



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA EFICACIA DE NUEVOS
CARBAMATOS SOBRE GARRAPATAS *Boophilus microplus*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA GUADALUPE PRADO OCHOA

TUTOR: DR. FERNANDO ALBA HURTADO
COMITÉ TUTORAL: DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE
DR. GERARDO GARCÍA TOVAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicada con todo mi amor a:

Mis papás:

Gilberto Prado e Isabel Ochoa

Mi amor:

Francisco Pérez

Mis enanos:

Francisco

Eduardo

Ana Paula

“Porque cada paso lo damos juntos”

Lupita

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Fernando Alba Hurtado por su enorme contribución en mi formación, su apoyo y por la confianza que depositó en mi para la realización de este trabajo.

Al Laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlán y en especial al Dr. Enrique Ángeles Anguiano, por haber diseñado y sintetizado los carbamatos utilizados en este trabajo.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, por abrirme sus puertas y por el apoyo brindado en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Macroproyecto de la UNAM: “Productividad sostenible de hatos de cría de pastoreo” por el financiamiento para este proyecto.

Al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) por las facilidades y apoyo para la realización de este trabajo.

A los miembros del Comité tutorial: Dr Gerardo García Tovar y Dr. Froylán Ibarra Velarde por sus observaciones, enseñanzas y consejos.

A los miembros del Jurado: Dr. Zeferino García Vázquez, Dra. Yazmín Alcalá Cantó, Dr. Fernando Osnaya Gallardo y Dr. Fernando Parrodi , que enriquecieron este trabajo con sus acertados comentarios y observaciones.

Al Dr. Marco Muñoz Guzmán por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Al M. en C. César Cuenca Verde por su ayuda y apoyo técnico en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIMSA) que colaboraron en este proyecto: MVZ Iliana E. Pérez González, MVZ Tabata B. González Torres, MVZ Melitón Lara Rocha y Raúl Reynoso Vivanco.

A todos, muchas gracias.

Índice

Índice.....	I
Índice de cuadros y figuras.....	III
Índice de anexos.....	IX
Abreviaturas.....	X
Resumen.....	XII
Introducción.....	1
Generalidades de <i>Boophilus microplus</i>	2
Clasificación Taxonómica.....	2
Morfología de <i>B. microplus</i>	3
Ciclo biológico de <i>B. microplus</i>	4
Epidemiología.....	6
Patogenia.....	7
Control.....	9
Control químico.....	9
Control no químico.....	13
Resistencia a los acaricidas.....	15
Carbamatos.....	19
Justificación.....	23
Hipótesis.....	24
Objetivos.....	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares.....	25
Material y métodos.....	26
Ubicación.....	26
Material biológico.....	26
Cepa de garrapatas <i>B. microplus</i>	26

Animales.....	26
Carbamatos evaluados.....	27
Diseño experimental.....	30
Técnicas para el diagnóstico de la susceptibilidad a acaricidas en larvas y adultas de la garrapata <i>Boophilus microplus</i>	32
Técnica de paquete de larvas (Stone y Haydock) o Larval Packet test (LPT).....	32
Técnica de Inmersión de adultas (AIT).....	33
Análisis estadístico.....	34
Resultados	35
Mantenimiento de la cepa de garrapatas <i>B. microplus</i>	35
Resultados de la Técnica de Paquete de larvas (LPT).....	35
Resultados de la Técnica de Inmersión de Adultas (AIT).....	36
Concentraciones de Inhibición de Eclosión (CIE).....	39
Discusión	62
Conclusiones	69
Anexos	70
Referencias	81

Índice de cuadros y figuras

Cuadro 1.	Casos de resistencia a acaricidas en garrapatas <i>B. microplus</i>	17
Cuadro 2.	Estructuras químicas y pesos moleculares de los carbamatos evaluados.....	33
Cuadro 3.	Mortalidad de larvas de <i>Boophilus microplus</i> producida por 18 carbamatos diseñados y sintetizados en FES-Cuautitlán. Cada dato representa la media \pm EE de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ese grupo tratado y su respectivo grupo testigo.....	40
Cuadro 4.	Mortalidad de larvas de <i>Boophilus microplus</i> producida por el carbamato LQM 934. Se presenta la media (\pm E.E.), el valor p y el Intervalo de confianza para la diferencia de medias de los datos de mortalidades obtenidos de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa entre ese grupo tratado y el testigo (ANOVA una vía).	41
Cuadro 5.	Mortalidad de larvas producida por el carbamato LQM 934. Se presenta la media (\pm E.E.), el valor p y el Intervalo de confianza para la diferencia de medias de los datos de mortalidades obtenidos de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa entre ese grupo tratado y el testigo (ANOVA una vía).....	42
Cuadro 6.	Concentraciones letales del carbamato LQM 934. Datos obtenidos del análisis probit (Polo-Plus Le-Ora Software)....	43
Cuadro 7.	Mortalidad de larvas producida por el carbamato LQM 938. Se presenta la media (\pm E.E.), el valor p y el Intervalo de confianza para la diferencia de medias de los datos de mortalidades obtenidos de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa entre ese grupo tratado y el testigo (ANOVA una vía).	44

Cuadro 8.	Mortalidad de larvas producida por el carbamato LQM 938. Se presenta la media (\pm E.E.), el valor p y el Intervalo de confianza para la diferencia de medias de los datos de mortalidades obtenidos de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa entre ese grupo tratado y el testigo (ANOVA una vía).....	45
Cuadro 9.	Concentraciones letales del carbamato LQM 934. Datos obtenidos del análisis probit (Polo-Plus Le-Ora Software)....	46
Cuadro 10.	Porcentaje de hembras que ovipositaron, índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por los carbamatos diseñados y sintetizados en FES-Cuautitlán sobre garrapatas adultas <i>B. microplus</i> . Cada valor representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos (ANOVA una vía, $p < 0.05$).....	47
Cuadro 11.	Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 917. Cada resultado representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigo (ANOVA una vía, $p < 0.05$).....	49
Cuadro 12.	Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 996. Cada resultado representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos (ANOVA una vía, $p < 0.05$).....	51
Cuadro 13.	Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 914. Cada resultado representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas.....	53

Cuadro 14.	Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 904. Cada resultado representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	55
Cuadro 15.	Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 906. Cada resultado representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	57
Cuadro 16.	Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 919. Cada resultado representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	59
Cuadro 17.	Concentraciones de inhibición de eclosión (CIE ₅₀ y CIE ₉₉) de los carbamatos. Análisis probit de los datos de eclosión de larvas obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas (Polo-Plus Le-Ora Software).....	61
Cuadro 18.	Preparación de la solución madre.....	75
Figura 1.	Zonas en las que la Campaña Nacional contra la garrapata ha dividido la República Mexicana (Senasica-Sagarpa, 2009).....	1
Figura 2.	Fotografía de hembra repleta de <i>Boophilus microplus</i>	2
Figura 3.	<i>Boophilus microplus</i> , macho (Sagarpa).....	3
Figura 4.	Hembra repleta de <i>Boophilus microplus</i> (Sagarpa).....	3
Figura 5.	Aparato locomotor de la garrapata (Sagarpa).....	4

Figura 6.	Ciclo biológico de <i>Boophilus microplus</i>	6
Figura 7.	Estructura general de los carbamatos.....	20
Figura 8.	Unión del carbamato a la acetilcolinesterasa, carbamilación (Odilón, 1993).....	21
Figura 9.	Fotografía de los infestaderos.....	26
Figura 10.	Diseño experimental.....	31
Figura 11.	Fotografía de hembras repletas de <i>B. microplus</i>	33
Figura 12.	Fotografía de huevos ovipositados por garrapatas tratadas con el carbamato LQM 904.....	37
Figura 13.	Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por los carbamatos diseñados y sintetizados en FES-Cuautitlán. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	48
Figura 14.	Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 917. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	50
Figura 15.	Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 996. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	52
Figura 16.	Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas	54

	producidos por el carbamato LQM 914. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	54
Figura 17.	Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 904. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	56
Figura 18.	Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 906. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	58
Figura 19.	Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 919. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.....	60
Figura 20.	Diagrama del proceso de infestación artificial de los bovinos.....	71
Figura 21.	Huevos de <i>B. microplus</i>	72
Figura 22.	Diagrama del proceso de mantenimiento de la cepa de garrapatas <i>B. microplus</i> , <i>in vitro</i>	29
Figura 23.	Fórmula para calcular los gramos de producto o de principio activo necesarios para preparar la solución madre.....	74
Figura 24.	Fotografía de impregnación de papeles filtro.....	75

Figura 25.	Fotografía de la trampa para el llenado de paquetes.....	76
Figura 26.	Paquetes de larvas.....	76
Figura 27.	Fotografía de la inmersión de hembras adultas repletas, en diferentes diluciones de los productos evaluados.....	78
Figura 28.	Fórmula para calcular el porcentaje de hembras que ovipositaron.....	80
Figura 29.	Fórmula para calcular el índice de oviposición.....	80
Figura 30.	Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición de oviposición.....	80

Índice de anexos

Anexo 1.	Infestación artificial de bovinos con la cepa de <i>B. microplus</i>	70
Anexo 2.	Mantenimiento de la cepa de <i>B. microplus</i> en el laboratorio.....	72
Anexo 3.	Técnica de paquete de larvas.....	74
Anexo 4.	Técnica de inmersión de adultas.....	78

Abreviaturas

µl	Microlitros
AIT	Adult Immersion Test
<i>B. annulatus</i>	<i>Boophilus annulatus</i>
<i>B. microplus</i>	<i>Boophilus microplus</i>
BHC	Hexaclorobenceno
Br	Bromo
C	Carbono
°C	Grados centígrados
CE	Concentración efectiva
CENAPA	Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal
CIE	Concentración de inhibición de eclosión
Cl	Cloro
CL	Concentración letal
cm	Centímetros
CMIs	Concentraciones mínimas inhibitorias
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Error estándar
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
g	Gramos
HR	Humedad relativa
IC	Intervalo de confianza
IO	Índice de oviposición
Kg	Kilogramos
LPT	Larval Packet test
LQM	Laboratorio de Química Medicinal
ml	Mililitros
mm	Milímetros
N	Nitrógeno
Na	Sodio

NOM	Norma Oficial Mexicana
NRC	National Research Council
O	Oxígeno
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PHA	Fitohemaglutinina
PP	Precipitación pluvial
ppm	Partes por millón
S	Azufre
sp	Especie
T	Temperatura
UIMSA	Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

Resumen

Boophilus microplus es la garrapata más importante en las áreas tropicales y subtropicales de México. El uso extensivo de los acaricidas químicos para el control o erradicación de la garrapata y otros insectos ha provocado el fenómeno de resistencia a los acaricidas comerciales. El desarrollo de nuevos acaricidas seguramente contribuirá a reducir el problema de resistencia y reducirá las enormes pérdidas económicas producidas por la infestación de garrapatas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una serie de 18 carbamatos diseñados y sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la UNAM sobre larvas y adultas de una cepa de garrapatas *Boophilus microplus* susceptible a acaricidas convencionales.

Se midió el efecto de los 18 carbamatos sobre la mortalidad de larvas por la técnica de paquete de larvas a 8 diferentes concentraciones. Los carbamatos con clave LQM 934 y LQM 938 tuvieron efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la mortalidad de las larvas, el resto no tuvieron efecto sobre las larvas de *B. microplus*. Los datos analizados por medio de la metodología probit (bioensayo a concentraciones múltiples) mostraron que las concentraciones letales para el producto LQM 934 fueron $CL_{10}=0.545\%$, $CL_{50}=0.644\%$, $CL_{90}=0.760\%$ y $CL_{99}=0.870\%$. Las concentraciones letales obtenidas para el carbamato LQM 938 fueron $CL_{10}=0.192\%$, $CL_{50}=0.226\%$, $CL_{90}=0.267\%$ y $CL_{99}=0.305\%$.

Por otro lado los 18 productos se evaluaron por medio de la técnica de inmersión de adultas a la concentración de 1mg/ml. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de hembras que ovipositaron de las garrapatas tratadas con respecto a las testigo, sin embargo se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en el peso de los huevos ovipositados por las garrapatas tratadas con los productos LQM 904, LQM 906, LQM 914, LQM 917, LQM 919 y LQM 996. Además se observaron diferencias estructurales en los huevos de las garrapatas tratadas, los cuales fueron de menor tamaño, más oscuros, desecados, y con poca adherencia a la masa de huevos. Estos huevos resultaron ser no viables por lo que no eclosionaron las larvas. Los porcentajes de eclosión de larvas se adecuaron al modelo probit, las concentraciones necesarias para inhibir el 99% de la eclosión de las larvas (CI_{O99}) para cada producto fueron las siguientes: LQM 904=1.493 mg/ml, LQM 906 = 0.537 mg/ml, LQM 917= 0.625 mg/ml, LQM 919= 0.687 mg/ml y LQM 996 = 0.279mg/ml.

En conclusión la evaluación de los efectos *in vitro* de los nuevos carbamatos sobre larvas y adultas de *B. microplus*, sugieren que son fármacos con un alto potencial para ser una buena opción farmacéutica para el control de la garrapatas.

1. Introducción

Las garrapatas son artrópodos, ectoparásitos hematófagos que parasitan a los animales domésticos, silvestres y al hombre, son los ectoparásitos más importantes del ganado en las áreas tropicales y subtropicales de centro y Sudamérica, África y Australia (Baxter *et al.*, 1998). *Boophilus microplus* es la especie de garrapata más importante en éstas áreas ya que produce grandes pérdidas económicas para la ganadería. Los efectos más importantes de la infestación por garrapatas son: anemia, reducción en crecimiento, reducción en parámetros reproductivos, reducción de la producción de carne y leche, disminución de la calidad de las pieles, parálisis y transmisión de enfermedades como babesiosis y anaplasmosis (Solorio *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2005).

En México representan un grave problema para la ganadería de pastoreo ya que se estima que el 70% de la ganadería nacional se explota en las regiones donde se presentan (Castellanos, 1998).



Figura 1. Zonas en las que la Campaña Nacional contra la garrapata ha dividido la República Mexicana (Senasica-Sagarpa, 2009)

La Campaña Nacional contra la garrapata ha clasificado la distribución de la garrapata *Boophilus sp.* en la República Mexicana en tres zonas (figura 1), la zona libre que ocupa una porción importante del norte del país, así como pequeñas áreas del centro, comprende 94.4 millones de hectáreas que equivalen al 47.88% del Territorio Nacional. La zona en erradicación cuenta con 1.1 millones de hectáreas que se ubican en las áreas en las cuales el parásito ha sido eliminado por efectos de la Campaña y representa un 0.57%. La zona en fase de control en este momento alcanza una superficie total de 101.6 millones de hectáreas y representa el 51.5% del país (Senasica-Sagarpa, 2009).

Generalidades de *Boophilus microplus*

Boophilus microplus es originaria del sureste de Asia, se ha distribuido a través de los trópicos incluyendo Australia, Este y Sur de África y Centro América. Fue introducida a México junto con *B. annulatus*, por el sur de Estados Unidos de Norte América, antes de ser exitosamente erradicada de dicho país (Jongejan *et al.*, 2004).



Figura 2. Fotografía de hembra repleta de *Boophilus microplus*

Clasificación taxonómica

Boophilus microplus (Canestrini, 1988), pertenece al *Phylum*: Arthropoda, clase: Arachnida, orden: Acarina, suborden: Metastigmata, familia: Ixodidae. Las cinco especies del género *Boophilus* han sido cambiadas al género *Rhipicephalus* (Horak *et al.*, 2002; Barker *et al.*, 2004) por su cercana relación filogenética y evolución, este cambio en nomenclatura ha llevado a la utilización del nombre *Boophilus* como subgénero.

Morfología de *B. microplus*

La estructura de las garrapatas se da por la fusión de gnatosoma y el cuerpo o idiosoma al cual están unidas las extremidades. Las larvas son hexápodas mientras que las ninfas y adultas son octápodas (Soulsby, 1988).

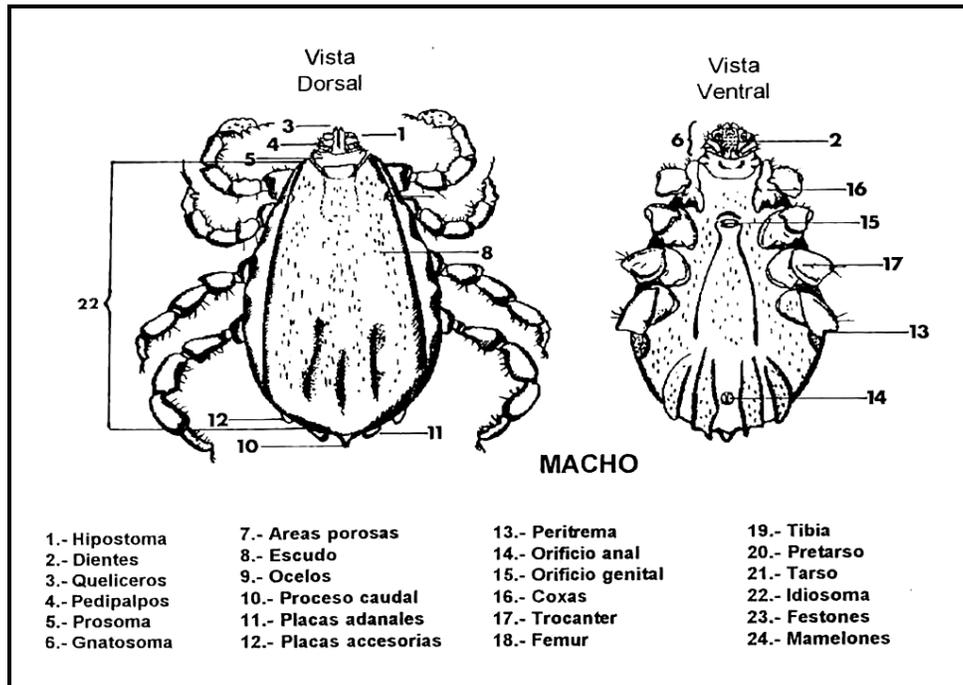


Figura 3. *Boophilus microplus*, macho (Sagarpa, 2009)

El aparato bucal o gnatosoma incluye dos palpos, cada uno con cuatro segmentos, cada palpo tiene en el cuarto segmento distal numerosas vellosidades sensitivas. Los palpos no penetran la piel del hospedador, presionan lateral y horizontalmente la piel durante la alimentación. Un par de esclerotizados y bi-segmentados quelíceros tubulares se extienden desde la base del gnatosoma y se localizan medialmente a los palpos (Anderson *et al.*, 2008). Posicionado en la parte media del gnatosoma se encuentra el hipostoma que posee pequeños dientes en su superficie externa, lo que le permite a la garrapata atravesar la piel del

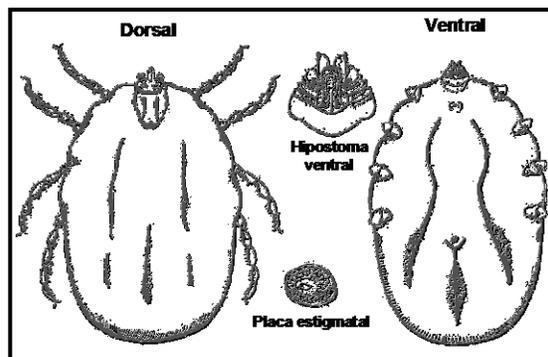


Figura 4. Hembra repleta de *Boophilus microplus* (Sagarpa, 2009)

hospedador y fijarse. La sangre del hospedador pasa por el canal formado por el hipostoma ventralmente y los quelíceros dorsalmente, igualmente la saliva de la garrapata pasa al hospedador por este canal (Anderson *et al.*, 2008).

La base del gnatosoma, que en *B. microplus* es de forma hexagonal, está unida al cuerpo por una membrana flexible. El cuerpo o idiosoma es posterior al gnatosoma. En la parte anterior del idiosoma se encuentran las patas y el poro genital, en la parte posterior los espiráculos respiratorios y el ano. El orificio genital está cerrado y no es aparente en larvas y ninfas, mientras que en adultos está abierto y es aparente (figura 3).

Un escudo en forma de lengüeta color café cubre la porción dorsal anterior del cuerpo de las hembras, larvas y ninfas, mientras que en machos adultos, cubre todo el cuerpo. Los machos presentan ventralmente placas adanales y accesorias (figura 4).

Durante la alimentación, la cutícula con excepción del escudo, se expande para acomodar la sangre ingerida.

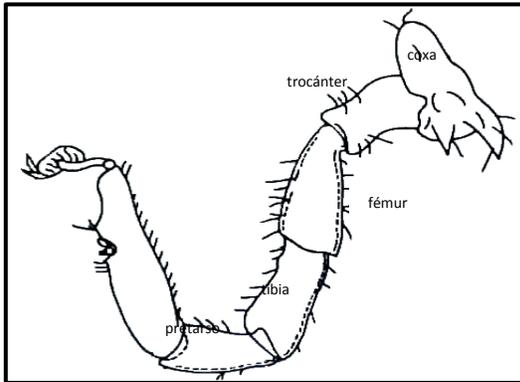


Figura 5. Aparato locomotor de la garrapata (Sagarpa, 2009)

Las patas articuladas con seis artejos son usadas para locomoción (figura 5). El órgano de Haller, localizado en el tarso del primer par de patas, detecta la temperatura, corrientes de aire, olores y químicos (Anderson y Magnarelli, 2008).

Ciclo biológico de *Boophilus microplus*

La garrapata *Boophilus microplus* presenta un ciclo de vida monoxeno (Figura 6), que se caracteriza por la utilización de un solo hospedador para completar su desarrollo que comprende un tiempo de entre 4 y 10 meses, siendo el hospedador generalmente un bovino.

El ciclo biológico de *Boophilus sp.* se compone de dos fases: La fase no parásita o de vida libre y la fase parásita (Soulsby, 1988).

La fase no parásita empieza cuando la hembra alimentada se desprende del hospedador, cae a la vegetación y por fototaxia negativa busca lugares protegidos donde se lleva a cabo la oviposición, cada hembra puede ovipositar entre 3500 y 4400 huevos, el período de preoviposición es de 2 a 39 días y el de oviposición de 4 a 44 días, dependiendo de las condiciones medioambientales. Después de la oviposición sigue el período de incubación de los huevos el cual es de 14 a 146 días, seguido de la eclosión de las larvas (Soulsby, 1988). Durante la fase no parásita o de vida libre las larvas se alimentan de la sustancia vitelina del huevo (Estrela *et al.*, 2007), y suben a la punta de los pastos para encontrar a su hospedador, las larvas detectan que se aproxima su hospedador mediante estímulos como la vibración, calor, olor y bióxido de carbono. El encuentro del hospedador comprende dos fases: fase pasiva, que corresponde al primer estímulo posterior a la eclosión de las larvas por lo que se requiere de un periodo durante el cual las larvas adquieren la viabilidad necesaria para resistir los efectos del ambiente, esta fase puede durar de 4 a 6 días, y la fase de búsqueda. El evento de encuentro es influenciado por diversos factores como las condiciones ambientales (temperatura y humedad), las cuales afectan directamente la longevidad, densidad y actividad de las larvas en los pastos.

La fase parásita incluye diferentes eventos: adherencia a la piel o pelaje del hospedador, búsqueda en la piel de un sitio adecuado, inserción de las partes bucales en la epidermis y dermis del hospedador, fijación de la larva y alimentación. Durante la alimentación se lleva a cabo la muda de larva a ninfa, de ninfa a adultos y la fecundación. Esta fase tiene una duración de 21 días en promedio, algunos investigadores mencionan que se pueden encontrar ninfas entre el día 5° al 14° y adultos entre el día 13° y 25° a partir de la fijación de las larvas. Finalmente las hembras repletas o ingurgitadas se desprenden y caen del hospedador (Anderson *et al.*, 2008).

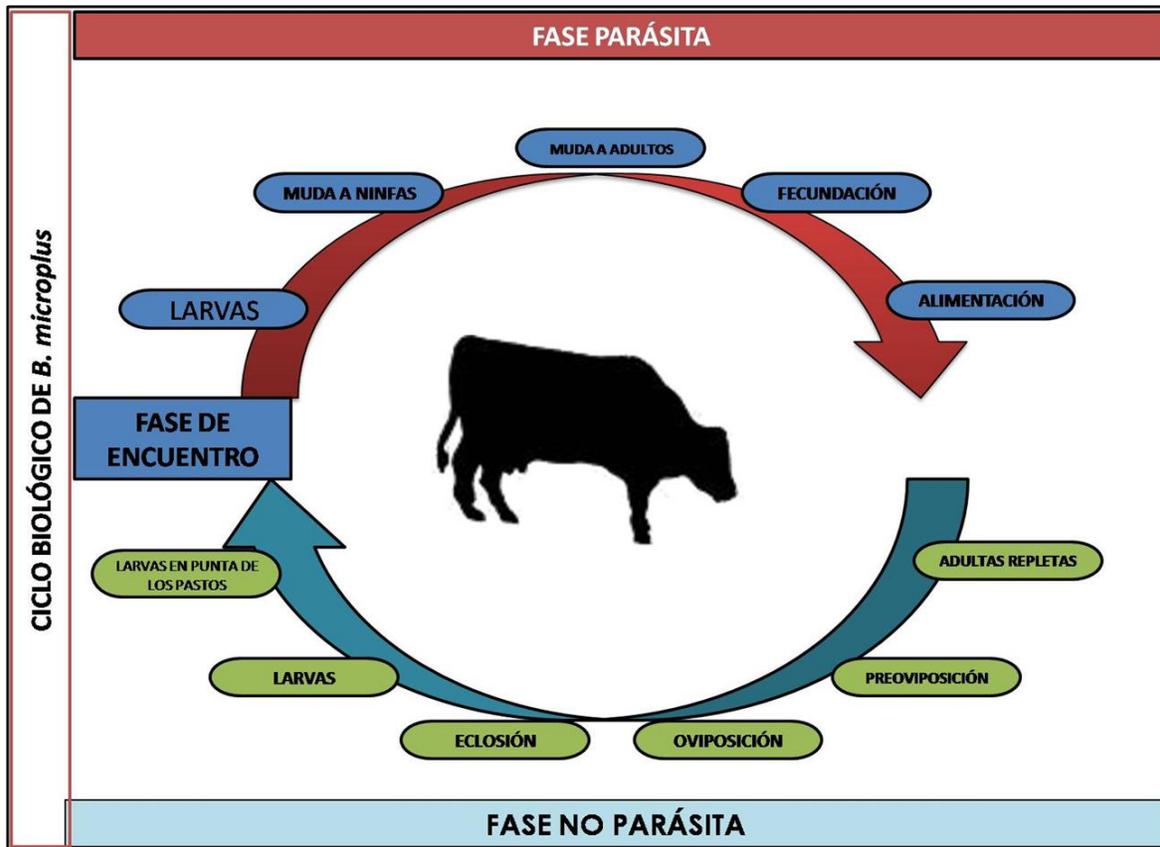


Figura 6. Ciclo biológico de *Boophilus microplus*

Epidemiología

La biología y ecología de *Boophilus microplus* en los bovinos es influenciada por factores intrínsecos y extrínsecos a los animales. Los factores intrínsecos más importantes son: sexo, raza, edad, tipo y color de pelo. Dentro de los factores extrínsecos se encuentran los factores climáticos y las prácticas de manejo (Lima *et al.*, 2000).

Las razas cebú (*Bos indicus*) presentan mayor resistencia a la infestación por garrapatas que las razas europeas (*Bos taurus*). Además esta resistencia es mayor en animales jóvenes que en viejos, y en hembras no gestantes que en gestantes (Jonsson *et al.*, 2000).

Bajo condiciones de temperatura, humedad relativa y precipitación pluvial favorables, *B. microplus* puede producir hasta cuatro o cinco generaciones al año.

El grado de infestación de los animales se relaciona con la influencia de los factores climáticos sobre la producción y sobrevivencia de los estados no parasitarios. Así se menciona que el invierno afecta negativamente la fase no parásita de *B. microplus*, ya que temperaturas menores a 20°C provocan un aumento en los periodos de oviposición y eclosión. Algunos autores mencionan que a la menor temperatura que puede ocurrir la oviposición es a 15°C mientras que a temperaturas entre 25° y 35° se disminuyen los periodos de preoviposición y oviposición, aumentándose la cantidad de huevos ovipositados. En cuanto a la humedad relativa, si es baja se inhibe la oviposición (Ouhelli *et al.*, 1982). La precipitación pluvial (PP) es uno de los principales factores que influyen sobre la dinámica poblacional de las garrapatas. Se ha observado que la mayor población de garrapatas coincide con la sequía y durante la temporada de lluvia declina. En el trópico húmedo de Veracruz, México se observó que PP>200 mm mensual ocasiona disminución en el número de garrapatas y PP de 100 a 150 mm mensual favoreció la mayor infestación de los animales. Se piensa que las altas precipitaciones disminuyen el número de garrapatas debido a la lixiviación que ocasionan (Alonso-Díaz *et al.*, 2007).

Patogenia

Las principales acciones patógenas de las garrapatas son: traumática, expoliatriz, hematófaga, tóxica e inoculatriz. Los principales efectos producidos por estas acciones son:

a) Anemia

La anemia es una consecuencia inevitable de una alta infestación por parásitos hematófagos, y las muertes atribuibles a la anemia resultante de la infestación por *B. microplus* son comunes. Una hembra de garrapata puede incrementar su peso al alimentarse de 100 a 200 veces, pero el volúmen de sangre ingerido es mucho mayor, ya que la sangre consumida es concentrada y se excretan fluidos a través de la saliva de la garrapata (Jonsson, 2006). Se estima que cada garrapata adulta es responsable de la pérdida de 1 ml de sangre (Riek, 1957).

b) Efectos en la inmunidad

Varios estudios han demostrado los efectos inmunosupresores por garrapatas en la inmunidad del huésped. Se ha sugerido que la supresión de la función inmune del huésped facilita la transmisión de enfermedades como babesiosis y anaplasmosis. Se ha demostrado que en animales infestados por *B. microplus* existe reducción significativa en la respuesta de linfocitos *in vitro* a la estimulación con fitohemaglutinina (PHA) y respuesta reducida *in vivo* a la vacunación con ovoalbúmina (Inokuma *et al.*, 1993).

c) Efectos en el consumo de alimento

Algunos autores proponen que la infestación por garrapatas ocasiona supresión del apetito en el ganado. Provocando disminución en el consumo de materia seca y aumento en el consumo de agua. Lo cual es una de las principales causas de la disminución en la producción (Jonsson, 2006).

d) Efectos en los parámetros productivos

Estudios en ganado lechero de raza Holstein Friesian demostraron que en un periodo de 15 semanas, las vacas sin garrapatas produjeron 2.86 litros más de leche y 16.6 kg más de peso vivo que las vacas infestadas. Se ha estimado que por cada garrapata repleta se pierde 8.9 ml de la producción diaria de leche y 1.0 g de peso vivo (Jonsson *et al.*, 1998).

e) Daño en pieles

El daño causado por la picadura de la garrapata durante su alimentación disminuye la calidad y por lo tanto el valor de las pieles. Aunque las garrapatas *Boophilus sp.* tienen un aparato bucal corto, el daño en las pieles es considerable ya que los sitios que prefieren para su alimentación son frecuentemente sitios con buen potencial para pieles (Jongejan *et al.*, 2004), además de la irritación en caso de infestaciones severas, las garrapatas pueden causar dermatitis graves (FAO, 1988).

f) Transmisión de enfermedades

Las garrapatas son vectores de una gran variedad de microorganismos patógenos, protozoarios, rickettsias, espiroquetas y virus (Jongejan *et al.*, 2004). Las enfermedades transmitidas por garrapatas tienen una distribución específica e impacto que está determinada por la distribución de las garrapatas vectores. Así la babesiosis y anaplasmosis, transmitidas principalmente por garrapatas del género *Boophilus* se encuentran distribuidas en los cinco continentes.

Las pérdidas económicas globales debidas a estas y otras enfermedades transmitidas por garrapatas, son estimadas en 7 billones de dólares americanos anuales, así mismo se ha reportado que la anaplasmosis y babesiosis bovinas son responsables de pérdidas anuales de 875 millones de dólares americanos en los países de América Latina, dichas pérdidas incluyen las pérdidas directas por muerte de los animales y disminución en la productividad, y pérdidas indirectas debidas al costo de las medidas de control (Duncan, 1997).

Control

Control químico

La estrategia más utilizada para controlar la infestación por garrapatas *B. microplus*, es la aplicación de sustancias químicas sobre el cuerpo de sus hospedadores a intervalos específicos (Ortiz, 1999). El historial del uso de acaricidas en el mundo ha incluido diferentes clases de acaricidas como los arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas cíclicas, fenilpirazolonas, piretroides y lactonas macrocíclicas. La efectividad de un acaricida en el control de garrapatas depende no sólo de la actividad del producto, sino también de la calidad y cantidad del ingrediente activo depositado sobre el animal o internamente.

El uso de arsénico fue el primer método efectivo para el control de las garrapatas, su uso se intensificó a partir de 1910 y fue usado en muchas partes del mundo por muchos años. Los baños con arsénico tuvieron mucho éxito para la erradicación de *Boophilus microplus* del sur de Estados Unidos. Pero el arsénico

tiene muy corto efecto residual (menos de dos días), y en muchas partes del mundo se detectaron garrapatas *Boophilus sp.* resistentes al arsénico (FAO, 1988).

Posteriormente, después de la Segunda Guerra mundial, el arsénico fue reemplazado por los organoclorados, que son acaricidas sintéticos, su mecanismo de acción es la interferencia con la conducción de los nervios de las garrapatas. Los primeros productos de este grupo fueron el DDT y el hexaclorobenzeno (BHC). Los organoclorados fueron ampliamente utilizados en todo el mundo pero por su alta toxicidad y persistencia en el ambiente, además de que el DDT y BHC tienden a acumularse en la grasa corporal, fueron retirados del mercado (George *et al.*, 2004).

Los organofosforados reemplazaron a los organoclorados. Los organofosforados son clasificados como los pesticidas más tóxicos para los vertebrados y están relacionados con gases neurotóxicos. Ethion, Chlorpyrifos, Chlorfenvinphos y Coumaphos son cuatro de los organofosforados más usados mundialmente para el tratamiento de ganado infestado con garrapatas. Los acaricidas carbamatos (por ejemplo: Carbaryl y Promacyl) como los organofosforados, actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa, pero son menos tóxicos (Rajput *et al.*, 2006).

Las formamidinas (amidinas) como el chlordimeform, clenpyrin, chloromethiuron y amitraz son miembros de un pequeño grupo de químicos que son efectivos contra las garrapatas. El uso del amitraz resultó exitoso para el control de garrapatas desde 1971 en Australia. El amitraz es inestable en los baños de inmersión, pero si se le adiciona hidróxido de calcio para mantener un pH de 12 en la solución de baño, el principio activo permanece estable. Las amidinas son antagonistas de los receptores de la octopamina en el cerebro de los parásitos: provocan hiperexcitabilidad y seguidamente parálisis y muerte. La excitación hace también que las garrapatas no logren fijarse al hospedador. También poseen un cierto efecto repelente lo que hace que muchas garrapatas se desprendan del hospedador antes de morir. (George *et al.*, 2004).

Los piretroides naturales que son insecticidas muy costosos e inestables a la luz solar, son los predecesores de una serie de productos sintéticos, los piretroides sintéticos. Los piretroides tienen una historia de evolución que comenzó en 1949, pero la tercera generación de estos químicos, permetrina y fenvalerato fueron los primeros disponibles para el control de garrapatas en el ganado. Cypermethrina, deltamethrina y cyhalothrina son ejemplos de la cuarta generación de piretroides ciano-sustituidos que son acaricidas efectivos (George *et al.*, 2004).

Existen dos clases de lactonas macrocíclicas con actividad acaricida. Las avermectinas que son derivadas del actinomiceto *Streptomyces avermitilis* y las milbemicinas que son derivadas de productos de fermentación de *S. higroscopicus aureolacrimosus*. Ivermectina, doramectina y eprinomectina son derivadas de las avermectinas, mientras que la moxidectina es la única lactona macrocíclica derivada de la milbemicina utilizada como acaricida. Las lactonas macrocíclicas son activas sistémicamente a muy bajas dosis, tienen buena efectividad usadas subcutáneamente y en formulaciones para aplicación pour-on, pero su alto costo limita su uso (George *et al.*, 2004).

Otro grupo de químicos utilizados como acaricidas son los inhibidores del desarrollo, como el fluarzuron que inhibe la formación de quitina en *B. microplus*, su eficacia persiste por aproximadamente doce semanas, sin embargo sus residuos se almacenan en la grasa, por lo que en los animales destinados para consumo humano, es necesario suspender el tratamiento con fluarzuron al menos seis semanas antes de su consumo (Bull, *et al.*, 2000).

Las familias de productos químicos que se utilizan actualmente para el control de las garrapatas en México son:

- Organofosforados (coumaphos, clorfenvinphos).
- Piretroides (deltametrina, flumetrina, lambdacyalotrina, cipermetrina, alfacipermetrina).
- Mezclas (flumetrina + cyflutrina, permetrina + clorpirifos, cymiazol + cipermetrina, clorfenvinfos + cipermetrina).

- Amidinas (amitraz).
- Inhibidores del desarrollo (fluarzuron).
- Fenilpirazolonas (fipronil).
- Lactonas macrocíclicas (ivermectina, doramectina, moxidectina) (Conacyt-Sagarpa, 2005)

Aplicación de acaricidas químicos

Existen varios métodos para la aplicación de acaricidas que incluyen los baños de inmersión, aspersion, aplicación pour-on, y aplicación vía parenteral.

- a) Baño de inmersión: En este método, los animales son inmersos en un baño conteniendo una solución acaricida. A lo largo de la historia han sido probados cientos de posibles acaricidas en baños de inmersión, desde aceite de pescado, petróleo crudo, keroseno, creosote, extracto de tabaco, combinaciones de sulfuro y keroseno, hasta los acaricidas comerciales actuales. En general los baños de inmersión proveen un método altamente efectivo para el tratamiento de animales con acaricidas sin embargo, su inmovilidad, alto costo inicial de construcción y el costo de los acaricidas puede hacerlos poco prácticos para las pequeñas ganaderías (George *et al.*, 2004).
- b) Baño de aspersion: La aplicación de acaricidas por medio de aspersion tiene muchas ventajas y ha sido exitosamente aplicado para el control de las garrapatas. El equipo es portátil y solo se necesitan pequeñas cantidades del acaricida para cada aplicación. Sin embargo, la aspersion puede ser menos eficiente que la inmersión por problemas asociados con la aplicación del acaricida en todas las partes del cuerpo del animal (Drummond *et al.*, 1976).
- c) Aplicación epicutánea. También se llama pour-on, se aplica directamente sobre la piel de los bovinos y los químicos actúan después de dispersarse sobre la superficie del animal o después de absorberse a través de la piel y ser ingeridos por el artrópodo.
- d) Parenteral. Es la inyección subcutánea de endectocidas.

Control no químico

Son las acciones ejercidas para el control de las garrapatas sin el uso de productos químicos y entre los principales se encuentran:

a) Resistencia del hospedador

Las razas de bovinos *Bos indicus* (Nelore, Brahman, Gyr, Indobrasil, Jersey, etc.) son más resistentes a infestaciones de garrapatas que las razas de origen europeo *Bos taurus* (Suizo, Charolais, Angus, Holstein friesian, etc.).

Las razas susceptibles sufren infestaciones de 15 a 100 veces más severas que las resistentes. Además esta resistencia es mayor en animales jóvenes que en viejos, y en hembras no gestantes que en gestantes.

Los mecanismos propuestos para ésta resistencia son muy diversos e incluyen las hipersensibilidad cutánea (mayor secreción de histamina en razas resistentes), anastomosis arteriovenosa en la piel, niveles séricos de inmunoglobulinas, y respuesta linfoproliferativa mayor en razas resistentes (Kashino *et al.*, 2005). Otros mecanismos son el comportamiento de acicalarse o lamerse, el color y espesor de la piel, y el largo del pelaje.

Estas características de resistencia son altamente heredables por lo que se usa como medida para controlar la infestación por garrapatas, la introducción de ganado *Bos indicus*, o la cruza entre *Bos taurus* y *Bos indicus* (Jonsson *et al.*, 2000).

b) Control inmunológico

El control inmunológico se refiere a la utilización de vacunas para el control de garrapatas. Actualmente se encuentra en el mercado una vacuna elaborada con metodología de biología molecular que utiliza como antígeno una proteína de las células digestivas del intestino de la garrapata (antígeno recombinante Bm96). En investigaciones recientes sobre la utilización de la vacuna se ha observado que no se produce ningún efecto sobre larvas, algo sobre ninfas y el efecto significativo se tiene sobre garrapatas adultas con un efecto en la capacidad de oviposición en las

adultas que sobreviven. En términos prácticos la vacunación con Bm96 produce no más del 50% de disminución en el número de garrapatas en la primera generación, obteniéndose mejores resultados en las generaciones subsecuentes (Willadsen, 2004). Por esta razón la aplicación de las vacunas es combinada con el uso de acaricidas químicos.

c) Control biológico

Se ha investigado el uso potencial de patógenos y depredadores de garrapatas para el control de estas. Dentro de los patógenos que se han identificado se encuentran virus, bacterias rickettsiales y otras como *Cedacea lapagei*; protozoarios como *Haemogregarina mauritanica*, *Nosema ixodis*, *Nosema parkeri*, *Nosema slovacica*, *Theileria annulata*, *Babesia spp.*, y otros; hongos de los géneros *Beuveria*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Verticillium* y *Metarhizium*; Nemátodos de la familia Nermithidae, Heterorharbditidae y Steinernematidae (Samish y Rehacek, 1999).

Las investigaciones recientes se han enfocado en el estudio de hongos entomopatógenos principalmente de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (Willadsen P. , 2006). *M. anisopliae* ha sido ampliamente estudiado para el control biológico. *M. anisopliae* invade a *B. microplus* mediante un proceso que involucra la adhesión de las conidias a la cutícula, germinación y penetración a través de la cutícula, provocando la muerte de la garrapata; se han obtenido buenos resultados en el laboratorio, pero su eficacia en el campo todavía está siendo evaluada (Alonso-Díaz *et al.*, 2007; Fernández Ruvalcaba *et al.*, 2005).

Dentro de los predadores de las garrapatas se han identificado: artrópodos como las arañas (Araneida), ácaros (Acarina), hormigas (Hymenoptera), mariposas (Lepidoptera), chinches (Hemiptera) y escarabajos (Coleoptera); aves, mamíferos insectívoros, reptiles y roedores. Los predadores contribuyen a la reducción en la población de garrapatas sin embargo su importación no es recomendada, en cambio deben conservarse y aumentarse los predadores locales (Samish y Rehacek, 1999).

Actualmente está siendo evaluada la actividad ixodicida de plantas como *Dahlstedtia pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoidae, Milletiedae) cuyos extractos no han mostrado tener efecto significativo sobre las garrapatas en ensayos *in vivo* (Pereira y Famadas, 2006); *Hypericum polyanthemum*, cuyo extracto (n-hexano) resultó ser altamente tóxico para larvas de *B. microplus* en ensayos *in vitro* (Sardá-Ribeiro *et al.*, 2007) y extractos de las partes aéreas de *Calea serrata* (Asteraceae) que tuvieron efecto sobre la producción y eclosión de huevos de *B. microplus in vitro* (Sardá Ribeiro *et al.*, 2007) pero su aplicabilidad para el control de garrapatas a nivel de campo no ha sido determinada.

Resistencia a los acaricidas

El uso intensivo de los acaricidas químicos para el control o erradicación de la garrapata y otros insectos ha provocado el fenómeno de resistencia a los acaricidas.

La resistencia a los acaricidas se define como la habilidad de una población de parásitos, para tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de los individuos en una población normal (susceptible) de la misma especie (Stone y Haydock, 1972). Este fenómeno es una habilidad fundamental de los seres vivos, para evolucionar en condiciones ambientales cambiantes con el fin de sobrevivir bajo nuevas circunstancias.

La resistencia es una respuesta genético evolutiva de las poblaciones de artrópodos expuestas a un estrés ambiental severo y continuo, como son las aplicaciones frecuentes de un acaricida en condiciones de una fuerte presión selectiva (Soberanes *et al.*, 2005).

Las mutaciones son el mecanismo de resistencia observado más comúnmente pero existen algunos ejemplos de mecanismos metabólicos (Chevillon *et al.*, 2007). En cepas de garrapatas resistentes a los piretroides una mutación en los canales de Na⁺ le confiere muy alta resistencia tanto a DDT como a los piretroides. La afinidad de la acetilcolinesterasa por los organofosforados es cambiada en las

garrapatas resistentes (Temeyer *et al.*, 2007). Un segundo mecanismo de la resistencia a los organofosforados está ligado a la actividad de la citocromo monooxigenasa P450 (Chevillon *et al.*, 2007). Adicionalmente una esterasa metabólica específica con actividad de hidrolizar la permetrina, la CzEst9, se ha asociado a una alta resistencia a las permetrinas (Foil *et al.*, 2004). En cuanto a la resistencia a amitraz no ha sido descrito su mecanismo, pero hay alguna evidencia de que se puede deber a una mutación en el gen del receptor neuromodulador octopamine (Chen *et al.*, 2007).

El desarrollo de resistencia en *B. microplus* presenta tres fases, la fase de establecimiento que se refiere a la aparición del alelo en una población que se da por mutaciones al azar, la fase de desarrollo, que se refiere al aumento del número de individuos resistentes, que se da por la sobrevivencia de éstos sobre los susceptibles después de los tratamientos acaricidas. En esta fase, aunque la frecuencia absoluta del alelo de resistencia es aún baja, puede ocurrir la dispersión a otras propiedades. Y la fase de emergencia, que es una fase corta debida a la alta tasa de selección y se manifiesta una reducción en la efectividad del acaricida (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

La resistencia a los acaricidas en la garrapata *B. microplus* se ha incrementado como un problema para la ganadería mundial, y en México tiene gran importancia porque su distribución también coincide con las áreas tropicales, que son las zonas más importantes de la industria ganadera nacional (Soberanes Céspedes *et al.*, 2002).

Se ha reportado el fenómeno de resistencia desde los años 40's y 50's en Australia, Sudamérica y África, en que aparecen brotes de poblaciones de garrapata resistentes a diversos grupos de compuestos organoclorados, y a finales de los 50's y principios de los 60's se presenta en Australia y Sudáfrica resistencia a compuestos inhibidores de las colinesterasas como carbamatos y organofosforados. Para finales de los 70's ya se habían reportado en Australia cepas de garrapatas resistentes a amidinas y para inicios de los 80's se tenía conocimiento de resistencia a los piretroides sintéticos (cuadro 1).

Acaricida (año de introducción al mercado)	Países y años en que se reportó la resistencia de <i>B. microplus</i>
Arsénico (1893)	Australia, 1936; Argentina, 1936; Brasil 1948; Colombia, 1948; Uruguay, 1953; Venezuela, 1966
DDT (1946)	Argentina, 1953; Brasil, 1953; Australia, 1953; Venezuela, 1966; S. África, 1979.
Ciclodienos y Toxafeno (1947)	Australia, 1953; Argentina, 1953; Venezuela 1966; Colombia, 1966; S. África, 1979.
Organofosforados y carbamatos (1955)	Australia, 1963; Argentina, 1964; Brasil, 1963; Colombia, 1967; Venezuela, 1967; S. África, 1979; Uruguay 1983; México, 1986.
Formamidinas (1975)	Australia, 1981; Brasil, 1995; Colombia, 2000; México, 2002.
Piretroides (1977)	Australia, 1978; Brasil, 1989; México, 1994; Venezuela, 1995; Colombia, 1997; Argentina, 2000.
Lactonas macrocíclicas (1981)	Brasil, 2001

Cuadro 1. Casos de resistencia a acaricidas en garrapatas *B. microplus* (George *et al.*, 2004).

Desde 1981 se encuentra documentada en México, la resistencia en la garrapata *B. microplus* hacia acaricidas organoclorados y organofosforados. Esta se presentó en la zona del Golfo de México en la región de Tuxpan, Veracruz (Aguirre y Santamaría, 1986), a ésta cepa se le denominó “Tuxpan”. Posteriormente en 1984 se identificó otra cepa denominada “Tempoal” resistente a organofosforados y clorados. En 1993, ocho años después de autorizado el uso de piretroides, fueron detectados los primeros casos de resistencia hacia estos acaricidas, en el este de la República, en la región del Golfo de México, se caracterizaron las cepas “San Jorge” y “La Mora” con resistencia a los piretroides (Flumetrina, Deltametrina y Cipermetrina) y con mediana resistencia a organofosforados como Coumaphos y Clofenvinphos (Ortiz *et al.*, 1995). Posterior al establecimiento de resistencia a piretroides, se incrementó considerablemente el uso del amitraz ya que este

acaricida mostró ser efectivo para el control de cepas resistentes a piretroides. Sin embargo la alta presión de selección ejercida con el exagerado uso del amitraz sobre las poblaciones de garrapata *B. microplus* en las regiones del Golfo de México, propició que a principios del año 2001 se detectara una cepa de garrapata denominada “San Alfonso” que presentó características de resistencia a amidinas, organofosforados y piretroides sintéticos (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

El desarrollo de la resistencia en México a organofosforados y amidinas ha sido lento en comparación con la resistencia a piretroides sintéticos, la cual apareció rápidamente. La cepa “Tuxpan” resistente a organofosforados ha estado sometida a una alta presión de selección y necesitó más de 7 generaciones para obtener una población homocigota resistente, sin embargo en el caso de cepas resistentes a piretroides sintéticos colectadas en el campo se han encontrado la mayoría homocigotas resistentes (Foil *et al.*, 2004).

La resistencia de las garrapatas *B. microplus* a los acaricidas, representa un alto riesgo para la productividad de la ganadería mexicana (Santamaría *et al.*, 1999), además limita la exportación del ganado bovino a Estados Unidos, que es un país libre de este ectoparásito (Davey y George, 1998).

La resistencia a los acaricidas a nivel mundial ha provocado una gran necesidad de implementar estrategias más efectivas para el manejo de ésta. La perspectiva de tales estrategias es alentadora debido a los avances en el conocimiento de la bioquímica, genética molecular, ecología, dinámica poblacional de garrapatas entre otros.

Las tácticas recomendadas para el manejo de la resistencia se agrupan en tres categorías: el manejo por moderación que consiste en aplicación de dosis bajas y poco frecuentes, reconociendo en este manejo que los genes de susceptibilidad a los acaricidas son un recurso valioso que debe conservarse; la segunda categoría es el manejo por saturación, en la que se intenta saturar las defensas de los insectos por medio del uso de dosis suficientemente altas para anular la resistencia, ésta se recomienda durante los primeros estados de selección,

cuando los genes de resistencia son raros; y el manejo por ataque múltiple que se basa en la premisa de que el control se puede lograr mediante la acción de varios agentes que actúan de manera independiente, incluyendo diferentes acaricidas, donde se ejerce una presión de selección a un nivel tan bajo que no conlleva al desarrollo de resistencia.

El desarrollo de nuevos ixodicidas seguramente contribuirá a reducir el problema de resistencia y reducirá las enormes pérdidas económicas producidas por la infestación de garrapatas.

Carbamatos

Los carbamatos aparecieron junto con los organofosforados en la Segunda Guerra Mundial como desarrollo militar, en forma de gases neurotóxicos. Desde los años 50's han sido utilizados como insecticidas, fungicidas, nematocidas, y herbicidas actualmente algunos son usados como pesticidas y en productos farmacéuticos en combinación con otros compuestos.

Originalmente los carbamatos se extrajeron de la planta de origen Africano *Pysostigma venenosum* (frijol de calabar). Esta planta contiene fisostigmina que es un éster del metilcarbamato que es un inhibidor reversible de las colinesterasas. También llamados uretanos, los carbamatos son compuestos orgánicos que poseen una estrecha relación funcional con los carbonatos (Ordaz-Pichardo *et al.*, 2002).

Formalmente los carbamatos son el éster de un alcohol (ROH) y un ácido carbámico (monoamina del ácido carbónico). El ácido carbónico como tal, no existe, porque se descarboxila espontáneamente dando CO₂ y NH₃, en cambio si existen sus sales, los carbamatos (figura 7) que son cristalinas y estables a temperatura ambiente (Odilón, 1993).

La variedad de usos de los carbamatos es muy amplia, se han utilizado en la industria como materia prima en la elaboración de productos como relleno de colchones, sillas, hilos, telas, defensas para automóviles, pegamentos; en cosmetología como desodorantes. En la agricultura y medicina veterinaria como pesticidas (insecticidas, herbicidas), en medicina humana como antimicrobianos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antiulcerosos, anticarcinogénicos etc. (Odilón, 1993; Ordaz-Pichardo *et al.*, 1990)

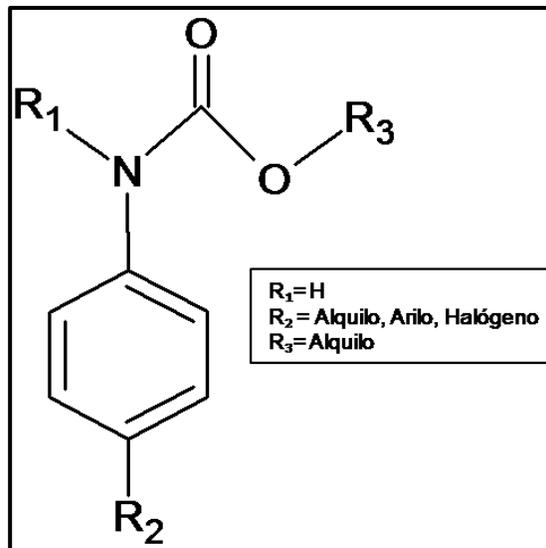


Figura 7. Estructura general de los carbamatos. (Odilón, 1993)

Algunos carbamatos como los N-metil carbamatos tienen una alta afinidad por las esterasas tales como la quimiotripsina, la acetilcolinesterasa, la pseudocolinesterasa, carboxilesterasa, paroxonas y otras esterasas no específicas. Así son capaces de inhibir reversiblemente la acetilcolinesterasa en el sistema nervioso (figura 8) en una reacción de carbamitación (Córdoba, 2006).

La acetilcolinesterasa cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, es la responsable de terminar la señal del impulso nervioso en las sinapsis colinérgicas, por lo que la inhibición de la acetilcolinesterasa produce parálisis y muerte (Baxter y Barker, 1998).

El grupo de investigadores del Dr. Enrique Ángeles Anguiano de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, se ha dedicado al diseño molecular, síntesis química y caracterización estructural del grupo de derivados del ácido carbámico utilizado en este proyecto. Algunos de estos carbamatos se les ha estudiado su actividad sobre diferentes organismos, por ejemplo:

Actividad antibiótica sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* y *Enterobacter aerogenes*, encontrando concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) entre 50 y 500 µg/ml (dependiendo del microorganismo). También se estudió la susceptibilidad de *Helicobacter pylori*, encontrando en este caso CMI entre 32 y 64 µg/ml (Guerrero, 2002).

Antiparasitarios: Se evaluó la eficacia de algunos derivados del ácido carbámico sobre cultivos de *Giardia lamblia*, encontrando concentraciones efectivas (CE) entre 18.16 y 181.6 µg/ml. También sobre *Hymenolepis nana*, que es un cestodo que parasita a el intestino de humanos y ratones, el cual resultó alterado en su morfología principalmente en la estructura y vellosidad de sus proglótidos, a concentraciones alrededor de 50 mg/kg de peso. También se ha evaluado la actividad antiamebiana de estos productos, encontrando que el carbamato LQM 996 y el LQM 177 tuvieron concentraciones efectivas (CE₉₀) de 125 y 25µg/ml respectivamente en inhibir el crecimiento de *Entamoeba histolytica* (Ordaz-Pichardo *et al.*, 2002).

Se ha evaluado la actividad antimicótica de estos carbamatos , encontrándose que el carbamato LQM 667 presentó una considerable inhibición del crecimiento de *T. mentagrophytes* y los carbamato LQM 938, LQM 996 y LQM 919 sobre *A. fumigatus* (Ruiz Saenz, 2004).

2. Justificación

Boophilus microplus es la garrapata más importante en las áreas tropicales y subtropicales de México, causa grandes pérdidas económicas a la ganadería. Durante muchos años, la estrategia más utilizada para el control de la garrapata ha sido el uso de acaricidas químicos, sin embargo la alta presión de selección ejercida por el uso exagerado de éstos ha provocado que aparezca el fenómeno de resistencia a los principales acaricidas comerciales. Lo anterior obliga a desarrollar nuevas alternativas farmacéuticas para el control de éstas garrapatas. Entre estas alternativas se encuentra el desarrollo de nuevas moléculas, a las cuales las garrapatas no han generado resistencia.

En la FES-Cuautitlán se han desarrollado una serie de carbamatos que potencialmente tienen actividad acaricida, su evaluación permitirá conocer su actividad sobre garrapatas *Boophilus microplus* y determinar su potencial uso como acaricidas.

3. Hipótesis

Los carbamatos de nueva síntesis evaluados en este trabajo tienen efecto sobre la mortalidad de larvas, inhibición de oviposición de hembras repletas y eclosión de larvas de garrapatas *Boophilus microplus*.

4. Objetivos

Objetivo general

Evaluar *in vitro* la eficacia de dieciocho nuevos carbamatos diseñados y sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por medio de las técnicas de paquete de larvas e inmersión de adultas, en una cepa de garrapatas *Boophilus microplus*.

Objetivos particulares

- Establecer una cepa de garrapatas *Boophilus microplus in vitro* en el laboratorio UIMSA-1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Así como el mantenimiento de la fase parásita de dicha cepa mediante la infestación artificial de bovinos.
- Evaluar los efectos de los carbamatos mediante la técnica de paquete de larvas para obtener porcentajes de mortalidad, y concentraciones letales CL_{50} y CL_{99} , de los productos que tengan efecto sobre las larvas.
- Evaluar los efectos de los carbamatos sobre garrapatas adultas repletas mediante la Técnica de Inmersión de Adultas y determinar los porcentajes de inhibición de oviposición e inhibición de eclosión producidos por dichos carbamatos.
- Determinar las concentraciones de los carbamatos necesarias para inhibir la eclosión de larvas (CIE_{50} , CIE_{99}) de los huevos ovipositados por las garrapatas tratadas.

5. Material y métodos

Ubicación

El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio 1 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Material biológico

Cepa de garrapatas *B. microplus*

Para este proyecto se utilizó una cepa de *B. microplus* susceptible a acaricidas convencionales utilizados en México. Dicha cepa fue donada por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) y se mantuvo la cepa *in vitro* en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA). Se utilizaron garrapatas adultas repletas y larvas de 7 a 14 días de edad para la evaluación de la efectividad de los carbamatos (anexo 1).

Animales

Se utilizaron seis bovinos de la raza Aberdeen Angus, de 200 a 300kg de peso, para el mantenimiento de la fase parásita de la cepa de garrapatas (anexo 2). Dichos bovinos se mantuvieron en condiciones de confinamiento total en infestaderos (figura 9) durante el tiempo que duró cada infestación artificial (aproximadamente 35 días). Después de cada periodo de infestación, se les dio a los animales un periodo de descanso en un corral, para que se recuperaran de los efectos producidos por la infestación (aproximadamente 30 días).

Las dimensiones de los infestaderos fueron calculadas para limitar el movimiento de los bovinos y de esta forma evitar el



Figura 9. Fotografía de los infestaderos.

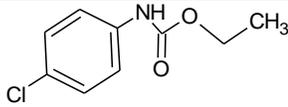
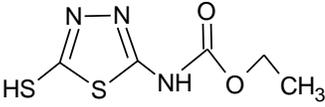
comportamiento de lamerse, así como para facilitar el manejo de los bovinos durante la recolección de las garrapatas. Los infestaderos se equiparon con comedero, bebedero y una charola en la parte inferior para la recolección de las garrapatas repletas.

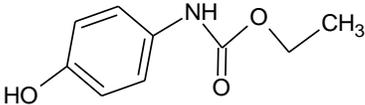
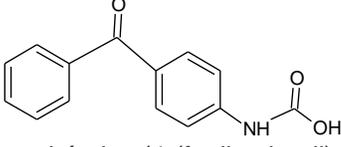
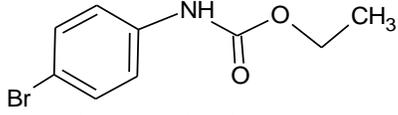
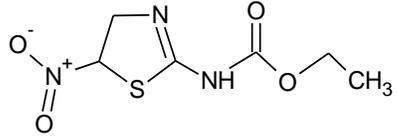
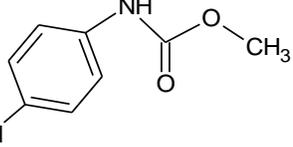
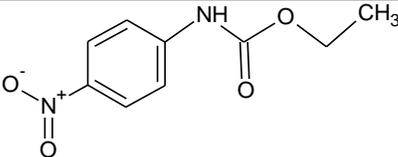
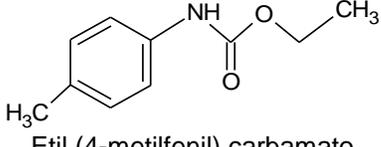
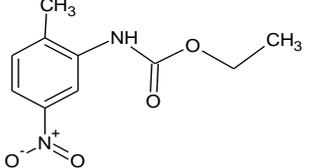
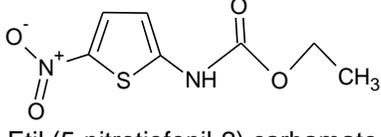
La alimentación de los bovinos consistió en forraje de avena, forraje de alfalfa y concentrado, las cantidades fueron calculadas de acuerdo a las tablas del NRC (National Research Council). El alimento se ofreció en tres horarios durante el día (7:00 hrs, 13:00 hrs. y 18:00 hrs.) para evitar que los bovinos se inquietaran por la falta de alimento. El agua se ofreció *ad libitum*.

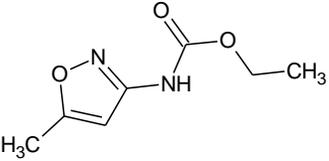
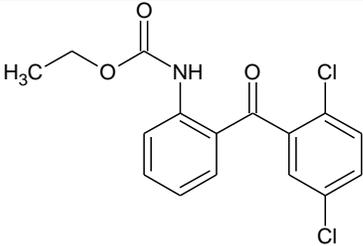
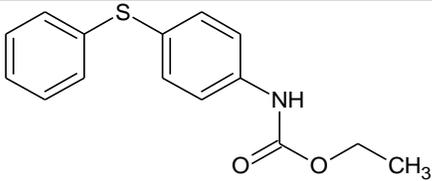
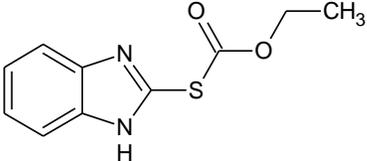
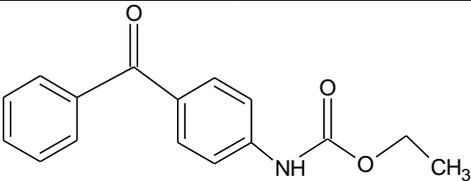
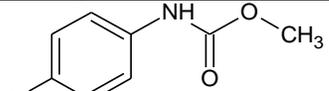
Carbamatos evaluados

Los carbamatos evaluados en el presente trabajo fueron diseñados y sintetizados en la Unidad de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Estos se sintetizaron usando aril y alquilaminas con hidruro de sodio y dietilcarbonato de benceno; se purificaron mediante cromatografía en columna y se recrystalizaron. Su estructura fue elucidada mediante las técnicas comunes de espectroscopía. Estos compuestos están sujetos a una patente (Ordaz-Pichardo *et al.*, 2004).

Los compuestos evaluados, que a partir de ahora serán nombrados por su clave de identificación, fueron los siguientes (cuadro 2):

CLAVE DE CARBAMATO	ESTRUCTURA Y NOMBRE QUÍMICO	PM (g/mol)
LQM 996	 Etil (4-clorofenil) carbamato	199.63
LQM 935	 Etil (5-sulfanil-1,4,4-tiadiazol-2-yl) carbamato	205.26

LQM 932	 <p>Diethyl hexano-1,6-diylbiscarbamato</p>	260.33
LQM 181	 <p>Etil (4-hidroxifenil) carbamato</p>	181
LQM 291	 <p>Ácido carbámico (4-(fenilcarbonil) fenil)</p>	241.24
LQM 919	 <p>Etil (4-bromofenil) carbamato</p>	244
LQM 938	 <p>Etil (5-nitro-4,5-dihidro-1,3-tiazol-2-yl) carbamato</p>	219.22
LQM 917	 <p>Metil (4-clorofenil) carbamato</p>	185.61
LQM 914	 <p>Etil (4-nitrofenil) carbamato</p>	210
LQM 906	 <p>Etil (4-metilfenil) carbamato</p>	179
LQM 903	 <p>Etil (2-metil-5-nitrofenil) carbamato</p>	224.21
LQM 006	 <p>Etil (5-nitrotiofenil-2) carbamato</p>	216.21

LQM 934	 <p>Etil (5-metil-1,2-oxazol-3-il) carbamato</p>	170
LQM 939	 <p>Etil [2-(2,5-diclorofenil) carbonil fenil] carbamato</p>	338
LQM 667	 <p>Etil [4-(fenilsulfanil) fenil] carbamato</p>	273
LQM 936	 <p>S-1H-benzimidazol-2-yl O-etil carbonotioato</p>	222
LQM 177	 <p>Etil 4-genzoilfenilcarbamato</p>	269
LQM 904	 <p>metil (4-bromofenil) carbamato</p>	230

Cuadro 2. Estructuras químicas y pesos moleculares de los carbamatos evaluados.

Diseño experimental

Los dieciocho carbamatos fueron evaluados por medio de las técnicas de paquete de larvas e inmersión de adultas. De las infestaciones artificiales de los bovinos se obtuvieron las garrapatas adultas para la Técnica de inmersión de adultas. De la reproducción de la cepa en el laboratorio se obtuvieron las larvas de *B. microplus* para la técnica de paquete de larvas. Basándose en los resultados obtenidos de los primeros ensayos, se seleccionaron los carbamatos con efecto significativo y se realizaron nuevos ensayos con la finalidad de encontrar las concentraciones efectivas de los mismos.

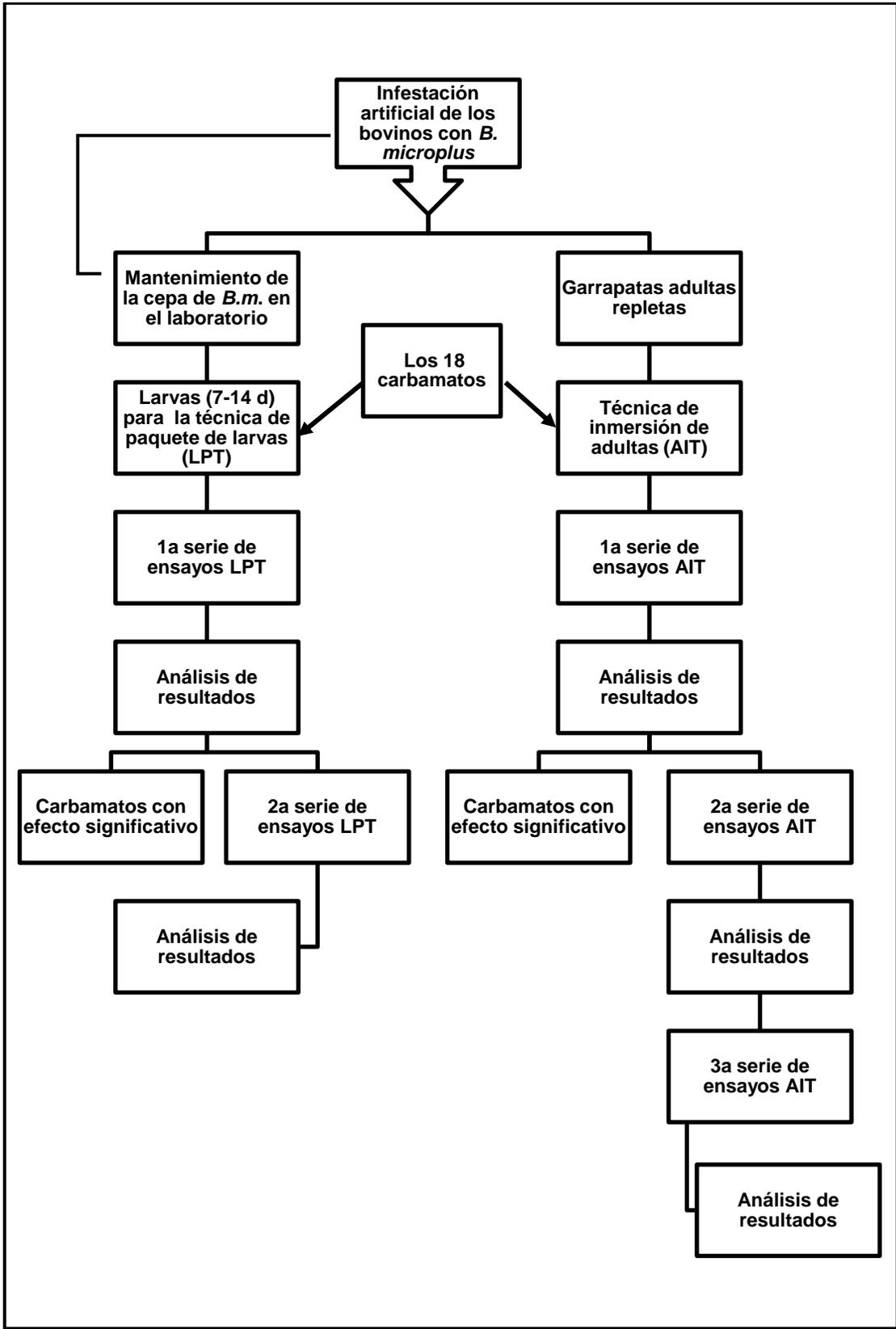


Figura 10. Diseño experimental

Técnicas para el diagnóstico de la susceptibilidad a acaricidas en larvas y adultas de la garrapata *Boophilus microplus*

Técnica de paquete de larvas (Stone y Haydock) o Larval Packet Test (LPT)

Esta técnica fue desarrollada por los investigadores australianos Stone y Haydock (Stone *et al.*, 1972). La Organización Mundial para la Agricultura y Alimentación (FAO) la ha propuesto como la metodología de elección para la detección de resistencia en todo el mundo.

Consiste en la exposición de larvas a papeles filtro impregnados con distintas concentraciones de los químicos a evaluar, con el objeto de obtener porcentajes de mortalidad del orden de 0 a 100 que serán analizados por medio de la metodología probit, ya que los efectos letales de los pesticidas están relacionados con los logaritmos de las concentraciones utilizadas (Stone *et al.*, 1972).

En la primera serie de ensayos se evaluaron los 18 carbamatos por medio de la Técnica de paquete de larvas (anexo 3). Para estos ensayos se prepararon ocho diluciones cuádruples seriadas de cada carbamato para realizar un tamizaje. Se realizaron dos repeticiones de cada ensayo.

Las concentraciones utilizadas para esta primera serie de ensayos fueron: 1%, 0.025%, 0.0625%, 0.0156%, 0.0039%, 0.0039%, 0.0009%, 0.0002% y 0% (testigo).

Posteriormente se evaluaron los carbamatos LQM 934 y LQM 938 debido a que dichos carbamatos tuvieron efecto significativo en la mortalidad de las larvas tratadas. Basándonos en los datos de las concentraciones efectivas obtenidas en la primera serie de ensayos se prepararon diferentes concentraciones de cada producto, que fueron las siguientes:

Para el carbamato LQM 934, las concentraciones de: 1%, 0.85%, 0.7%, 0.55%, 0.4%, 0.24% y 0% (testigo), con cuatro réplicas; y para el carbamato LQM 938 se utilizaron las concentraciones: 1%, 0.25%, 0.2125%, 0.175%, 0.1375%, 0.1%, 0.0625% y 0% (testigo), con cuatro repeticiones de la prueba.

De los ensayos anteriores no se obtuvieron datos suficientes para la estimación correcta de las concentraciones letales. Por lo que se realizó una última serie de ensayos con la Técnica de paquete de larvas a las siguientes concentraciones: Para LQM 934, 1%, 0.91%, 0.82%, 0.73%, 0.64%, 0.55% y 0% (testigo) y para LQM 938, 0.25%, 0.235%, 0.22%, 0.205%, 0.19%, 0.175% y 0% (testigo), con cuatro repeticiones de la prueba. Los datos obtenidos de esta última serie permitieron una estimación correcta de las concentraciones letales (CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} y CL_{99}) por medio de la metodología Probit.

Técnica de Inmersión de adultas (Adult Immersion Test: AIT)

La técnica de Inmersión de Adultas fue descrita por Drummond y ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico de susceptibilidad a acaricidas y para el diagnóstico de resistencia a acaricidas en la garrapata *Boophilus microplus* (de Freitas Fernandes *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2006; Sardá-Ribeiro *et al.*, 2007; Alonso-Díaz *et al.*, 2007).



Figura 11: Fotografía de hembras repletas de *B. microplus*

Para este proyecto se realizó la técnica descrita por Drummond, con algunas modificaciones (anexo 4). Se emplearon garrapatas adultas repletas recién recolectadas (figura 11). Primero se evaluaron los 18 carbamatos por medio de la técnica de Inmersión de adultas, con tres repeticiones, a la concentración de 1mg/ml, ya que se consideró que dicha concentración es lo suficientemente alta

para establecer una diferencia entre los productos con efecto y los productos sin efecto, de acuerdo a ensayos previos.

Los carbamatos que tuvieron efecto significativo en aumentar el porcentaje de inhibición de oviposición y disminuir el porcentaje de la eclosión de larvas en los grupos tratados (cuadro 10) fueron evaluados en una segunda serie de ensayos de AIT. Esta última con la finalidad de obtener una correcta estimación de la concentración de inhibición de eclosión de larvas (CIE), por medio de la metodología Probit.

Los carbamatos evaluados fueron los de clave: LQM 906, LQM 904, LQM 914, LQM 917, LQM 996 Y LQM 919. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 1mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625mg/ml, 0.03125mg/ml y 0% (testigos: testigo de DMSO y agua, testigo de únicamente agua). Se realizaron 3 repeticiones de cada prueba.

Análisis estadístico

Los datos de mortalidad de larvas, índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y porcentaje de eclosión fueron analizados por ANOVA una vía (one way) con un nivel de confianza del 95%, con el software Statistica 7 de StatSoft®. También se realizó la prueba de Tukey con el mismo software. Dicho análisis se realizó para determinar los grupos con efecto estadísticamente significativo en relación al grupo testigo.

Los datos de mortalidades obtenidas de los ensayos de la Técnica de paquete de larvas se analizaron con la metodología Probit (dosis-respuesta) usando el software Polo-Plus (Le-Ora, 2004). Este análisis permitió conocer las concentraciones letales: CL₁₀, CL₅₀, CL₉₀ CL₉₉ y sus respectivos límites de confianza al 95%.

Los datos de eclosión obtenidos de los ensayos con la Técnica de Inmersión de Adultas también se analizaron con la metodología Probit para determinar las concentraciones de inhibición de eclosión (CIE): CIE₅₀ y CIE₉₉.

6. Resultados

Mantenimiento de la cepa de garrapatas *B. microplus*

Durante el tiempo de realización del presente proyecto se obtuvieron tres generaciones de la cepa de *Boophilus microplus* susceptible a acaricidas comerciales en México. La fase parásita de las garrapatas se mantuvo mediante la infestación artificial de bovinos en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. La fase no parásita se mantuvo en el laboratorio UIMSA 1, de la misma facultad.

El mantenimiento de dicha cepa proporcionó el material biológico (larvas y adultas) suficiente para la realización de las técnicas de Paquete de Larvas e Inmersión de Adultas Repletas de este proyecto.

Resultados de la Técnica de Paquete de larvas (LPT)

En el cuadro 3 se presentan los resultados de la evaluación de los 18 carbamatos por la técnica de Paquete de larvas. Únicamente los carbamatos LQM 934 y LQM 938 tuvieron un efecto significativo sobre la mortalidad de las larvas ($p < 0.05$). El LQM 934 causó el 100% de mortalidad de larvas a la concentración de 1%. Mientras que el carbamato LQM 938 tuvo un efecto del 100% de mortalidad de larvas a las concentraciones de 1% y 0.25%. No existió diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el grupo testigo con agua y el grupo testigo con agua y DMSO.

En el cuadro 4 se presentan los datos de la mortalidad de larvas de *B. microplus* producida por el carbamato LQM 934. Como se observa en el cuadro, el carbamato tuvo efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la mortalidad de larvas a las concentraciones de 1%, 0.85%, 0.7% mientras que a la concentración de 0.55% no tuvo efecto ($p > 0.05$). En base a estos resultados, se llevó a cabo otra serie de ensayos de Paquete de Larvas, cuyas mortalidades medias ($\pm E.E.$) se presentan en el cuadro 5.

Estos datos fueron analizados por medio de la metodología Probit para obtener las concentraciones letales (CL), que fueron las siguientes: $CL_{10}=0.545\%$, $CL_{50}=0.644\%$, $CL_{90}=0.760\%$ y $CL_{99}=0.870\%$. Estos resultados se presentan en el cuadro 6.

En el cuadro 7 se presenta la mortalidad de larvas producida por el carbamato LQM 938 por medio de la técnica de paquete de larvas. Como se observa en el cuadro, el carbamato tuvo efecto significativo ($p<0.05$) sobre la mortalidad de larvas a las concentraciones de 1%, 0.25%, 0.2125%, 0.175% mientras que a la concentración de 0.1% no tuvo efecto ($p>0.05$). En base a estos datos, se llevó a cabo otra serie de ensayos con nuevas diluciones, para poder hacer una correcta estimación de la curva dosis-respuesta. Los datos obtenidos de estos ensayos se presentan en el cuadro 8. Estos datos fueron analizados por medio de la metodología Probit para obtener las concentraciones letales (CL) de dicho carbamato. Estas concentraciones letales se presentan en el cuadro 9 y fueron las siguientes: $CL_{10}=0.192\%$, $CL_{50}=0.0.226\%$, $CL_{90}=0.267\%$ y $CL_{99}=0.305\%$.

Resultados de la Técnica de Inmersión de Adultas (AIT)

En el cuadro 10 y figura 13 se presentan los datos obtenidos de la evaluación de los efectos de los 18 carbamatos por medio de la técnica de Inmersión de Adultas, con tres repeticiones de la prueba. Dichos carbamatos se evaluaron a la concentración de 1mg/ml sobre hembras repletas de *B.microplus*. Se presentan las medias ($\pm E.E.$) de los porcentajes de hembras que ovipositaron, porcentajes de inhibición de oviposición y porcentajes de eclosión.

En el porcentaje de hembras que ovipositaron no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre ninguno de los grupos tratados con cada carbamato, y los testigos.

Seis de los carbamatos evaluados tuvieron efecto significativo ($p<0.05$) en el aumento del porcentaje de inhibición de oviposición y en la disminución del porcentaje de eclosión de las larvas. Dichos carbamatos fueron: LQM 996, LQM 917, LQM 914, LQM 904, LQM 906 y LQM 919.

Estos seis carbamatos tuvieron efecto sobre las características físicas de los huevos ovipositados por las garrapatas tratadas. Se observaron los huevos desecados y con poca adherencia entre los huevos (figura 12).



Figura 12. Fotografía de huevos ovipositados por garrapatas tratadas con el carbamato LQM 904

Posteriormente se realizó otra serie de ensayos (tres repeticiones por prueba) con los carbamatos que tuvieron efecto significativo. Los resultados de dichos ensayos fueron los siguientes:

LQM 917

En el cuadro 11 y la figura 14 se presentan los resultados de la evaluación del carbamato LQM 917 por medio de la Técnica de Inmersión de Adultas a diferentes concentraciones (tres repeticiones por prueba). A la concentración de 1 mg/ml se observó el 65.46% de inhibición de oviposición y 0% de eclosión de larvas y la concentración de 0.5 mg/ ml se obtuvo el 67% de inhibición de oviposición y 0% de eclosión de larvas.

LQM 996

En el cuadro 12 y la figura 15 se presentan los resultados de la evaluación del carbamato LQM 996 por medio de la Técnica de Inmersión de adultas, usando diferentes concentraciones del producto (3 repeticiones de la prueba). A la concentración de 1 mg/ml se observó el 65.63% de inhibición de oviposición y 0% de eclosión de larvas; a la concentración de 0.5 mg/ ml se obtuvo el 58.63% de inhibición de oviposición y 0% de eclosión y a la concentración de 0.25 mg/ml se observó el 42.80% de inhibición de oviposición y 1.09% de eclosión de larvas.

LQM 914

En el cuadro 13 y la figura 16 se presentan los resultados de las pruebas con el carbamato LQM 914 a diferentes concentraciones por medio de la Técnica de Inmersión de Adultas. A la concentración de 1 mg/ml se observó el 50.78% de

inhibición de oviposición y 0% de eclosión de larvas; a la concentración de 0.5 mg/ml se observó el 42.42% de inhibición de oviposición y 0% de eclosión y a la concentración de 0.25 mg/ml se observó el 34.35% de inhibición de oviposición y 0 % de eclosión de larvas.

LQM 904

En el cuadro 14 y la figura 17 se presentan los resultados de la evaluación del carbamato LQM 904 por medio de la Técnica de Inmersión de Adultas, utilizando diferentes concentraciones del producto y tres repeticiones de la prueba. A la concentración de 1 mg/ml se obtuvo el 53.99 % de inhibición de oviposición y 8.13% de eclosión de larvas.

LQM 906

En el cuadro 15 y la figura 18 se presentan los resultados de la evaluación del carbamato LQM 906 por medio de la Técnica de Inmersión de adultas con diferentes concentraciones y tres repeticiones por prueba. A la concentración de 1 mg/ml se observó el 10.68% de inhibición de oviposición y 0% de eclosión de larvas; a la concentración de 0.5 mg/ ml se observó el 17.06% de inhibición de oviposición y 1.28% de eclosión.

LQM 919

En el cuadro 16 y la figura 19 se presentan los resultados de la evaluación del carbamato LQM 919 por medio de la Técnica de Inmersión de Adultas a diferentes concentraciones y 3 repeticiones por prueba. A la concentración de 1 mg/ml se observó el 56.89% de inhibición de oviposición y 0% de eclosión de larvas; a la concentración de 0.5 mg/ ml se observó el 54.95% de inhibición de oviposición y 0.46 % de eclosión y a la concentración de 0.25 mg/ml se observó el 38.98% de inhibición de oviposición y 14.33% de eclosión de larvas.

Concentraciones de Inhibición de Eclosión (CIE)

Los datos de los porcentajes de eclosión de larvas, de los ensayos de la Técnica de Inmersión de Adultas con los carbamatos LQM 904, LQM 906, LQM 919, LQM 917 y LQM 996 fueron sometidos al análisis Probit. Los resultados de dicho análisis se presentan en el cuadro 17. Como se puede observar, el carbamato LQM 996 tiene el mayor efecto sobre la eclosión ya que sus CIEs fueron: $CIE_{50}=0.121$ mg/ml y $CIE_{99}=0.279$ mg/ml; seguido del carbamato LQM 906 en el que se observó: $CIE_{50}=0.133$ mg/ml y $CIE_{99}=0.537$ mg/ml, el carbamato LQM 917 en el que se observó: $CIE_{50}=0.137$ mg/ml y $CIE_{99}=0.625$ y el carbamato LQM 919 en el que se observó: $CIE_{50}=0.097$ mg/ml y $CIE_{99}=0.687$ mg/ml. El producto que tuvo el menor efecto fue el LQM 904 con $CIE_{50}=0.661$ mg/ml y $CIE_{99}=1.493$ mg/ml.

Los datos obtenidos del carbamato LQM 914 no pudieron analizarse por medio de la metodología probit, ya que dichos datos no se adecuaron al modelo. Sin embargo dicho carbamato tuvo el efecto de inhibir completamente la eclosión de larvas a la concentración de 0.25 mg/ml.

CONCENTRACIÓN %	1	0.25	0.0625	0.0156	0.0039	0.0009	0.0002	0.00006	testigo
CARBAMATO									
LQM 936	0.00 ± 0.00	0.26 ± 0.20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.01 ± 1.53	1.04 ± 0.81	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.46 ± 0.35
LQM 904	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.44	0.64 ± 0.44	0.62 ± 0.48	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 938	100.00 ± 0*	100.00 ± 0*	2.69 ± 1.08	2.69 ± 1.08	0.18 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 932	59.21 ± 12*	0.12 ± 0.14	0.99 ± 0.76	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 934	100.00 ± 0*	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.61	0.00 ± 0.00
LQM 939	2.54 ± 1.17	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.44 ± 0.53	0.00 ± 0.00	0.11 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.45	0.00 ± 0.00
LQM 607	2.11 ± 1.15	0.62 ± 0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.22 ± 0.16	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 919	0.47 ± 0.32	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 906	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 917	0.21 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 903	0.00 ± 0.00	7.83 ± 1.24	3.13 ± 0.18	0.61 ± 0.15	0.00 ± 0.00	0.69 ± 0.45	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 181	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.55 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 935	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.18 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 006	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 996	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.18	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 177	0.29 ± 0.42	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.24	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 914	0.37 ± 0.34	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.21	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
LQM 291	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.16	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

Cuadro 3. Mortalidad de larvas de *Boophilus microplus* producida por 18 carbamatos diseñados y sintetizados en FES-Cuautitlán. Cada dato representa la media ± EE de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ese grupo tratado y su respectivo grupo testigo.

Concentración (%) de LQM 934	Mortalidad Media (\pmE.E.)	Valor p	I.C. 95% †
1	99.25 \pm 0.53*	P < 0.001	78.18 - 120.3
0.85	85.89 \pm 6.83*	P < 0.001	64.82 - 107.0
0.7	39.61 \pm 9.30*	P < 0.001	18.54 - 60.67
0.55	12.35 \pm 5.51	P > 0.05	-8.711 - 33.42
0.4	0.09 \pm 0.09	P > 0.05	-20.97 - 21.16
0.25	0.00 \pm 0.00	P > 0.05	-21.06 - 21.06
TESTIGO	0.00 \pm 0.00		

Cuadro 4. Mortalidad de larvas de *Boophilus microplus* producida por el carbamato LQM 934. Se presenta la media (\pm E.E.), el valor p y el † Intervalo de confianza para la diferencia de medias de los datos de mortalidades obtenidos de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa entre ese grupo tratado y el testigo (ANOVA una vía).

Concentración (%) de LQM 934	Mortalidad Media (\pmE.E.)	Valor p	I.C. 95% †
1	100.00 \pm 0.00*	P < 0.001	81.21 - 118.8
0.91	100.00 \pm 0.00*	P < 0.001	81.21 - 118.8
0.82	98.53 \pm 0.29*	P < 0.001	79.74 - 117.3
0.73	83.74 \pm 3.74*	P < 0.001	64.95 - 102.5
0.64	37.18 \pm 9.81*	P < 0.001	18.39 - 55.97
0.55	13.75 \pm 4.47	P > 0.05	-5.037 - 32.54
TESTIGO	0.00 \pm 0.00		

Cuadro 5. Mortalidad de larvas producida por el carbamato LQM 934. Se presenta la media (\pm E.E.), el valor p y el † Intervalo de confianza para la diferencia de medias de los datos de mortalidades obtenidos de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa entre ese grupo tratado y el testigo (ANOVA una vía).

Carbamato LQM 934 (análisis probit)	
n= 4878	pendiente = 7.760±0.468
Concentraciones letales (%)	I.C. 95%
CL ₁₀ =0.545	0.522 – 0.563
CL ₅₀ =0.644	0.629 - 0.658
CL ₉₀ =0.760	0.738 - 0.789
CL ₉₉ =0.870	0.872 - 0.924

Cuadro 6. Concentraciones letales del carbamato LQM 934. Datos obtenidos del análisis Probit (Polo-Plus Le-Ora Software).

Concentración (%) de LQM 938	Mortalidad Media (\pmE.E.)	Valor p	I.C. 95% †
1	98.46 \pm 0.67*	P < 0.001	91.49 - 105.4
0.25	99.82 \pm 0.18*	P < 0.001	92.85 - 106.8
0.2125	89.94 \pm 3.06*	P < 0.001	82.97 - 96.91
0.175	44.59 \pm 2.09*	P < 0.001	37.63 - 51.57
0.1375	3.21 \pm 2.19	P > 0.05	-3.764 - 10.18
0.1	0.00 \pm 0.00	P > 0.05	-6.970 - 6.970
0.0625	0.00 \pm 0.00	P > 0.05	-6.970 - 6.970
TESTIGO	0.00 \pm 0.00		

Cuadro 7. Mortalidad de larvas producida por el carbamato LQM 938. Se presenta la media (\pm E.E.), el valor p y el † Intervalo de confianza para la diferencia de medias de los datos de mortalidades obtenidos de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa entre ese grupo tratado y el testigo (ANOVA una vía).

Concentración (%) de LQM 938	Mortalidad Media (\pmE.E.)	Valor p	I.C. 95% †
0.25	98.77 \pm 0.23	P < 0.001	84.88 - 112.6
0.235	44.28 \pm 7.64	P < 0.001	30.40 - 58.17
0.22	28.22 \pm 1.65	P < 0.001	14.33 - 42.10
0.205	20.37 \pm 2.24	P < 0.001	6.485 - 34.25
0.19	7.50 \pm 1.42	P > 0.05	-6.383 - 21.38
0.175	8.92 \pm 1.72	P > 0.05	-4.965 - 22.80
TESTIGO	0.00 \pm 0.00		

Cuadro 8. Mortalidad de larvas producida por el carbamato LQM 938. Se presenta la media (\pm E.E.), el valor p y el † Intervalo de confianza para la diferencia de medias de los datos de mortalidades obtenidos de cuatro repeticiones de la Técnica de Paquete de Larvas. * indica diferencia significativa entre ese grupo tratado y el testigo (ANOVA una vía).

Carbamato LQM 938 (análisis probit)	
n= 5110	pendiente = 7.955±0.462
Concentraciones letales (%)	I.C. 95%
CL ₁₀ =0.192	0.183 - 0.198
CL ₅₀ =0.226	0.221 - 0.233
CL ₉₀ =0.267	0.256 - 0.284
CL ₉₉ =0.305	0.286 - 0.337

Cuadro 9. Concentraciones letales del carbamato LQM 934. Datos obtenidos del análisis Probit (Polo-Plus Le-Ora Software).

CARBAMATO	porcentaje de hembras que ovipositaron	índice de oviposición	porcentaje de inhibición de oviposición	porcentaje de eclosión
Testigo agua	100 ± 0.00	0.4934 ± 0.02	0.00 ± 0.00	70.38 ± 1.61
Testigo DMSO	93.33 ± 3.33	0.4347 ± 0.02	11.28 ± 3.66	56.17 ± 3.52
LQM 006	96.67 ± 3.33	0.4386 ± 0.03	10.49 ± 5.63	53.97 ± 5.50
LQM 177	100 ± 0.00	0.4601 ± 0.03	6.10 ± 5.11	66.16 ± 4.08
LQM 181	93.33 ± 3.33	0.4440 ± 0.02	-8.29 ± 4.59	65.61 ± 3.59
LQM 291	93.33 ± 6.67	0.4507 ± 0.04	8.01 ± 8.50	67.99 ± 5.76
LQM 607	96.67 ± 3.33	0.4533 ± 0.03	7.49 ± 5.18	70.32 ± 3.02
LQM 903	100 ± 0.00	0.5000 ± 0.01	-2.05 ± 2.05	70.51 ± 0.74
LQM 904	100 ± 0.00	0.1997 ± 0.02*	59.24 ± 3.82*	0.00 ± 0.00*
LQM 906	93.33 ± 6.67	0.3035 ± 0.03*	38.06 ± 5.33*	10.03 ± 1.91*
LQM 914	90.00 ± 10.00	0.1841 ± 0.02*	62.43 ± 4.70*	0.09 ± 0.09*
LQM 917	93.33 ± 6.67	0.2156 ± 0.03*	56.00 ± 6.71*	0.00 ± 0.00*
LQM 919	90.00 ± 10.00	0.1521 ± 0.04*	62.9 ± 9.59*	0.00 ± 0.00*
LQM 932	86.67 ± 3.33	0.3924 ± 0.02	4.3 ± 4.23	60.57 ± 5.87
LQM 934	83.33 ± 3.33	0.3800 ± 0.02	7.31 ± 4.67	66.89 ± 5.44
LQM 935	93.33 ± 6.67	0.4584 ± 0.05	6.44 ± 9.55	70.87 ± 2.57
LQM 936	96.67 ± 3.33	0.4405 ± 0.02	-7.43 ± 3.89	52.15 ± 7.98
LQM 938	100 ± 0.00	0.3940 ± 0.03	3.89 ± 7.59	63.5 ± 0.61
LQM 939	93.33 ± 3.33	0.4606 ± 0.00	6.01 ± 0.97	70.01 ± 5.99
LQM 996	96.67 ± 3.33	0.1551 ± 0.02*	68.35 ± 4.16*	0.00 ± 0.00*

Cuadro 10. Porcentaje de hembras que ovipositaron, índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por los carbamatos diseñados y sintetizados en FES-Cuautitlán sobre garrapatas adultas *B. microplus*. Cada valor representa la media (±EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

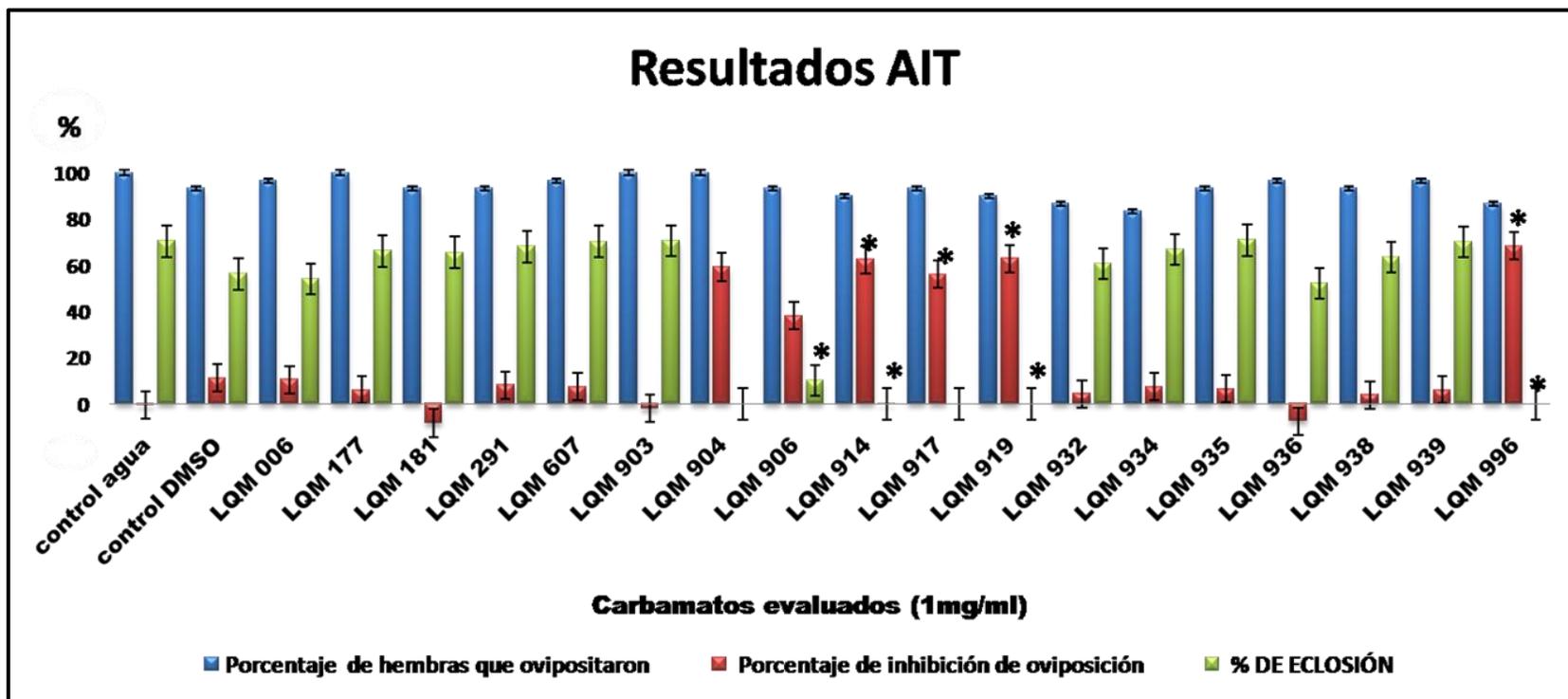


Figura 13. Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por los carbamatos diseñados y sintetizados en FES-Cuautitlán. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

LQM 917	Índice de oviposición (I0) (±EE)	% de inhibición de oviposición (±EE)	% de eclosión (±EE)
(1mg/ml)	0.1681 (±0.01)*	65.46 (±2.33) *	0.00 (±0.00)*
(0.5 mg/ml)	0.1569 (±0.02)*	67.76 (±4.56)*	0.00 (±0.00)*
(0.25 mg/ml)	0.3618 (±0.02)*	25.63 (±4.00)*	18.92 (±4.82)*
(0.125 mg/ml)	0.4216 (± 0.01)	13.34 (±2.63)	23.26 (±2.68)*
(0.0625 mg/ml)	0.4604 (±0.04)	7.54 (±8.62)	65.40 (±10.17)
(0.03125 mg/ml)	0.4448 (±0.03)	8.57 (±5.72)	70.88 (±0.74)
Testigo (H₂O)	0.4865 (±0.02)	0.00 (±0.00)	65.01 (±2.12)
Testigo (DMSO)	0.5001 (±0.03)	-2.79 (±5.45)	76.00 (±2.58)

Cuadro 11. Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 917. Cada resultado representa la media (±EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigo.

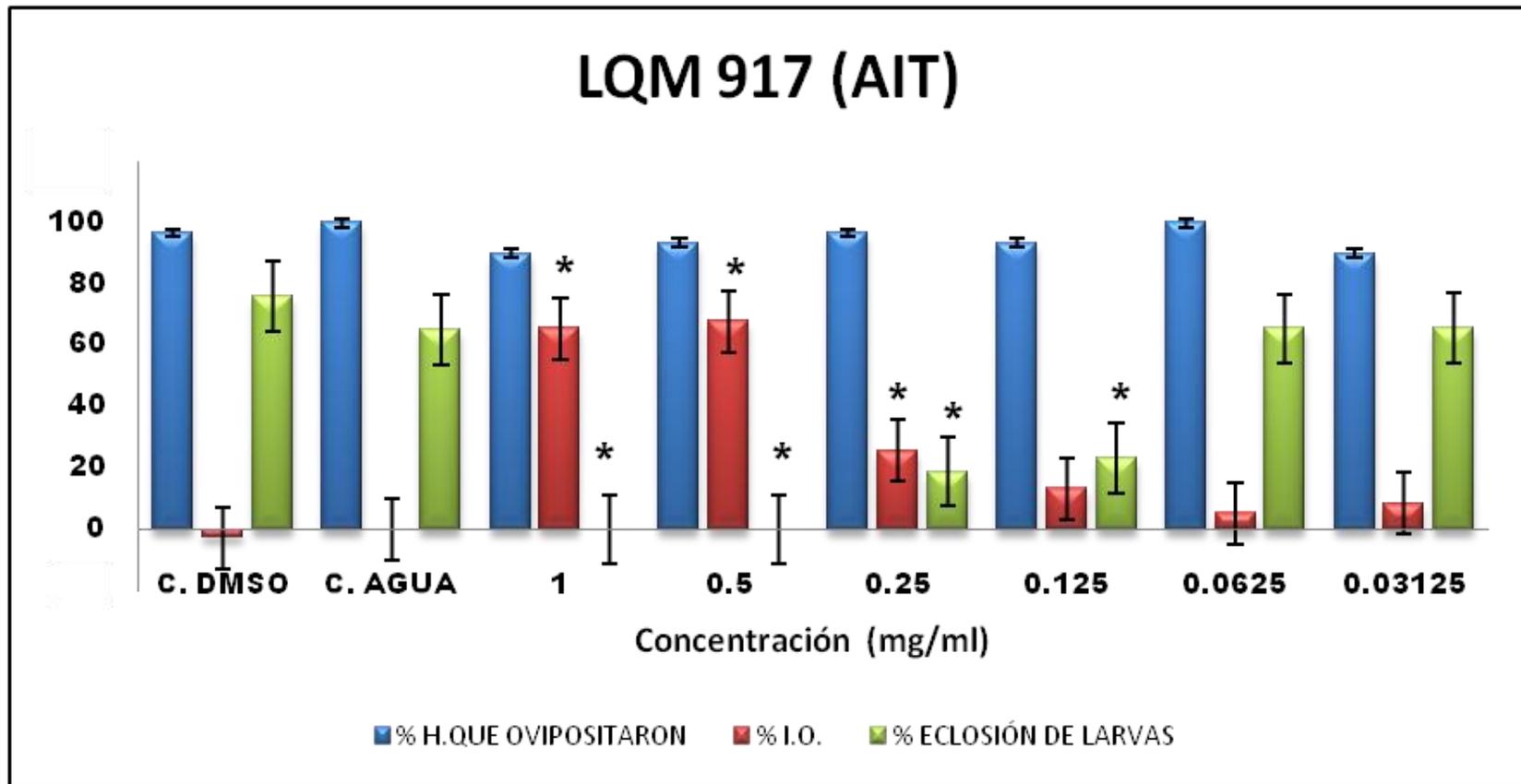


Figura 14. Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 917. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

LQM 996	Índice de oviposición (IO) (±EE)	% de inhibición de oviposición(±EE)	% de eclosión (±EE)
(1mg/ml)	0.1681 (±0.01)*	65.46 (±2.33)*	0.00 (±0.00)*
(0.5 mg/ml)	0.1569 (±0.02)*	67.76 (±4.56)*	0.00 (±0.00)*
(0.25 mg/ml)	0.3618 (±0.02)*	25.63 (±4.00)*	1.09 (±0.61)*
(0.125 mg/ml)	0.4216 (± 0.01)	13.34 (±2.63)	35.26 (±1.12)*
(0.0625 mg/ml)	0.4604 (±0.04)	7.54 (±8.62)	67.08 (±2.59)
(0.03125 mg/ml)	0.4448 (±0.03)	8.57 (±5.72)	68.73 (±2.14)
Testigo (H₂O)	0.4865 (±0.02)	0.00 (±0.00)	71.46 (±2.92)
Testigo (DMSO)	0.5001 (±0.03)	-2.79 (±5.45)	69.91 (±6.71)

Cuadro 12. Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 996. Cada resultado representa la media (±EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

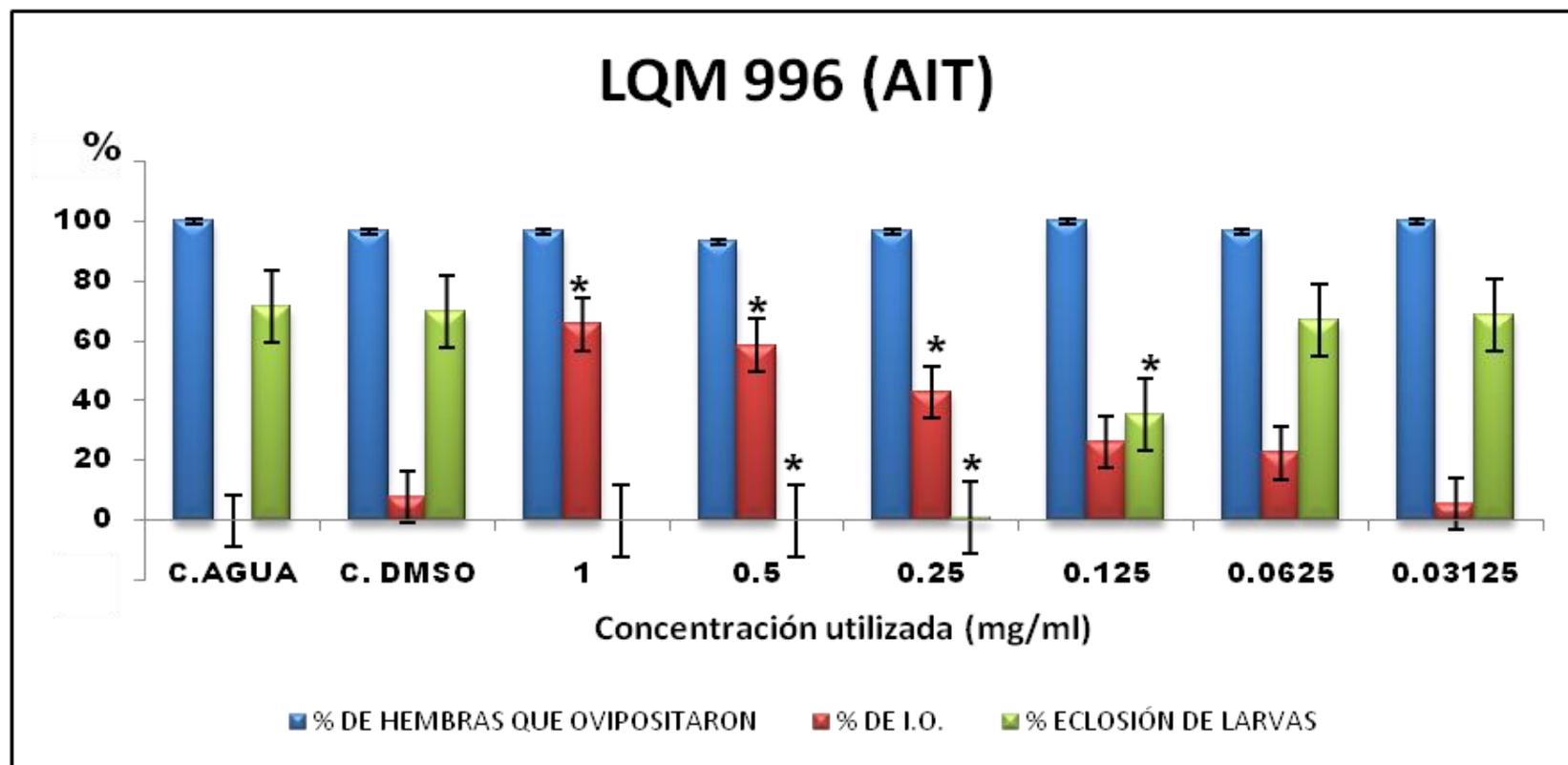


Figura 15. Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 996. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

LQM 914	Índice de oviposición (IO) (\pmEE)	% de inhibición de oviposición (\pmEE)	% de eclosión (\pmEE)
(1mg/ml)	0.2203 (\pm 0.01)*	50.78 (\pm 2.71)*	0.00 (\pm 0.00)*
(0.5 mg/ml)	0.2577 (\pm 0.02)*	42.42 (\pm 5.26)*	0.00 (\pm 0.00)*
(0.25 mg/ml)	0.2938 (\pm 0.01)*	34.35 (\pm 1.89)*	0.00 (\pm 0.00)*
(0.125 mg/ml)	0.4441 (\pm 0.02)	0.78 (\pm 3.65)	47.02 (\pm 9.07)*
(0.0625 mg/ml)	0.5010 (\pm 0.03)	-11.94 (\pm 6.20)	68.70 (\pm 4.30)
(0.03125 mg/ml)	0.4642 (\pm 0.03)	-3.73 (\pm 5.98)	67.40 (\pm 5.07)
Testigo (H₂O)	0.4476 (\pm 0.04)	0.00 (\pm 0.00)	69.57 (\pm 7.80)
Testigo (DMSO)	0.4502 (\pm 0.01)	-0.60 (\pm 2.74)	74.83 (\pm 4.29)

Cuadro 13. Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 914. Cada resultado representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

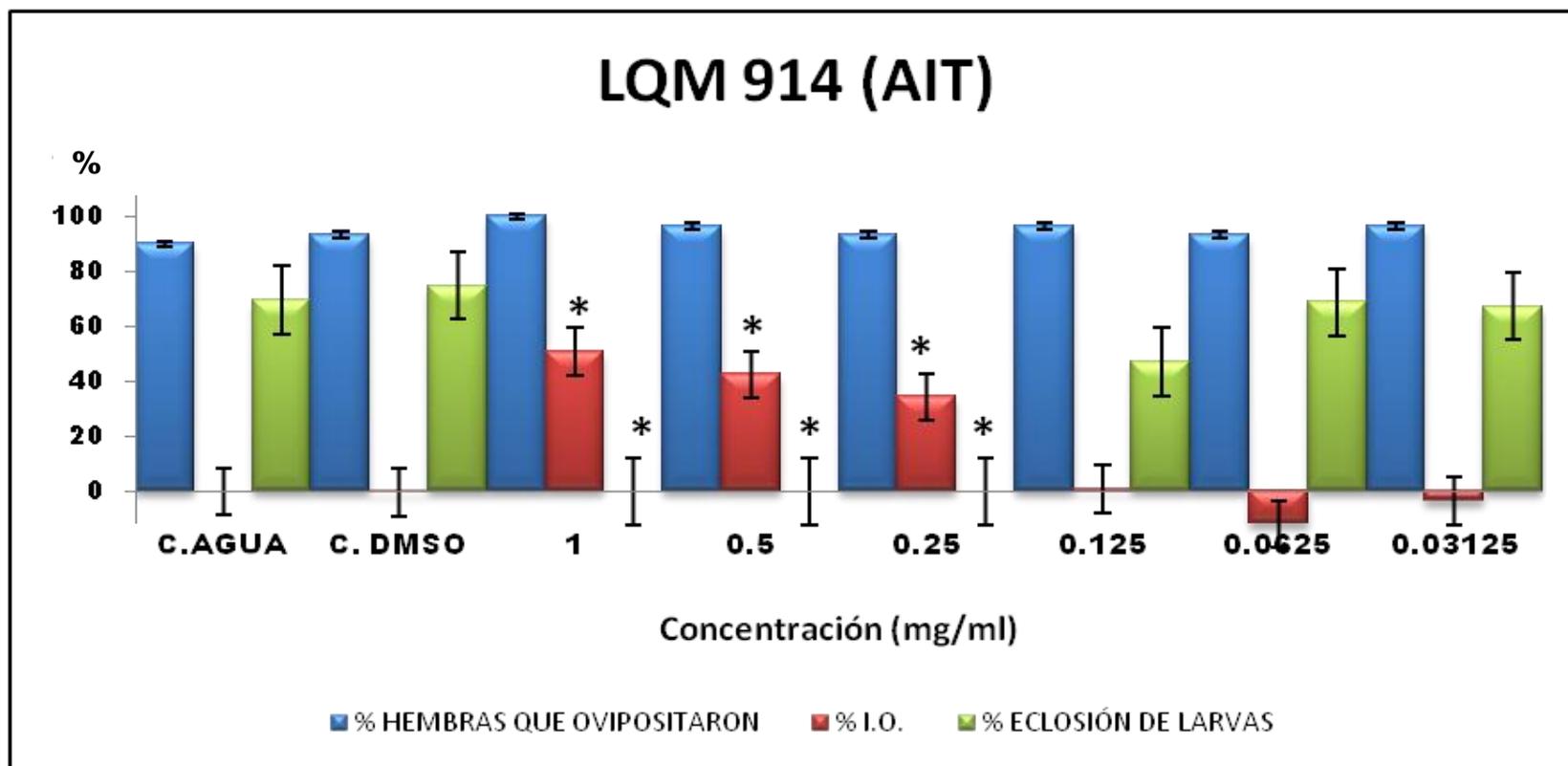


Figura 16. Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 914. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

LQM 904	Índice de oviposición (IO) (\pmEE)	% de inhibición de oviposición (\pmEE)	% de eclosión (\pmEE)
(1mg/ml)	0.1971 (\pm 0.02)*	53.99 (\pm 4.01)*	8.13 (\pm 1.46)*
(0.5 mg/ml)	0.1975 (\pm 0.03)*	53.91 (\pm 8.16)*	55.60 (\pm 4.23)
(0.25 mg/ml)	0.2379 (\pm 0.02)*	44.48 (\pm 3.51)*	58.91 (\pm 7.31)
(0.125 mg/ml)	0.4034 (\pm 0.04)	5.84 (\pm 8.65)	57.49 (\pm 3.85)
(0.0625 mg/ml)	0.4528 (\pm 0.02)	-5.67 (\pm 4.36)	65.95 (\pm 5.08)
(0.03125 mg/ml)	0.4386 (\pm 0.04)	-2.37 (\pm 10.39)	64.78 (\pm 1.49)
Testigos (H₂O)	0.4285 (\pm 0.02)	0.00 (\pm 0.00)	67.75 (\pm 1.34)
Testigos (DMSO)	0.4128 (\pm 0.02)	3.65 (\pm 4.63)	68.33 (\pm 5.20)

Cuadro 14. Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 904. Cada resultado representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

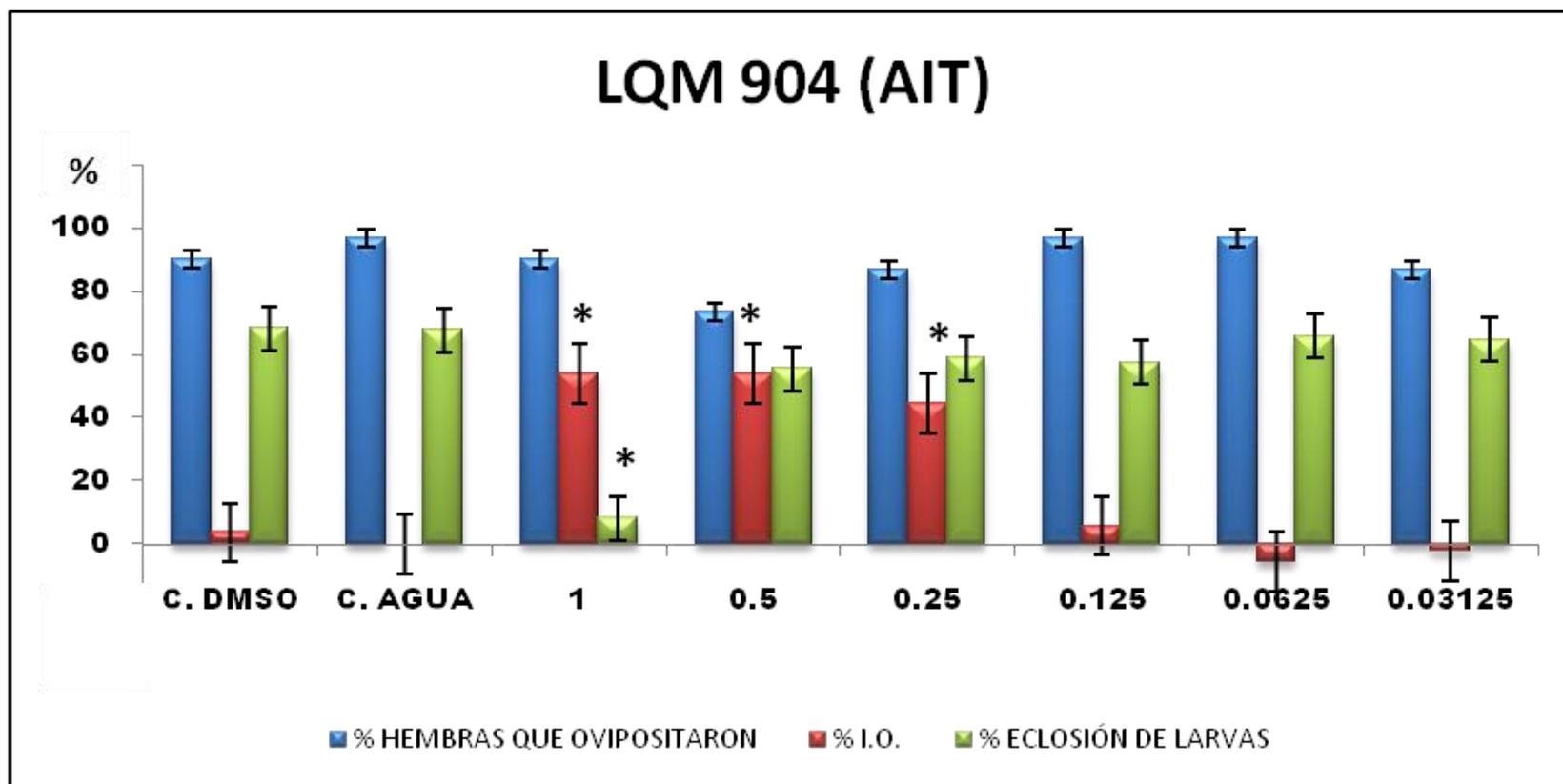


Figura 17. Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 904. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

LQM 906	Índice de oviposición (IO) (±EE)	% de inhibición de oviposición(±EE)	% de eclosión (±EE)
(1mg/ml)	0.3454 (±0.03)*	10.68 (±6.17)*	0.00 (±0.00)*
(0.5 mg/ml)	0.4259 (±0.03)	17.06 (±5.87)*	1.28 (±1.28)*
(0.25 mg/ml)	0.4690 (±0.02)	4.58 (±4.74)	8.66 (±4.63)*
(0.125 mg/ml)	0.4868 (±0.02)	5.21 (±3.81)	39.43 (±3.40)
(0.0625 mg/ml)	0.4705 (±0.01)	8.36 (±2.76)	53.70 (±7.26)
(0.03125 mg/ml)	0.5171 (±0.04)	-0.70 (±8.28)	65.10 (±4.13)
Testigo (H₂O)	0.5135 (±0.05)	0.00 (±0.00)	65.01 (±1.09)
Testigo (DMSO)	0.5285 (±0.03)	-2.92 (±6.01)	66.10 (±3.62)

Cuadro 15. Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 906. Cada resultado representa la media (±EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

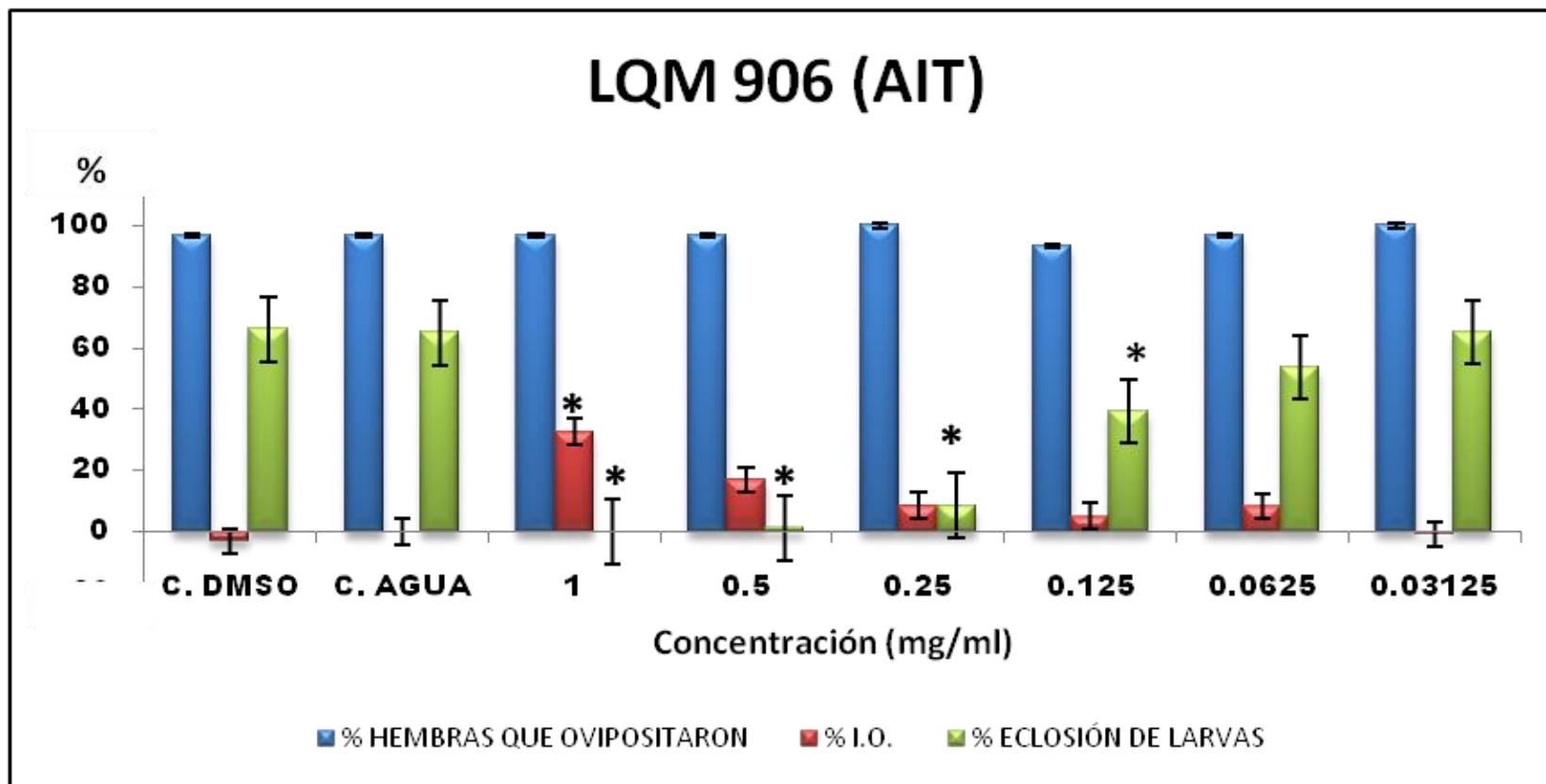


Figura 18. Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 906. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

LQM 919	Índice de oviposición (IE) (\pmEE)	% de inhibición de oviposición (\pmEE)	% de eclosión (\pmEE)
(1mg/ml)	0.2226 (\pm 0.00)*	56.89 (\pm 0.57)*	0.00 (\pm 0.00)*
(0.5 mg/ml)	0.2326 (\pm 0.03)*	54.95 (\pm 6.76)*	0.46 (\pm 0.32)*
(0.25 mg/ml)	0.3151 (\pm 0.05)*	38.98 (\pm 9.34)*	14.33 (\pm 3.41)*
(0.125 mg/ml)	0.4001 (\pm 0.04)	22.53 (\pm 7.75)	37.46 (\pm 6.13)
(0.0625 mg/ml)	0.4447 (\pm 0.03)	13.88 (\pm 6.53)	57.57 (\pm 3.38)
(0.03125 mg/ml)	0.5265 (\pm 0.04)	-1.95 (\pm 6.79)	75.46 (\pm 4.83)
Testigo (H₂O)	0.5164 (\pm 0.04)	0.00 (\pm 0.00)	75.81 (\pm 5.31)
Testigo (DMSO)	0.4914 (\pm 0.01)	4.85 (\pm 7.33)	73.91 (\pm 4.49)

Cuadro 16. Índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 919. Cada resultado representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

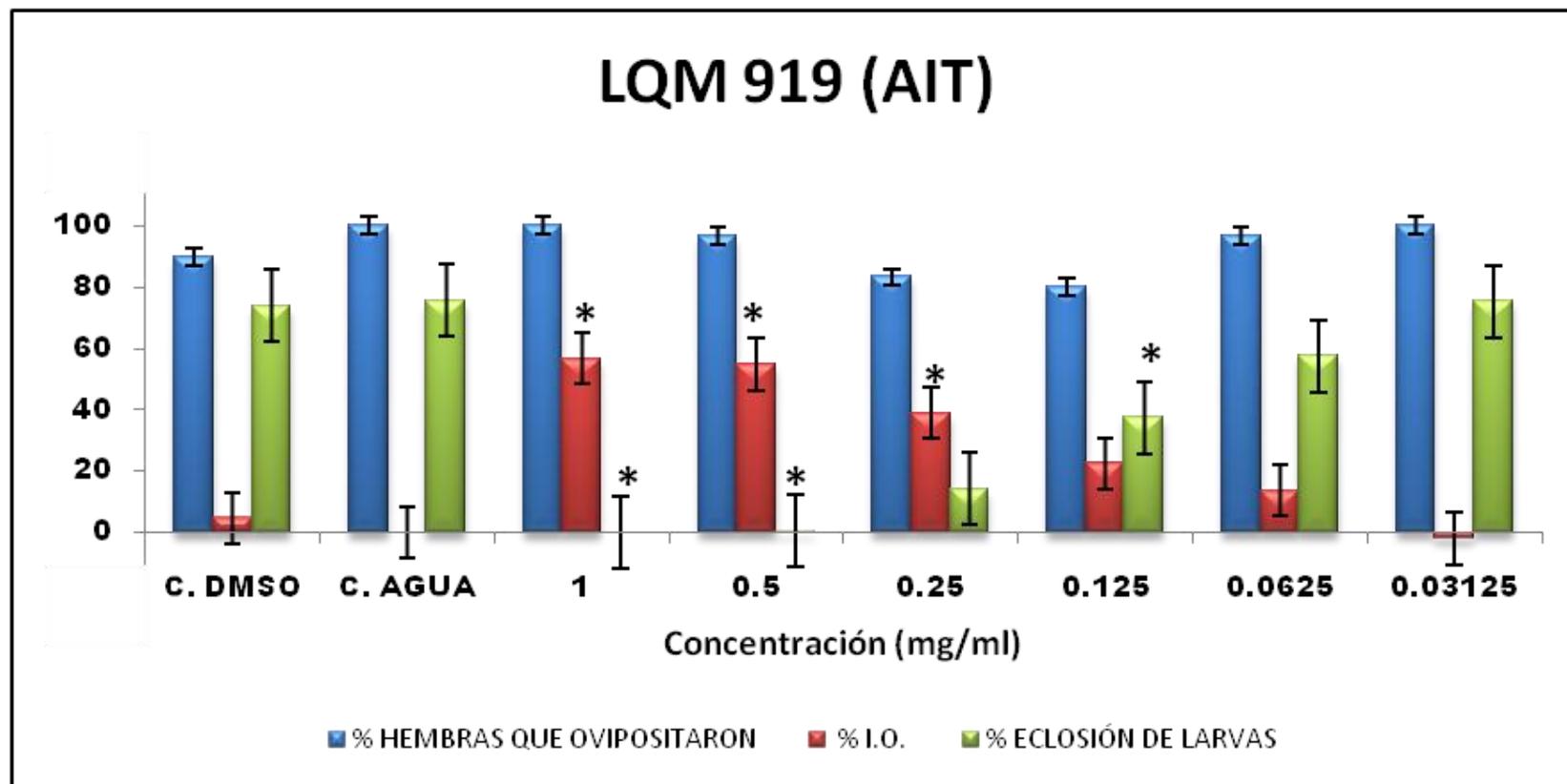


Figura 19. Porcentaje de hembras que ovipositaron, porcentaje de inhibición de oviposición y % de eclosión de larvas producidos por el carbamato LQM 919. Cada barra representa la media (\pm EE) de los datos obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas. Los * indican diferencia significativa entre estos grupos y los grupos testigos.

carbamato	pendiente	CIE₅₀ (mg/ml)	IC 95%	CIE₉₉ (mg/ml)	IC 95%
LQM 996	6.448 ± 0.461	0.121	0.114 - 0.128	0.279	0.249 - 0.326
LQM 917	3.528 ± 0.168	0.137	0.100 - 0.171	0.625	0.438 - 1.222
LQM 904	6.575 ± 0.504	0.661	0.515 - 0.755	1.493	1.218 - 2.419
LQM 906	3.836 ± 0.213	0.133	0.104 - 0.158	0.537	0.401 - 0.911
LQM 919	2.744 ± 0.092	0.097	0.083 - 0.112	0.687	0.526 - 0.994

Cuadro 17. Concentraciones de inhibición de eclosión (CIE₅₀ y CIE₉₉) de los carbamatos. Análisis Probit de los datos de eclosión de larvas obtenidos de tres repeticiones de la Técnica de Inmersión de Adultas (Polo-Plus Le-Ora Software).

7. Discusión

Boophilus microplus es una de las especies de garrapatas más ampliamente distribuida y constituye un serio problema para la ganadería de las regiones tropicales y subtropicales de México y de muchas otras partes del mundo. Las garrapatas son causa de enormes pérdidas económicas debidas a los efectos que ocasionan. Durante muchos años la estrategia de control más utilizada ha sido la aplicación de acaricidas químicos. El historial del uso de acaricidas en el mundo ha incluido diferentes productos como los arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas cíclicas, fenilpirazolonas, piretroides y lactonas macrocíclicas. Sin embargo el uso continuo de estos ha provocado el fenómeno de resistencia a los acaricidas.

Una alternativa para el manejo de la resistencia hacia los acaricidas es el desarrollo de nuevos fármacos hacia los cuales no se haya desarrollado resistencia, por lo anterior en este proyecto se evaluaron productos químicos de la familia de los carbamatos recientemente diseñados y sintetizados en la Facultad de Estudios superiores Cuautitlán de la UNAM.

Los carbamatos han sido utilizados principalmente como insecticidas, herbicidas, nematodocidas y fungicidas. El hecho de que los carbamatos tienen gran variedad de aplicaciones y por lo tanto propiedades muy diferentes, hace necesario evaluarlos individualmente y no extrapolar las características de los carbamatos conocidos a los de nueva síntesis.

La evaluación de los carbamatos se realizó mediante la Técnica de Paquete de larvas desarrollada por Stone y Haydock (Stone *et al.*, 1972). Se eligió dicha técnica porque la Organización Mundial para la Agricultura y Alimentación (FAO) la ha propuesto como la metodología de elección para la detección de resistencia a acaricidas, y muchos investigadores la han utilizado para evaluar el efecto de nuevos productos (Sardá-Ribeiro *et al.*, 2007; de Freitas Fernandes *et al.*, 2007; Bock *et al.*, 2004; Sabatini *et al.*, 2001). De los 18 carbamatos evaluados mediante

la técnica de paquete de larvas, los carbamatos con clave LQM 938 y LQM 934 tuvieron efecto sobre la mortalidad de las larvas. Los datos obtenidos de las diferentes diluciones con cada producto permitieron una estimación adecuada de las concentraciones letales, por medio del análisis probit. Se observó un mayor efecto con el carbamato LQM 938 con una $CL_{99}= 0.305\%$ que con el LQM 934 con una $CL_{99}=0.870\%$. Estas concentraciones letales son un poco altas, comparadas con las obtenidas de larvas tratadas con el organofosforado coumaphos en el que se obtuvo una $CL_{99}= 0.155\%$ o el piretroide permetrina $CL_{99}= 0.214\%$ (Davey *et al.*, 1998).

El criterio para tomar una larva como muerta fue la parálisis o incapacidad de movimiento. Al ser observadas las larvas tratadas al microscopio, notamos que la mayoría estaban paralizadas lo cual concuerda con el mecanismo de acción descrito para los carbamatos convencionales el cual es la inhibición de la acetilcolinesterasa, dicha enzima cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, que es la responsable de terminar la señal del impulso nervioso en las sinapsis colinérgicas, por lo que la inhibición de la acetilcolinesterasa produce parálisis y muerte (Baxter *et al.*, 1998).

Es importante mencionar que al evaluar el efecto de estos dos productos por medio de la Técnica de Inmersión de adultas, no provocaron la muerte de las garrapatas tratadas ni afectaron la oviposición, sin embargo no existen formas de determinar *in vitro* si algún fármaco provoca parálisis de las garrapatas adultas y que por lo tanto cause desprendimiento del hospedador. Por lo anterior, es necesario en futuros trabajos realizar pruebas *in vivo*, para evaluar los efectos de dichos carbamatos sobre los diferentes estadios de la garrapata (larva, ninfa y adultos).

También es importante notar que algunos reportes indican que existe resistencia cruzada entre los organofosforados y los carbamatos, ya que comparten el mecanismo de acción anteriormente descrito. La resistencia a organofosforados se ha asociado a un aumento en la actividad de esterasas y a la actividad de la citocromo monoxigenasa P450 (Chevillon *et al.*, 2007), mecanismos que también

pueden provocar resistencia a los carbamatos. Por lo anterior, es necesario realizar ensayos posteriores para evaluar la actividad del carbamato LQM 938 y el LQM 934 en cepas de garrapatas resistentes a organofosforados.

También se evaluaron los dieciocho carbamatos mediante la Técnica de Inmersión de Adultas descrita por Drummond (Drummond *et al.* 1976) la cual ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico de susceptibilidad a acaricidas y para el diagnóstico de resistencia a acaricidas en la garrapata *Boophilus microplus* (de Freitas Fernandes *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2006; Sardá-Ribeiro *et al.*, 2007; Alonso-Díaz *et al.*, 2007). Para realizar dicha técnica se hicieron modificaciones, como la utilización de dimetilsulfóxido para disolver a los carbamatos, ya que estos no son hidrosolubles por lo que se solubilizaron primero en DMSO antes de agregar el agua. Como no se ha documentado el efecto del dimetilsulfóxido sobre las garrapatas, se utilizó un grupo testigo adicional en el que se trató a las garrapatas con DMSO y agua, no se encontró diferencia significativa en ninguno de los parámetros evaluados en la prueba, entre este grupo y el testigo de únicamente agua. Por lo que concluimos que los efectos observados se deben al carbamato evaluado y no al DMSO.

Las primeras evaluaciones con la Técnica de Inmersión de Adultas se realizaron tratando a las garrapatas repletas con una concentración alta (1mg/ml) de cada producto para identificar a los productos con actividad sobre las garrapatas. Ninguno de los productos tuvo efecto sobre el porcentaje de hembras que ovipositaron, sin embargo los carbamatos: LQM 917, LQM 904, LQM 914, LQM 919, LQM 996 y LQM 906 demostraron tener efecto significativo sobre el índice de oviposición, porcentaje de inhibición de oviposición y porcentaje de eclosión de larvas. El índice de oviposición es la relación entre el peso de las garrapatas y el peso de los huevos, se observó que el índice de oviposición de las garrapatas tratadas por estos carbamatos fue significativamente menor que el índice de oviposición del grupo testigo, lo cual indica que la cantidad y peso de los huevos ovipositados por las garrapatas tratadas fue menor que la de los controles. El porcentaje de inhibición de oviposición es un dato que se obtiene a partir de los

índices de oviposición, en los seis carbamatos se observaron porcentajes de inhibición de oviposición por arriba del 50% lo cual indica que estos productos son capaces de inhibir la oviposición en más del 50%. Los huevos ovipositados por las garrapatas tratadas tuvieron alteraciones morfológicas, se observaron de menor tamaño, de coloración oscura, desecados y con poca adherencia entre ellos. Dichos huevos fueron incubados para verificar su viabilidad y resultaron ser no viables ya que no eclosionaron. Esto se reflejó en los resultados de inhibición de eclosión, ya que en los grupos tratados con estos productos se inhibió la eclosión en valores cercanos al 100%.

Posteriormente se trataron garrapatas repletas con diferentes concentraciones de cada uno de estos productos por medio de la técnica de Inmersión de Adultas. Los datos obtenidos de estos ensayos mostraron que existe una relación dosis-respuesta de los efectos observados, ya que los datos de eclosión permitieron la estimación de las concentraciones de inhibición de eclosión por medio del análisis probit., Dicho análisis mostró que el carbamato que tiene mayor actividad es el de clave LQM 996 ($CIE_{50}= 0.121$ mg/ml y $CIE_{99}=0.279$ mg/ml), ya que sus CIE_{50} y CIE_{99} son las menores, seguido de los productos LQM 906 ($CIE_{50}= 0.133$ mg/ml y $CIE_{99}=0.537$ mg/ml), LQM 917 ($CIE_{50}= 0.137$ mg/ml y $CIE_{99}=0.625$) y LQM 919 ($CIE_{50}= 0.097$ mg/ml y $CIE_{99}=0.687$ mg/ml). El producto que tuvo el menor efecto fue el LQM 904 con $CIE_{50}= 0.661$ mg/ml y $CIE_{99}=1.493$ mg/ml. Los datos obtenidos del carbamato LQM 914 no pudieron analizarse por medio de la metodología probit, ya que dichos datos no se adecuaron al modelo. Posiblemente aumentando el número de diluciones entre el rango de efectividad se pueda adecuar a dicho modelo. Sin embargo, dicho carbamato tuvo el efecto de inhibir completamente la eclosión de larvas a la concentración de 0.25 mg/ml.

Las concentraciones efectivas obtenidas de los productos evaluados en este trabajo pueden compararse con las concentraciones efectivas de acaricidas organofosforados sobre la cepa susceptible de *B. microplus* obtenidas mediante la técnica de inmersión de adultas reportadas por otros autores, los cuales obtuvieron las siguientes concentraciones efectivas: Coumaphos 200 ppm,

Chlorfenvinphos 300 ppm, chlorpyrifos 300 ppm, Ethion 560 ppm, flumetrina 40 ppm, cypermetrina 200 ppm, amitraz 150 ppm y deltametrina 20 ppm (Foil *et al.*, 2004) y en este proyecto se obtuvieron concentraciones efectivas para LQM 996= 0.279 mg/ml que equivalen a 279 ppm, LQM 906 = 0.537 mg/ml o 537 ppm y LQM 914=0.25 mg/ml o 250 ppm.

Es importante mencionar que los productos que tuvieron las actividades antes mencionadas, no tuvieron actividad larvicida. Ya que al ser evaluada su eficacia sobre larvas por medio de la técnica de paquete de larvas, no se observó parálisis ni muerte de las larvas tratadas a ninguna de las concentraciones de los productos. Lo anterior podría indicar que el mecanismo de acción de los productos que afectan la oviposición de las garrapatas tratadas es diferente al mecanismo descrito tradicionalmente para los carbamatos, de inhibir la enzima acetilcolinesterasa en las garrapatas. Booth *et al.* (1986) demostró que el tratamiento de hembras repletas con precocene produce la desecación de huevos por la ausencia de una capa externa que protege la pérdida de agua. Dicha capa es producida por las células glandulares del órgano de Gene en la garrapata y estos autores también demostraron que el precocene destruye el órgano de Gene (Booth *et al.* 1986). Los carbamatos evaluados en este trabajo con actividad sobre la inhibición de la oviposición tuvieron un efecto similar sobre los huevos, probablemente tengan el mismo mecanismo de acción del precocene. Futuros trabajos donde se evalúe por microscopía óptica y electrónica la integridad de dicho órgano responderán esta pregunta.

Por otra parte los carbamatos con actividad sobre la inhibición de la eclosión tienen una estructura química similar, por lo que probablemente tienen el mismo mecanismo de acción. Estos carbamatos tienen algunas similitudes con la estructura química de los carbamatos benzimidazoles, los cuales han mostrado tener interacción con los centros de organización de los microtúbulos, especialmente con uno de los dímeros que los forman, la β tubulina, de algunos protozoarios como *Trichomona vaginalis* y *Giardia lamblia*, además sobre helmintos y hongos, provocando efectos en la morfología y sobre el índice

mitótico en dichos parásitos (Katiyar *et al.*, 1994; Chavez *et al.* 1992; Penedo *et al.*, 2007) Por ejemplo se ha demostrado que el mecanismo de acción del flubendazol sobre *Toxocara canis* y *Ascaris suum* es el de impedir la polimerización de los microtúbulos en el interior de las células de dichos parásitos, provocando severos daños en su hipodermis e intestinos e impide la formación de gametos (Hanser *et al.*, 2003). Por lo anterior se requiere realizar estudios para determinar si este podría también ser un mecanismo de acción de los nuevos carbamatos sobre *B. microplus*.

Los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro* de estas nuevas moléculas son muy alentadores. Sin embargo, antes de utilizar dichos productos *in vivo*, es necesario evaluar su potencial tóxico. La toxicidad de los carbamatos presentes en el mercado es muy variada, en general son de media o baja toxicidad exceptuándose algunos productos como el carbaril, aldicarb, carbofurán, methomyl, lannate, methavin y nudrin que son de toxicidad alta. El methomyl está clasificado como altamente tóxico; el Aldicarb está clasificado como extremadamente tóxico ya que su DL₅₀ (dosis necesaria para matar el 50% de la población de prueba) se encuentra entre 0.3 y 0.9 mg/kg (de peso) en animales de experimentación (EPA, 1997); el propoxur se clasifica como ligeramente tóxico sin embargo es carcinogénico en animales de laboratorio; el carbaril se considera muy tóxico, con una DL₅₀ oral en ratas de 225 mg / kg y causa dermatitis alérgica en perros y dermatitis aguda e irritaciones en los seres humanos, mientras que la toxicidad de los benzimidazoles es baja (Pan pesticide database, 2009).

Por lo anterior son necesarios estudios futuros para determinar la toxicidad de los nuevos carbamatos utilizados en este proyecto. Los estudios toxicológicos que se requieren deben ajustarse a la guía técnica correspondiente de la Organización Mundial de la Salud y realizarse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio emanadas de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (INE, 2007).

En los últimos años se han investigado nuevas alternativas para el control de las garrapatas. Entre estas podemos mencionar la vacunación, el uso potencial de

patógenos y depredadores de garrapatas para el control de estas (Samish *et al.*, 1999), el estudio de hongos entomopatógenos, principalmente de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* (Willadsen, 2006), la actividad ixodocida de plantas como *Dahlstedtia pentaphylla* (Pereira *et al.*, 2006) y *Calea serrata* (Sardá Ribeiro *et al.*, 2007), combinaciones de productos químicos presentes en el mercado y el desarrollo de nuevos acaricidas químicos.

Actualmente se maneja el concepto de control integrado de ectoparásitos, el cual involucra la aplicación sistemática de dos o más tecnologías para el control de poblaciones de ectoparásitos (Willadsen, 2006). Por ejemplo combinar el uso de acaricidas químicos, con métodos alternativos como los antes mencionados, y medidas de manejo, además de conocer la dinámica poblacional de la garrapata en cada región para poder implementar tratamientos estratégicos (Redondo *et al.*, 1999). Como parte de este control integrado es importante el desarrollo de nuevos acaricidas a los cuales las garrapatas no han desarrollado resistencia.

8. Conclusiones

- Los productos que tuvieron efecto sobre la mortalidad de larvas fueron LQM 934 y LQM 938.
- Los productos LQM 919, LQM 996, LQM 917, LQM 914, LQM 904 y LQM 906 tuvieron efecto significativo en el aumento del porcentaje de inhibición de oviposición y en la disminución del porcentaje de eclosión de huevos de las garrapatas adultas repletas tratadas.
- Los efectos sobre el porcentaje de inhibición de oviposición, eclosión y el estado físico de los huevos observados en los productos LQM919, LQM996, LQM917, LQM914, LQM904 y LQM906 indican que dichos carbamatos tienen un mecanismo de acción diferente al de los carbamatos LQM 934 y LQM 938 con actividad larvicida.
- La evaluación de los efectos *in vitro* de los nuevos carbamatos sobre larvas y adultas de *B. microplus*, sugieren que son fármacos con un alto potencial para ser una buena opción farmacéutica para el control de la garrapatas.

9. Anexos

1. Infestación artificial de bovinos con la cepa de *B. microplus*

El procedimiento para la infestación artificial es el siguiente (figura 20):

- Introducción de los bovinos a los infestaderos. Se realiza dos días antes a la infestación artificial.
- Infestación artificial. Se infestó cada bovino con la eclosión de 1g de huevos de garrapatas *B. microplus* (aproximadamente 20 000 larvas de 30 días de edad). Las larvas se colocaron en el lomo del animal y con la ayuda de un pincel se distribuyeron a lo largo del dorso.
- Revisión periódica de los animales en infestaderos. Se realizó 3 veces al día para comprobar el bienestar de los bovinos y para vigilar la evolución del ciclo biológico de las garrapatas.
- Recolección de hembras repletas. La recolección de garrapatas hembras repletas se llevó a cabo a partir del día 21 y hasta el día 26 post-infestación. Se recolectaron las garrapatas repletas que cayeron del bovino a la charola del infestadero, y se desprendieron manualmente del cuerpo del bovino las garrapatas repletas de 5 a 8 mm de longitud. Una vez recolectadas, las garrapatas se llevaron al laboratorio.
- Tratamiento ectoparasiticida de los bovinos. Con la finalidad de evitar la dispersión de las garrapatas, los bovinos se bañaron por aspersion con amitraz, el día 30 post-infestación.
- Traslado de los bovinos de los infestaderos a su corral. Se realizó aproximadamente el día 35 post-infestación.
- Periodo de descanso. Se dio a los bovinos un periodo de descanso (de duración variable) con el fin de que estos se recuperaran de los efectos producidos por la infestación por garrapatas. Una vez transcurrido este tiempo los bovinos fueron nuevamente infestados artificialmente.



Figura 20. Diagrama del proceso de infestación artificial de los bovinos

2. Mantenimiento de la cepa de *B. microplus* en el laboratorio

La fase no parásita del ciclo biológico de la cepa de *B. microplus* se mantuvo en condiciones de laboratorio mediante el siguiente procedimiento (figura 22):



Figura 21. Huevos de *B. microplus*

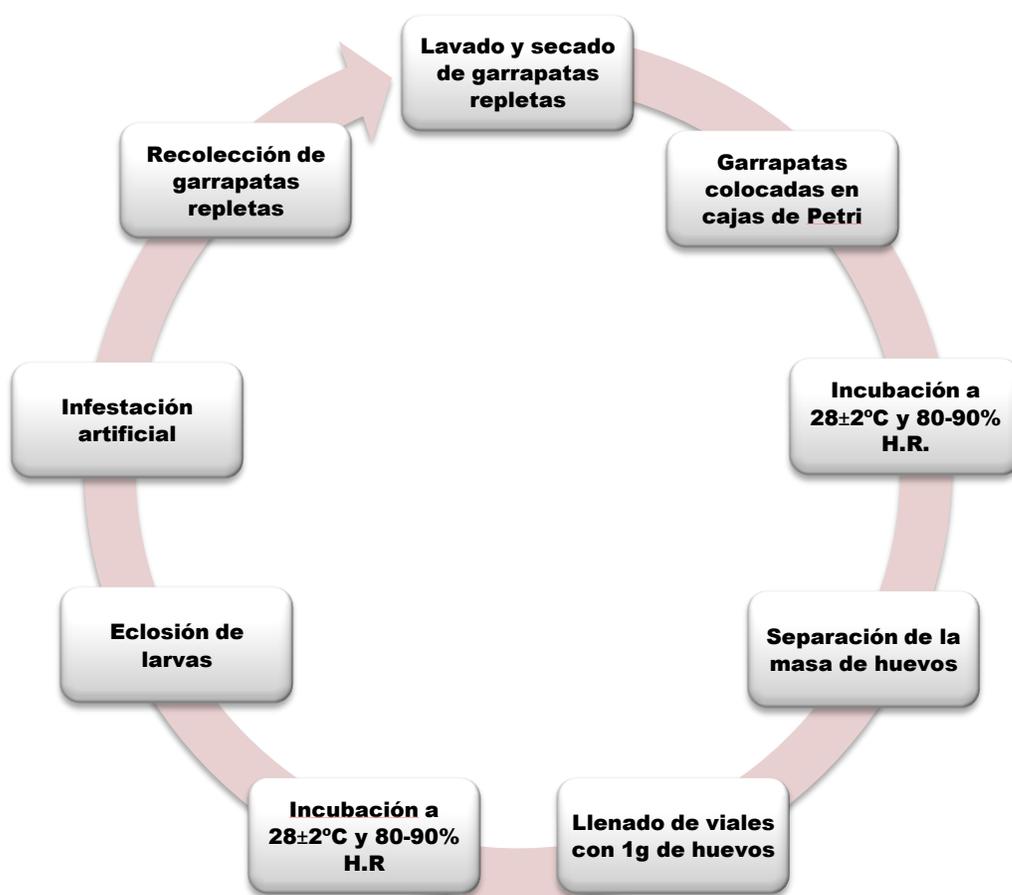


Figura 22. Diagrama del proceso de mantenimiento de la cepa de garrapatas *B. microplus*, *in vitro*.

- Las garrapatas adultas, fueron lavadas con agua corriente y secadas con toallas de papel.
- Colocación de las garrapatas en cajas de petri. Las garrapatas fueron colocadas en grupos de 20 garrapatas en cajas de petri desechables de 10 cm de diámetro. Las cajas se identificaron con el nombre de la cepa (FESC), número de generación, y fecha de recolección de las garrapatas.
- Incubación. Las cajas de petri con las garrapatas se incubaron en una estufa entomológica a la temperatura de 28 ± 2 °C y 80 a 90% de humedad relativa, durante 14 días para obtener la oviposición completa de las garrapatas.
- Separación de la masa de huevos (figura 21). La masa de huevos se recolectó de las cajas de petri con ayuda de una espátula.
- Colocación de los huevos en viales. Los huevos fueron pesados en una balanza analítica y se colocó 1g de huevos en cada vial de cristal. Posteriormente los viales se taparon con una torunda de algodón y se identificaron con el nombre de la cepa, fecha de recolección de las garrapatas y fecha de separación de la masa de huevos.
- Incubación de los huevos y larvas. Los viales con los huevos se incubaron en la estufa entomológica a una temperatura de 28 ± 2 °C y 80 a 90% de humedad relativa, durante 14 a 30 días hasta la eclosión de las larvas. Las larvas se incubaron bajo las mismas condiciones de esta forma pueden permanecer viables alrededor de 60 días (Davey *et al.*, 1991).

3. Técnica de Paquete de Larvas

El procedimiento para la Técnica de paquete de larvas fue el descrito a continuación.

Preparación de concentración inicial o solución madre.

Para la preparación de la solución madre, se consideró el valor porcentual de la solución a preparar, el volumen requerido y la concentración en que está el principio activo del químico a evaluar. Como diluyente se utilizó el tricloroetileno y como fijador el aceite de oliva en proporción 2:1.

Para conocer los gramos de principio activo necesarios para preparar la solución madre se empleó la fórmula de la figura 23. En el cuadro 18 se presenta un ejemplo de las cantidades utilizadas para la preparación de la concentración inicial o solución madre en este proyecto.

$\frac{(\% \text{ C.I.})}{(\mathbf{f} \cdot \mathbf{3})} \quad \frac{(100\%)}{(\% \text{ C.F.T.})} = \text{g de producto}$
<p>%CI = concentración (%) que se desea obtener. f = valor fraccionario que se asigna al volumen que se requiere preparar. (3)= constante, valor fraccionario del aceite de oliva en la mezcla, considerando que el tricloroetileno se evapora de la mezcla. %CFT= Porcentaje de concentración de la forma técnica del químico a utilizar.</p>

Figura 23. Fórmula para calcular los gramos de producto o de principio activo necesarios para preparar la solución madre

Cantidad de solución madre (ml)	10
%C.I.	1
f	10
f x 3	30
% C.F.T.	100
mg de principio activo	33.33
aceite de oliva (ml)	3.33
tricloroetileno (ml)	6.67

Cuadro 18. Preparación de solución madre

Preparación de diluciones

Se prepararon diluciones seriadas a partir de la solución madre. La elección del factor de dilución dependió de los resultados previos a cada ensayo.

Como dilución control se utilizó la mezcla de aceite de oliva y tricloroetileno, una parte de aceite de oliva por dos partes de tricloroetileno.

Impregnación de papeles filtro

Para los paquetes de larvas se utilizaron rectángulos de papel filtro Wathman No. 1 de 7.5 x 8.5 cm, previamente identificados con el nombre del producto utilizado y la dilución. Los papeles se impregnaron con las diluciones de los químicos a evaluar y se realizaron al menos dos repeticiones de cada dilución y testigos. La impregnación se realizó con la ayuda de una micropipeta graduada con capacidad de 1,000 μ l y se emplearon 670 μ l de la dilución correspondiente por cada papel

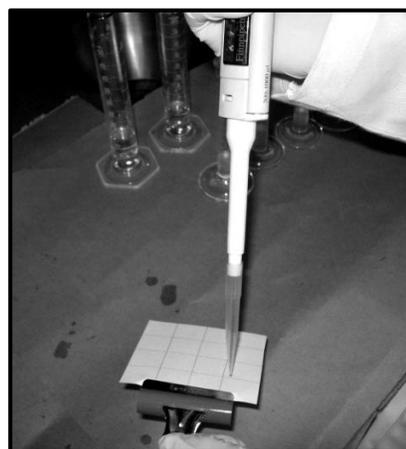


Figura 24. Fotografía de impregnación de papeles filtro.

(figura 24). Una vez impregnados los papeles se sujetaron con prensapapeles y se colgaron en un soporte de alambre galvanizado. Se dejaron secar por una hora con la finalidad de que se evaporara el tricloroetileno y en la superficie del papel quedara sólo el aceite de oliva y el químico a evaluar.

Armado y llenado de paquetes

Los paquetes se armaron doblando los rectángulos de papel filtro por la mitad, con la cara impregnada con el químico hacia adentro y sellando los extremos libres con prensapapeles. Se comenzó armando los paquetes a partir de los testigos hasta la concentración mayor.



Figura 25. Fotografía de la trampa para el llenado de paquetes de larvas

Para llenar los paquetes se armó una trampa. Dicha trampa consistió en una charola de plástico con agua y jabón detergente en polvo, y en el interior se colocó una caja de petri de cristal con el fondo hacia arriba, un par de vasos de precipitado con una aguja de disección y un pincel y por último el vial conteniendo las larvas sobre la caja de petri (figura 25).

Para esta técnica se utilizaron larvas de 7 a 14 días de edad. El llenado de paquetes se realizó colocando cada paquete, comenzando con los testigos, sobre la caja de petri. Con la ayuda del pincel y la aguja de disección se tomaron del borde del vial aproximadamente 100 larvas y se dejaron caer dentro del paquete. Cada paquete se cerró con un prensapapeles.



Figura 26. Paquetes de larvas

Incubación

Los paquetes se colocaron en una charola y se introdujeron en la estufa entomológica a temperatura de 28 ± 2 °C y con un rango de 80 a 90% de humedad relativa, en donde permanecieron por 24 horas (figura 26).

Lectura de resultados.

Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron las larvas de los paquetes de los grupos tratados y de los testigos. Las larvas sobrevivientes fueron capturadas con cinta adhesiva y se contabilizaron tanto muertas como vivas con ayuda de un contador de mesa. Todas las larvas con capacidad de caminar o deslizarse se consideraron como vivas. Posteriormente se calcularon los porcentajes de respuesta de mortalidad por dilución y sus valores medios.

4. Técnica de Inmersión de Adultas

El procedimiento para la técnica de inmersión de adultas fue el siguiente:

Preparación de concentración inicial y diluciones

La cantidad (mg) de cada carbamato evaluado, se disolvió primero en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), debido a que los carbamatos no son hidrosolubles. Una vez disuelto el carbamato se aforó con agua destilada. Se agregaron 25 ml de la solución a evaluar en cada vaso de precipitado. Como testigos se utilizó un testigo con agua destilada y otro testigo con 1ml de DMSO aforado a 25 ml con agua destilada. Se realizaron tres réplicas de cada concentración y testigos.

Garrapatas

Las garrapatas adultas repletas, recién recolectadas, se lavaron con agua corriente y se secaron con toallas de papel. Posteriormente fueron pesadas en grupos de 10 garrapatas en una balanza analítica.

Inmersión

Se colocó cada grupo de 10 garrapatas en un vaso de precipitado que contenía 25 ml de la dilución del químico a evaluar. Las garrapatas permanecieron inmersas durante 30 minutos (figura 27).



Figura 27. Fotografía de la inmersión de hembras adultas repletas, en diferentes diluciones de los productos evaluados.

Incubación.

Transcurrido el tiempo de inmersión, se decantó la solución y las garrapatas de cada grupo se secaron con toallas de papel. El grupo de garrapatas se adherió dorsalmente con cinta doble adhesivo en cajas de petri desechables. Cada caja se

identificó, con el nombre de la cepa, la fecha de realización de la técnica, clave de carbamato y concentración.

Las cajas de petri con las garrapatas se incubaron en la estufa entomológica a 28 ± 2 °C de temperatura y 80-90% de humedad relativa, durante 7 días.

Transcurridos los 7 días de incubación, se contó el número de garrapatas que ovipositaron en cada grupo. Posteriormente se incubaron por 7 días más bajo las mismas condiciones para obtener la oviposición completa de las garrapatas.

Separación de la masa de huevos.

La masa de huevos de cada grupo tratado y testigos, fue retirada con ayuda de una espátula. Los huevos se pesaron en una balanza analítica y se colocaron en viales de cristal identificados con los mismos datos que la caja de petri. Los viales se taparon con una torunda de algodón. Los viales con los huevos se incubaron bajo las mismas condiciones por 14 - 30 días hasta la eclosión de las larvas.

Conteo de la eclosión

Los viales se colocaron en una estufa a 60°C de T. por dos horas con la finalidad de matar las larvas.

Para contar los huevos eclosionados y no eclosionados, primero se homogenizó el contenido de cada vial. Se tomó una muestra aleatoria, lo suficientemente grande para llenar un campo de 100 mm². Con ayuda de un microscopio estereoscópico se contaron los huevos y los cascarones de todo el campo.

Parámetros evaluados

- Porcentaje de hembras que ovipositaron. Se calculó tomando los datos del número de hembras que ovipositaron en cada grupo tratado y controles, empleando la fórmula de la figura 28.

$$\frac{(\text{hembras que ovipositaron}) * (100)}{(\text{Hembras totales})} = \text{Porcentaje de hembras que ovipositaron}$$

Figura 28. Fórmula para calcular el porcentaje de hembras que ovipositaron

- Porcentaje de inhibición de oviposición. Para calcular el porcentaje de inhibición de oviposición de cada grupo, primero se calculó el índice de oviposición (IO) utilizando la fórmula de la figura 29. Una vez obtenido el IO, se calculó el porcentaje de inhibición de oviposición de cada grupo con la fórmula de la figura 30 (Sardá-Ribeiro, *et al.*, 2007).

$$IO = \frac{\text{Peso de los huevos (g)}}{\text{Peso de las hembras (g)}}$$

IO= Índice de oviposición

Figura 29. Fórmula para calcular el índice de oviposición

$$\% \text{ de inhibición de oviposición} = \frac{IO \text{ grupo testigo} - IO \text{ grupo tratado}}{IO \text{ grupo testigo}} * 100$$

IO= Índice de oviposición

Figura 30. Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición de oviposición

10. Referencias

Aguirre, J., Santamaría, V. 1986. Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados. VII Reunión Anual Asc. Mex. de Parasitología Veterinaria, A.C. Ciudad Victoria, Tamps. México.

Alonso-Díaz, M., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Ángel-Sahagún, R., Rodríguez-Vivas, R. *et al.*, 2007. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* (147): 336-340.

Alonso-Díaz, M., López-Silva, B., Magalhaes-Labarthe, A., y Rodríguez-Vivas, R. 2007. Infestación natural de hembras de *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 (Acari:Ixodidae) en dos genotipos de bovinos en el trópico húmedo de Veracruz, México. *Vet. Méx.* 38 (4): 503-509.

Alonso-Díaz, M., Rodríguez-Vivas, R., Fragoso-Sánchez, H., y Rosario-Cruz, R. 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch. Med. Vet.* 38 (2).

Anderson, J., Magnarelli, L. 2008. Biology of ticks. *Infectious disease clinics of North America.* (22): 195-215.

Barker, S., Murrell, A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology.* 7 (129): S15-S36.

Baxter, G., Barker, S. 1998. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick: *Boophilus microplus* characterization and role in organophosphate resistance. I. *Bio. and Mol. Biol.* (28): 581-599.

Bock, B., Jackson, L., De vos, A., y Jorgensen, W. 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology.* (129): S247-S269.

Booth, T., Beatdle, D., y Hart, D. 1986. The effects of precocene treatment on egg wax production in Gene's organ and egg viability in the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) an ultrastructural study. *Exp. Appl. Acarol.* (2): 187-189.

Bull, M., Swindale, S., Overend, D., y Hess, E. 2000. Suppression of *Boophilus microplus* populations with fluarzuron-an acarine growth regulator. *Aust. Vet. J.* (74): 468-470.

Castellanos, J. 1998. Seguimiento a predios con garrapata resistente hacia los ixodicidas y alternativas para su control. Curso de diagnóstico y control de las principales enfermedades parasitarias. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

Chavez, B., Cedillo-Rivera, R., y Martínez-Palomo, A. 1992. *Giardia lamblia*: Ultrastructural Study of the in Vitro Effect of Benzimidazoles. J. of Euk. Microbiol. 39 (4): 510-515.

Chen, A., Haiqi, H., y Davey, R. 2007. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. Vet. Parasitol. (148): 379-383.

Chevillon, C., Basile, K., Barré, N., Durand, P., Arnathau, C., y de Meeûs, T. 2007. Direct and indirect inferences on parasite mating and gene transmissions patterns Pangamy in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Infection, Genetics and Evolution. (7): 298-304.

Conacyt-Sagarpa. 2005. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas en el Sureste de México. Folleto técnico no.1.

Davey, R., y George, J. 1998. *In vitro* and *in vivo* evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. J. Med. Entomol. (35): 1013-1019.

Davey, R., Cooksey, L., y Despins, J. 1991. Survival of larvae of *Boophilus annulatus*, *Boophilus microplus* and *Boophilus hybrids* (Acari: Ixodidae) in different temperature and humidity regimes in the laboratory. Vet. Parasitol. (40): 305-313.

de Freitas Fernandes, F., y de Paula Zouza Freitas, E. 2007. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae:Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Vet. Parasitol. (147): 150-154.

Drummond, O., Ernst, E., Treviño, L., Gladney, J., y Graham, H. 1976. Test of acaricides for control of *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*. J. Econ. Entomol. (69): 37-40.

Duncan, C. 1997. Dynamics and impact of tick borne diseases of cattle. Trop. Anim. Health. Prod. (29): 1S-3S.

Estrela, A., Seixas, A., y Termignoni, C. 2007. A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitellin digestion activity. Comp. Biochem. and Physiol. (148): 410-416.

FAO. 1988. Recuperado en Marzo del 2009 de <http://www.fao.org/docrep/004/x6538e/X6538E03.htm>.

Fernández Ruvalcaba, M., Zhioua, E., y García Vázquez, Z. 2005. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. Téc. Pecu. Méx. 43 (3): 433-440.

Finney, D. 1971. Probit Analysis (3a. ed.). London: Cambridge.

Foil, L., Coleman, P., Eisler, M., Fragoso Sanchez, H., García Vazquez, Z., Guerrero, F., et al. 2004. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. Vet. Parasitol. (125): 163-181.

George, J., Pound, J., y Davey, R. 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. Parasitology. (129): S353-S366.

Guerrero, O. 2002. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de nuevos derivados del ácido carbámico sobre *Helicobacter pylori*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hanser, E., Mehlhorn, H., Hoeben, D., y Vlaminck, K. 2003. In vitro studies on the effects of flubendazole against *Toxocara canis* and *Ascaris suum*. Vet. Parasitol. 89: 63-74.

Horak, I., Camicas, J., y Keirans, J. 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodidae): a world list of valid tick names. Exp. Appl. Acarol. (28): 27-54.

INE. 2007. Instituto Nacional de Ecología. Recuperado en Abril de 2009 de <http://www.ine.gob.mx>

Inokuma, H., Kerlin, R., Kemp, D., y Willadsen, P. 1993. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. Vet. Parasitol. (47): 107-118.

Jongejan, F., y Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. Parasitology (129), S3-S14.

Jonsson, N., Bock, R., y Jorgensen, W. 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. Vet. Parasitol. (155): 1-9.

Jonsson, N., Matschoss, A., Pepper, P., Green, P., y Ansell, J. 2000. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). Vet. Parasitol. (89), 297-305.

Jonsson, N., Mayer, D., Matschoss, A., Green, P., y Ansell, J. 1998. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high-yielding dairy cows. *Vet. Parasitol.* (78): 65-77.

Jonsson, N.N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.* (137): 1-10.

Kashino, S., Resende, J., Sacco, A., y Rocha, C. 2005. *Boophilus microplus*. The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp. Parasitol.* (110): 12-21.

Katiyar, S., Gordon, V., McLaughlin, y Edlind, T. 1994. Antiprotozoal Activities of Benzimidazoles and Correlations with B-Tubulin Sequence. *Antimicrobial A. Chem.* 2086-2090.

Keane, S., Ryan, M. 1999. Purification, characterization, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella*. *Insect Biochemistry and molecular Biology.* (29): 1097-1104.

Le-Ora, Software. 2004. A user's guide to probit or logit analysis. Le Ora Software.

Li, A., Pruet, J., Davey, R., George, J. 2005. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* (81):145-153.

Lima, W., Ribeiro, M., y Guimaraes, M. 2000. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Trop. Anim. Health. Prod.*(32): 375-380.

Odilón, A. 1993. Síntesis de carbamatos a partir de aminas aromáticas. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

OECD. 1996. Organization for Economic cooperation and Development. Guidelines for Testing of Chemicals. Recuperado en Febrero de 2009 de <http://www.oecd.org>.

Oliveira, M., Oliveira Sequeira, T., Araujo Jr., J., Amarante, A., y Oliveira, H. 2005. Babesia Spp. infection in *Boophilus microplus* engorged females and eggs in Sao Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* (130): 61-67.

Ordaz-Pichardo, C., Ángeles-Anguiano, E., Villa-Treviño, S., Arriaga-Alba, M., y Garza-Amaya, M. 2002. Evaluación in vitro de derivados del ácido carbámico

como inhibidores del crecimiento de *Entamoeba histolytica*. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas. 5 (2): 127-137.

Ordaz-Pichardo, C., Shibayama, M., Villa-Treviño, S., y De la Garza, M. 2004. Patente nº PA/a/2004003417 (Instituto Mexicano de la propiedad Industrial). México.

Ortiz, E. 1999. El uso de ixodicidas en México. En: Segundo Seminario internacional de Parasitología animal: Garrapatas y enfermedades que transmiten, 57-65. Oaxtepec, Morelos, México.

Ortiz, E., Santamaría, V., Ortiz, N., Soberanes, C., Osorio, M., Franco, B. *et al.*, 1995. Caracterización de la resistencia de *B. microplus* a ixodicidas en México. III. Seminario internacional de parasitología animal."Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria". SAGAR-CANIFARMA-FAO-IICA-INIFAP. 58-66. Acapulco Guerrero, México.

Ouhelli, H., Pandey, B. 1982. The effects of temperature, humidity, photoperiod and weight of the engorged female on oviposition of *Boophilus annulatus* (SAY, 1821). Vet. Parasitol. (11): 231-239.

Pan pesticide database. 2009. Recuperado en Abril de 2009, de <http://www.pesticideinfo.org>

Penedo, C., Rocha, A. 2007. Effects of three benzimidazoles on growth, general morphology and ultraestructure of *Tritrichomonas foetus*. FEMS Microbiol. L. 275 (2): 292-300.

Pereira, J., Famadas, K. 2006. The efficiency of extracts of *Dahlstedtia pentaphylla* (Leguminosae, Papilionoidae, Millettidae) on *Boophilus microplus* (Cane-strini, 1887) in artificially infested bovines. Vet. Parasitol. (142): 192-195.

Pruett, J. 2002. Comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterase extracted from organophosphate resistant and susceptible strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J. Econ. Entomol. (95): 1239-1244.

Rajput, Z., Hu, S., Chen, W., Arijó, A., y Xiao, C. 2006. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. J. of Zhejiang University Science B. 7: 912-921.

Recanska, E. 1990. Effect of carbamate local anesthetics on artificial lipid membranes. Pharmazie. 45: 684-685.

Redondo, M., Fragoso, H., Ortiz, M., Montero, C., Lona, J., Mendelin, J., *et al.* 1999. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on

grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac (TM) and amidine treatments. *Exp. Appl. Acarol.* (23): 841-849.

Riek, R. 1957. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks.I. Tick anaemia. *Aust. J. Agric.* (8): 209-214.

Ruiz Saenz, L. 2004. Prueba de susceptibilidad a derivados del ácido carbámico de *Aspergillus fumigatus* y *Trichophyton mentagrophytes*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sabatini, G., Kemp, D., Hughes, S., Nari, A., y Hansen, J. 2001. Test to determine LC 50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* (95): 53-62.

Sagarpa .2009. Recuperado en Febrero de 2009, de www.sagarpa.gob.mx/dlg/guerrero/ganaderia/sanidades/capacitacion/imagenes/dis_garrapata.ppt

Samish, M., Rehacek, J. 1999. Pathogens and predators of ticks. *A. Rev. Entomol.* (44): 159-182.

Sardá Ribeiro, V., Avancini, C., Goncalves, K., Toigo, E., y Von Poser, G. 2007. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet. Parasitol.* (8):134-141

Sardá-Ribeiro, V., Toigo, E., Bordignon, S., Goncalves, C., y Von Poser, G. 2007. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* (147):199-203.

SENASICA. Procedimientos de técnicas para el diagnóstico de susceptibilidad a acaricidas en larvas y adultos de la garrapata *Boophilus microplus*. CENAPA-PD-1/0.1-26.

Senasica-Sagarpa. (2009). Recuperado en Febrero de 2009 de [Http/ www.senasica.sagarpa.gob.mx/web/](http://www.senasica.sagarpa.gob.mx/web/)

Soberanes Céspedes, N., Santamaría Vargas, M., Fragoso Sánchez, H., y García Vazquez, Z. (2002). Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Téc. Pecu. Méx.* 40 (1): 81-92.

Soberanes, N., Rosario, R., Santamaría, M., y García, V.Z. 2005. Variabilidad en la actividad general de esterases de la garrapata *Boophilus microplus* y su relación con la resistencia a organofosforados. *Instituto Nacional de Investigaciones, Agrícolas y Pecuarias.* 43 (2): 239-246.

Solorio, R., Rodríguez, V., Pérez, G. E., Wagner, G. 1999. Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern Yucatán. *Prev. Med. Vet.* (40), 261-269.

Solorio-Rivera, J., y Rodríguez-Vivas, R. 1997. Epidemiología de la babesiosis bovina.I. Componentes Epidemiológicos. *Rev. Biomed.* 8: 37-47.

Soulsby, E. 1988. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7,823. México: Interamericana.

Stone,B., y Haydock, K. 1972. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus*. *Bull. Entomol. Res.* (53): 563-578.

Temeyer, K., Pruett, J., Olafson, P. y Chen, A. 2007. R86K a Mutation in BmAChE3 Yielding a *Rhipicephalus microplus* organophosphate insensitive acetylcholinesterase. *J. Med. Entomol.*, 44, 1013-1018.

U.S. EPA. 1988. Aldicarb: Special review technical support document. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C. Recuperado en Marzo de 2009 de [Http/www.epa.org](http://www.epa.org)

Willadsen, P. 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology.* (129): S367-S387.

Willadsen, P. 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol.* (138): 161-168.