



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Eficacia de nuevos compuestos derivados del ácido
bórico sobre garrapatas
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

SANDRA LIZETH ITURBE REQUENA

ASESOR:

Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

CO-ASESOR:

Dr. Fernando Alba Hurtado



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

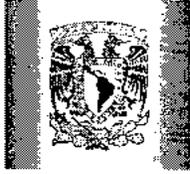


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicarle a usted que revisamos **LA TESIS:**

Eficacia de nuevos compuestos derivados del ácido bórico sobre garrapatas Rhipicephalus (Boophilus) microplus.

Que presenta la pasante: **Sandra Lizeth Iturbe Reguena**
Con número de cuenta: **40706822-7** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Enero de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MVZ. Gloria Josefina Ortiz Gasca	
VOCAL	MVZ. Irma Tovar Corona	
SECRETARIO	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
1er SUPLENTE	MC. Javier Alejandro Buendía Jiménez	
2do SUPLENTE	QFB. Patricia Jeane Domínguez Quiñones	

NOTA: los sinodales supientes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Agradecimientos

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán y al Dr. Fernando Alba Hurtado, por brindarme su confianza, por darme la oportunidad de realizar este proyecto y por contribuir a mi formación profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por apoyarme en mi formación académica, por permitirme ser parte de esta gran institución y convertirme en una profesionista y una mejor persona.

A la sección de Química Orgánica del Departamento de Ciencias Químicas de la FESC-UNAM, en especial al Dr. René Miranda Ruvalcaba y al cDr. Joel Omar Martínez por diseñar y sintetizar los productos utilizados en este trabajo.

Al M. en C. César Cuenca Verde, técnico del laboratorio, por su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al laboratorio de inmunología y biología molecular de parásitos que a través del Proyecto PAPIIT IN22331 hicieron posible la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado: M.V.Z. Gloria Josefina Ortiz Gasca, M. en C. Irma Tovar Corona, M. en C. Javier Alejandro Buendía Jiménez y Q.F.B. Patricia Jeane Domínguez Quiñones, por enriquecer este trabajo con sus acertadas observaciones.

A la M. en C. María Guadalupe Prado Ochoa, por su amistad, sus valiosas enseñanzas y a través de su ejemplo su contribución a mi formación profesional.

Al M.V.Z. Ricardo Alfonso Gutiérrez Amézquita por su apoyo incondicional durante la carrera y la realización de este trabajo.

A todos muchas gracias.

Dedicatorias

A mis padres Lidia y Marcos y mi hermana Nayeli:

Por ser los mejores guías, por estar conmigo en todo momento y apoyarme para realizar lo que más quiero en la vida. Los amo.

A Ricardo:

Por ser mi compañero incondicional, mi mejor amigo y permitirme compartir la vida contigo. Te amo.

A mis amigos:

Azalea, Ricky, Fany, Maresa, Carlos y Alhelí, por su apoyo, cariño y por brindarme su amistad sincera. Los quiero.

A Bongo por enseñarme el hermoso camino de la Medicina Veterinaria, a Truck, Roño, Bony, Junior, Milky, Brownie y a todos esos seres que han iluminado mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE	5
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	7
ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
SITUACIÓN EN MÉXICO DE LA GARRAPATA <i>Rhipicephalus</i> (<i>Boophilus</i>) <i>spp.</i>	12
GENERALIDADES DE <i>R. microplus</i>	13
Clasificación taxonómica.....	13
Morfología.....	14
Ciclo biológico	16
PATOGENIA	18
CONTROL	19
Control no químico	20
Control químico	24
APLICACIÓN DE IXODICIDAS	28
RESISTENCIA A LOS IXODICIDAS	29
Mecanismos de resistencia a los ixodicidas.....	30
Manejo de la resistencia a ixodicidas.....	31
EL ACIDO BÓRICO, SUS DERIVADOS Y LOS ORGANOBORANOS...31	
Uso del ácido bórico y sus derivados como pesticidas.....	32
JUSTIFICACIÓN	34

HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	36
Objetivo general	36
Objetivos particulares.....	36
MATERIAL Y MÉTODOS	37
Ubicación	37
Material biológico	37
Compuestos evaluados.....	38
Diseño experimental.....	40
Técnica de inmersión de adultas	42
Técnica de paquete de larvas.....	45
Análisis estadístico	47
RESULTADOS.....	48
Resultados de la técnica de inmersión de adultas	48
Resultados de la técnica de paquete de larvas.....	48
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	59
REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO 1: ESTRUCTURAS QUÍMICAS Y PESOS MOLECULARES DE LOS ONCE DERIVADOS DEL ÁCIDO BÓRICO EVALUADOS (MARTÍNEZ, 2011).	38
CUADRO 2: PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LARVAS (%ML) DE <i>R. microplus</i> PRODUCIDA POR LOS ONCE COMPUESTOS DERIVADOS DEL ÁCIDO BÓRICO EVALUADOS. CADA VALOR REPRESENTA LA MEDIA (\pm EE).....	551
CUADRO 3: CONCENTRACIONES LETALES DEL PRODUCTO <i>ABORÓNICO</i> Y SUS RESPECTIVOS ÍNDICES DE CONFIANZA, OBTENIDOS MEDIANTE EL ANÁLISIS PROBIT (POLO-PLUS LE-ORA SOFTWARE)	53
FIGURA 1: CLASIFICACIÓN DEL TERRITORIO NACIONAL, SEGÚN LOS AVANCES DE LA CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA GARRAPATA <i>R. microplus</i> . (SAGARPA, 2011).....	122
FIGURA 2: MORFOLOGÍA EXTERNA DE <i>R. microplus</i> . VISTAS DORSAL Y VENTRAL DE MACHO Y HEMBRA ADULTOS. (ADAPTADO DE QUIROZ, 1984)	155
FIGURA 3: CICLO BIOLÓGICO DE <i>R. microplus</i> . LOS ESTADIOS DE LA GARRAPATA QUE OCURREN SOBRE EL HOSPEDERO SON LA FASE PARÁSITA, Y LOS QUE OCURREN EN EL SUELO PERTENECEN A LA FASE NO PARÁSITA (ADAPTADO DE QUIROZ, 1984; SOULSBY, 1988).....	177

FIGURA 4: DISEÑO EXPERIMENTAL. PORCENTAJE DE OVIPOSICIÓN (%OP), PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA OVIPOSICIÓN (%INHOP), PORCENTAJE DE ECLOSIÓN (%EC), PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LARVAS (%ML), CONCENTRACIONES LETALES (CL), CONCENTRACIONES INHIBITORIAS DE LA OVIPOSICIÓN (CIO), CONCENTRACIONES INHIBITORIAS DE LA ECLOSIÓN (CIE).....	441
FIGURA 5: HEMBRAS DE <i>R. microplus</i> OVIPOSITANDO.....	42
FIGURA 6: HUEVOS DE <i>R. microplus</i> EN VIALES DE CRISTAL.....	43
FIGURA 7: ARMADO Y LLENADO DE PAQUETES DE LARVAS.....	46
FIGURA 8: PORCENTAJE DE OVIPOSICIÓN (%OP), PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA OVIPOSICIÓN (%INHOP) Y PORCENTAJE DE ECLOSIÓN DE LARVAS (%EC) PRODUCIDOS POR 10 DE LOS 11 DERIVADOS DEL ÁCIDO BÓRICO A CONCENTRACIÓN DE 1MG/ML. CADA BARRA REPRESENTA LA MEDIA (\pm EE).	49
FIGURA 9: PORCENTAJE DE OVIPOSICIÓN (%OP), PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA OVIPOSICIÓN (%INHOP) Y PORCENTAJE DE ECLOSIÓN DE LARVAS (%EC) PRODUCIDOS POR LOS 11 DERIVADOS DEL ÁCIDO BÓRICO A UNA CONCENTRACIÓN DE 0.5 MG/ML. CADA BARRA REPRESENTA LA MEDIA (\pm EE).....	50
FIGURA 10: PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LARVAS (%ML) DE <i>R. microplus</i> PRODUCIDOS POR EL PRODUCTO <i>ABORÓNICO</i> . CADA BARRA REPRESENTA LA MEDIA (\pm EE)	52
FIGURA 11: CONCENTRACIONES LETALES DEL PRODUCTO <i>ABORÓNICO</i> , OBTENIDOS MEDIANTE EL ANÁLISIS PROBIT (POLO-PLUS LE-ORA SOFTWARE).	54

ABREVIATURAS

%Ec	Porcentaje de eclosión
%InhOp	Porcentaje de inhibición de la oviposición
%ML	Porcentaje de mortalidad de larvas
%Op	Porcentaje de oviposición
ANOVA	<i>Analysis of variance.</i> Análisis de varianza
CENAPA	Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal
CIE	Concentración inhibitoria de la eclosión
CIO	Concentración inhibitoria de la oviposición
CL	Concentración letal
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Error estándar
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IO	Índice de Oviposición
NOM	Norma Oficial Mexicana
NRC	National Research Council
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
T1	Testigo de agua destilada y DMSO
T2	Testigo de agua destilada
TIA	Técnica de inmersión de adultas
TPL	Técnica de paquete de larvas
UIMSA	Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal

RESUMEN

La resistencia a los ixodídeos es el principal problema en el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en países como México, Australia y Brasil entre otros. Lo anterior, ha conducido a diseñar, sintetizar y probar nuevas moléculas para el control de esta parasitosis. El objetivo del estudio fue determinar *in vitro* mediante las técnicas de inmersión de adultas y paquete de larvas, la eficacia de once nuevos derivados del ácido bórico, diseñados y sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, sobre la viabilidad y la oviposición de una cepa susceptible de *R. microplus*.

En la prueba de paquete de larvas, de los once derivados, solo el producto identificado como *ABorónico* tuvo efecto ($p < 0.05$) sobre el porcentaje de mortalidad de larvas (%ML) a concentraciones de 1 (%ML = 91.79 ± 8.22), 0.75 (%ML = 51.08 ± 13.97) y 0.5 (%ML = 51.9 ± 9.21) mg/ml. Con los datos anteriores, por metodología Probit se calcularon las siguientes concentraciones letales para este producto: $CL_{50} = 0.745$, $CL_{90} = 0.991$ y $CL_{99} = 1.251$.

Los productos identificados como: *MMO1,3Cmeta* y *MMO1,3Cpara* produjeron una disminución moderada pero significativa ($p < 0.05$) sobre el porcentaje de eclosión de huevos en la prueba de inmersión de hembras adultas (19.3 ± 3.7 y 22.4 ± 3.1 respectivamente) a una concentración de 1 mg/ml.

En conclusión, la evaluación del efecto del producto *ABorónico in vitro* sobre larvas de *R. microplus* sugiere que este producto o derivados del mismo tienen potencial para ser considerados una opción farmacéutica en el control de garrapatas.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son los ectoparásitos hematófagos más importantes del ganado en zonas tropicales y subtropicales del mundo (Anderson y Magnarelli, 2008). En México, las especies más importantes que afectan al ganado bovino son *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (antes *Boophilus microplus*) y *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (antes *Boophilus annulatus*), recientemente reclasificadas en este género (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006). Desde que estas garrapatas fueron descritas por Curtice en 1891, se clasificaron en el género *Boophilus*; sin embargo, con las técnicas moleculares actuales han sido reclasificadas como un subgénero de *Rhipicephalus* (Barker *et al.*, 2002; Horak *et al.*, 2002; Murrell *et al.*, 2003).

La infestación por estos parásitos causa pérdidas económicas severas a la producción bovina, debido a que provoca anemia, disminución del consumo de alimento, disminución en la producción de carne, disminución en la producción de leche y daños a la piel de los animales. También restringe de manera importante la movilización de animales debido a la transmisión de organismos causantes de enfermedades como la babesiosis y anaplasmosis. Adicionalmente, se incrementa el costo de producción por el empleo obligado de productos químicos y mano de obra para el control de garrapatas, además de los costos por tratamientos de las hemoparasitosis que transmiten (SAGARPA, 2011).

SITUACIÓN EN MÉXICO DE LA GARRAPATA *Rhipicephalus (Boophilus) spp.*

El control de garrapatas en México, tiene su origen en la segunda década del siglo XX, iniciando acciones aisladas de lucha contra estos ectoparásitos en los estados de Chihuahua en 1927 y Sonora en 1928. El estado de Sonora inició la Campaña contra *Rhipicephalus (Boophilus) sp.* en forma técnica e intensiva en el año de 1960, lo que condujo a la erradicación de la garrapata en 2.5 millones de hectáreas de su territorio en 1972. Sin embargo, actualmente el control de garrapatas se realiza de manera individual por los propios productores (SAGARPA, 2011).



Figura 1: Clasificación del territorio nacional, según los avances de la campaña nacional contra la garrapata *R. microplus*. (SAGARPA, 2011)

Actualmente la campaña nacional contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) sp.*, tiene por objetivos:

- a) Generar conocimiento acerca de la resistencia a ixodicidas y la caracterización de la misma en las garrapatas de México.
- b) El control de la movilización animal dentro del territorio nacional.
- c) La capacitación de veterinarios y productores para lograr la erradicación de la garrapata.

En esta campaña (Figura 1), se reporta que una amplia zona del norte y parte del centro del país se encuentran libres, lo que equivale al 47.8%, la zona de erradicación representa el 0.57%, mientras que la zona en fase de control representa el 51.5% del país (SAGARPA, 2011).

GENERALIDADES DE *R. microplus*

R. microplus es una garrapata originaria del sureste de Asia pero se ha distribuido a través de los trópicos como Australia, Este y Sur de África y Centro de América. Fue introducida a México junto con *R. annulatus* por el sur de los Estados Unidos (George, 2000; Barré *et al.*, 2008).

Clasificación taxonómica

R. microplus (Canestrini, 1887) es del Phylum *Arthropoda*, Clase *Arachnida*, Orden *Acarina*, Suborden *Metastigmata* y Familia *Ixodidae* (Quiroz, 1984; Encinas, 1999; Soulsby, 1988). Las 5 especies del género *Boophilus* descritas por Curtice en 1891, han sido reclasificadas con base en su relación con garrapatas del género *Rhipicephalus*, tomando en cuenta la filogenia y evolución de las garrapatas Ripicefalinas y debido a que existe una fuerte evidencia molecular (secuencias de ADN comparadas por PCR), morfológica (la falta de ornamentación en el escudo), zoogeográfica histórica (origen Afrotropical/ Oriental) y distributiva mundial, se ha determinado que el género *Rhipicephalus* está ampliamente relacionado con el género

Boophilus; proponiendo a este último como un subgénero. Debido a que existe una gran cantidad de información bajo el nombre de *Boophilus* algunos autores sugieren que las especies del mismo se refirieran como *Rhipicephalus (Boophilus) spp.* (Barker *et al.*, 2002; Horak *et al.*, 2002; Murrell *et al.*, 2003).

Morfología

El cuerpo de las garrapatas está cubierto por un exoesqueleto formado por una capa cuticular quitinosa. El cuerpo está formado por una porción anterior denominada gnatosoma, y una porción posterior denominada idiosoma (Figura 2). Las garrapatas pertenecientes a la familia *Ixodidae* (garrapatas duras) poseen escudo y el gnatosoma se encuentra en posición anterior con respecto al idiosoma (Quiroz, 1984; Anderson y Magnarelli, 2008). *R. microplus* es una garrapata dura, de color café oscuro, las hembras llegan a medir hasta 1.5 cm cuando están repletas y los machos hasta 0.5 cm. El gnatosoma es corto y su escudo es de color café sin ornamentaciones (Barker *et al.*, 2002). Los machos poseen un escudo que cubre casi todo el cuerpo, no así en las hembras en las que el escudo es pequeño y cubre aproximadamente un octavo del cuerpo, por lo que tienen la capacidad de expandir la cutícula para repletarse (Encinas, 1999).

El gnatosoma o capítulo está formado por los órganos bucales y forma un canal de alimentación a través del cual el alimento pasa hacia el esófago. Las estructuras que lo conforman son: base del capítulo, palpos, quelíceros e hipostoma. Los quelíceros y los palpos están adaptados para la captación de los alimentos, además de una función quimiosensorial. El hipostoma posee una serie de prolongaciones cortantes en su superficie externa, que permiten el desgarre de la piel para la fijación de la garrapata a su hospedero (Quiroz, 1984; Anderson y Magnarelli, 2008). En el caso de *R. microplus*, la base del

capítulo es de forma hexagonal y los palpos no rebasan en tamaño al hipostoma (Kang *et al.*, 1985)

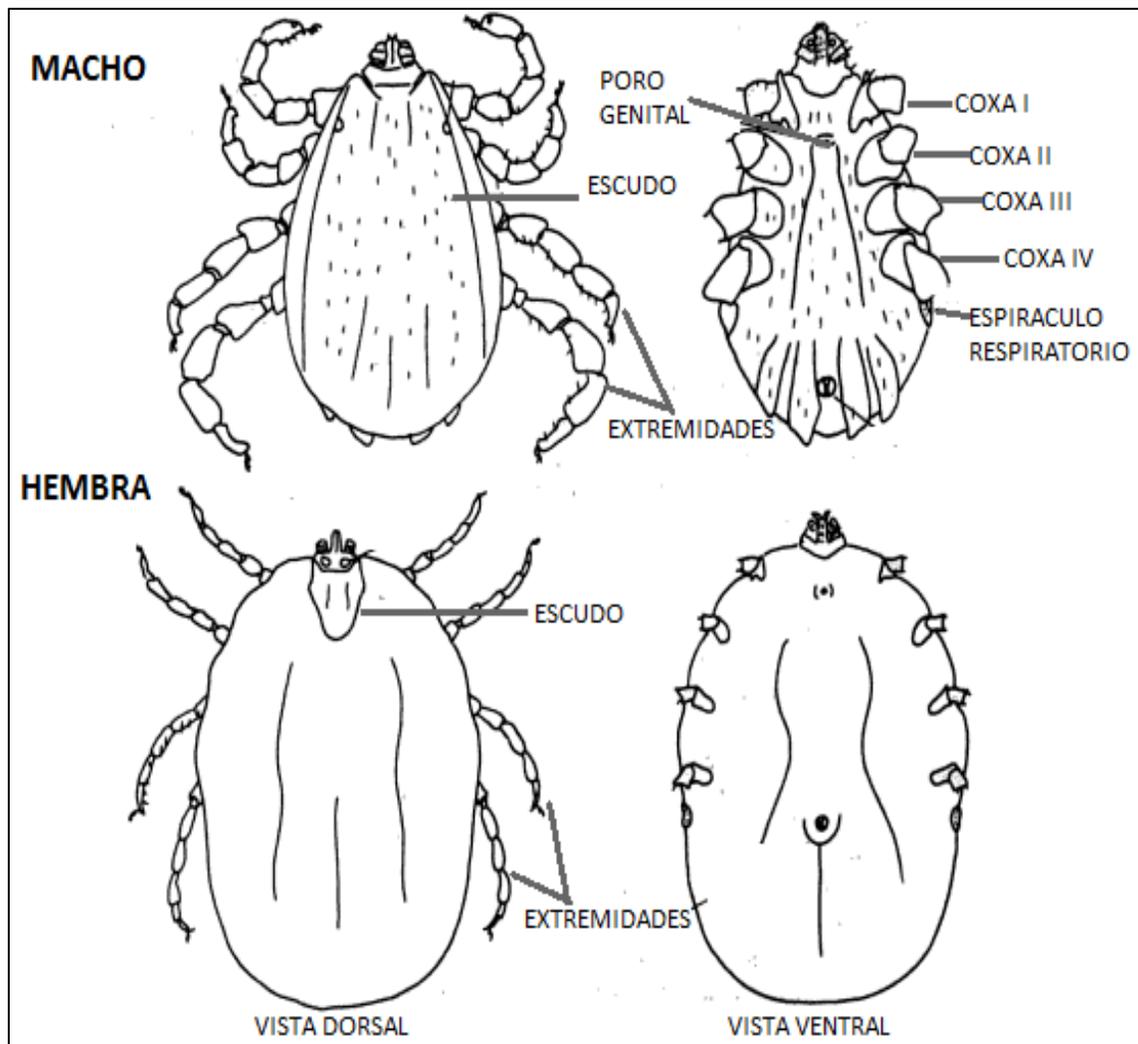


Figura 2: Morfología externa de *R. microplus*. Vistas dorsal y ventral de macho y hembra adultos. (Adaptado de Quiroz, 1984)

El idiosoma está formado por una parte anterior o propodosoma y una posterior o histerosoma. En el propodosoma se encuentran las patas y el poro genital, mientras que en el histerosoma se encuentran los espiráculos respiratorios y el ano.

La fase larvaria es hexápoda, mientras que las ninfas y adultas son octápoda. Las patas están divididas en seis segmentos: coxa, trocánter, fémur, gena, tibia y tarso. En el tarso del primer par de patas se encuentra el órgano de Haller el cual sirve para detectar temperatura, corrientes de aire, olores y químicos (Quiroz, 1984; Anderson y Magnarelli, 2008).

Los espiráculos respiratorios tienen una forma muy característica en cada género, en el caso de *R. microplus* son circulares con una mácula central y están situados posterolateralmente a la cuarta coxa (Kang *et al.*, 1985).

Ciclo biológico

R. microplus es una garrapata de un solo hospedero (Figura 3). Su hospedero definitivo es principalmente el bovino, aunque puede encontrarse también en venados. Las garrapatas tienen cuatro estadios evolutivos en su ciclo vital: huevo, larva, ninfa y adulto.

El ciclo biológico puede durar entre 4 y 10 meses; y comprende dos fases: la fase de vida libre o fase no parásita, y la fase parásita. La fase de vida libre inicia cuando la hembra repleta se desprende del hospedero y busca un lugar para ovipositar. El periodo de preoviposición es de 2 a 39 días y el periodo de oviposición es de 4 a 44 días. Cada hembra de *R. microplus* pone entre 3500 y 4400 huevos. Después, los huevos se incuban de 14 a 146 días hasta la eclosión de las larvas (Soulsby, 1988).

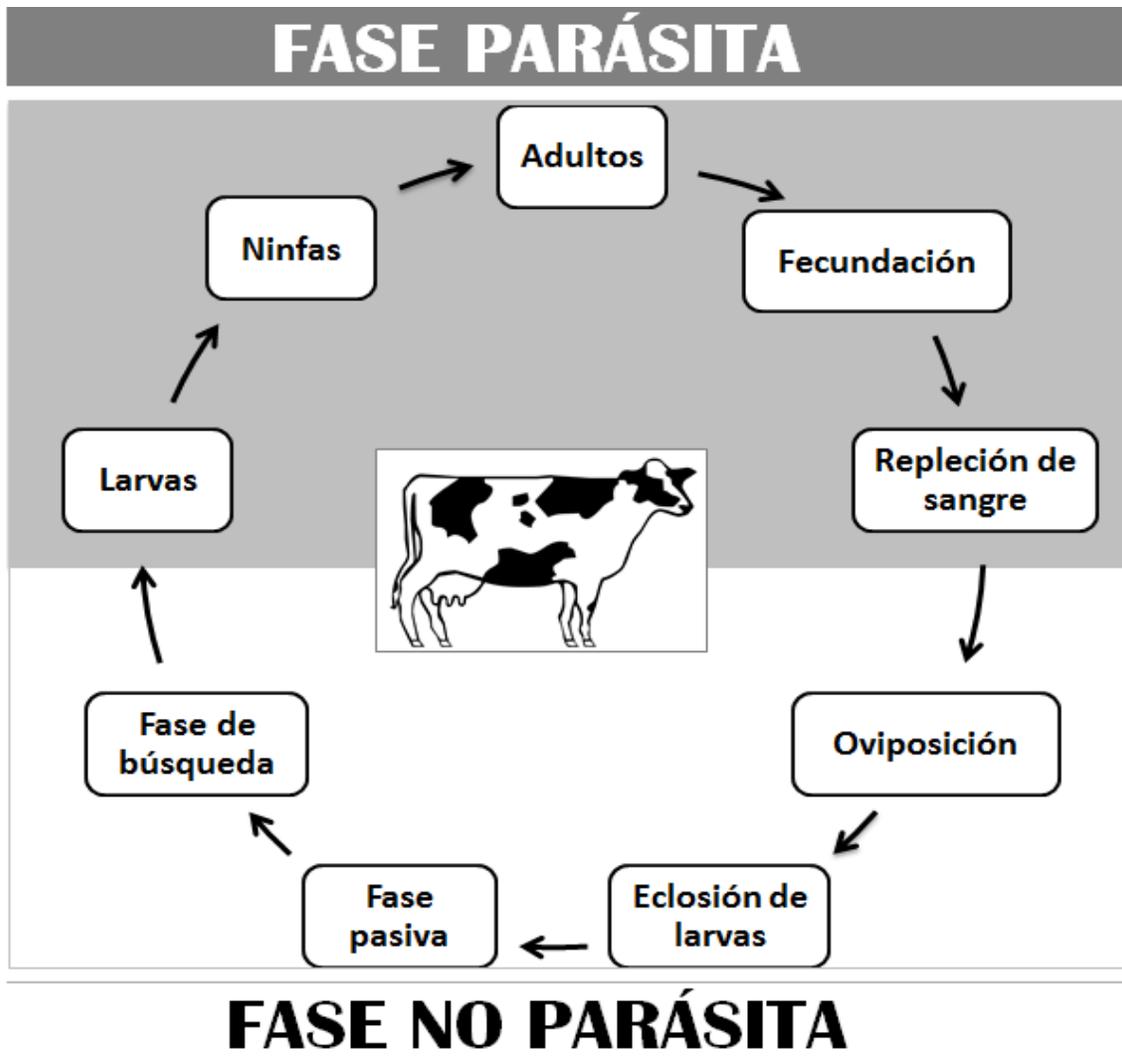


Figura 3: Ciclo biológico de *R. microplus*. Los estadios de la garrapata que ocurren sobre el hospedero son la fase parásita, y los que ocurren en el suelo pertenecen a la fase no parásita (Adaptado de Quiroz, 1984; Soulsby, 1988).

En la fase de vida libre se presentan dos etapas: la etapa pasiva y la etapa de búsqueda. Durante la etapa pasiva las larvas recién nacidas adquieren la madurez para buscar al hospedero alimentándose de su vitelo. Dentro de la etapa de búsqueda, las larvas suben a las puntas de los pastos para encontrar a su hospedero, al que detectan por medio de la emisión de dióxido de carbono, la vibración y el calor corporal (Anderson y Magnarelli, 2008).

La fase parásita comienza una vez que las larvas han hallado a su hospedero, se adhieren a su pelaje, insertan en la piel sus piezas bucales y comienzan a alimentarse. Mientras se alimenta, la larva realiza la muda a ninfa y posteriormente a adulto. El macho adulto busca a la hembra para la cópula. Posteriormente la hembra fecundada se ingurgita (repleción de sangre) y finalmente se desprende del hospedero, para llevar a cabo la oviposición en el suelo (Quiroz, 1984).

PATOGENIA

Los daños que *R. microplus* genera a su hospedero se deben a las acciones patógenas traumática, expoliatriz, inoculatriz, tóxica y antigénica. La acción traumática es causada por la perforación de la piel del hospedero con las piezas bucales de la garrapata al momento de alimentarse. La acción expoliatriz consiste en la sustracción de sangre y líquidos tisulares, cuyo principal efecto es la anemia. En este sentido, cada hembra en estado adulto es capaz de consumir entre 0.5 ml y 1.2 ml de sangre, por lo que el grado de infestación de los animales está directamente relacionado a el total de la pérdida de volumen sanguíneo. Además, la anemia puede agravarse debido a hemoparasitos transmitidos que pueden tener acción lítica sobre los eritrocitos (Quiroz, 1984; Jonsson, 2006).

La acción inoculatriz, corresponde a la introducción de agentes patógenos causantes de otras enfermedades en el hospedero. Las garrapatas son vectores de microorganismos tales como protozoarios, rickettsias, espiroquetas y virus. *R. microplus* es el principal transmisor de *Babesia bigemina* en Australia, Panamá y América, *Babesia argentina* en Australia y

Argentina, y *Anaplasma marginale* en Australia y América (Soulsby, 1988; Uilenberg, 1995; de Castro, 1997).

Las acciones tóxica y antigénica son asociadas a las secreciones salivales de la garrapata que son inyectadas por la herida y que contribuyen a prevenir la coagulación de la sangre y la reacción inflamatoria, además de que inhiben el dolor causado por la presencia de la garrapata (Quiroz, 1984).

También, se ha sugerido que las infestaciones masivas por garrapatas tienen efecto supresor del apetito en ganado de leche, basado en que los animales afectados por garrapatas consumen menor cantidad de materia seca, por lo que se observa en ellos disminución de la producción láctea y disminución de la condición corporal. Así mismo, se ha observado que los animales que no ingieren los requerimientos mínimos diarios de acuerdo a su fin zootécnico, sufren infestaciones de un grado mayor que los animales bien nutridos (Jonsson, 2006). En un estudio realizado en ganado Holstein-Fresian, se demostró que por cada hembra repleta, hubo una pérdida productiva de hasta 2.86 ml de leche por día y hasta 1.0 g de peso vivo en los animales infestados relacionado a un bajo consumo de materia seca (Jonsson *et al.*, 1998; Jonsson *et al.*, 2000).

CONTROL

Para evitar las pérdidas económicas generadas por las garrapatas, el ser humano ha probado varias maneras de detener la reproducción y diseminación de éstos ectoparásitos. Existen principalmente dos tipos de control para la ixodidosis: el control químico y el control no químico. El primero ha sido el más importante y el más utilizado en todo el mundo, sin embargo, debido a la aparición de resistencia a los productos utilizados, se han planteado nuevas estrategias que no dependan del uso de sustancias químicas.

1. Control no químico

Este se basa en el manejo de diversos métodos, que van desde los propios del hospedero, hasta los que se apoyan en el uso de plantas y de otros organismos para el control de las infestaciones sin el uso de ixodicidas químicos.

- a. Resistencia del hospedero:** La resistencia a la infestación de garrapatas, es una habilidad innata por parte del hospedero que se considera de buena heredabilidad (en el caso de *R. microplus* es de 0.34) y que se encuentra influenciada por raza, edad, etapa fisiológica y estado inmunológico (Jonsson *et al.*, 2000; Willadsen, 2006).

Los bovinos de razas cebuinas (*Bos indicus*) como por ejemplo, Gyr, Nelore, Indubrasil, Guzerat, Brahaman, entre otras, presentan una mayor resistencia a las infestaciones que se ha atribuido al grosor de la piel y compuestos liberados a través de las glándulas sebáceas que actúan como repelentes a las larvas. Por el contrario, las razas de origen europeo (*Bos taurus*) por ejemplo, Holstein-Friesian, Charolais, Suizo, etc., son más susceptibles. Actualmente, se realizan cruzas entre razas cebuinas y europeas para aumentar la resistencia de estos últimos, mantener buenos parámetros productivos y controlar mejor las infestaciones (de Castro y Newson, 1993). También se ha observado que la resistencia es mayor en animales jóvenes que en viejos, y en hembras no gestantes que en hembras gestantes (Jonsson *et al.*, 2000).

Los mecanismos inmunológicos de resistencia del hospedero propuestos incluyen: la secreción de histamina en la hipersensibilidad cutánea y las altas concentraciones de complemento en suero, entre otras (Jonsson *et al.*, 2000).

b. Inmunización: Se han desarrollado dos vacunas (Gavac® y TickGard®) basados en el antígeno recombinante Bm86, el cual es una glicoproteína que se encuentra en las células intestinales de la garrapata, sin embargo, los antígenos de éstas vacunas, no están expuestos directamente al sistema inmune del hospedero, por lo que también son llamados antígenos ocultos. La lisis de las células intestinales de la garrapata ocurre cuando ésta, al ingerir sangre del hospedero inmunizado, ingiere también anticuerpos y complemento, provocando así, que las células intestinales sean destruidas y la sangre consumida se filtre al hemocele (Nijhof *et al.*, 2007). Con esto se reduce el número de hembras repletas, su peso y su capacidad reproductiva, observándose un menor número de larvas en las infestaciones subsecuentes (de la Fuente *et al.*, 2007).

c. Control biológico: Para este tipo de control se ha estudiado el uso de patógenos, depredadores y biopesticidas, aunque su uso en campo aún es limitado.

- *Patógenos:* Dentro éstos se encuentran bacterias, rickettsias y nematodos. Se ha observado que en garrapatas *Dermacentor sp.* y *Hyalomma sp.* en una infección experimental con *Rickettsia sp.*, se causa alteración en la conducta, interfiere en el desarrollo de los estadios y afecta la reproducción, además, causa daños patológicos en sus glándulas salivales y en algunos casos, la muerte. La inmersión experimental de hembras repletas en una solución con la bacteria *Cedecea lapagei* inhibió la oviposición, además de causar la muerte de un 95-100% de las hembras (Samish y Rehacek, 1999). Nematodos de las familias *Mermithidae*, *Heterorhabditidae* y *Steinernematidae* son capaces de matar hembras adultas repletas de *Ixodes ricinus* y *R. annulatus* (Samish y Rehacek, 1999).

- *Depredadores*: Los más activos son las hormigas de los géneros *Iridomyrmex*, *Asphaenogaster*, *Pheidole* y *Solenopsis germinata*. Estas hormigas atacan a las hembras repletas de *R. annulatus*, *R. microplus*, *Otobius megnini* y *Otobius moubatasangre* (Quiroz, 1984). En México, la hormiga *Solenopsis geminata* depreda del 63 al 100% de hembras repletas de *R. microplus*. En pruebas de laboratorio en Australia, el ácaro *Anystis baccarum* mató al 38% de las hembras adultas de *R. microplus*, mientras que *Anystis jabanica* produjo un 8% de mortalidad de larvas (Samish y Rehacek, 1999).

En colonias mantenidas bajo condiciones de laboratorio, las moscas *Megasiela rufipes* y *Megasiela scalaris* infectaron a *Amblyomma*, *Anocentor*, *Boophilus* e *Ixodes*; estas moscas ovipositaron sobre las garrapatas adultas, reduciendo la oviposición hasta en un 50%. Otros depredadores naturales son las arañas, escarabajos, aves y reptiles (Samish y Rehacek, 1999).

- *Biopesticidas*: Estos se han tomado como alternativa a los ixodicidas químicos empleando hongos entomopatógenos. La acción de estos es mediante la adhesión de sus conidias al cuerpo de la garrapata, una vez que las conidias han germinado, penetran la cutícula. Se ha observado la penetración de los hongos entomopatógenos 72 horas post inoculación bajo condiciones de laboratorio (Alonso-Díaz *et al.*, 2007). Los hongos entomopatógenos que han sido más estudiados, son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, de los que se han realizado preparaciones a base de conidias que se han aplicado a huevos, larvas, ninfas y adultos; en los que se ha visto una reducción en la viabilidad de los huevos, alta mortalidad de larvas y disminución de la fertilidad (Kaaya y Hassan, 2000). Alonso-Díaz *et al.* (2007), reportan que la cepa Ma34 de *M. anisopliae* utilizada en

preparaciones a concentración de 10^8 conidias/ml tienen efectividad del 100% *in vitro* sobre huevos y adultos. Sin embargo, la acción de los hongos entomopatógenos en campo se ve reducida debido a altas temperaturas y a la acción de los rayos ultravioleta, que afectan su patogenicidad (Alonso-Díaz *et al.*, 2007).

d. Manejo de praderas: Este se debe realizar en base al ciclo biológico de la garrapata a controlar, debido a la longevidad de las larvas en el potrero. En el caso de *R. microplus* se recomienda que la pradera permanezca sin bovinos de 8 a 9 meses (Quiroz, 1984). Sin embargo, esto no es factible debido que este periodo de tiempo es muy largo, y se pierde la producción de forraje.

Por otro lado, algunos forrajes son también parte del control, como por ejemplo el zacate gordura (*Melinis minutiflora*), una planta originaria de las zonas tropicales, con efecto garrapaticida (principalmente sobre larvas) cuyo uso se ha estudiado recientemente, y se ha observado que su actividad se debe a sus compuestos químicos y no por sus propiedades físicas (las vellosidades de la planta) como se creía anteriormente. En estudios recientes se encontraron doce compuestos químicos diferentes en los extractos de esta planta, entre los principales están eicosano, ácido linolénico metil éster y ácido hexadecanóico; los cuales se cree que deben actuar juntos para lograr este efecto (Muro *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha visto que el sabor de esta planta es poco palatable para el ganado, además de que no se ha estudiado si su olor, que es parecido al de la melaza, pueda transferirse a la leche o carne (Muro *et al.*, 2004).

2. Control químico

Hasta ahora el uso de productos químicos con efectividad contra garrapatas llamados ixodicidas, ha sido el tipo de control más empleado en todo el mundo para combatirlas. Se han tratado de desarrollar ixodicidas que cumplan con una alta efectividad, sin causar daño a los animales, al humano y/o al ambiente. El avance de la investigación en la biología de las garrapatas, ha dado conocimiento de su estructura, fisiología y comportamiento, lo que puede ser aplicado para diseñar fármacos con mecanismos de acción más específicos que puedan detener su reproducción, viabilidad y/o diseminación.

Los primeros intentos de aplicación de ixodicidas se realizaron en el año de 1893, utilizando como garrapaticidas aceite de semilla de algodón, aceite de pescado, petróleo crudo, keroseno, creosote, extracto de tabaco, jabón o sulfuro, que se administraban dos o tres veces por semana con ayuda de esponjas y cepillos. Posteriormente en 1895 se comenzó a sumergir al ganado en mezclas que contenían este tipo de sustancias (George, 2000; Botana *et al.*, 2002; George *et al.*, 2004).

El arsénico se introdujo como novedad reemplazando los remedios anteriores, y demostró ser altamente efectivo contra las garrapatas. El primer informe del uso de arsénico como acaricida, está reportado en garrapatas *R. microplus* en ganado Angus de Australia en 1896, a esta preparación se le conoció como “Queensland Dip” o “Australian Dip”. Sin embargo, otras referencias indican que el arsénico se utilizó por primera vez en la República de Sudáfrica en 1893. La resistencia a este compuesto apareció alrededor de cincuenta años después de su utilización como ixodicida. Las razones más importantes para reemplazar al arsénico por insecticidas orgánicos sintéticos, fueron la cercanía de la dosis terapéutica con la concentración tóxica, la

acumulación de este compuesto en los tejidos de los animales y la aparición de resistencia (George *et al.*, 2004).

Después de la Segunda Guerra Mundial, se dio a conocer otro grupo de compuestos conocidos como organoclorados tales como el diclorodifeniltricloroetano (DDT), el hexaclorociclo-hexano (HCH), el hexaclorobenceno (BHC), el toxafeno y la dieldrina. Este grupo fue ampliamente utilizado en regiones resistentes al arsénico, y fueron los primeros en ser comercializados también. Su prohibición se debió a su acumulación en el tejido adiposo de los animales y su persistencia en el ambiente (George *et al.*, 2004).

Posteriormente los compuestos organofosforados como el ethion, coumaphos, chlorfenvinphos y chlorpyriphos, reemplazaron a los organoclorados (Botana *et al.*, 2002). Los organofosforados se han utilizado ampliamente, demostrando tener una muy buena acción. Sin embargo, se ha observado que presentan una elevada toxicidad en vertebrados, además de guardar una relación con gases neurotóxicos como los gases sarín, soman y tabun (George *et al.*, 2004).

Los carbamatos como el carbaryl y promacyl, son compuestos derivados del ácido carbámico que se caracterizan por tener una muy baja toxicidad. El mecanismo de acción tanto de los organofosforados como de los carbamatos, es la inhibición de la acetilcolinesterasa, motivo por el que generalmente se presenta resistencia cruzada para ambos compuestos (George, 2000).

Los piretroides naturales son un grupo de ixodicidas muy costosos e inestables en presencia de la luz solar, sin embargo, sirvieron como

predecesores de los piretroides sintéticos que son altamente efectivos como acaricidas, incluyendo compuestos como permetrina, deltametrina, decametrina, flumetrina, cyhalotrina y cyflutrina. Su prolongado efecto residual es una desventaja en su empleo, además de que debido a esta característica se aumenta la presión de selección de cepas resistentes a estos ixodocidas (George *et al.*, 2004).

En 1970 se sintetizaron las formamidinas y cicloamidinas como: chlordimeform, cholomethiuron, clenpyrin y amitraz (George *et al.*, 2004; Botana *et al.*, 2002). El chlordimeform fue utilizado en Australia como aditivo en los baños de inmersión para tratar a los animales con cepas resistentes a organofosforados. Sin embargo, en 1976 fue retirado del mercado debido a que se comprobó su efecto carcinogénico. El amitraz es el más empleado en el mundo, debido a que es un compuesto altamente efectivo; a pesar de ser un compuesto inestable en baños de inmersión, pero si se agrega hidróxido de calcio para lograr un pH de 12 el principio activo permanece estable (George *et al.*, 2004).

Las lactonas macrocíclicas son otro grupo de acaricidas, de las cuales existen dos tipos; las avermectinas (ivermectina, eprinomectina y doramectina) y las milbemicinas (moxidectina) obtenidas de *Streptomyces avermitilis* y *S. higroscopicus aureolacrimosus* respectivamente. Su principal ventaja es que la dosis tóxica para las garrapatas es baja en comparación con otros productos y su aplicación puede ser por vía subcutánea, oral o epicutánea pero su alto costo limita su uso (George, 2000; George *et al.*, 2004).

El fipronil es una fenilpirazolona que puede ser aplicada por vía epicutánea y tiene una eficacia del 99% en animales alojados en unidades de producción intensivas, además provee de protección contra la reinfestación por larvas hasta por ocho semanas pos-tratamiento. Sin embargo, en condiciones de producción extensiva, su vida se ve reducida, debido a las condiciones ambientales como la luz solar, que reduce su acción a dos o tres semanas después de su aplicación (George *et al.*, 2004).

Hacia finales del siglo XX aparecieron otros compuestos derivados de benzoil fenil urea que actúan inhibiendo la formación de quitina, tal es el caso del lufenurón, flufenoxuron, diflubenzuron y fluazurón. Su principal efecto en garrapatas es la reducción casi total de la fertilidad y fecundidad de hembras repletas, además de producir mortalidad de fases inmaduras debido a que les impide mudar al siguiente estadio. El fluazurón puede persistir hasta por doce semanas, aunque su uso es restringido debido a que se excreta en la leche, lo cual es indeseable para la cría y para el consumo humano (George *et al.*, 2004).

El metopreno es un análogo sintético de la hormona ecdisona producida por fases juveniles de la garrapata, la cual es promotora del cambio de estadio, el metopreno bloquea el desarrollo juvenil evitando que se llegue al estadio adulto. Debido a que la ecdisona es una hormona que no poseen los mamíferos, su margen de seguridad es muy amplio, lo cual es ventajoso para su uso (Botana *et al.*, 2002).

APLICACIÓN DE IXODICIDAS

El éxito de un acaricida depende de la toxicidad del principio activo, calidad del producto, su correcta dosificación o de la superficie alcanzada en el cuerpo del animal. Se pueden emplear diferentes métodos para la aplicación de un ixodicida de acuerdo a las características del producto, como baño de inmersión, aspersion, aplicación epicutánea y aplicación parenteral.

- a) **Baño de inmersión:** En esta técnica se sumerge al ganado en la solución ixodicida. Se ha visto que éste método es el más efectivo para el control de las garrapatas; sin embargo, las instalaciones deben contar con un corral de acopio, manga de manejo, tina y escurridero, lo cual resulta muy gravoso para las pequeñas unidades de producción pecuaria (George *et al.*, 2004; NOM-019-ZOO-1994).
- b) **Baño de aspersion:** Este procedimiento consiste en la aplicación del ixodicida mediante el uso de una bomba de rociado la cual puede ser accionada de manera manual o mecánica. Las instalaciones que se recomiendan son: un corral de acopio y una manga de manejo, en la cual se rocía el ixodicida a una presión constante, con lo que se asegura que el producto se disperse por toda la superficie corporal del animal. (NOM-019-ZOO-1994).
- c) **Aplicación epicutánea:** Por este método se coloca el fármaco directamente en la piel del animal, por la línea media dorsal, desde la cruz hasta la región coccígea. El ixodicida se dispersa en la piel del animal y posteriormente es ingerido por el parásito (NOM-019-ZOO-1994).
- d) **Aplicación parenteral:** Consiste en la inyección parenteral del fármaco, que al absorberse y alcanzar niveles sanguíneos adecuados, tiene efecto sobre las garrapatas que se encuentran alimentándose (NOM-019-ZOO-1994).

RESISTENCIA A LOS IXODICIDAS

La resistencia a un fármaco con acción sobre garrapatas, se define como la capacidad de una fracción poblacional de estos parásitos para sobrevivir a ciertas concentraciones de productos ixodicidas, que resultan letales o afectan la reproducción del resto de la población considerada como normal (susceptible), la cual una vez establecida es hereditaria (NOM-019-ZOO-1994).

Existen tres fases en el desarrollo de la resistencia a los ixodicidas (Alonso-Díaz *et al.*, 2006; Cardozo, 2007):

- 1) *Fase de establecimiento*: Esta ocurre cuando aparece el alelo resistente en una población, generalmente es un proceso dado por mutaciones naturales, independiente a la presión de selección.
- 2) *Fase de desarrollo o diseminación*: Es el aumento del número de individuos resistentes después del uso de ixodicidas químicos. En este pueden ocurrir dos métodos de selección: la selección rápida ocurre cuando el gen de resistencia es dominante o parcialmente dominante y permite la selección de heterocigotos. La selección lenta se da cuando los alelos son recesivos. En esta fase aún no son detectables las fallas de los ixodicidas llevándose a cabo la dispersión hacia otras regiones en forma desapercibida.
- 3) *Fase emergente*: El alelo resistente es lo suficientemente común en la población. En ésta la eficacia de los ixodicidas ha disminuido considerablemente debido a la alta presión de selección.

Los factores principales asociados a la evolución de la resistencia, son los genéticos, que incluyen la frecuencia de los alelos resistentes, el número de alelos, la dominancia y la expresividad de estos; los factores biológicos, que

son los propios de la especie, como número de generaciones, número de descendientes por generación, sobrevivencia y refugio; y operacionales del químico, lo cuales incluyen la persistencia de residuos, tipo de aplicación, formulación y umbral de aplicación y selección.

Mecanismos de resistencia a los ixodícidias

En las últimas décadas se realizaron numerosos estudios dirigidos a conocer los diversos procesos bioquímicos y genéticos desarrollados por las garrapatas para evitar o disminuir el efecto de los productos químicos. De acuerdo al tipo de respuesta al producto químico, la resistencia ha sido agrupada en 4 categorías (Alonso-Díaz *et al.*, 2006):

- a) Resistencia de comportamiento: El parásito modifica su conducta para evitar el químico.
- b) Resistencia de la penetración: Es la modificación de algunos compuestos presentes en el exoesqueleto para impedir o retardar la penetración del producto.
- c) Resistencia metabólica: Es la detoxificación del producto químico por procesos enzimáticos que radica en la modificación en las vías metabólicas del parásito.
- d) Insensibilidad del sitio de acción: En esta se ve la modificación del sitio de acción del ixodícida para disminuir el efecto del producto químico. En el caso de *R. microplus* la resistencia a algunos químicos se ha asociado a mutaciones en los genes codificadores de canales de sodio (piretroides y organoclorados), a la actividad de la citocromo monooxigenasa P450 (organofosforados), a la actividad de las carboxilesterasas (piretroides) y a la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (organofosforados y carbamatos).

En México, se reportó la resistencia a organofosforados y carbamatos en 1986, a los piretroides sintéticos en 1994, a las amidinas en 2002 y a la ivermectina en 2010 (George *et al.*, 2004; Pérez-Cogollo *et al.*, 2010).

Manejo de la resistencia a ixodicidas

Se han sugerido dos formas para controlar la resistencia en una población de garrapatas, estas son saturación y moderación. La saturación consiste en la utilización del mismo producto hasta que el cambio es forzoso por la dispersión de la resistencia. La concentración y frecuencia de los tratamientos se incrementan progresivamente. La moderación es un método basado en el reemplazo inmediato del compuesto al que existe la resistencia. Para lograr el reemplazo de estos compuestos se han evaluado nuevos productos con el fin de encontrar alternativas farmacéuticas para el tratamiento de la ixodidosis (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

EL ACIDO BÓRICO, SUS DERIVADOS Y LOS ORGANOBORANOS

El ácido bórico se utiliza desde hace más de 200 años en la práctica médica, como sedante, espasmolítico y diurético, fue introducido por Lister en 1875 para uso antiséptico.

Algunos de sus derivados, como el borato de colina, han sido aplicados en desórdenes hepáticos y como antifímico, el borato de procaína se utiliza como anestésico local, el borato de hexametilentetramina como antiséptico renal, el borato de neomicina para uso oftalmológico y el borato de decilguanidinio tiene acción fungicida.

Los organoboranos también son compuestos de interés farmacológico. Entre estos se encuentran los triarilboranos que han demostrado ser potentes fungicidas y germicidas de amplio espectro; el ácido fenilbórico es antiséptico y bactericida especialmente en presencia de iones Ag o Cu. Este compuesto tiene también propiedades sedantes, se ha visto que potencia notablemente la actividad de hipnóticos tales como el hidrato de cloral y los barbituratos, así como también la acción de la morfina, la codeína y la procaína.

Entre otras cualidades de los compuestos que contienen boro como los ésteres del ácido bórico y de ácidos aril-bóricos, compuestos poliméricos y sales derivadas de los boranos se encuentra la de quimioterapéuticos antineoplásicos (Baran, 1989).

Uso del ácido bórico y sus derivados como pesticidas

El ácido bórico se ha utilizado en cebos para plagas desde los años 1800 y está clasificado como pesticida no orgánico, no volátil y de baja toxicidad para los mamíferos (Zurek *et al.*, 2002). Desde principios de 1900 el ácido bórico junto con otros compuestos boratos como el “Borax” (decahidrato tetraborato sódico) han sido utilizados contra cucarachas principalmente contra *Blattella germanica*, contra hormigas como *Myrmica rubra*, *Solenopsis sp.*, *Linepithema sp.* y contra mosquitos *Aedes sp.*, *Culex sp.* y *Ochlerotatus sp.* y contra otras plagas de interés agrícola. (Cochran, 1995; Yan, 1997; Xue *et al.* 2006). Estos compuestos también han sido utilizado para eliminar ácaros del polvo que viven en las alfombras y tapetes (Burnett, 1996).

El modo de acción del ácido bórico no ha sido completamente establecido, sin embargo, se sabe que es un compuesto de acción lenta. Los mecanismos propuestos son: por abrasión de la cutícula seguida de una desecación lenta, por destrucción de las células intestinales lo que ocasiona la

muerte por inanición, además, acción neurotóxica, con disminución de la actividad de la acetilcolinesterasa y daños reproductivos demostrados en *Blatella germanica* (Cochran 1995; Habes *et al.*, 2006; Kilani-Morakchi *et al.*, 2009).

JUSTIFICACIÓN

Dados los problemas generados por la resistencia de las garrapatas a las familias comerciales de acaricidas químicos, la falta de control integral y la poca o nula aplicación de otros tipos de control como el biológico, es permanente la necesidad de la creación de productos de nueva síntesis para el control químico de las garrapatas. El trabajo conjunto de Químicos, Médicos Veterinarios y otros profesionales en la FES-Cuautitlán, ha permitido evaluar nuevos compuestos para tal fin.

El ácido bórico y sus derivados han mostrado tener una acción eficaz para el control de algunos artrópodos como cucarachas, hormigas, mosquitos, ácaros del polvo, entre otros; además de que estos compuestos no presentan ninguna semejanza con alguna de las familias de productos disponibles a las cuales ya se tiene identificada la resistencia. Por lo anterior la evaluación de estos productos como ixodicidas resulta interesante.

HIPÓTESIS

Los derivados del ácido bórico de nueva síntesis tienen efecto negativo sobre la oviposición de adultas repletas o la eclosión de larvas y aumentan la mortalidad de larvas de garrapatas *R. microplus*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar *in vitro* mediante las técnicas de inmersión de adultas y paquete de larvas, la eficacia de once nuevos derivados del ácido bórico diseñados y sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, sobre la viabilidad y la oviposición de una cepa susceptible de garrapatas *R. microplus*.

Objetivos particulares

- Evaluar los efectos de los derivados del ácido bórico sobre el porcentaje de oviposición, índice de oviposición, el porcentaje de inhibición de oviposición y el porcentaje de eclosión de larvas, mediante la técnica de inmersión de hembras adultas repletas de *R. microplus*.
- Evaluar los efectos de los derivados del ácido bórico sobre el porcentaje de mortalidad de larvas de *R. microplus* mediante la técnica de paquete de larvas.
- Identificar los derivados del ácido bórico con eficacia sobre garrapatas, para calcular por metodología Probit sus concentraciones letales (CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} y CL_{99}), sus concentraciones inhibitorias de la oviposición (CIO_{50} y CIO_{99}) y sus concentraciones inhibitorias de la eclosión (CIE_{50} y CIE_{99}).

MATERIAL Y MÉTODOS

UBICACIÓN

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos (laboratorio 1) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA), y en las instalaciones del módulo de Posgrado, ubicados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

MATERIAL BIOLÓGICO

- **Cepa de garrapatas *R. microplus***

Se utilizó una cepa susceptible a amidinas, piretroides y organofosforados; donada por el Centro Nacional de Parasitología (CENAPA) del SENASICA. La fase parásita de la cepa ha sido mantenida a través de infestaciones controladas y sucesivas en bovinos, y la fase no parásita se mantiene *in vitro* en el laboratorio.

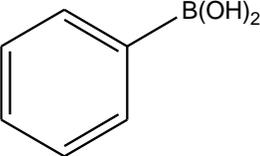
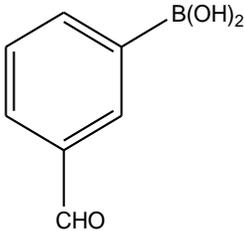
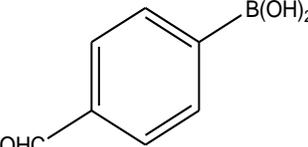
- **Animales**

Se utilizaron becerros de la raza Holstein con un peso aproximado de 250 kg. Los animales fueron colocados en infestaderos cuyo diseño limita parcialmente el movimiento, evita el lamido y otras conductas del animal para eliminar las garrapatas de su cuerpo. La alimentación de los becerros consistió alfalfa y avena achicalada, alimento concentrado comercial con 14% de proteína y agua *ad libitum*; los requerimientos y porciones fueron calculadas en base a las tablas del National Research Council (NRC). El alimento se ofreció en 3 horarios (7:00 hrs., 13:00 hrs. y 18:00 hrs.) para evitar el estrés de los animales.

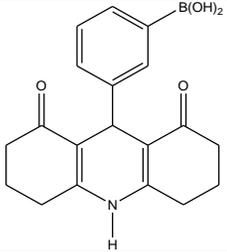
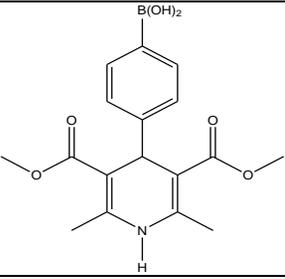
COMPUESTOS EVALUADOS

Se evaluaron 11 derivados del ácido bórico, los cuales fueron diseñados y sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Estos compuestos se sintetizaron bajo el protocolo de la química verde, utilizando técnicas de irradiación por microondas y después, se purificaron por cromatografía de capa fina. Finalmente, para su caracterización se utilizaron métodos espectroscópicos como resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y espectrofotometría de infrarrojo (Martínez, 2011).

La estructura química, la nomenclatura y el peso molecular de los compuestos utilizados, se presentan en el cuadro 1. Para facilidad del texto, estos compuestos serán referidos por su clave.

Clave	Peso molecular	Estructura	Nomenclatura
<i>ABorónico</i>	122.05		Ácido fenilborónico
<i>ABmeta</i>	150.0488		Ácido fenil-3-formilborónico
<i>ABpara</i>	150.0488		Ácido fenil-4-formilborónico

MMOEt	259.1208		3-Carboxietil-4-fenil-2-metil -6-oxo-1,4,5,6- tetrahidropiridina
MMO1,3Cmeta	285.1172		Ácido 3-(4-fenil-2,5-dioxo- 1,2,3,4,5,6,7,8- octahidroquinolin)fenilboró nico
MMO1,3Cpara	285.1172		Ácido 4-(4-fenil-2,5-dioxo- 1,2,3,4,5,6,7,8- octahidroquinolin)fenilboró nico
HMOB	329.1672		3,5-Dicarboxietil-4-fenil- 2,6-dimetil-1,4- dihidropiridina
HMO1,3Corto	337.1485		Ácido 2-(9-fenil-1,8-dioxo- 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10- decahidroacridin) fenilborónico

<i>HMO1,3Cmeta</i>	337.1485		Ácido 3-(9-fenil-1,8-dioxo-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10-decahidroacridin) fenilborónico
<i>HMO Mepara</i>	345.1384		Ácido 4-(3,5-bis-carbometoxi-4-fenil-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridina) fenilborónico

Cuadro 1: Estructuras químicas y pesos moleculares de los once derivados del ácido bórico evaluados (Martínez, 2011).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Los once derivados del ácido bórico fueron evaluados *in vitro* mediante las técnicas de inmersión de adultas y paquete de larvas (Figura 4). Para la obtención de hembras repletas se infestó un becerro con aproximadamente 20,000 larvas de *R. microplus* de 30 días de edad, después de 21 días, se colectaron garrapatas hembras repletas de las charolas colocadas debajo del infestadero para este propósito. Una parte de las hembras repletas recolectadas se utilizó para la técnica de inmersión de adultas, y otra parte de las garrapatas se utilizó para la obtención de larvas en el laboratorio, las cuales se destinaron para la técnica de paquete de larvas. Con base en los resultados obtenidos se seleccionaron los productos que tuvieron efecto significativo para obtener sus concentraciones efectivas.

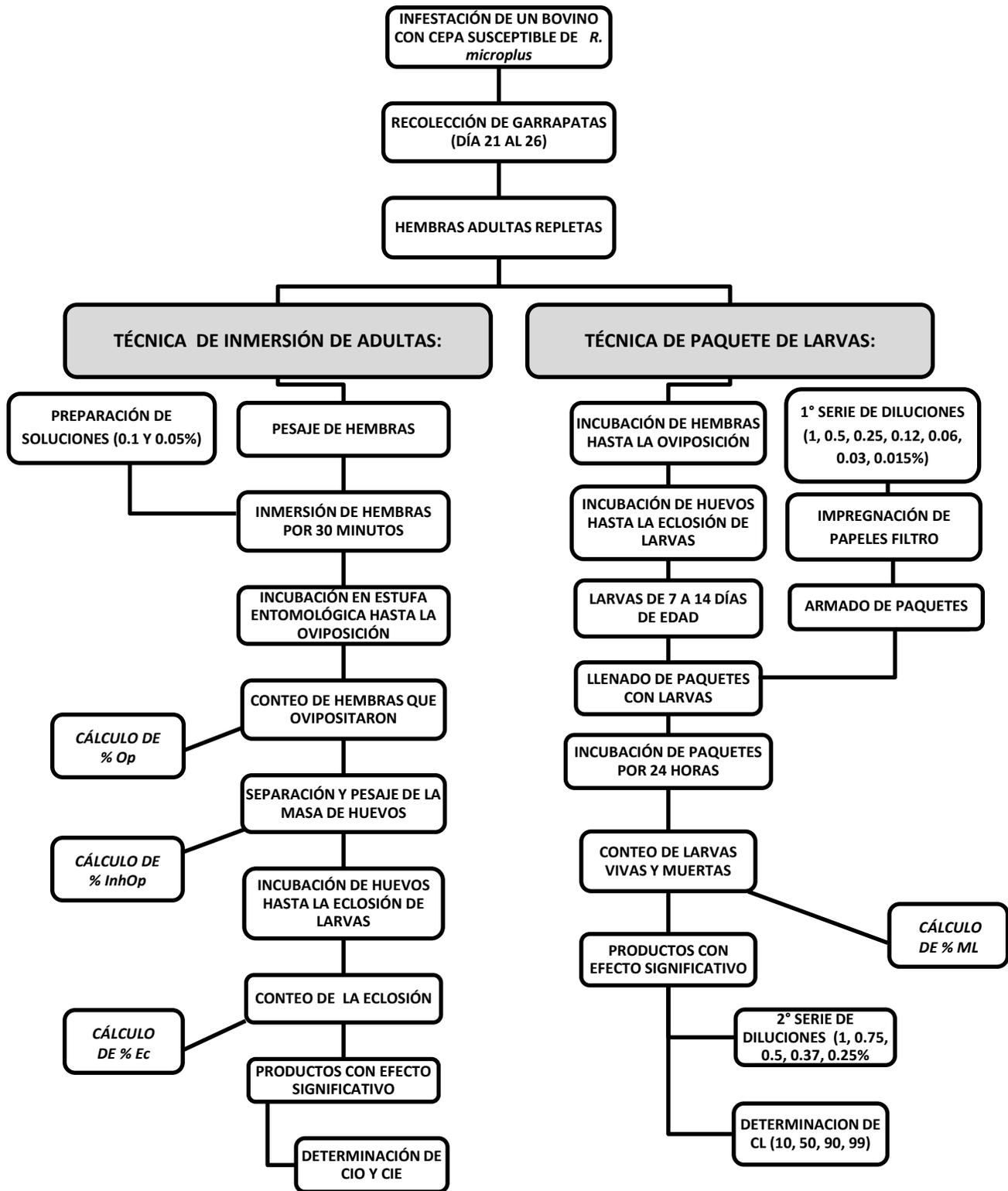
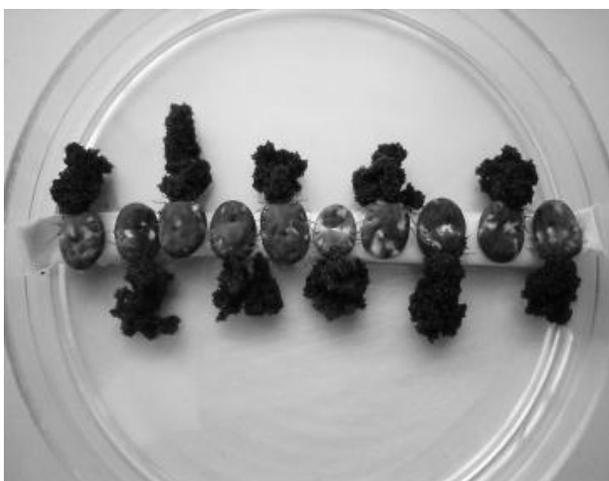


Figura 4: Diseño experimental. Porcentaje de oviposición (%Op), porcentaje de inhibición de la oviposición (%InhOp), porcentaje de eclosión (%Ec), porcentaje de mortalidad de larvas (%ML), concentraciones letales (CL), concentraciones inhibitorias de la oviposición (CIO), concentraciones inhibitorias de la eclosión (CIE)

TÉCNICA DE INMERSIÓN DE ADULTAS

La técnica de inmersión de adultas (TIA) fue descrita por Drummond en 1973 y ha sido utilizada por la FAO para evaluar la susceptibilidad a ixodicidas de nueva síntesis o demostrar la resistencia a los ixodicidas convencionales en garrapatas *R. microplus* (FAO, 2011).

Cada producto evaluado fue probado por duplicado a concentraciones de 1 y 0.5 mg/ml. Los productos se disolvieron previamente en 2 ml de DMSO y esta solución se aforó a 50 ml con agua destilada. Grupos de 10 hembras repletas fueron sumergidas en 25 ml de solución de las dos concentraciones de cada producto durante 30 minutos, posteriormente fueron secadas con papel absorbente y las garrapatas de cada grupo se inmovilizaron dorsalmente sobre cinta adherente dentro de una caja de Petri. Cada caja fue identificada con el nombre de la cepa, fecha de realización de la técnica, clave del químico evaluado y concentración. Los grupos testigo fueron sumergidos en agua destilada y DMSO (T1) o únicamente en agua destilada (T2).



Las cajas se colocaron en una estufa entomológica a 28 °C con una humedad relativa del 80-90%, durante 7 días, concluido este tiempo se contó el número de garrapatas que ovipositaron de cada caja (Figura 5) para determinar el porcentaje de oviposición (%Op).

Figura 5: Hembras de *R. microplus* ovipositando

Para calcular el índice de oviposición (IO) y el porcentaje de inhibición de la oviposición (%InhOp) se tomaron en cuenta los pesos de las hembras antes del ensayo y el peso del total de la masa de huevos producidos hasta los 14 días. Posteriormente los huevos obtenidos de cada caja, se incubaron en viales de cristal por 14 a 30 días hasta la eclosión de las larvas (Figura 6).

Para determinar el porcentaje de eclosión (%Ec), las larvas se inactivaron colocando los viales en una estufa a 60°C durante 2 horas, después se homogenizó el contenido, y se tomó una muestra aleatoria, la cual se colocó en un campo de 100mm². Con ayuda de un microscopio estereoscópico se contaron diferencialmente todos los huevos eclosionados y no eclosionados.



Figura 6: Huevos de *R. microplus* en viales de cristal

Parámetros evaluados¹

- *Porcentaje de oviposición (%Op)*: Se calculó tomando los datos del número de hembras que ovipositaron de cada grupo tratado y su testigo empleando la fórmula:

$$\frac{\text{HEMBRAS QUE OVIPOSITARON} * 100}{\text{HEMBRAS TOTALES}} = \%Op$$

¹ Para realizar los cálculos se tomó a T1

- *Porcentaje de inhibición de la oviposición (%InhOp)*: Para calcular este parámetro primero se calculó el índice de oviposición (IO) tomando el peso de los huevos y las hembras, utilizando la fórmula 1 y posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de la oviposición tomando los datos de IO del grupo tratado y el IO del grupo testigo, con la fórmula 2.

FÓRMULA 1:

$$\frac{\text{PESO DE LOS HUEVOS (g)}}{\text{PESO DE LAS HEMBRAS (g)}} = \text{IO}$$

FÓRMULA 2:

$$\frac{\text{IO GRUPO TESTIGO} - \text{IO GRUPO TRATADO}}{\text{IO GRUPO TESTIGO}} * 100 = \% \text{InhOp}$$

- *Porcentaje de eclosión (%Ec)*: Se calculó tomando los datos del número de cascarones y huevos no eclosionados colocados en el campo de 100 mm² empleando la fórmula:

$$\frac{\text{NO. DE CASCARONES} * 100}{\text{NO. DE CASCARONES} + \text{NO. HUEVOS}} = \% \text{Ec}$$

TÉCNICA DE PAQUETE DE LARVAS

La Técnica de Paquete de Larvas (TLP) fue desarrollada por Stone y Haydock en 1972. Esta técnica está recomendada por la FAO, y ha sido utilizada para detectar la resistencia a ixodicidas y probar moléculas de nueva síntesis (FAO, 2011). Se preparó una solución madre o concentración inicial del 1% para la cual se consideró el volumen requerido (4 ml) y la concentración de la forma técnica de los productos a evaluar (todos con una pureza del 99%). Como diluyente se utilizó tricloroetileno y como fijador aceite de oliva en proporción 2:1. Para conocer la cantidad en gramos de producto necesarios para preparar la solución madre se empleó la fórmula (Prado, 2009):

$$\frac{\%C.I.}{f * 3} \times \frac{100\%}{\%C.F.T.} = \text{g de producto}$$

%C.I.= Concentración inicial (%) que se desea obtener.

f= Valor fraccionario que se asigna al volumen que se requiere preparar.

(3)= Constante. Valor fraccionario del aceite de oliva, considerando que el tricloroetileno se evapora en la mezcla.

% C.F.T.= Concentración (%) de la forma técnica del químico a evaluar.

A partir de la solución madre se realizaron diluciones seriadas de cada producto a concentraciones de 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.0625%, 0.0312%, y 0.015625%. En cada ensayo realizado se utilizaron como testigo papeles impregnados solo con aceite de oliva y tricloroetileno. De cada dilución se impregnaron dos rectángulos de papel filtro Wathman No.1 de 7.5 X 8.5 cm, los cuales se identificaron con la clave del producto y la dilución. Los papeles se impregnaron con 670 μ l de solución y se dejaron secar durante una hora para lograr la evaporación del tricloroetileno.

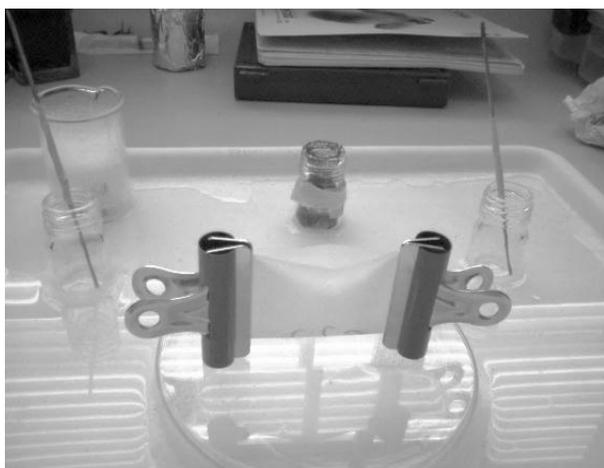


Figura 7: Armado y llenado de paquetes de larvas

Los paquetes de larvas se armaron doblando los papeles filtro por la mitad, con la cara impregnada hacia dentro y sellando los extremos con prensapapeles. El llenado de los paquetes de larvas se hizo sobre una charola con solución jabonosa a manera de trampa como medida de contención para las larvas, las que lograban adherirse a los guantes o a los instrumentos de trabajo fueron capturadas con cinta adhesiva (Figura 7).

En cada paquete se introdujeron aproximadamente 100 larvas de *R. microplus* de 7 a 14 días de edad, y posteriormente se sellaron con un tercer prensapapeles. Los paquetes se incubaron en estufa entomológica a 28 °C con un 80-90% de humedad relativa por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, los paquetes se abrieron y se contaron separadamente las larvas vivas y muertas, con ayuda de un contador de mesa.

Se consideraron como criterios de mortalidad la incapacidad de movimiento y/o de desplazamiento de las larvas (Prado, 2009). Posteriormente se realizaron los cálculos de porcentaje de mortalidad de larvas (%ML) por cada dilución utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{NO. DE LARVAS MUERTAS} * 100}{\text{NO. DE LARVAS VIVAS} + \text{NO. DE LARVAS MUERTAS}} = \%Ec$$

Para el producto que presentó efecto significativo sobre el %ML (*ABorónico*) se realizó una segunda serie de diluciones de 1%, 0.75%, 0.5%, 0.37%, 0.25% y 0% (testigo de aceite y tricloroetileno). Los datos obtenidos en los paquetes de larvas de estas concentraciones permitieron la estimación de las concentraciones letales (CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} y CL_{99}) mediante el análisis Probit.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de %Op, %InhOp, %Ec y %ML se analizaron por ANOVA una vía con un nivel de confianza del 95% con el software Graph Pad Prism 5.4 ®. También se realizó la prueba de Tukey con el mismo software para determinar los grupos con diferencias significativas en relación al grupo testigo.

Los datos de %ML obtenidos por medio de la técnica de paquete de larvas se analizaron por metodología Probit usando el software Polo-Plus® (Le-Ora, 2004). Este análisis permitió calcular las concentraciones letales (CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} y CL_{99}) del producto.

RESULTADOS

RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE INMERSIÓN DE ADULTAS

Los datos de %Op, %InhOp y %Ec obtenidos de la evaluación de los derivados del ácido bórico sobre hembras repletas, a concentración de 1mg/ml y 0.5mg/ml se presentan en las figuras 8 y 9 respectivamente.

Los productos *MMO1,3Cpara* y *MMO1,3Cmeta* produjeron una disminución moderada del porcentaje de eclosión ($p < 0.05$) únicamente a concentraciones de 1mg/ml con respecto al testigo (22.44 ± 3.14 , 19.37 ± 2.70 y 38.14 ± 2.51 respectivamente). En el resto de los productos no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales y sus respectivos grupos testigo en ninguno de los parámetros evaluados ($p > 0.05$).

RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE PAQUETE DE LARVAS

En el cuadro 2 se presentan los resultados de la evaluación de los once productos derivados de ácido bórico mediante la Técnica de Paquete de Larvas. Únicamente el producto *ABorónico* aumentó significativamente la mortalidad de larvas ($p < 0.05$) a concentraciones de 1% y 0.5% (98.57 ± 1.43 y 43.32 ± 17.93 respectivamente) con respecto al grupo testigo (3.058 ± 1.60).

Con base en los resultados del producto *ABorónico*, se llevó a cabo otro ensayo con una segunda serie de diluciones cuyos resultados se presentan en la figura 10. Se observó un efecto dosis-dependiente (figura 11) y las concentraciones letales obtenidas se muestran en el cuadro 3.

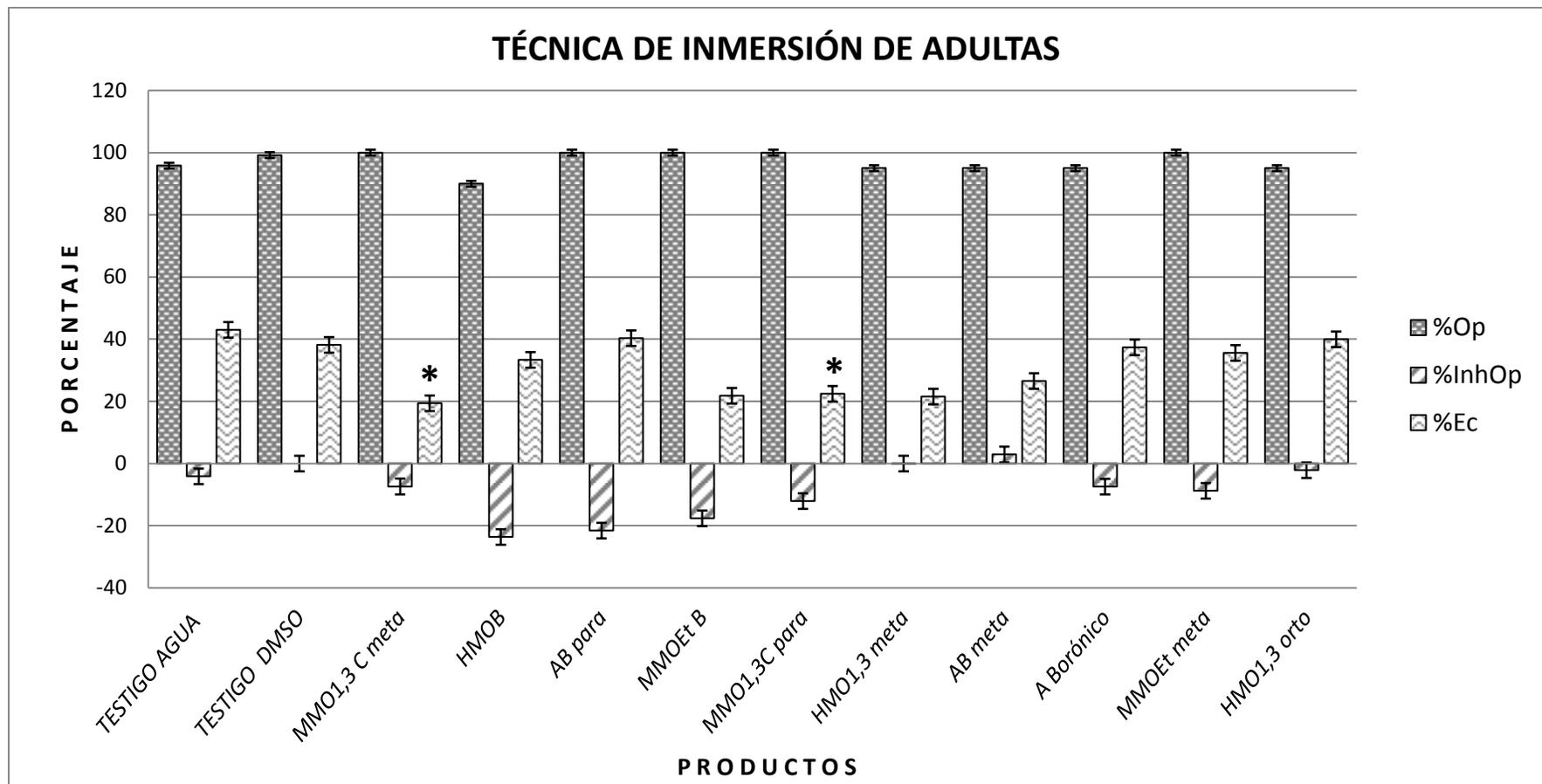


Figura 8: Porcentaje de oviposición (%Op), porcentaje de inhibición de la oviposición (%InhOp) y porcentaje de eclosión de larvas (%Ec) producidos por 10 de los 11 derivados del ácido bórico a concentración de 1mg/ml. Cada barra representa la media (\pm EE).

* Diferencia significativa contra el grupo testigo

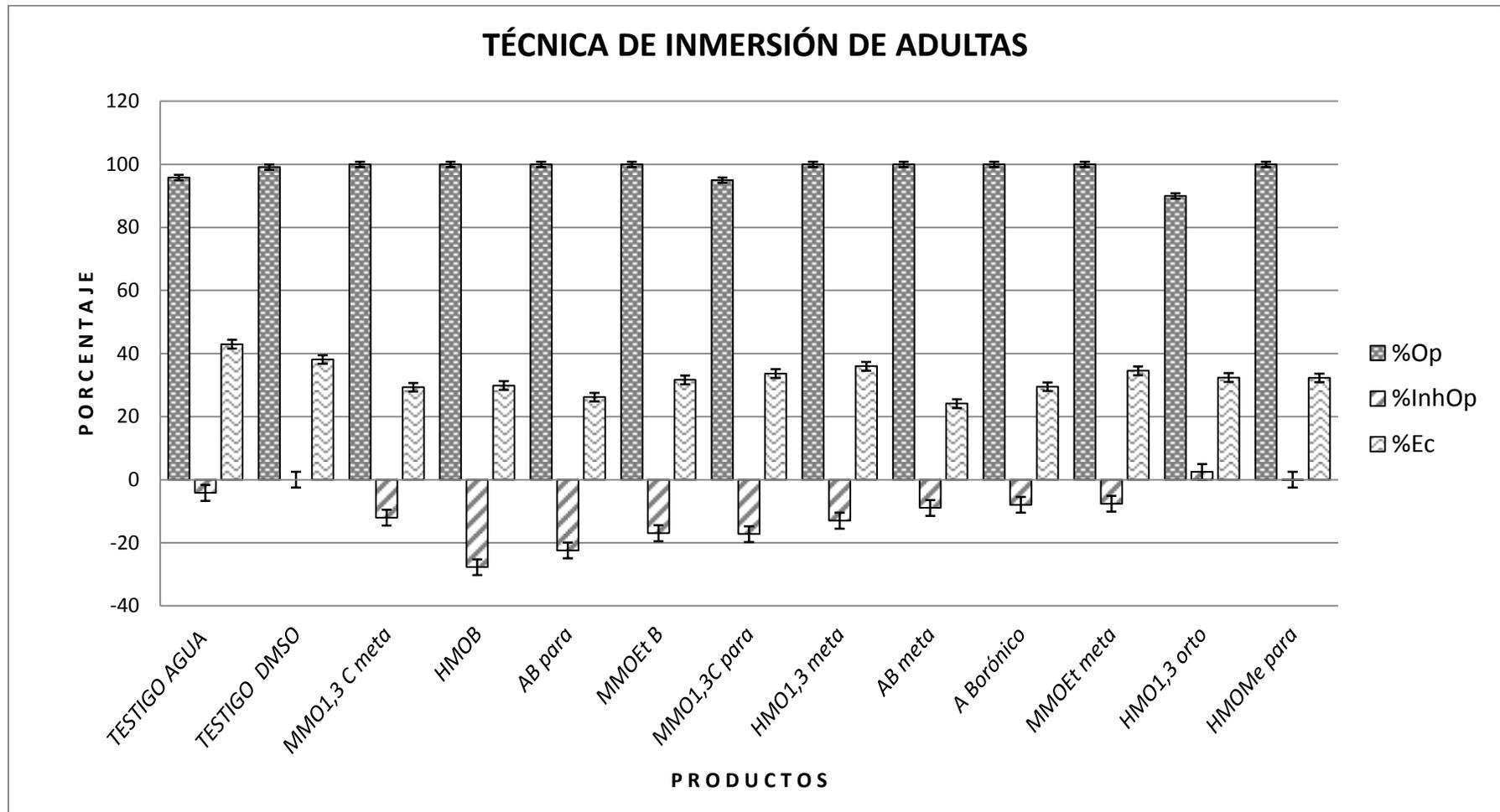


Figura 9: Porcentaje de oviposición (%Op), porcentaje de inhibición de la oviposición (%InhOp) y porcentaje de eclosión de larvas (%Ec) producidos por los 11 derivados del ácido bórico a una concentración de 0.5 mg/ml. Cada barra representa la media (\pm EE).

TÉCNICA DE PAQUETE DE LARVAS

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN %							TESTIGO
	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125	0.015625	
HMO1,3C meta	0.60 ± 0.60	0.46 ± 0.46	0.00 ± 0.00	0.90 ± 0.09	0.385 ± 0.38	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.385 ± 0.25
HMOMe para	1.02 ± 1.02	2.21 ± 1.24	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.48 ± 0.48	0.47 ± 0.47	0.385 ± 0.25
MM01,3C para	0.77 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.69 ± 0.69	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.385 ± 0.25
AB meta	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	0.385 ± 0.25
MMO1,3C meta	1.58 ± 0.86	3.70 ± 3.70	9.10 ± 5.94	2.70 ± 2.45	1.90 ± 1.90	0.00 ± 0.00	0.80 ± 0.40	3.058 ± 1.60
HMO1,3C orto	11.87 ± 5.94	5.98 ± 3.62	11.36 ± 7.31	4.63 ± 2.66	4.99 ± 2.30	4.95 ± 2.63	7.11 ± 4.831	3.058 ± 1.60
AB para	6.72 ± 4.08	12.13 ± 6.47	1.97 ± 1.45	5.34 ± 4.26	5.54 ± 2.53	1.39 ± 0.94	0.00 ± 0.00	3.058 ± 1.60
A Borónico	98.57 ± 1.43*	43.32 ± 17.93*	1.88 ± 1.20	1.38 ± 0.93	1.21 ± 0.74	0.62 ± 0.62	0.41 ± 0.41	3.058 ± 1.60
HMOB	1.49 ± 0.54	0.85 ± 0.05	0.48 ± 0.48	0.38 ± 0.38	0.00 ± 0.00	1.41 ± 0.28	0.85 ± 0.03	0.248 ± 0.25
MMOEtB	1.03 ± 0.08	0.66 ± 0.66	0.00 ± 0.00	0.46 ± 0.46	0.89 ± 0.01	0.00 ± 0.00	1.03 ± 0.03	0.248 ± 0.25
MMOEt meta	1.52 ± 1.52	0.00 ± 0.00	1.09 ± 0.39	0.32 ± 0.32	0.95 ± 0.95	0.95 ± 0.95	0.57 ± 0.57	0.248 ± 0.25

Cuadro 2: Porcentaje de mortalidad de larvas (%ML) de *R. microplus* producida por los once compuestos derivados del ácido bórico evaluados. Cada valor representa la media (± EE).

*Diferencia significativa contra el grupo testigo.

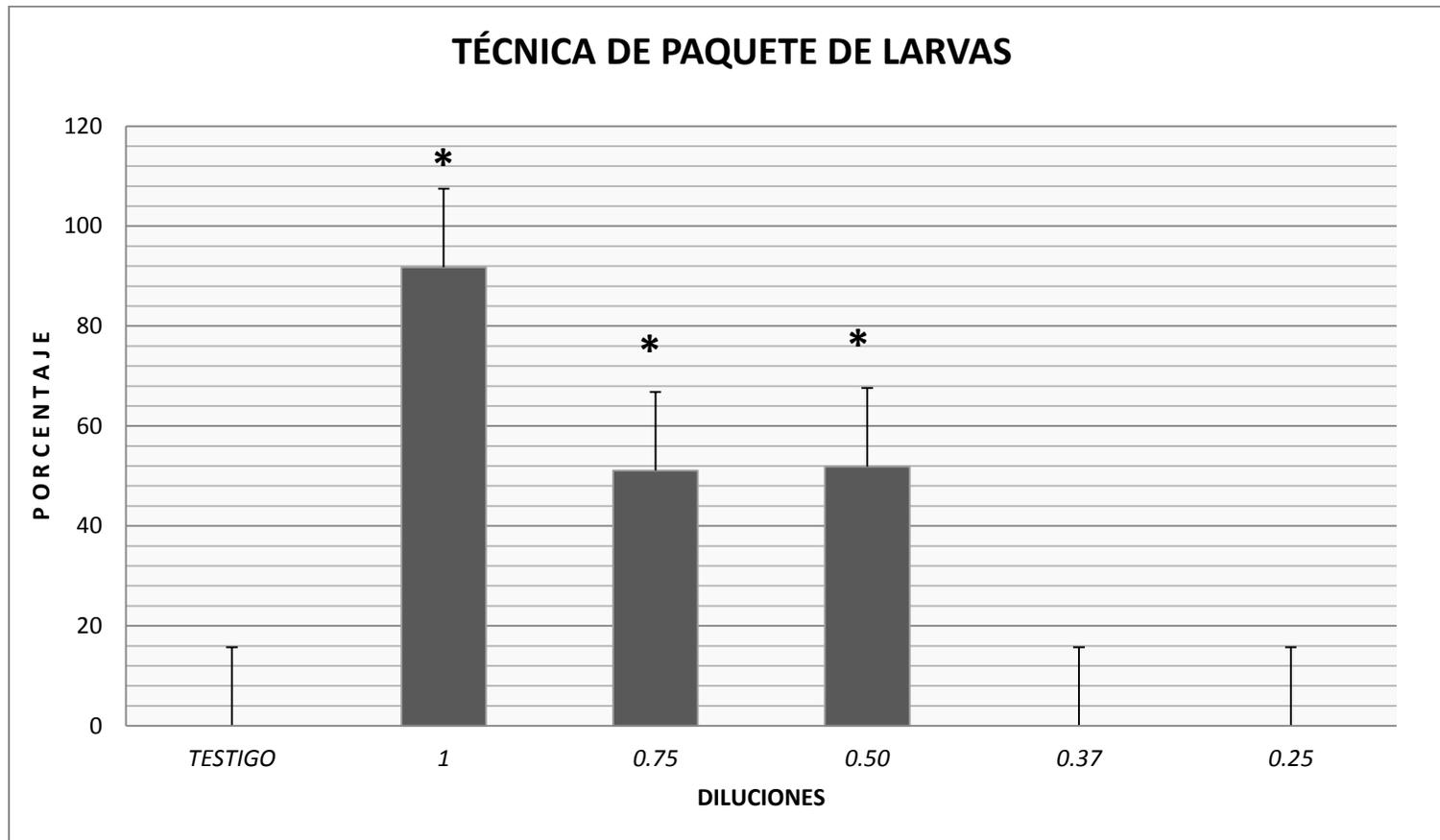


Figura 10: Porcentaje de mortalidad de larvas (%ML) de *R. microplus* producidos por el producto *ABorónico*. Cada barra representa la media (\pm EE)

* Diferencia significativa contra el grupo testigo.

Producto <i>ABorónico</i>		
<i>n= 1548</i>	<i>pendiente= 10.340 ± 0.521</i>	
Concentraciones letales	Índice de confianza (95%)	
CL₁₀	0.560	0.486 a 0.611
CL₅₀	0.745	0.696 a 0.800
CL₉₀	0.991	0.904 a 1.154
CL₉₉	1.251	1.090 a 1.598

Cuadro 3: Concentraciones letales del producto *ABorónico* y sus respectivos índices de confianza, obtenidos mediante el análisis Probit (Polo-Plus Le-Ora Software)

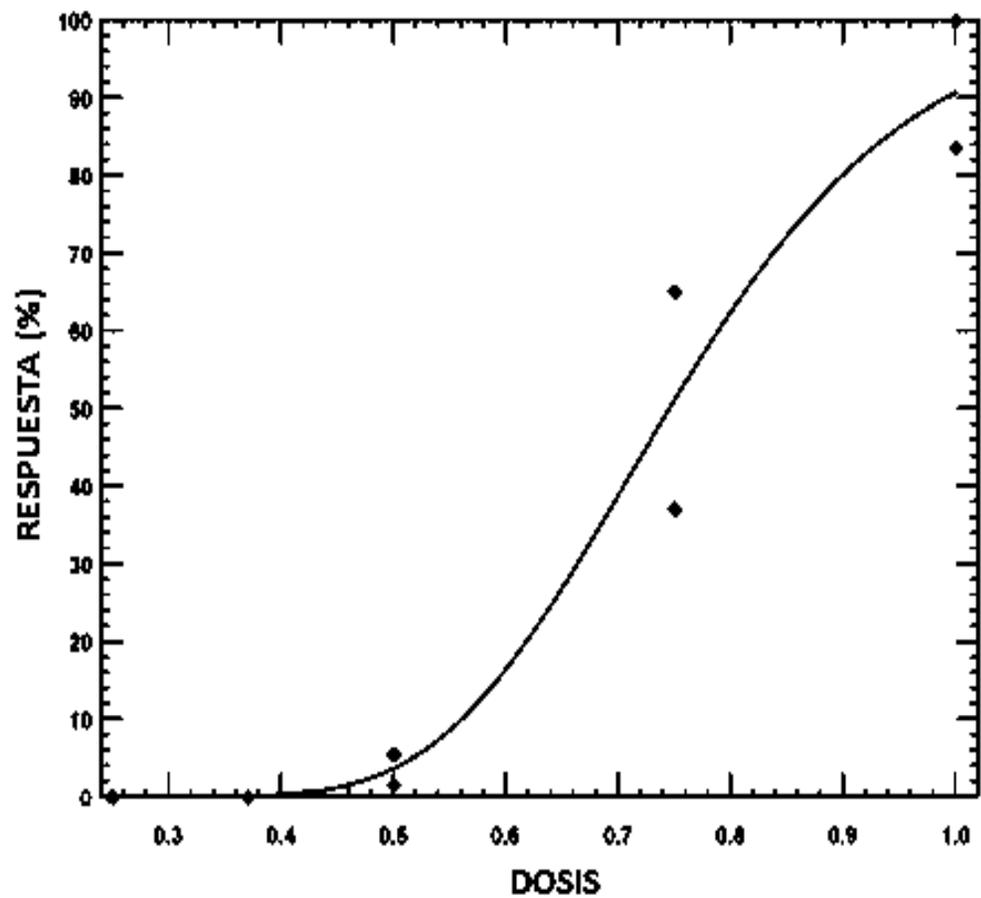


Figura 11: Concentraciones letales del producto *ABorónico*, obtenidos mediante el análisis Probit (Polo-Plus Le-Ora Software).

DISCUSIÓN

La infestación por *R. microplus* en el ganado, representa un grave problema económico en la industria pecuaria, no solo por las pérdidas productivas, sino también, por las enfermedades transmitidas y la limitación de la movilización del ganado. El método de control más utilizado a nivel mundial ha sido el empleo de ixodicidas químicos; sin embargo, el uso irracional de éstos ha generado la aparición de resistencia a la mayoría de las familias de productos comerciales. El desarrollo de nuevos fármacos con acción ixodicida, es una alternativa para el manejo de la resistencia. Por esta razón, en este trabajo se realizó la evaluación de once nuevos derivados del ácido bórico diseñados y sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

El ácido bórico y sus derivados presentan propiedades de aplicación médica muy diversas y aunque su mecanismo de acción no se encuentra bien establecido, se conoce su eficacia contra artrópodos como cucarachas, mosquitos, hormigas y ácaros del polvo. Además la estructura de estos compuestos no presenta similitud con ninguna familia de ixodicidas disponible comercialmente. Por lo que la posibilidad de que estos compuestos tengan efecto sobre garrapatas y no presenten resistencia cruzada con alguna familia de ixodicidas hace interesante su estudio.

En este estudio se evaluaron once productos derivados del ácido bórico por medio de la TIA y TPL, ambas técnicas están recomendadas por la FAO y son ampliamente utilizadas para el diagnóstico de susceptibilidad o resistencia a ixodicidas, así como también son las pruebas estándar para probar moléculas de nueva síntesis sobre *R. microplus*.

La evaluación de los derivados del ácido bórico por la TIA mostró que los productos *MMO1,3Cmeta* y *MMO1,3Cpara* disminuyeron moderadamente el %Ec a una concentración de 1 mg/ml. En estudios realizados por Prado (2009) y Pérez-González (2010) utilizando diferentes carbamatos de nueva síntesis, se observó que algunos de estos productos tuvieron efecto negativo sobre el %Ec y sobre %InhOp, este último parámetro, indicó una reducción en el peso de los huevos ovipositados y adicionalmente, estos huevos presentaban un color más oscuro y se apreciaron desecados. En este trabajo, aunque no se observó afectado el %InhOp, ni la apariencia de los huevos, si se afectó la eclosión, lo que sugiere que estos productos tienen un mecanismo de acción diferente a los carbamatos evaluados anteriormente bajo las mismas condiciones experimentales.

Dado el efecto moderado de los productos *MMO1,3Cmeta* y *MMO1,3Cpara* sobre adultas repletas, se sugiere que las concentraciones utilizadas en esta prueba no fueron suficientes para demostrar una mayor eficacia. En otros artrópodos las concentraciones eficaces de ácido bórico utilizadas son más altas, como observaron Rust *et al.* (2004) en hormigas *Linepithema humile* que a concentraciones de 5 y 10mg/ml se produjo la mortalidad de entre el 50 y el 88%. En un estudio realizado por Xue *et al.* (2006) se observó que el ácido bórico a una concentración de 10mg/ml en fases adultas de *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus* y *Ochlerotatus taeniorhynchus*, produjo mortalidad de entre el 80 y el 100%. Para el control de cucarachas *Blatella germanica* se recomienda utilizar soluciones entre el 2 y el 5% de ácido bórico para obtener mortalidades del 100% (Cochran, 1994). Por lo anterior, este trabajo sienta las bases para realizar futuros ensayos con éstos productos a

mayores concentraciones a fin de establecer si concentraciones mayores que las utilizadas presentan una mejor eficacia sobre la eclosión.

Para la TPL se realizaron diluciones dobles seriadas, lo cual nos permitió determinar que el producto *ABorónico* produjo un aumento significativo de la mortalidad de larvas a concentraciones de 1, 0.75 y 0.5%, observándose un efecto dosis-dependiente. El criterio de mortalidad de larvas tomado para evaluar el efecto del producto, fue la muerte (inmovilidad total) o la incapacidad de desplazarse (movimiento leve sin desplazamiento). En la concentración del 1 y 0.75% se observó 100% de mortalidad e inmovilidad total de las larvas, sin embargo, en la concentración de 0.5% se observó también incapacidad de desplazamiento en una proporción menor de las mismas, lo que sugiere que el efecto de este producto puede ser sobre el sistema nervioso del parásito produciendo parálisis. En este contexto, en un estudio realizado por Habes *et al.* (2006) probando ácido bórico a concentraciones de 8.2 a 49.62%, se observó en cucarachas *Blatella germanica* un efecto dosis dependiente en la reducción de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, lo cual apoya la hipótesis de un posible efecto neurotóxico.

Por otro lado, si se lograra demostrar un efecto neurotóxico por alteración de la acetil colinesterasa, sería también posible la existencia de resistencia cruzada con otros compuestos con el mismo mecanismo de acción, por lo que es importante hacer evaluaciones de este producto en cepas resistentes a diferentes organofosforados.

Comparando las concentraciones efectivas del producto *ABorónico* (1, 0.75 y 0.5%), con las de algunos ixodicidas comunes como: permetrina (0.005%), amitraz (0.02%) y coumaphos (0.02%), podemos observar que la

concentración eficaz del *ABorónico* fue mayor que la de éstos. Aunque las concentraciones efectivas de este producto son más altas, se ha reportado que el margen de seguridad del ácido bórico en mamíferos es muy amplio, debido a que este compuesto no es volátil y es incapaz de penetrar a través de la piel intacta (Gore *et al.*, 2004). Sin embargo, para conocer la toxicidad del producto *ABorónico*, es necesario realizar en un futuro pruebas de toxicidad en mamíferos.

La TIA descrita originalmente por Drummond en 1973, utiliza como diluyente únicamente agua destilada, en este estudio, los productos fueron previamente solubilizados en DMSO como fue realizado anteriormente por Prado (2009), debido a que estas moléculas son insolubles en agua. Por lo anterior, también se utilizó un testigo con agua y DMSO para conocer el efecto de este solvente en garrapatas. Tanto en el estudio anterior como en este, no se encontró efecto del DMSO sobre las garrapatas tratadas y tampoco se observaron diferencias significativas entre el T1 y el T2 por lo que concluimos que los efectos observados fueron producidos por los derivados del ácido bórico y no por el DMSO.

Finalmente, dado que la molécula base para el diseño de los productos probados en este trabajo fue el ácido fenilborónico libre (*ABorónico*), el cual presentó una alta eficacia sobre la mortalidad de larvas, se vislumbra la posibilidad de obtener derivados de esta moléculas con buena eficacia como ixodicidas, aun cuando la mayoría de los productos probados no la presentaron en las pruebas. Los productos con eficacia moderada en la TIA presentan entre ellas una gran similitud en su estructura y síntesis, lo que indica un camino posible para la mejora del diseño de estas moléculas buscando mejorar su efecto sobre *R. microplus*.

CONCLUSIONES

- ✓ Los productos identificados como *MMO1,3Cmeta* y *MMO1,3Cpara* presentaron una disminución moderada del %Ec en la TIA, sin embargo, no fue posible establecer las concentraciones inhibitorias de la eclosión de éstos productos.
- ✓ El producto *ABorónico* presentó una alta eficacia sobre la mortalidad de larvas en la TPL a concentraciones de 1, 0.75 y 0.5%.
- ✓ Los productos *MMO1,3Cmeta* y *MMO1,3Cpara* no tuvieron acción larvicida, y el producto *ABorónico* no presentó efecto sobre ninguno de los parámetros evaluados en la TIA, lo que indica que estos productos, presentan un mecanismo de acción diferente.
- ✓ La evaluación de los efectos de los derivados del ácido bórico *in vitro* sobre la oviposición y la viabilidad de las larvas de *R. microplus*, sugiere que estos productos tienen potencial como ixodicidas y deben ser evaluados más ampliamente.

REFERENCIAS

1. Alonso-Díaz M.A., García L., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutiérrez R., Angel-Sahagún C.A., Rodríguez-Vivas R.I., Fragoso-Sánchez H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 2007;147:336-340.
2. Alonso-Díaz M.A., Rodríguez-Vivas R.I., Fragoso-Sánchez H., Rosario-Cruz R. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch. Med. Vet.* 2006;38:105-113.
3. Anderson J.F., Magnarelli L.A. Biology of ticks. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2008;22:195-215.
4. Baran J.E., La nueva farmacoterapia orgánica: Compuestos de boro. *Acta Farm. Bonaerense.* 1989;8:199-206.
5. Barker S.C., Murrell A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. *Exp. Appl. Acarol.* 2002;28:55-68.
6. Barré N., Li A., Miller R., Gäia H., Delathière J.M., Davey R., George J. In vitro and in vivo evaluation of deltamethrin and amitraz mixtures for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in New Caledonia. *Vet. Parasitol.* 2008;155:110-119.

7. Botana L. Farmacología y terapéutica veterinaria. España: McGraw-Hill. 2002.
8. Burnett J. Dust mite control method using DOT. US Patent (US005672362A) 1996.
9. Cardozo N. Producción animal/ Bovinos de carne/ Sanidad animal/ Resistencia de la garrapata (*B. microplus*) a los acaricidas 2007. (Sitio argentino de producción animal) Recuperado en Septiembre de 2011 de <http://www.produccion-animal.com.ar/>
10. Cochran D.G. Toxic effects of boric acid on the German cockroach. Birkhäuser Verlag. Basel. 1995;51:561-563.
11. De Castro J.J. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. Vet. Parasitol. 1997;71:77-97.
12. De Castro J.J., Newson R.M. Host resistance in cattle tick control. Parasitol. Today. 1993;9:13-17.
13. De la Fuente J., Canales M., Pérez de la Lastra J.M., Kocan K.M., Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Anim. Health Res .Rev. 2007;8:23-28.
14. Encinas A., Oleaga A., Pérez R. Garrapatas duras. En: Cordero C.M. Parasitología Veterinaria. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana, 1999:420-429.

- 15.FAO 2011. Module 1 Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. Recuperado en Junio de 2011 de <http://ftp.fao.org/ago014e05.pdf>
- 16.George J. Present and future technologies for tick control. Annals New York Academy of Sciences. 2000;916:583-588.
- 17.George J.E., Pound J.M., Davey R.B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. Parasitol. 2004;129:S353-S366.
- 18.Gore J.C., Zurek L., Santangelo R.G., Stringham S.M., Watson D.W., Schal C. Water solutions of boric acid and sugar for management of German cockroach populations in livestock production systems. J. Econ. Entomol.2004;97:715-720.
- 19.Habes D., Morakchi S., Aribi N., Farine J.P., Soltani N. Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. Pest. Biochem. Physiol. 2006;84:17-24.
- 20.Horak I.G., Camicas J.L., Keirans J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. Exp. Appl. Acarol. 2002;28:27-54.
- 21.Jonsson N.N., Mayer D.G., Matschoss A.L., Green P.E., Ansell J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. Vet. Parasitol. 1998;78:65-77.

22. Jonsson N.N., Mayer D.G., Matschoss A.L., Pepper P., Green P.E., Ansell J. Resistance of Holstein –Fresian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Vet. Parasitol.* 2000;89:297-305.
23. Kaaya G.P., Hassan S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Exp. Appl. Acarol.* 2000;24:913-926.
24. Kang Y.B., Jang D.H. Scanning electron microscopic observations on the surface structure of the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) female specimens. *Korean J. Parasitol.* 1985;23:313-323.
25. Kilani-Morakchi S., Aribi N., Soltani N. Activity of boric acid on German cockroaches: Analysis of residues and effects on reproduction. *African J. Biotechnol.* 2009;8:703-708.
26. Le-Ora, Software. 2004. A user's guide to Probit or logit analysis. Le Ora Software.
27. Martínez J.O. Síntesis de heterociclos derivados del boro, mediante el protocolo de la química verde y su evaluación farmacológica (Tesis de doctorado en ciencias químicas) Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: UNAM, 2011.
28. Muro F.J., Cruz-Vázquez C., Fernandez-Ruvalcaba M., Molina J. Effect of *Melinis minutiflora* extracto in *Boophilus microplus* tick larvae. *Vet. Méx.* 2004;35:153-159.
29. Murrell A., Campbell N.J.H., Barker S.C. The value of idiosyncratic markers and changes to conserved tRNA sequences from the

- mitochondrial genome of hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) for Phylogenetic inference. *Syst. Biol.* 2003;52:296-310.
30. Nigg H., Simpson S. Toxicity of boron compounds to certain arthropods. US Patent (US- 6645949BI) 1993.
31. Nijhof M., Taoufik A., de la Fuente J., Kocan K.M., de Vries E., Jongejan F. Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *Int. J. Parasitol.* 2007;37 653-662.
32. NOM-019-ZOO-1994 recuperado en agosto de 2011 de www.normateca.sagarpa.gob.mx
33. Pérez-Cogollo L.C., Rodríguez-Vivas R.I., Ramirez-Cruz G.T., Miller R.J. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet. Parasitol.* 2010;168:165-169.
34. Pérez-González I.E. Evaluación *in vitro* de la eficacia de nuevos carbamatos sobre cepas de garrapatas del género *Boophilus sp.* resistentes a ixodicidas. (Tesis de maestría en ciencias de la salud y de la producción animal). Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: UNAM, 2010.
35. Prado MG. Evaluación *in vitro* de la eficacia de nuevos carbamatos sobre garrapatas *Boophilus microplus*. (Tesis de maestría en ciencias de la salud y de la producción animal) Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: UNAM, 2009.

36. Quiroz H. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México: Limusa, 1984.
37. Rodríguez-Vivas R.I., Rodríguez-Arevalo F., Alonso-Díaz M.A., Fragoso-Sánchez H., Santamaría V.M., Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the state of Yucatan, Mexico. *Prev. Vet. Med.* 2006;75:280-286.
38. Romero K.S., Obtención de tres ésteres de Hantzsch derivados de los ácidos formilfenilborónicos, empleando irradiación por microondas (Tesis de licenciatura) Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: UNAM, 2010.
39. Rust M., Reiersen D., Klotz J. Delayed toxicity as a critical factor in the efficacy of aqueous baits for controlling argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *J. Econ. Entomol.* 2004;97(3):1017-1024.
40. SAGARPA 2011. Recuperado en septiembre de 2011, de www.conasa.org.mx/conasaplanestrategarrap.pdf
41. Samish M., Rehacek J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* 1999;44:159-82.
42. Soulsby E. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. México: Interamericana, 1988.
43. Uilenberg G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet. Parasitol.* 1995;57:19-41.

44. Willadsen P. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol.* 2006;138:161-168.
45. Xue R, Kline D, Ali A, Barnard D. Application of boric acid baits to plant foliage for adult mosquito control. *J. Am. Mosq. Cont. Assoc.* 2006;22:497-500.
46. Yan S. Evaluation of local pathogenic fungi, boric acid, and their potential synergism for control of the European fire ant, *Myrmica rubra* (Thesis, master of science in Entomology). Beijing, China: Beijing Forestry University, 1997.
47. Zurek L., Watson D.W., Schal C. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hiphomycetes) and boric acid against the german cockroach (Dictyoptera: Blatellidae) *Biol. Control.* 2002;23:296-302.