientes activos que se encuentran en toda la planta, aunque con mayor concentración en las semillas para su uso en agronomía y medicina, tanto humana como animal. Estos son la base para la preparación de una amplia variedad de insecticidas orgánicos, considerados como agentes medicinales e insecticidas incluyendo garrapaticidas la azadiractina, salanina, meliantrol, nimbina y nimbidina, de los cuales la azadiractina es el principio activo más importante y con más actividad ectoparasiticida tanto de plantas como de los animales, actuando de diferentes maneras en los parásitos como: la interrupción del desarrollo de huevos, larvas y pupas, bloqueando la muda de larva a ninfa, repelen larvas y adultos, esteriliza adultos, envenena larvas y adultos y evita que los insectos se alimenten al participar sobre la ecdisoma (hormona de la muda) y la hormona juvenil, bloqueando la liberación de la hormona péptida morfogénica ; (Angulo-Escalante et al., 2004; Cruz Fernandez, 1988; Sáenz-De-Cabezón et al., 2010; Villamil, Naranjo, & Van Strahlen, 2012).

La azadiractina se obtuvo por primera vez del árbol de Neem en 1968 por (Butterworth and Morgan) y su estructura completa fue descrita 17 años después. Neem produce una gran cantidad de triterpenoides, la biosíntesis de los cuales culmina en la azadiractina. La biosíntesis de azadiractina comienza con un esteroide precursor (por ejemplo tirucallol, azadirone, azadiradione) y la apertura de anillo C (e.g. nimbin, salannina), después de lo cual a través de dos niveles de más complejidad estructural culmina la formación del anillo de furano, modificaciones que finalmente producen azadiractina (Angulo-Escalante et al., 2004; Mordue & Nisbet, 2000).

La Azadiractina actúa principalmente por ingestión pero también por contacto, sobre

La Azadiractina actúa principalmente por ingestión pero también por contacto, sobre

todo en el estadio juvenil. Es eficaz, pero no posee “efecto de choque” por lo que necesita algunos días (Arias et al., 2009; López & Estrada, 2005) (6-8) para manifestar su propia actividad, cuando el parásito la ingiere esta afecta su patrón de alimentación, el desarrollo del cuerpo y su ciclo reproductivo, inhibiendo la producción de la neurohormona protoracicotropica, la cual a su vez regula la síntesis de la hormona juvenil, hormonas indispensables para la muda y maduración del huevo (Orozco-Sánchez & Rodríguez-Monroy, 2007; Villamil et al., 2012).

Las garrapatas son vectores importantes de agentes que causan enfermedades en animales domésticos en zonas tropicales alrededor del mundo (Guerra Liera et al., 2005; Handule, Ketavan, & Gebre, 2002) *Rhipicephalus pulchellus* Gerstaecker after exposure to neem oil. The ultimate goal was to determine the bioacaricidal activity of Ethiopian neem extract under laboratory conditions for the control of *R. pulchellus* larvae. The LT 50 values were determined for populations from each subsequent treatment by probit analysis and significant increases (chi-square test, $P > 0.01$ entre estos; algunos protozoarios, virus, bacterias y hongos. Transmiten la mayor variedad de microorganismos que cualquier otro tipo de artrópodos, deteriorando además la salud de los animales al alimentarse de sangre y dañar la piel (Schleske, 2011).

Bajo condiciones ambientales ideales para que vivan y proliferen, su control y erradicación continúa fundamentándose en el uso de insecticidas (control químico). Esta práctica se

discute por ser contaminante del ambiente, en algunas ocasiones pobre eficacia antiparasitaria y, por tanto, en el control de las enfermedades que transmite y por resultar costosa, lo que la hace poco sostenible (Alouani, Rehim, & Soltani, 2009; González, Márquez, Meléndez, & López-Ortega, 2010; Orozco-Sánchez & Rodríguez-Monroy, 2007; Parrotta & Chaturvedi, 1994).

Las garrapatas constituyen el suborden Ixodida del orden Parasitiformes, en los que todos son parásitos. El suborden Ixodida contiene tres familias; Ixodidae Argasidae, Nuttalliellidae. La familia Ixodidae se divide en 13 géneros y 600 especies, aproximadamente un 80 % de las especies de garrapatas descritas (Estrada-Peña, 2015)

La garrapata marrón (*Rhipicephalus sanguineus*), es una plaga común del perro, gato y de otros animales. Todas las etapas del ciclo de vida se alimentan de estos y del humano, esta garrapata es más activa durante el verano, pero con la utilización de los sistemas de calefacción durante el invierno, se ha ampliado su época de actividad. Es responsable de transmitir enfermedades como piroplasmosis y babesiosis en perros (Estrada-Peña, 2015).

La garrapata marrón del perro se encuentra ampliamente distribuida en México, identificada y documentada desde la década de los 60s (Hoffmann, 1962).

La necesidad de métodos de control de garrapatas más seguros, menos agresivos al hombre y al medio ambiente, ha estimulado la

búsqueda de nuevos acaricidas a partir de extractos vegetales, que de forma aislada o en combinación, retrasen el desarrollo de resistencia o reduzcan el problema de los residuos por su característica biodegradable. El desarrollo de plaguicidas “orgánicos” o “biológicos” que se obtienen principalmente de recursos vegetales autóctonos y que muestren una mejor relación costo-eficacia, es una alternativa a los productos utilizados actualmente. Respecto al Neem, es necesario establecer un uso adecuado contra diversas plagas, pues en general, cada vez que sobreviven a la aplicación de un producto químico natural o de síntesis, transmiten la información genética a posteriores generaciones (González et al., 2010; López & Estrada, 2005; Orozco-Sánchez & Rodríguez-Monroy, 2007).

En los animales de compañía no existen programas de control de las garrapatas como en los animales en producción, aunque si existen tratamientos para disminuir las infestaciones, los cuales consisten en la aplicación de ixodicidas durante las estaciones de mayor frecuencia de infestación y dependiendo del grado de infestación. Es importante mencionar que el uso continuo de ixodicidas que se ha ejercido durante los últimos años ha propiciado la manifestación de efectos de resistencia en las poblaciones de garrapatas a productos de las familias de organofosforados, piretroides y otras sustancias de origen químico, o bien tratamientos orales muy costosos y con poco tiempo de efectividad.

El extracto de Neem es una sustancia que ha sido utilizadas para el tratamiento de diferentes ectoparásitos en las plantas, y de forma

in vitro en la eliminación de las garrapata por lo que representa una alternativa para el control y erradicación de este ectoparásito en los animales de compañía (Schleske, 2011).

El objetivo de este trabajo fue el de investigar el efecto del extracto de la planta de Neem sobre las garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* presentes en perros de diferentes razas, ya que en la actualidad existe una gran cantidad de ectoparasiticidas en el mundo, muchos de los cuales producen intoxicaciones tanto en los animales domésticos y silvestres como en los humanos (Dunkel & Richards, 1998).

Materiales y Métodos

Preparación de la solución de Neem

La preparación de la solución de Neem se realizó en el Laboratorio de Fisiología del Departamento de Medicina Veterinaria, se utilizaron 100 g de hojas de la planta de Neem por cada 100 mL de agua destilada, se dejaron reposar por 12 h en vaso de precipitado, se filtró utilizando un embudo de cristal y papel filtro, se preparó una solución hidroalcohólica (100 mL de solución de extracto de Neem: 50 mL de alcohol), la solución se refrigeró por 24 horas. Para la preparación de shampoo se utilizaron 100 mL de la solución hidroalcohólica por cada 150 ml de shampoo base, se colocó la base de shampoo en una plancha caliente, hasta alcanzar una temperatura de 60°C, se agregó paulatinamente los 100 ml de solución hidroalcohólica con Neem, hasta quedar homogénea, se dejó enfriar y se colocó en recipientes de plástico con

capacidad para 250 mL.

Identificación de las garrapatas.

Para la identificación de las garrapatas, se realizó la extracción de las mismas de los animales infestados y se trasladaron al Laboratorio de Parasitología de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara para su identificación basada en la taxonomía del género (Estrada-Peña, 2015; Solari, Cuore, Trelles, & Mautone, n.d.).

Para el conteo de garrapatas se utilizaron técnicas descritas por Flores et al (2008) Para esta sección se dispuso del acarómetro, que está conformado por una hoja de acetato con una ranura rectangular de 4 cm de ancho por 5 cm de largo, dando como resultado una superficie de 20 cm². Se evaluaron seis zonas de la superficie corporal de los caninos: orejas, cuello, dorso, axilas, abdomen y zona inguinal (Broglia-Micheletti et al., 2010).

Grado de infestación de las garrapatas

La evaluación del grado de infestación se realizó usando la técnica de Flores Egocheaga (2008), clasificando los niveles de infestación: baja para perros con < 10, moderada de 10 a 30 y alta con > 30 garrapatas por campo.

Animales y tratamientos

Para este trabajo se consideraron 50 perros de talla mediana de diferente raza y sexo, infestados, de manera natural, con garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) los cuales se dividieron en dos grupos de 25 animales cada uno,

colocados en jaulas individuales, identificando primero el grado de infestación de garrapatas, así como el tipo de garrapatas que presentaron; el primer grupo se bañó por la mañana con agua corriente y el shampoo con la solución de Neem, al segundo grupo se le aplicó un baño de la misma manera pero utilizando un ectoparasiticida comercial (jabón asuntol®), procedimiento que se repitió durante cuatro semanas, la evaluación de la infestación se llevó a cabo mediante la inspección el día 0, 7, 14, 21 y 28 pos tratamiento, evaluando la presencia o ausencia de garrapatas en sus diferentes etapas.

Análisis Estadístico.

Los valores se sometieron a un análisis de suma de rangos Mann-Whitney a un nivel de significancia del 0.05%, utilizando el software SigmaStat 3.1.

Resultados

Los animales de estudio se incorporaron al proyecto con infestación de tipo natural y se dividieron en los dos grupos de manera aleatoria, se encontró una gran variedad en los niveles de infestación. Se identificaron perros con escaso número de garrapatas, así como aquellos con valores importantes. Los rangos iniciales fueron de 149 y 161 garrapatas por área evaluada.

Después de los tratamientos el número de ectoparásitos fue disminuyendo gradualmente, sin embargo, en el grupo con tratamiento Neem, se observó un efecto desparasitante más eficiente y permanente, ya que para el día 21 y 28 ya no se encontraron garrapatas, fenómeno

que no se identificó en el grupo comercial (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de estadística descriptiva del número de garrapatas pos-tratamientos Neem y garrapaticida comercial.

Grupo	Periodo (días)	Valor Mínimo	Valor Máximo	Rango	Promedio
Neem	0	1	150	149	31.68
	7	0	121	121	11.60
	14	0	56	56	3.6
	21	0	1	01	0.04
	28	0	0	0	0
garrapaticida comercial	0	1	162	161	36.92
	7	0	150	150	19.08
	14	0	126	126	13.04
	21	0	91	91	9.36
	28	0	32	32	5.08

Al comparar los valores de la mediana en ambos grupos se encontró una disminución marcada en el número de garrapatas a partir de la primera semana (7mo día) y esta disminuyó y se mantuvo hasta el final del estudio (día 28). En el grupo comercial el efecto fue menor y menos eficiente en relación al tiempo (Figura 1).

En la Figura 2 se pueden observar diferentes animales y áreas evaluadas al inicio o tiempo cero y al día 14, después de dos baños con el tratamiento Neem.

Figura 2. Imagen que muestra a la izquierda animales con diferentes grados de infestación por garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) durante el tiempo inicial (día 0), a la derecha los animales tratados después de dos baños con el extracto de Neem (día 14).

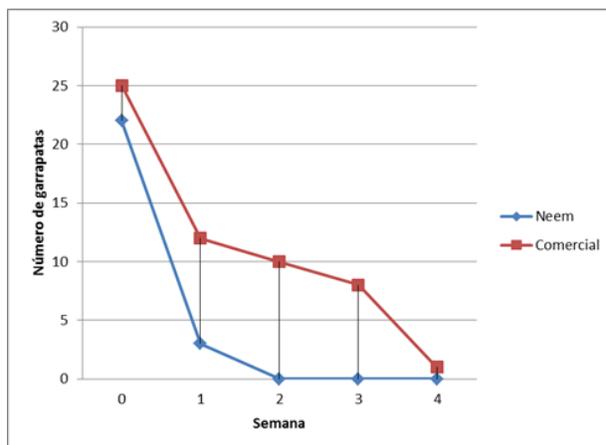


Figura 1. Comparación del estadígrafo de Mediana de garrapatas por semana en los grupos Neem y producto comercial.



Discusión

Las garrapatas y pulgas pueden deteriorar la salud de los animales por alimentarse de su sangre y dañar su piel, o por ser vectores de microorganismos patógenos. Bajo condiciones ambientales ideales para que proliferen y vivan, su control y erradicación continúa fundamentándose en el uso de insecticidas de síntesis (control químico). Esta práctica se cuestiona por ser contaminante del medio ambiente, en no pocas ocasiones pobre eficacia antiparasitaria y, por tanto, en el control de las enfermedades que transmite y porque también puede resultar costosa, lo que la hace poco sostenible.

La infestación por garrapatas y pulgas constituye en muchos países un grave problema que limita la producción agropecuaria, altera la salud de animales productores de alimento, de animales de compañía y quizá en muchas ocasiones también del ser humano.

El contenido de azadiractina en hojas varía a través de las distintas etapas de desarrollo del árbol durante el año. Al respecto (Cruz 2001) el mayor contenido de este ingrediente activo se encuentra durante el periodo vegetativo o de producción de hoja ($2.7\mu\text{g}$ de AZA/g), disminuyendo durante la floración ($2.1\mu\text{g}$ de AZA/g) y casi desaparece durante la formación y madures del fruto ($0.5\mu\text{g}$ de AZA/g), el nivel alcanzado en esta última etapa varía de 4.7 a $9.0\mu\text{g}$ de AZA/g de semilla o sea 2 a 4 veces más que la contenida en las hojas.

Los resultados obtenidos de este estudio

muestran que el efecto del principio activo presente en el extracto del Neem (Azadiractina) tiene mayor efecto que los ectoparasiticidas comerciales sobre la garrapata tanto en estadios adultos como en juveniles, mostrando, así mayor actividad en garrapatas jóvenes (*Rhipicephalus sanguineus*), resultando de esto la interrupción del ciclo biológico de los ectoparásitos al inhibir la producción de la hormona que promueve la ecdisis de los ectoparásitos también llamada protoracicotropica, mientras que el garrapaticida comercial, mostró menor actividad en el género de la misma garrapata tanto en estadios adultas como en juveniles ya que algunos perros fueron tratados con jabón hasta por cuatro ocasiones y no se logró un efecto deseado debido a que la exposición del mismo principio activo se genera una resistencia adquirida.

Literatura Citada

- Alouani, A., Rehim, N., & Soltani, N. (2009). Larvicidal Activity of a Neem Tree Extract (Azadirachtin) Against Mosquito Larvae in the Republic of Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2(1), 15–22. Retrieved from <http://jjbs.hu.edu.jo/files/v2n1/3.pdf>
- Angulo-Escalante, M., Gardea-Béjar AA, Vélez, de la R. R., Estrada, G. R., Carrillo-Fasio, A., Cháidez-Quiroz, C., & Partida-López, J. (2004). Contenido de azadiractina a en semillas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) colectadas en Sinaloa, México. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 27(4), 305–311. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/610/61027402.pdf>
- Arias, D., Vázquez, G., Acosta, W., Montañez, L., Alvarez, R., & Pérez, V. (2009). Determinación del Azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*). *Revista INGENIERÍA UC*, 16(3), 22–26. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/707/70717551004.pdf>
- Cruz Fernandez, M. (1988). Dinámica de la azadiractina en arboles de nim (*Azadirachta indica* a Juss) de México y su efecto contra dos insectos de almacén. Universidad Autónoma de Nuevo León. Doctorado

- en Ciencias Agrícolas. Retrieved from <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080110341.PDF>
- Dunkel, F. V., & Richards, D. C. (1998). Effect of an azadirachtin formulation on six nontarget aquatic macroinvertebrates. *Environmental Entomology*, 27(3), 667–674. <https://doi.org/10.1093/ee/27.3.667>
- Estrada-Peña, A. (2015). Orden Ixodida: Las garrapatas. *Revista IDE@ - SEA*, (13), 1–15. Retrieved from http://sea-entomologia.org/IDE@/revista_13.pdf
- González, M., Márquez, A., Meléndez, C., & López-Ortega, A. (2010). Efecto del extracto de hojas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) en la diabetes mellitus inducida por estreptozotocina en ratones. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 15(2), 64–71. Retrieved from <http://www.ucla.edu.ve/dveterin/departamentos/CienciasBasicas/gcv/2530int2530er2530no/articulos/documasp/~vol15num2art4dic10.pdf>
- Guerra Liera, J. E., Corrales Aguirre, J. L., Soto Angulo, L. E., Moreno Quiroz, J., Rodríguez García, J., Gastélum Delgado, M. A., ... Meza Salazar, M. (2005). Dairy cattle tick (*Boophilus microplus*) control with *Azadirachta indica* A. Juss. *ISAH*, 1, 248–251. Retrieved from http://www.isah-soc.org/userfiles/downloads/proceedings/2005/sections/46_vol_1.pdf
- Handule, I. M., Ketavan, C., & Gebre, S. (2002). Toxic effect of Ethiopian Neem oil on larvae of cattle tick, *Rhipicephalus pulchellus* Gerstaecker. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 36, 18–22. Retrieved from <http://www.thaiscience.info/journals/Article/TKJN/10974096.pdf>
- Hoffmann, A. (1962). Monografía de los Ixodoidea de México. I parte. *Revista de La Sociedad Mexicana de Historia Natural*, XXIII, 1–96. Retrieved from <http://repositorio.fcencias.unam.mx:8080/jspui/bitstream/11154/142756/1/23VMonografiasIxodoidea.pdf>
- López, D. M., & Estrada, O. J. (2005). Los Bioinsecticidas de Nim en el control de plagas de insectos en cultivos ecológicos. La Habana (Cuba). *Rev. Facultad Ciencias Agrarias FCA*, XXXVII(2), 41–49. Retrieved from http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/782/lopezAgrarias2-05.pdf
- Mordue, A. J., & Nisbet, A. J. (2000). Azadirachtin from the Neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais Da Sociedade Entomológica Do Brasil*, 29(4), 615–632. <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000400001>
- National Research Council (U.S.). Board on Science and Technology for International Development. (2002). *Neem : a tree for solving global problems : report of an ad hoc panel of the Board on Science and Technology for International Development, National Research Council*. New York: Books for Business.
- Orozco-Sánchez, F., & Rodríguez-Monroy, M. (2007). Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(3), 251–258. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/620/62060303.pdf>
- Parrotta, J. A., & Chaturvedi, A. N. (1994). *Azadirachta indica* A. Juss. Neem, margosa. Meliaceae Mahogany family. *SO-ITF-SM-70. USDA Forest Service, International Institute of Tropical Forestry*. Retrieved from https://www.fs.fed.us/global/iitf/pubs/sm_iitf070-8.pdf
- Sáenz-De-Cabezón, I. F., Moreno-Grijalba, F., Marco, V., Pérez-Moreno, I., W, M., M, N., & AJ, N. (2010). Acute and Reproductive Effects of Align®, an Insecticide Containing Azadirachtin, on the Grape Berry Moth, *Lobesia botrana*. *Journal of Insect Science*, 10(1), 33. <https://doi.org/10.1673/031.010.3301>
- Schleske, M. I. (2011). “Prevalencia de unidades de producción con garrapatas *Rhipicephalus (boophilus) microplus* resistentes a amidinas y factores de riesgo asociados a su presentación en la región centro del estado de Veracruz.” Universidad Veracruzana. Maestría en Ciencia Animal. Retrieved from <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30456/1/Schleske.pdf>
- Villamil, M. D., Naranjo, N., & Van Strahlen, M. A. (2012, July 23). Efecto insecticida del extracto de semillas de Neem (*Azadirachta indica*) sobre *Collaria scenica*, Stal (Hemiptera: Miridae). *Entomobrasilis*, pp. 125–129. Retrieved from <http://www.periodico.ebras.bio.br/ojs/index.php/ebras/article/view/224>