



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“Eficacia del ixodicida experimental 712-BF-016 contra *Rhipicephalus*  
(*Boophilus*) *microplus* *in vitro* e *in vivo* en bovinos”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**GUADALUPE SANTILLAN VELÁZQUEZ**

**TUTOR: DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMITÉ TUTORAL:  
DR. HECTOR SALGADO ZAMORA  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL IPN  
DR. PEDRO MENDOZA DE GIVES  
CENID-PARASITOLOGÍA VETERINARIA, INIFAP**

**MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2013**



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.

# AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Dr. Froylan Ibarra Velarde por brindarme su confianza y permitirme ser parte de proyecto, por sus grandes consejos y asesoría.
- ❖ A los Doctores Margarita Romero Avila y al Dr Blas Flores de la Facultad de Química de la UNAM, quien diseño y sintetizó el compuesto 712-BF-016 utilizado en este proyecto.
- ❖ Al Dr. Hector Salgado Zamora del Laboratorio de Química Organiza de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, quien sintetizo el vehículo por el cual el fármaco tuviera una mejor absorción sobre la epidermis de los animales para poder medir su eficacia.
- ❖ Al Dr. Pedro Mendoza de Gives que pertenece al CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP quien formo parte de mi comité tutorial, y a quien agradezco sus consejos y observaciones.
- ❖ A los miembros del jurado Dr. Fernando Alba Hurtado, Dra. María Teresa Quintero, Dra. Ana María Salazar Martínez, por sus acertados comentarios para mejorar este trabajo.
- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por la oportunidad de pertenecer a esta gran Institución, y brindarme sus enseñanza académica para alcanzar mis metas
- ❖ Al Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la UNAM, en donde se pudieron obtener las garrapatas adultas asi como las larvas utilizadas en este proyecto, y por todo el apoyo para la realización de este trabajo.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría.
- ❖ Al proyecto PAPIT DGAPA- UNAM IN – 201710 por el apoyo financiero recibido para poder realizar este trabajo.
- ❖ A mis profesores, quienes son parte fundamental en mi formación academica.

# DEDICATORIA

- ❖ A mi Mama, a quien quiero amo y adoro con todo mi corazón y que me ha apoyado en todo mi camino.
- ❖ A mis amigas que siempre estuvieron conmigo Cony, Estefany, Lucy, que siempre me brindaron su amistad incondicional, gracias

## INDICE

1. Índice.....	1,2,3,4,5
2. Índice de Figuras.....	4
3. Índice de Cuadros y Gráficas.....	4
4. Resumen .....	6,7
5. Introducción .....	8
6. Antecedentes sobre <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	8
7. Distribución Geográfica de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	9
8. Clasificación Taxonómica (Murrel et. al, 2000).....	10
9. Morfología de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	10
10. Ciclo Biológico.....	13
11. Patogenia de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	
a) Los efectos directos sobre el organismo del huésped.....	14
b) Los efectos indirectos sobre el organismo del huésped.....	15
12. Métodos de Control de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	16
13. Pruebas para determinar el porcentaje de eficacia in vitro.....	18
a) Prueba de inmersión de adultas (PIA).	
b) Prueba de inmersión de larvas (PIL).	
c) Prueba de inmersión de larvas (PIL).....	19
14. Fenómeno de resistencia de las garrapatas a los Ixodocidas.....	20
15. Antecedentes sobre el compuesto experimental 712-BF-016.....	21
16. Objetivo General y Objetivos Particulares.....	21
17. Hipótesis.....	22
18. Justificación .....	22

<b>19. Material y métodos</b>	
a) Ubicación del estudio	
b) Material Biológico .....	23
<b>20. Experimento 1: Evaluación de la eficacia ixodida in vitro del compuesto experimental 712-BF-016 contra larvas de garrapatas <i>R. (Boophilus) microplus</i></b>	
a) Ubicación del estudio	
b) Obtención de larvas para evaluación	
c) Desarrollo de la prueba.....	24
<b>21. Experimento 2: Evaluación de la eficacia ixodida in vitro del compuesto experimental 712-BF-016 contra garrapatas adultas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>22. Experimento 3: Evaluación de eficacia ixodida del compuesto experimental 712-BF-016 mediante una prueba de campo en becerros infestados en forma experimental.</b>	
a) Ubicación del área de estudio.....	25
b) Animales	
c) Conducción del estudio	
d) Medición de la eficacia	
e) Análisis estadístico.....	26
<b>23. Recolección de hembras adultas pos-tratamiento</b>	
a) Incubación	
b) Separación de la masa de huevos.....	27
c) Conteo de la eclosión.....	28
d) Parámetros evaluados.....	29
<b>24. Resultados .....</b>	<b>30</b>
<b>25. Discusión.....</b>	<b>33,34,35,36</b>
<b>26. Conclusión.....</b>	<b>37</b>
<b>27. Referencias.....</b>	<b>38,39,40</b>

<b>28. Cuadross</b>	y
Graficas.....	41,42,43,44,45
<b>29. Apéndice 1: Evaluación de compuestos mediante la Técnica de Paquete de Larvas (Stone y Haydock, 1962).</b>	
a) Preparación de concentración inicial o solución madre.....	46
b) Preparación de diluciones	
c) Impregnación de papeles filtro.....	47
d) Armado y llenado de paquetes	
e) Incubación	
f) Lectura de resultados.....	48
g) Evaluación de la eficacia.....	49
<b>30. Apéndice 2: Evaluación de compuestos mediante la Técnica de Inmersión de hembras Adultas (Drummond et al., 1967) .....</b>	<b>49</b>
a) Garrapatas	
b) Inmersión	
c) Incubación	
d) Separación de la masa de huevos.....	50
e) Conteo de la eclosión	
f) Parámetros evaluados.....	51
<b>31. Apéndice 3: Evaluación de la eficacia de un compuesto experimental contra garrapatas <i>Rhicephalus (Boophilus) microplus</i> en becerros infestados en forma experimental</b>	
a) Animales	
b) Infestación de bovinos	
c) Adaptación de los bovinos al establo.....	52
d) Infestación	
e) Tratamiento con un ixodicida (garrapaticida) o algún compuesto experimental	
f) Liberación de los bovinos.....	53
<b>32. Portada del artículo publicado del presente estudio.....</b>	<b>54</b>

## Índice de figuras

- Figura 1.- Distribucion geografía de *R. (Boophilus) microplus* y *Amblyoma cajennense*.....9
- Figura 2.- Macho de *R. (Boophilus) microplus* vista ventral.....11
- Figura 3.- Vista dorsal de un macho de *R. (Boophilus) microplus*.....12
- Figura 4.- Vista dorsal de una Hembra de *R. (Boophilus) microplus*.....12
- Figura 5.- Vista ventral de una Hembra de *R. (Boophilus) microplus*.....13
- Figura 6.- Ciclo de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.....14
- Figura 7.- Estructura Química del Compuesto Experimental 712-BF-016.....21

## Índice de Cuadross y graficas

- Cuadros 1.- Porcentaje de Mortalidad Larvaria de *R. (Boophilus) microplus* por medio de la Técnica de paquete de larvas de Stone y Haydoc (1962).....41

Cuadros 2.- Porcentaje de Mortalidad In Vitro de R. ( <i>Boophilus</i> ) <i>microplus</i> adulta con el compuesto experimental 712-BF-016. (Técnica de inmersión de adultas, Drummond, 1973).....	42
Cuadros 3.- Concentración Letal 50% del compuesto 712-BF-016 contra garrapatas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en Prueba de Inmersión de Larvas (Stone y Haydock), en Prueba de Inmersión de adultas (Drummond).....	44
Cuadros 4.- Porcentaje de eficacia del compuesto 712-BF-016 y cipermetrina contra garrapatas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en ganado infestado en forma experimental.....	44
Cuadros 5 .- Índice de oviposición y porcentaje de inhibición de la ovoposición de las garrapatas colectadas del ganado tratado con el compuesto experimental 712-BF-016 o con cipermetrina.....	45
Cuadros 6.- Porcentaje de eclosión de huevos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> de garrapatas colectadas de ganado tratado con el compuesto 712-BF-016 o cipermetrina.....	45
Grafica 1.- Porcentaje de mortalidad en larvas de R. ( <i>Boophilus</i> ) <i>microplus</i> pos-tratamiento a diferentes concentraciones del compuesto 712-BF-016.....	42
Grafica 2.- Porcentaje de mortalidad en larvas y adultas de R. ( <i>Boophilus</i> ) <i>microplus</i> postratamiento con diferentes concentraciones del compuesto 712-BF-016.....	43
Grafica 3.- Curva dosis respuesta de las concentraciones utilizadas del compuesto 712-BF-016 contra garrapatas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en la Técnica de paquete de larvas y en la Técnica de inmersión de adultas.....	43



## **Eficacia de un ixodicida del compuesto experimental 712-BF-016 contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus in vitro e in vivo en bovinos***

### **Resumen**

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* constituye un serio problema para la ganadería mundial en virtud de las grandes pérdidas económicas que ocasiona por diversos conceptos, entre ellos la trasmisión de enfermedades como la anaplasmosis y la piroplasmosis. Su control generalmente se realiza mediante compuestos ixodicidas los cuales a través de las décadas han generado la aparición de resistencia. El objetivo del presente estudio fue el de evaluar la eficacia ixodicida del compuesto experimental 712-BF-016 contra garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus in vitro* y en bovinos. En un primer experimento se evaluó mediante 5 repeticiones la eficacia ixodicida *in vitro* del compuesto citado contra larvas de (*B.*) *microplus* utilizando la prueba de paquete de larvas de Stone y Haydock. En un segundo estudio se evaluó la eficacia del compuesto contra garrapatas adultas obtenidas de bovinos infestados utilizando la prueba de Drummond de inmersión de garrapatas adultas, ambas pruebas autorizadas por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO). En un tercer experimento se evaluó la eficacia del compuesto en 24 bovinos infectados c/u con 20,000 larvas de una cepa susceptible de (*B.*) *microplus* ubicados en el rancho de "Santa Cruz" de Hueytamalco, Puebla. A los 21 días posteriores a la infestación, se cuantificó el número de garrapatas adultas para conformar grupos. Los bovinos fueron divididos en 4 grupos de 6 animales cada uno. El grupo 1 recibió una aspersion con el compuesto experimental formulado al 16%, el grupo 2 se trató con el compuesto experimental al 20% y el grupo 3 recibió Cipermetrina (Tlalaxin-13) en aspersion al 16%. La eficacia fue medida al 3er día postratamiento como porcentaje de derribe de garrapatas en los grupos tratados con referencia al testigo sin tratamiento. Los resultados de la prueba *in vitro* en paquete de larvas indicaron una mortalidad de 93.2%, 83.7%, 67.6%, 60.9% y 48.4%, a concentración del 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%,

0.0625%, respectivamente y de 97.60%, 95.5%, 91.9%, 85.9% y 77.5% contra garrapatas adultas a concentración del 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125% y 0.0625%, respectivamente. En el estudio con bovinos los resultados obtenidos indicaron una eficacia de 61% y 76% para el compuesto 712-BF-016 a las concentraciones de 16 y 20%, respectivamente y de 85% para la cipermetrina formulada al 16%. Se concluye que no hubo concordancia entre los resultados obtenidos *in vitro* y los obtenidos en bovinos. En este último caso posiblemente se requiera de un mejor vehículo para formular el compuesto.

Estudio financiado parcialmente por el proyecto PAPIIT-DEGPA-UNAM IN201710.

## INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ácaros del superorden parasitiformes orden Ixodida Superfamilia Ixodoidea, ectoparásitos hematófagos que parasitan a los animales domésticos, silvestres y al hombre. Algunas de ellas tienen relevancia adicional en virtud de que son importantes transmisores de enfermedades tanto en el ganado de zonas tropicales y subtropicales (Baxter et al., 1998), así como de enfermedades involucradas con la salud pública en el mundo (Solis, 1991).

En México, se han identificado 77 especies siendo *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Amblyomma cajennense* las especies de mayor importancia para el ganado bovino (Jongelan, 2004).

### **Antecedentes sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Esta garrapata llegó al continente Americano junto con el ganado bovino traído por los españoles desde la época de la colonia y representa uno de los mayores problemas en la ganadería bovina, en virtud del gran impacto económico debido a diversas causas tales como: daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre, efectos tóxicos, reducción en la producción de leche, en la producción de becerros y el incremento en los costos de control; además de los agentes etiológicos que transmiten como: virus, bacterias, rickettsias y protozoos (Rodríguez-Vivas et al., 2005).

Importante de notar, es la transmisión de la babesiosis o piroplasmosis causadas por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, así como la anaplasmosis, debida a la acción y presencia de *Anaplasma marginale*, enfermedades que causan considerable morbilidad y/o mortalidad en el ganado bovino (Ibarra, 2012).

## Distribución geográfica de *R. (Boophilus) microplus*

*R. (Boophilus) microplus*, (Canestrini, 1887) se distribuye geográficamente en África, América, Australia y Asia por lo que se presenta en 5 especies: *R. haemaphysaloides*, *R. appendiculatus*, *R. microplus*, *R. annulatus*, *R. sanguineus*. Su distribución actual en América comprende desde la frontera de los Estados Unidos y México, hasta la parte norte de Argentina, siendo abundante en las regiones tropicales bajas y en el ganado de raza europea (SENASICA, 2011).


En México *R. (Boophilus) microplus* se localiza entre los paralelos 32 de los hemisferios norte y sur (Lima y col, 2000) y obedece a factores ambientales, como la humedad relativa, la temperatura y la vegetación, que son determinantes en la distribución de las especies.

Otros factores que intervienen en la distribución (del parásito) son la altitud, presencia y abundancia de hospederos y las prácticas de control o erradicación que el hombre ejerce sobre las poblaciones de garrapatas (Rodríguez Vivas, 2005).

Esta garrapata ocupa el 53% del territorio nacional y se le atribuye importancia por su amplia distribución principalmente en zonas del trópico bajo de México. (Rodríguez Vivas, 2005).



Rodríguez Vivas et al, 2005.

Figura 1. Distribución geográfica de *B. microplus* y *A. cajennense* en México. 

## **Clasificación Taxonómica (Murrel et al, 2000).**

**Phylum:** Artrópoda (Siebold & Stannius 1845)

**Subphylum:** Chelicerata

**Clase:** Arachnida (Lamarck 1815)

**Orden:** Acari (Nitzsch 1818)

**Suborden:** Ixodoidea (Banks 1894)

**Familia:** Ixodidae (Murray 1877)

**Género:** *Rhipicephalus* (*Boophilus*)

**Especie:** *microplus*. (Canestrini, 1988)

Recientemente han sido reclasificadas dentro del género *Rhipicephalus* de acuerdo a su filogenia y evolución, este cambio en nomenclatura ha llevado a la utilización del nombre *Boophilus* como subgénero (Murrell et al., 2000).

## **Morfología de *R. (Boophilus) microplus***

Presenta un gnatosoma corto y recto, las patas se aprecian de color pálido cremoso. El cuerpo puede tener varias formas desde oval hasta rectangular y el escudo es oval y más ancho en la parte frontal (Ibarra et al., 2012).

La base del gnatosoma es hexagonal, los estigmas respiratorios (aberturas unidas al sistema traqueal) se encuentran detrás del último par de patas a los lados del cuerpo y son ovals o circulares. Las ninfas tienen un escudo café-anaranjado y el color del cuerpo es café o azul grisáceo.

Sobre la porción anterior de la base del gnatosoma se encuentran los palpos, uno a cada lado del par de quelíceros y del hipostoma central. Los palpos están formados de 4 artejos y cada quelíceros presenta unas cuchillas de gran tamaño en el extremo distal y el hipostoma tiene numerosos dientes pequeños.

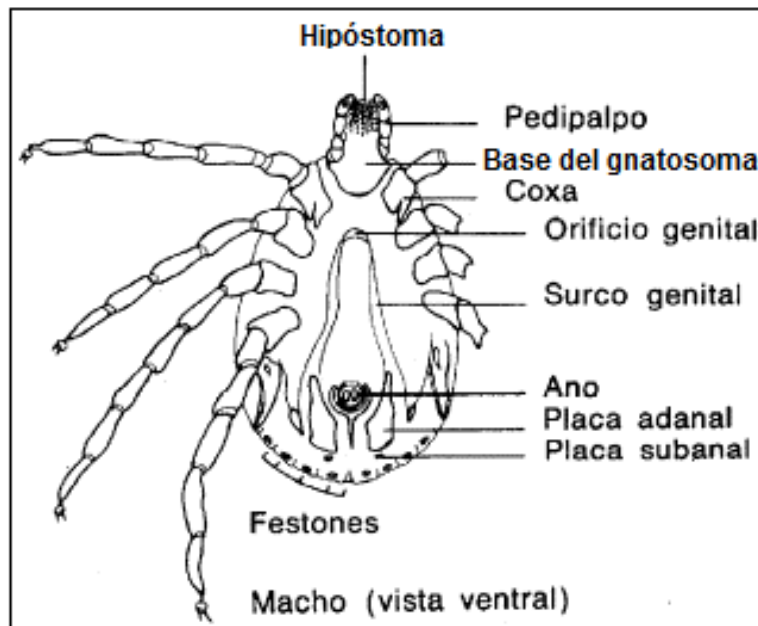
Los huevos los ponen en una única nidada y las larvas ninfas y adultos se alimentan una sola vez por estadio y requieren de varios días para alimentarse por completo.

*El huevo.* La producción de huevos depende de factores ambientales, pero de manera general se estima que una garrapata grávida libera de 2,500 a 3,500 huevos y la puesta de 5 a 15 días.

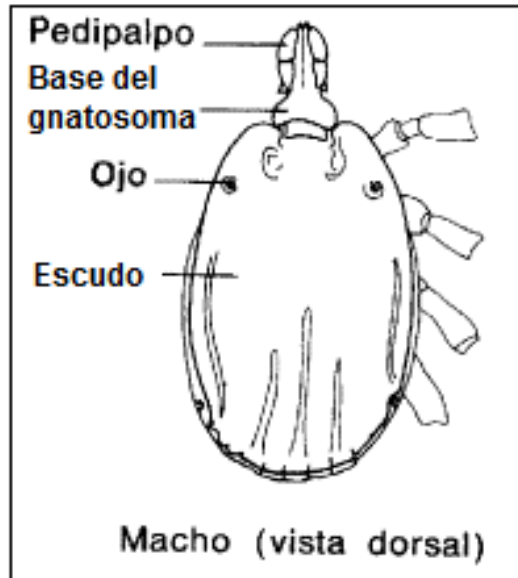
*La larva o pinolillo.* Presenta 3 pares de patas y por lo general se puede apreciar el mayor porcentaje de larvas repletas entre el sexto y noveno día. Miden aproximadamente 1.0 mm de largo, y son de un color blanco cremoso.

*La ninfa.* Presenta cuatro pares de patas y una doble fila de dientes en el hipóstoma. Las ninfas repletas miden entre 2.5 mm y 4 mm. y son de color gris oscuro. Este estadio todavía no presenta el orificio genital.

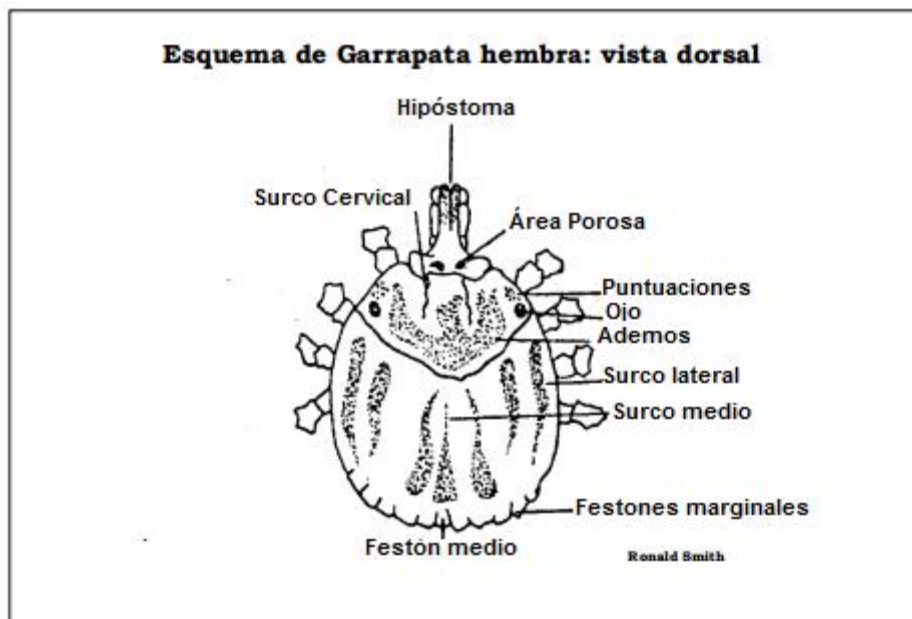
*El adulto.* Tanto los machos como las hembras tienen el cuerpo globoso y aplanado y presentan 4 pares de patas. El tamaño corporal varía entre 2.8 mm hasta 2 cm. dependiendo del estado fisiológico (alimentados o en ayunas). (Ibarra et al, 2012).



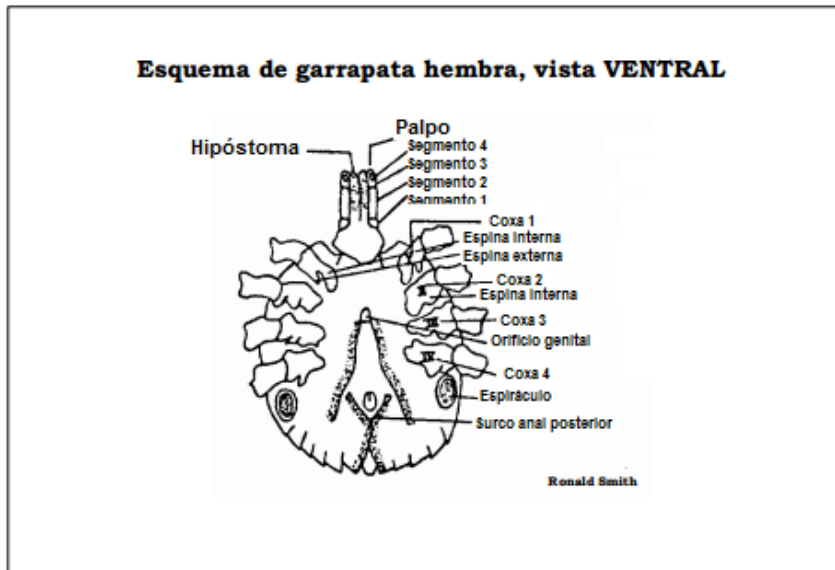
**(Fig. 1)** Macho de *R. (Boophilus) microplus* vista ventral (<http://www.geocities.ws/ueb2001/Resumen/imagen/garrapata.gif>)



(Fig. 2) Vista dorsal de un macho de *R. (Boophilus) microplus*  
<http://www.geocities.ws/ueb2001/Resumen/imagen/garrapata1.gif>



(Fig.3) Vista dorsal de una Hembra de *R. (Boophilus) microplus*  
<http://cni.inta.gov.ar/helminto/Alumnos/Garrapatas.pdf>



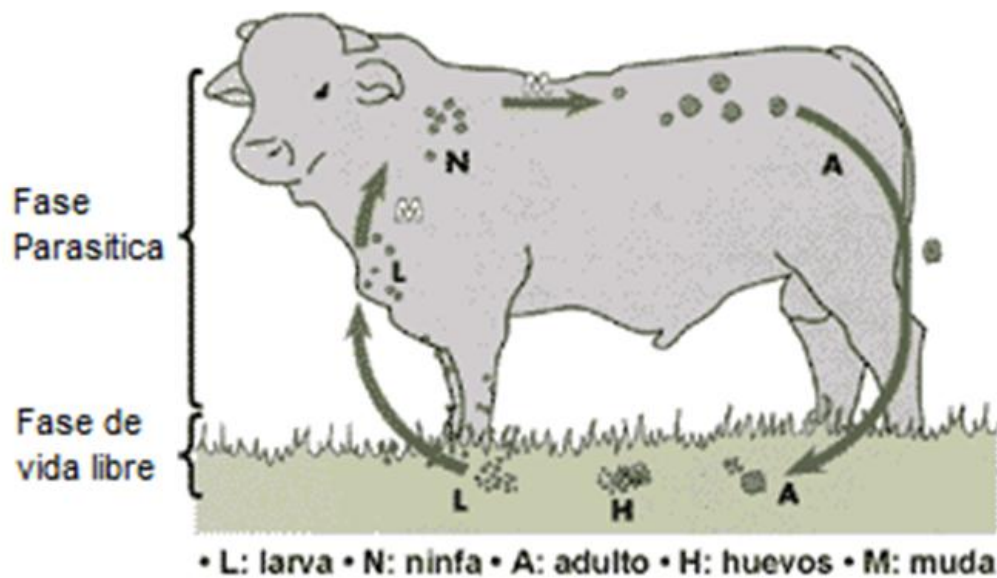
**Fig. 4** Vista ventral de una Hembra de *R. (Boophilus) microplus* (<http://cniia.inta.gov.ar/helminto/Alumnos/Garrapatas.pdf>)

### Ciclo Biológico

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es de un solo huésped y tienen cuatro estadios evolutivos en su ciclo vital: el huevo, larva o pinolillo, ninfa y el adulto (Ibarra et al, 2012).

La hembra ingurgitada llamada también teolagina, se desprende del hospedero y cae al suelo para poner entre 2000 a 4500 huevos en un período de 4 a 44 días dando lugar a larvas o pinolillos de vida libre. Las larvas eclosionan entre 14 y 146 días dependiendo de las condiciones climáticas. Posteriormente, las larvas que están en la vegetación se pegan al hospedero se alimentan y mudan hacia la fase de ninfa y posteriormente hacia el estado adulto (esta etapa dura aproximadamente de 18 a 22 días). Machos y hembras copulan sobre el hospedero y el ciclo de vida completo se puede concretar dentro de 2 meses (Ibarra et al., 2012).





**Fig. 5** Ciclo de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*  
(<http://www.over.com>)

### Patogenia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

El parasitismo por las garrapatas conlleva a efectos directos e indirectos, cuya intensidad depende del número, especie y localización de los parásitos.

#### a) Los efectos directos sobre el organismo del huésped pueden ser:

Dermatitis: es la reacción que tiene el hospedero ante la picadura de la garrapata, sea en su estado larval, ninfal o adulto. Esto ocurre por los alérgenos que contienen en su saliva, generalmente hay inflamación y prurito en el sitio de la picadura. Normalmente cuando la garrapata se arranca sin el cuidado debido sus partes bucales quedan dentro de la piel, generando una lesión que favorece a la proliferación de bacterias dando una infección secundaria que puede dar lugar a abscesos (Cordero et. al., 2001).

En el caso de las vacas lecheras, estos abscesos ocasionalmente están involucrados en el daño y la pérdida de uno o más cuartos de la glándula mamaria con la consecuente disminución de la producción láctea (Jonsson, 2006).

Toxicosis: La eliminación de sustancias por parte del parásito ocasiona un grado de toxicidad variable en el huésped, determinando daño en tejidos, y por ende en las funciones vitales del huésped. Las garrapatas inyectan en el lugar donde tienen implantados los órganos o apéndices bucales una saliva que contiene sustancias químicas de carácter anticoagulante o hemolítico, gracias a, la absorción de sangre de que se alimentan, también induce efectos tóxicos, ya que su saliva contiene enzimas o neurotoxinas que inhiben las funciones inmunes y metabólicas lo cual se ve reflejado en el apetito del animal provocando debilitamiento y anemias debido al consumo de grandes cantidades de sangre por parte de las garrapatas (Cordero; 2001, Ribeiro y Spielman,1986).

Anemia: Cuando hay una cantidad grande de garrapatas parasitando a un huésped, estas pueden ocasionarle una considerable pérdida de sangre, en el ganado de engorda. Cada garrapata adulta repleta de sangre ha demostrado reducir la ganancia de peso diaria en 0.6 g (Rodríguez Vivas, 2005), lo que produce pérdidas en la producción de leche y carne.

Las garrapatas también afectan la capacidad reproductiva, bajando los índices de fertilidad (Jonsson, 2006).

**b) Los efectos indirectos sobre el organismo del huésped son:**

Inoculación: En su papel como vectores de agentes etiológicos, las garrapatas pueden actuar como:

1.- Transmisores mecánicos de gérmenes patógenos, los cuales ni se modifican, ni se multiplican en el cuerpo de la garrapata, solo lo hospedan, tanto externamente como internamente. La infección se produce cuando la garrapata llega a alimentarse o cuando ésta es ingerida por el huésped.

2.- Transmisores biológicos de gérmenes patógenos:

a) Transmisión ciclo-evolutiva- propagativa, cuando el agente patógeno sufre cambios evolutivos propios de sus ciclo y además se multiplica dentro de la garrapata, como es el caso de los protozoarios esporozoarios *Babesia* y *Theilería* (Cafrune et al. 1995).

La transmisión biológica de los numerosos gérmenes se efectúa durante la picadura, por medio de la saliva secretada por las glándulas salivales (Cafrune et al., 1995).

La FAO hace mención de las pérdidas económicas atribuibles a la garrapata *R. (Boophilus) microplus* por disminución en la ganancia de peso y las enfermedades que transmiten al ganado bovino, en México se ha estimado en 48 millones de dólares anuales (Rodríguez Vivas, 2005).

### **Métodos de control**

Diferentes métodos han sido propuestos para el control de garrapatas, pero es el método químico el que logró la mayor aceptación por su efecto rápido y por el bajo precio de adquisición (Nari 1999; de Castro, 1997).

En México, el control de *Rhicephalus (Boophilus) microplus* se ha basado en el uso de productos químicos como los garrapaticidas (productos químicos); estrategia que consiste en romper los ciclos de vida, aplicando baños a intervalos, regulados por la región ecológica, especies de garrapatas, eficacia del producto y la economía de los productores (Fragoso et al., 2001; Redondo et al., 1999).

A nivel mundial, existen 6 grupos de productos químicos comerciales para el control de las garrapatas: 1) organofosforados (OF), 2) piretroides (PS), 3) amidinas, 4) endectocidas, 5) fenilpirazolonas y 6) inhibidores del desarrollo. También se pueden encontrar en el mercado productos con mezclas de algunos de los grupos mencionados (FAO, 1987; Ortiz, 1991).

**Organofosforados:** se caracterizan por inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (neurotransmisor), produciendo un aumento de estímulos

nerviosos de los insectos. Son lipofílicos y se absorben a través de la piel y se acumulan en tejido adiposo donde son liberados lentamente a la sangre. Tienen una permanencia de 4 a 8 días. Los medicamentos de mayor uso en este grupo son: clorfenvinfos, clorpirifos, coumafos y diazinón (Rodríguez Vivas et al., 2005).

**Piretroides:** provocan un bloqueo de la actividad motriz o bien por la producción de excitabilidad, incoordinación de movimientos, irritabilidad, parálisis, letargo y muerte del insecto. Los Piretroides tienen un efecto residual de aproximadamente 15 días. Entre los fármacos más frecuentes en este grupo se encuentran: cipermetrina, deltametrina y flumetrina (Rodríguez Vivas et al, 2005).

**Amidinas:** son antagonistas de los receptores de la octopamina en el cerebro de los parásitos: provocan hiperexcitabilidad seguida de parálisis y muerte. Esta hiperexcitabilidad hace que la garrapata tampoco se pueda fijar al hospedero. El producto de mayor uso es el amitraz (George et al., 2004).

**Fenilpirazolonas:** Están relacionadas con las avermectinas por el modo de acción, ya que bloquea el paso de iones cloro a través del sistema receptor GABA. El Fipronil es la sustancia activa usada para el control de garrapatas de manera “pour-on”, lo que permite que penetre la cutícula de los ectoparásitos (Rodríguez Vivas et al, 2005).

**El fluazurón:** Son los inhibidores del desarrollo, se caracteriza por interferir principalmente en la formación de la quitina, impidiendo la formación de la cutícula del ectoparásito, considerándoseles inhibidores de las mudas y del crecimiento. La limitante de este producto es que las garrapatas tratadas no mueren al instante, sino que su efecto es reducir la capacidad reproductiva de las garrapatas y se ven los efectos letales al reducir las poblaciones de las mismas (Rodríguez Vivas, 2005).

**Endectocidas:** Son las llamadas lactonas macrocíclicas que incrementan la liberación del ácido gamma amino butírico (GABA) del sistema nervioso de los insectos.

El mecanismo de acción de la moxidectina está relacionado con la apertura de los canales de cloro en la conexión postsináptica y, permite el flujo de iones, produciendo un estado irreversible de descanso, parálisis y muerte del parásito (Rodríguez Vivas, 2005).

Todos estos productos ixodicidas o garrapaticidas pueden ser aplicados a través de baños de inmersión, baños de aspersion, uso de mangas portátiles, tratamiento por derrame dorsal comúnmente conocido como “pour on” o por “spot on”, tratamiento mediante inyección y también mediante uso de aretes y collares (Rodríguez Vivas et al, 2005).

Sin embargo, hoy en día esta amplia gama de insecticidas en algunas regiones muestra una menor eficacia indicando la posibilidad de que se trate de un problema de resistencia del parásito contra determinado ixodicida o grupo de ixodicidas.

Por lo anteriormente mencionado se manifiesta la necesidad de continuar en la búsqueda de nuevas estructuras químicas con promisorio potencial ixodicida a fin de disminuir el fenómeno de resistencia.

### **Pruebas para determinar el porcentaje de eficacia *in vitro***

Una alternativa viable para evaluar estas estructuras químicas en forma preliminar es el uso de bioensayos los cuales están indicados para determinar el porcentaje de eficacia *in vitro* contra larvas y adultos de garrapata.

***Prueba de inmersión de adultos (PIA).*** (Drummond, 1967)

Las pruebas para determinar susceptibilidad a un producto acaricida son variadas; sin embargo, la técnica de inmersión de adultos, descrita por Drummond y colaboradores (1967) para teleoginas (garrapatas hembras ingurgitadas) es la referencia a nivel mundial aprobada por la FAO para la detección de resistencia (FAO, 2004).

***Prueba de inmersión de larvas (PIL).*** (Shaw, 1966).

Otra prueba utilizada es la técnica de inmersión de larvas de Shaw, la cual determina el porcentaje de mortalidad de larvas con concentraciones terapéuticas del acaricida (Shaw, 1966).

Estas pruebas realizadas *in vitro* son una aproximación del comportamiento del principio activo *in vivo* y son útiles para detectar fallas en el manejo del compuesto acaricida durante la preparación y aplicación de los baños.

***Prueba de inmersión de larvas (PIL)*** (Stone y Haydock, 1962).

Otra prueba utilizada es la técnica de inmersión de larvas de Stone y Haydock, la cual determina el porcentaje de mortalidad de larvas con concentraciones terapéuticas del acaricida (Stone y Haydock, 1962).

Estas pruebas realizadas *in vitro* son una aproximación del comportamiento del principio activo *in vivo* y son útiles para detectar fallas en el manejo del compuesto acaricida durante la preparación y aplicación de los baños.

## **Fenómeno de resistencia de las garrapatas a los Ixodicidas**

La resistencia es el aumento significativo de individuos dentro de una población de una misma especie, capaz de tolerar dosis de droga (s) que han resultado letales para la mayoría de los individuos de la misma especie. El desarrollo de la resistencia es un proceso evolutivo que aparece por selección genética (Ibarra et al., 2012).

La aplicación indiscriminada de garrapaticidas ha ocasionado la aparición de cepas de garrapatas resistentes a nivel de campo. En la actualidad el fenómeno de resistencia se ha diseminado ampliamente y se tiene conocimiento que en varios ranchos de Tamaulipas y del sureste de la República Mexicana, se ha detectado resistencia múltiple a piretroides, organofosforados y al amitraz (Ibarra et al., 2012).

La aplicación indiscriminada de garrapaticidas ha ocasionado la aparición de cepas de garrapatas resistentes a nivel de campo. El desarrollo de la resistencia es un proceso evolutivo que aparece por selección genética y se presenta en tres fases:

*Fase de establecimiento.* Momento en que surge el alelo resistente en una población y el proceso se realiza por mutaciones naturales e independientes a la presión de selección.

*Fase de desarrollo.* Es el incremento en el número de individuos resistentes que ocurre por la tasa de sobrevivencia preferencial sobre individuos susceptibles después del uso de productos químicos.

*Fase de emergencia.* Este proceso es de corta duración y el alelo de resistencia es común en la población que manifestará la ineficacia del garrapaticida (Rodríguez Vivas et al, 2005).

## Antecedentes sobre el compuesto experimental 712-BF-016

Características del compuesto experimental:

Es un polvo blanco-cristalino, soluble en MeOH, EtOH, DMSO, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, AcOEt, Acetona, Tricloroetileno, Ligeramente soluble en agua e insoluble en Et<sub>2</sub>O (etanol). Su peso Molecular es 223.66, con un p.f. de 48-50°C. Su fórmula química es C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>3</sub>H y su estructura química es la siguiente:

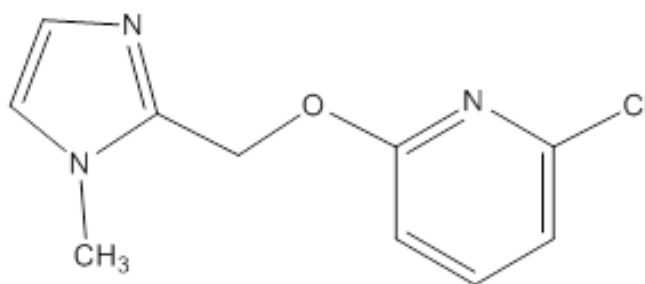


Fig. 7 Estructura Química del Compuesto Experimental 712-BF- 016

### Objetivo General

Determinar la eficacia ixodocida del compuesto experimental 712-BF-016 contra larvas y adultas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* en bovinos infestados en forma experimental.

### Objetivos Particulares

1. Evaluar la efectividad *in vitro* del compuesto experimental 712-BF-016 contra larvas de garrapatas *Boophilus microplus*.
2. Evaluar la efectividad *in vitro* del compuesto experimental 712-BF-016 contra garrapatas adultas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.
3. Evaluar la efectividad *in vivo* del compuesto experimental 712-BF-016 contra una cepa susceptible de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en becerros infestados en forma experimental.



## Hipótesis

El compuesto experimental 712-BF-016 mostrará una eficacia garrapaticida superior al 85% en pruebas *in vitro* e *in vivo*, produciendo la muerte de larvas, y adultas así como la inhibición de la oviposición de hembras repletas (teologinas) de *R. (Boophilus) microplus*.

## Justificación

Las garrapatas del genero *R. (Boophilus) microplus* producen cuantiosas pérdidas económicas tanto en México como en otros países y su control se realiza generalmente a través del uso de ixodicidas. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha generado cepas de garrapatas resistentes, razón por la cual se hace difícil el control de las mismas, por lo que es de suma importancia investigar y trabajar en el desarrollo de nuevas moléculas con potencial garrapaticida que no generen resistencia al menos durante algunos años como los grupos químicos previamente mencionados.

Por otro lado, se sabe que el desarrollo de nuevos ixodicidas químicos es costoso y se deben usar métodos y estrategias tendientes a determinar la eficacia de compuestos experimentales optimizando el uso de tiempo dinero y esfuerzo.

Con base a lo anterior, se ha trabajado en forma inter-disciplinaria con colaboradores de la Fac. de Química de la UNAM para sintetizar el compuesto experimental 712-BF-016 el cual a través de un escrutinio preliminar ha mostrado un promisorio potencial ixodicida. Por tal razón se consideró importante evaluar su real potencial utilizando métodos *in vitro* como la prueba de paquete de larvas de Stone y Haydock (1962), la prueba en garrapatas adultas conocida como prueba de Drummond (1967) así como una prueba de campo en bovinos infestados con una cepa susceptible de *R. (Boophilus microplus)* inducidas en forma experimental.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Ubicación del estudio**

Las pruebas de laboratorio *Prueba de inmersión de larvas (PIL)* y *Prueba de inmersión de adultas (PIA)*, se realizaron en el Departamento de Parasitología en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

El trabajo de campo se realizó en el rancho “Santa Cruz”, perteneciente al Municipio de Teziutlán, Puebla.

### **Material biológico**

#### **Obtención de garrapatas (*Boophilus microplus*)**

Las garrapatas utilizadas fueron obtenidas a partir de la infestación de 2 becerros recién destetados los cuales estaban alojados en el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la UNAM.

Los bovinos se infestaron cada uno con 2 g de larvas (40 mil larvas aproximadamente). A los 21 días postinfestación se colectaron 1833 garrapatas hembras repletas entre 5 y 8 mm de longitud, las cuales fueron trasladadas al Departamento de Parasitología en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Las larvas fueron colocadas en una coladera y lavadas con agua de la llave, posteriormente fueron secadas con una toalla de papel y puestas encima de papel filtro dentro de cajas Petri a razón de 15 garrapatas/caja, para ser incubadas durante 15 días a una temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  y 80% de humedad relativa.

Una vez que las garrapatas ovipositaron (aproximadamente entre 15 y 20 días), se separó la masa de huevos, en viales (con 1 g de huevos en cada vial), donde nuevamente se incubaron, hasta que cumplieron un mes de eclosión y se mantuvieron en incubación hasta su utilización, ya sea para infestar bovinos como se describe mas adelante o para realizar las pruebas *in vitro* previamente mencionadas.

## **Experimento 1**

### ***Evaluación de la eficacia ixodicida in vitro del compuesto experimental 712-BF-016 contra larvas de garrapatas R. (Boophilus microplus)***

*Ubicación del estudio:* El presente estudio se realizó en, el laboratorio de Investigación del Departamento de Parasitología de la FMVZ, de la UNAM y la obtención de larvas de garrapata en el CEPIPSA de la FMVZ, UNAM ubicado en el municipio de Parres, D.F.

*Obtención de larvas para evaluación.-* En el día 0 se infestaron 2 bovinos jóvenes con 40,000 larvas de garrapata *R. (Boophilus) microplus* donadas por el Centro Nacional de Parasitología Animal de Jiutepec, Morelos. Los bovinos permanecieron infestados hasta el día 21 cuando las garrapatas obtuvieron su estadio adulto (hembras) post-infestación. Las garrapatas adultas de donde fueron desprendidas de los bovinos y se trasladaron al laboratorio para su incubación en cajas de Petri a 28°C y con una humedad relativa de 80%. Una vez colectados los huevos de las garrapatas, estos fueron colocados en viales puestos en frascos universales y pesados a razón de 1 g por vial para ser incubados durante 20 días a fin de permitir la eclosión de las larvas. A los 15 días posteriores las larvas estuvieron listas para utilizarlas en una evaluación *in vitro*.

*Desarrollo de la prueba.-* Se evaluó la eficacia ixodicida *in vitro* del compuesto citado contra larvas de (*B.*) *microplus* utilizando la prueba de paquete de larvas de Stone y Haydock (1962) que consiste en la exposición de larvas en papeles filtro impregnados con distintas concentraciones de los químicos a evaluar con el objeto de obtener los porcentajes de mortalidad larvaria, comparadas con el grupo testigo sin tratamiento, (La información completa de la técnica se puede apreciar en el Apéndice 1).

## ***Experimento 2***

### ***Evaluación de la eficacia ixodida in vitro del compuesto experimental 712-BF-016 contra garrapatas adultas de Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

La eficacia del compuesto contra garrapatas adultas (hembras) obtenidas de cultivos en bovinos fue evaluada tal y como se señala en el primer experimento.

Para ello se utilizó la prueba de inmersión de adultas de Drummond (1967), en donde se realizaron 3 repeticiones obteniendo además de la determinación de la eficacia, el porcentaje de eclosión de huevos y las larvas, en comparación con los parámetros de medición obtenidos en el grupo testigo sin tratamiento. (El Apéndice 2 muestra en forma completa el montaje de esta prueba para su evaluación).

## ***Experimento 3***

### ***Evaluación de efectividad ixodida del compuesto experimental 712-BF-016 mediante una prueba de campo en becerros infestados en forma experimental.***

*Ubicación del área de estudio.*- El rancho “Santa Cruz” se encuentra en el Municipio de Teziutlán Puebla localizado entre 1990 a 2000 metros sobre el nivel del mar. El Municipio forma parte del mismo nombre y está situado en el extremo NE del Estado, región que se conoce como la Sierra Norte.

El clima de la parte alta del Municipio de Teziutlán es húmedo y frío en el invierno, templado y lluvioso en el verano y otoño, sujeto a los cambios bruscos de temperatura y presión debidos a las perturbaciones atmosféricas frecuentes del Golfo, por su proximidad. Los vientos dominantes, durante el día, son del Norte, y por la noche, del Sur. En la primavera, suelen correr vientos fuertes del Sur. En el invierno, escarcha y ocasionalmente nieve.

*Animales.*- Para esta etapa de evaluación experimental del compuesto, se contó con 24 becerros de raza indefinida, (cruzas) con un peso entre 150 y 200Kg, ubicados en las instalaciones del rancho, “Santa Cruz” de Ayotoxco,

Puebla. Los animales fueron alimentados con concentrado comercial, alfalfa y gramas nativas y tuvieron acceso de agua *ad libitum*.

*Conducción del estudio.*- Los becerros fueron infestados con 20,000 larvas c/u de una cepa susceptible de *R. (Boophilus) microplus* obtenidas como se señaló anteriormente. A los 21 días posteriores a la infestación, se procedió a contar el número de garrapatas adultas presentes en los bovinos para realizar el tratamiento.

Los becerros en estudio se seleccionaron homogéneamente con base al número de garrapatas y fueron divididos en 4 grupos (G) de 6 animales c/u.

El G1 recibió una aspersión del compuesto experimental formulado al 16%. Dicha aspersión fue aplicada con bomba en un volumen total de 4 L.

El G2 fue tratado de igual manera al anterior pero con una formulación al 20% del compuesto.

El G3 recibió una aspersión con un Ixodicida comercial (Tlalaxin 13, Rlab. Shark S.A. de C.V), formulado al 16% y aplicado en un volumen igual a los grupos anteriores.

El G4 sirvió como grupo Testigo sin tratamiento.

*Medición de la efectividad.*- La efectividad se midió como porcentaje de garrapatas derribadas en el grupo tratado con referencia al testigo sin tratamiento. Estas evaluaciones se hicieron en los días 1, 2, 3 posterior a la aplicación del tratamiento.

*Análisis estadístico.*- La información obtenida fue analizada estadísticamente mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA de una vía), para determinar si había diferencias significativas entre grupos y entre tratamientos. El promedio de garrapatas recuperadas en cada tratamiento fue considerado como la variable dependiente. Los datos de mortalidad de larvas obtenidas por medio de la Técnica de Paquete de Larvas y las adultas adquiridas por medio de la Técnica de Inmersión de Drummond se analizaron por medio de la metodología Probit (dosis respuesta), donde se obtuvo la CL<sub>50</sub>.

### **Recolección de hembras adultas pos-tratamiento:**

Del día 20 posterior a la infestación y hasta el día 22, se hizo la recolección de garrapatas hembras que median de 5 a 8 mm, se colectaban directamente del becerro; así como las que caían sobre el piso. Las garrapatas fueron llevadas Al Departamento de Parasitología en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, donde se lavaron con agua corriente y se secaron con papel absorbente. Posteriormente fueron pesadas en grupos de 10 garrapatas en una balanza analítica.

### **Incubación**

Cada grupo de garrapatas se adhirió dorsalmente con cinta doble adhesivo en cajas Petri. Cada caja se identificó, con el nombre del grupo, la fecha de recolección y concentración del compuesto.

Las cajas de Petri con las garrapatas se incubaron en la estufa entomológica a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura y 80-90% de humedad relativa, durante siete días.

Transcurridos los siete días de incubación, se contó el número de garrapatas que ovipositaron en cada grupo. Posteriormente se incubaron por siete 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 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  $60^{\circ}\text{C}$  por dos horas con la finalidad de matar las larvas. Para contar los huevos eclosionados y no eclosionados,

primero se homogeneizó el contenido de cada vial. Se tomó una muestra aleatoria, lo suficiente grande para llenar un campo de 100 mm<sup>2</sup>, con ayuda de un microscopio estereoscópico se contaron los huevos sin eclosionar 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 siguiente fórmula:

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

Índice de oviposición. Para calcular el porcentaje de inhibición de oviposición de cada grupo, primero se calculó el porcentaje de inhibición de oviposición (OP).

$$\text{O.P.} = \frac{\text{Peso de huevos (g)}}{\text{Peso de hembras (g)}} (20,000)$$

Dónde:

20,000 = número de larvas presentes en un gramo de huevos

F.C. del % eclosión = fracción centesimal del porcentaje de eclosión

(Drummond, *et al.* 1967)

Porcentaje de inhibición de la oviposición. Este valor se obtiene a partir del OP. Se calculó el porcentaje de inhibición de oviposición de cada grupo con la fórmula siguiente: (Sardá-Ribeiro, et al., 2007)

$$\% \text{ I.O.} = \frac{(\text{OP/} - \text{OP/t})}{\text{OP/T}} \times 100$$

Dónde:

OP/T= Reproducción estimada del grupo control

OP/t = Reproducción estimada del grupo experimental

La efectividad de las diferentes concentraciones fue evaluada a través de tres parámetros: la mortalidad de teoginas de (*B. microplus*); la reducción de la oviposición (reducción de la relación huevos garrapatas) y la disminución de la eclosión.

La efectividad fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Efectividad} = \frac{\bar{X} \text{ Garrapatas Testigos} - \bar{X} \text{ Garrapatas Tratadas}}{\bar{X} \text{ Garrapatas Testigo}} \times 100$$

(Abbott, 1925)

El porcentaje de eclosión se estableció por medio de la siguiente fórmula:

$$\% E = \frac{C}{H+C} \times 100$$

En donde: C=cascarones, H=huevos

(Abbott, 1925)



## RESULTADOS

La información obtenida en los diferentes parámetros evaluados puede apreciarse de manera general en los Cuadros 1 al 6 así como en las Gráficas 1, 2, y 3 que se encuentran localizadas después de las referencias.

En la Cuadros1, se muestra que mediante la utilización de la técnica *in vitro* de Stone y Haydock (1962), fue posible obtener el porcentaje de mortalidad larvaria, observando que a medida que se aumentó la concentración del compuesto experimental, la mortalidad larvaria fue mayor.

El análisis estadístico indicó que hubo diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) como se aprecia en las literales indicadas para cada una de las concentraciones.

En la Gráfica 1 se observa que el compuesto experimental 712–BF–016 tuvo una mayor efectividad medida en el porcentaje de mortalidad en las larvas evaluadas a través de la técnica de paquete de larvas de Stone y Haydock (1962).

En el Cuadros 2 se muestra que de manera similar a la prueba con larvas, a medida que aumenta la concentración del compuesto experimental mayor mortalidad en garrapatas adultas.

El compuesto 712-BF-016 evaluado *in vitro* contra una cepa susceptible de garrapatas adultas por medio de TIA (Drummond et al. 1976), provocó la muerte de las garrapatas tratadas y afectaron su oviposición, por lo que se determina que tuvo una alto porcentaje de mortalidad en garrapatas adultas. Es importante hacer notar que la efectividad conferida por el compuesto evaluado a las diferentes concentraciones contra garrapatas adultas, se mantuvo alta (97.6%, 95.4%, 91.9%, 85.9, y 77.5%) y directamente proporcional a la concentración probada (1%, 0.50%, 0.25%, 0.13%, y 0.06%), respectivamente.

No se encontraron diferencias significativas a concentraciones de 1% y 0.5%. Sin embargo, en las siguientes concentraciones si se observaron diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, con relación al peso de los huevos de garrapatas adultas tratadas, el ANDEVA de una vía, indicó que no existían diferencias significativas en concentraciones de 0.25% y 0.0625%. Sin embargo el peso promedio de huevos de adultas tratadas con las concentraciones de 1%, 0.50% y 0.125% fueron estadísticamente diferentes (Cuadros 2).

En la Grafica 2 se observa que el compuesto experimental 712-BF-016 tuvo una mayor efectividad medida en el porcentaje de mortalidad en las garrapatas adultas comparado con las larvas.

### **Análisis Probit**

En la Grafica 3 se observa la curva dosis respuesta de las concentraciones utilizadas del compuesto 712-BF-016 contra garrapatas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en la Técnica de paquete de larvas y en la Técnica de inmersión de adultas. Como puede observarse la mayor efectividad es claramente visible en la evaluación contra garrapatas adultas. La grafica se encuentra posterior a las referencias

En el Cuadros 4, muestra los resultados obtenidos con respecto a la efectividad en bovinos. El grupo tratado con el compuesto experimental 712-BF-016 formulado al 16% produjo una efectividad de 61.78%. Cuando el compuesto formulado al 20% se aplicó a los bovinos, la efectividad fue del 76.43%. Mientras que el grupo tratado con cipermetrina al 16% (grupo de referencia), generó una efectividad del 83%. El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre los tres tratamientos, siendo el más eficaz cipermetrina al 16% (Cuadros 4).

El Cuadros 5, muestran los resultados relativos al índice de oviposición de las garrapatas y al porcentaje de eclosión de huevos de las garrapatas.

Para la concentración del compuesto experimental 712-BF-016 al 16%, el índice de ovoposición fue del 0.28 y el porcentaje de inhibición de la ovoposición fue de 50.1.

Para el grupo de garrapatas tratadas con el compuesto experimental 712-BF-016 al 20% el índice de ovoposición fue del 0.34 y el porcentaje de inhibición de la ovoposición fue de 39.5.

En el caso de las garrapatas del grupo tratado con cipermetrina al 16%, el índice de ovoposición fue del 0.24 y el porcentaje de inhibición de la ovoposición fue de 57.5, indicando con ello que la concentración utilizada del compuesto experimental al 16%, fue la que produjo un mayor efecto en la mortalidad (Cuadros 5).

En lo que concierne al índice de ovoposición se observa que la formulación del compuesto experimental al 16% presenta un mejor efecto en virtud de haber mostrado un índice de ovoposición de 0.28 y un porcentaje de inhibición de la ovoposición del 50.1%. La estadística indica que al comparar las concentraciones experimentales con el fármaco de referencia (cipermetrina al 16%), se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadros 5).

El Cuadros 6 da referencia al porcentaje de eclosión de garrapatas *R. (Boophilus) microplus* en donde se aprecian porcentajes de 50.57%, 55.99% y 74.89%, para las tres concentraciones evaluadas, respectivamente.

Esta información señala diferencias estadísticas entre grupos ( $p < 0.05$ ) indicando ventaja para la formulación del compuesto experimental al 16% ya que su porcentaje de eclosión de huevos tratados fue menor.

## DISCUSION

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (la garrapata de un solo huesped), constituye un serio problema para la industria ganadera en regiones tropicales y subtropicales a nivel mundial. Esta garrapata es el principal vector de la babesiosis y anaplasmosis así como por daños sobre la producción, daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre y efectos tóxicos, disminución en la ganancia de peso de los animales y en la producción de leche, así como bajas en la fertilidad del ganado, costos por tratamiento, entre otras (Sardá-Ribeiro et al, 2007).

La estrategia comúnmente utilizada para el control de estos artrópodos es la aplicación de ixodicidas sobre el cuerpo del bovino a intervalos específicos. Los ixodicidas más utilizados han sido los organofosforados, piretroides, fenilpirazolonas, lactonas macrocíclicas así como las Amidinas (Foil et al, 2004).

Sin embargo, un problema frecuente que presentan las garrapatas hacia los ixodicidas existentes es el fenómeno de resistencia el cual se genera por parte del parásito hacia el compuesto o compuestos aplicado(s) condicionado por razones genéticas o uso inadecuado e indiscriminado de estos ixodicidas (Alonso-Díaz et al, 2006).

En México, no solo se sabe de resistencia a un ixodicida específico, sino que ya se reportan casos de resistencia múltiple a ciertos grupos de ixodicidas en donde las garrapatas mostraron ser resistentes a los piretroides, organofosforados y formamidinas como es el caso del amitraz (Rosado-Aguilar et al, 2008).

De manera similar, Rodríguez-Vivas et al, (2007) describen la presencia de resistencia a Amitraz, piretroides sintéticos y organofosforados en diferentes ranchos pertenecientes al estado de Yucatán.

Por tal razón la necesidad de desarrollar un nuevo compuesto ixodicida es inminente y la estrategia general es la de evaluar entre muchos compuestos la posible molécula capaz de eliminar estos parásitos en un alto porcentaje.

El compuesto 712-BF-016 está conformado por dos moléculas: un imidazol y una piridina, los cuales forman dos anillos aromáticos. Estas dos moléculas por sí solas las podemos encontrar en otros productos comerciales, pero juntas no se habían probado hasta el desarrollo de este proyecto.

Se sabe que la piridina ha sido evaluada en otros compuestos como el Piriproxifen, donde su molécula principal es esta, este compuesto se ha probado como ixodicida en la garrapata *Haemaphysalis elliptica* y en la pulga de gato, *Ctenocephalides felis*, en perros en el Sur de África, donde se evaluó su efectividad terapéutica (a las 48 horas), residual (9,16,23,30,37 días) del compuesto midiendo el porcentaje de mortalidad de ambos parásitos. Los resultados obtenidos indicaron una efectividad terapéutica del 83.1%, de la residual fue mayor del 90% para *Haemaphysalis elliptica*, y para *Ctenocephalides felis* tuvo una efectividad terapéutica de 97.5% y residual de 100%, por lo que su efectividad terapéutica y residual de este compuesto garantiza su efectividad al tener un alto porcentaje de mortalidad (J J Fourie et. al., 2010).

Se ha probado el Piriproxifen sobre la mortalidad de *Triatoma infestans* en la región del Chaco Boliviano, donde varias casas rurales fueron tratadas con dicho compuesto aplicándolo de forma micro-encapsulado en pared bio-ensayos donde la concentración fue de (piriproxifen 0.063%) que al parecer puede imitar la acción de una hormona juvenil en la regulación del crecimiento de los insectos, este compuesto tuvo una alta mortalidad tanto en adultos como en huevos teniendo un alto efecto en la mortalidad hasta por 34 meses, esto hace que sea un buen candidato para la eliminación de poblaciones intradomesticas y peridomésticos de *T. infestans* (Abraham Gemio Alarico et al., 2010).

Por otro lado, el imidazol se ha encontrado eficaz sobre una base experimental contra una larga lista de insectos y artrópodos relacionados, incluyendo termitas, cucarachas, escarabajos carábidos, chinches, pulgas, moscas,

mosquitos, garrapatas, arañas y ácaros fitófagos. El imidazol depende mucho de la concentración que se utilice y de los componentes al momento de hacer su formulación para que tenga un mayor efecto sobre el control de los insectos antes mencionados, se ha utilizado este como un eficaz plaguicida de contacto como es el imidazol (glioxalina o 1,3-diazol) que tiene una baja toxicidad para los mamíferos y que se utiliza como antimetabólico el cual su estructura química tiene parecido mucho a una vitamina pero cambia en un átomo, por esta estructura al momento de la aplicación desprende un aroma que hace que el insecto la ingiera y dentro del sistema circulatorio del insecto este antimetabolito se convierte en un inhibidor antagonista de la regulación del crecimiento del insecto a nivel fisiológico interrumpiendo el metabolismo dando como resultado la muerte (Roy J. Pence, 1965).

Sin embargo, la tarea de desarrollar un nuevo ixodicida no es fácil ya que se menciona que el contar con una nueva molécula cuesta más de 200 millones de dólares.

De hecho, la industria farmacéutica no muestra mucho interés en emprender tal proyecto debido en parte a la crisis económica mundial que no fácilmente permite que se tenga disponibilidad y capacidad económica para realizar este tipo de investigación.

Como muestran los resultados obtenidos en este estudio, la efectividad ixodicida bajo condiciones *in vitro* tanto en la prueba de paquete de larvas como en la de adultas fue aceptablemente promisorio y la serie de repeticiones de las pruebas realizadas avalan la existencia de un cierto potencial ixodicida. Como es sabido, la técnica de Paquete de Larvas, desarrollada por Stone y Haydock (1972) está propuesta por la Organización Mundial para la Agricultura y Alimentación (FAO) como la metodología para la detección de la efectividad del compuesto sobre las larvas de garrapatas, por lo que su bajo costo y facilidad de montaje ha permitido que varios investigadores la hayan utilizado para evaluar nuevos productos (Sarda-Ribeiro et al., 2007; de Freitas Fernandes et al., 2007; Sabatini et al., 2001).

Sin embargo, la efectividad producida bajo condiciones de campo en bovinos no mostró tener similitud a los resultados *in vitro* por lo que invita a analizar las posibles causas del porque la efectividad conferida fue menor.

Desde luego es importante señalar que resulta difícil el querer comparar resultados que son generados bajo condiciones *in vitro* con aquellos producidos *in vivo*, en virtud de que los cambios que se pueden suscitar en un modelo biológico son muchos y muy diferentes.

Un punto importante de señalar es que el vehículo con el cual el compuesto fue formulado tal vez no fue el adecuado ya que no permanecía mucho tiempo en el lomo y cuerpo de los animales y esto podría en cierta manera ser causa de que la efectividad fuera disminuida.

Por otro lado y en virtud de que los animales no se encontraban alojados en un corral techado existía la posibilidad de que les lloviera y el compuesto aspersado fuera lavado y por ende la concentración remanente fuera efectiva en menor escala.

Aquí se puede sugerir un estudio farmacocinético en donde a través del análisis de suero de animales tratados utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución pudiera determinarse si parte del compuesto es absorbido a través de la piel y conocer la cantidad de nanogramos presentes en el suero así como su tiempo de permanencia y eliminación.

El criterio para tomar una larva como muerta fue la parálisis o incapacidad de movimiento. Al ser observadas las larvas tratadas al microscopio, la mayoría estaban paralizadas lo cual concuerda con el mecanismo de acción descrito para los carbamatos convencionales (Baxter et al., 1998). Sin duda estudios de microscopía electrónica sobre el intestino y tegumentos de garrapatas tratadas ayudarían a dilucidar en parte el modo de acción de este compuesto experimental.

Adicionalmente, un análisis químico tanto interno como externo de las garrapatas muertas podría indicarnos si su muerte es provocada por el contacto directo del compuesto experimental o por intoxicación interna y/o por ambos.

Con referencia a la utilización del análisis Pro bit, este mostró al generar la curva dosis respuesta que a menor concentración del compuesto su respuesta fue mayor en la mortalidad de garrapatas adultas en comparación con la mortalidad larvaria y que su Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) fue de 0.0138, y muestra que con una mínima concentración del compuesto se logró obtener una CL<sub>50</sub>.

Con relación a la prueba de campo, los resultados no fueron sometidos al análisis Probit ya que fueron pocos los datos obtenidos, para poderlos someter a esta prueba.

Finalmente es pertinente señalar que el presente estudio es solamente una modesta contribución preliminar, avocada a solamente determinar si una formulación preparada al 16% o al 20% con el compuesto experimental 712-BF-016 mostraba actividad ixodicida contra el parásito en estudio.

Futuros estudios de evaluación biológica con diferentes excipientes, farmacocinética y de toxicidad utilizando pruebas *in vitro* y controladas *in vivo* con este compuesto, dilucidarán su real potencial ixodicida.

**Agradecimientos:** Al proyecto PAPIIT–DGAPA UNAM clave IN201710 por apoyo financiero para realizar este estudio.

## **CONCLUSIONES**

El compuesto experimental 712-BF-016 evaluado bajo condiciones *in vitro*, contra larvas y adultos de una cepa susceptible de *R. (Boophilus) microplus* mostró una efectividad aceptablemente promisoriosa.

La efectividad ejercida por el compuesto experimental bajo condiciones de campo en bovinos, no mostró una correlación similar con la de los resultados *in vitro*. Posiblemente el excipiente utilizado para formular el compuesto experimental no fue el adecuado y por lo tanto la efectividad obtenida fue menor.



## REFERENCIAS

- ABBOTT. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 1925; 18: 256-257.
- ABRAHAM GEMIO ALARICO, NAHUEL ROMERO, LAURA HERNÁNDEZ, SILVIA CATALÁ, DAVID GORLA. Residual effect of a micro-encapsulated formulation of organophosphates and piriproxifen on the mortality of deltamethrin resistant *Triatoma infestans* populations in rural houses of the Bolivian Chaco region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2010. Vol. 105(6): 752-756
- ALONSO-DÍAZ M A, RODRÍGUEZ-VIVAS R I, FRAGOSO-SÁNCHEZ H, ROSARIO-CRUZ R. Ixodicicide resistance of the *Boophilus microplus* tick to ixodicides. (Revisión bibliográfica). Arch. Med. Vet. 2006; Vol. 38 No. 2.
- BAXTER, G., BARKER, S. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick: *Boophilus microplus* characterization and role in organophosphate resistance. I. Bio. and Mol. Biol. 1998; 28: 581–599.
- CAFRUNE, M., AGUIRRE, D, MANGOLD, A, GUGLIELMONE, A. Experimental studies of the rate of infection of *Boophilus microplus* eggs with *Babesia bovis*. R, Vet. Scí. 1995; 58:284 – 285.
- CASTRO, JJ. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. Vet Parasitol 1997; 71: 77-97.
- CORDERO, M., ROJO, F., MARTÍNEZ, A., SÁNCHEZ, C., NAVARRETE, I., DÍEZ, P., QUIROZ, H., CARVALHO, M. Parasitología Veterinaria. 2001. Edit. Mc. Graw-Hill. Interamericana.
- DRUMMOND, R., GRAHAM, O., ERNEST, S. Evaluation of insecticides for the control of *Boophilus annulatus* (Say) and *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) on cattle. In Proceedings, 2nd International Congress of Acarology. Akademia Kiado, Budapest, Hungría 1967. p. 493-498.
- DRUMMOND, O., ERNST, E., TREVIÑO, L., GLADNEY, J., Y GRAHAM, H. Test of acaricides for control of *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*. 1976. J. Econ. Entomol. (69):37-40.
- DE FREITAS FERNANDES, F., Y DE PAULA ZOUZA FREITAS, E. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae).2007.Vet. Parasitol. (147):150-154.
- FAO. Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. 2004 . Module. 1:56.

- FAO. Control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten. Manual práctico de campo. 1987
- FOIL LD, COLEMAN P, EISLER M, FRAGOSO-SÁNCHEZ H, GARCÍA-VÁZQUEZ Z, GUERRERO FD, JONSSON NN, LANGSTAFF IG, LI AY, MACHILA N, MILLER RJ, MORTON J, PRUETT JH, TORR S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Veterinary Parasitology* 2004; 125: 161-185.
- FRAGOSO, S., H., C., N., SOBERANES. Control de la resistencia a los ixodídeos a la luz de los conocimientos actuales. *Memorias de XXV Congreso Nacional de Buiatría*. Veracruz, Veracruz, México. Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos, A.C. 2001. Pp. 40-48.
- GEORGE, J., POUND, J., Y DAVEY, R.. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitol.* 2004. Vol. 129:S353-S366.
- IBARRA, F. Infestación por garrapatas *Boophilus*. En: *Parasitología Veterinaria*. 2012. Vol. III Artrópodos. Eds. Ibarra-Velarde, F, Figueroa-Castillo, J.A., Quintero - Martínez. 1ª. Ed. Editorial Color, S.A. de C.V. México.
- J J FOURIE, L J FOURIE, I G HORAK AND M G SNYMAN. The efficacy of a topically applied combination of cyphenothrin and pyriproxyfen against the southern African yellow dog tick, *Haemaphysalis elliptica*, and the cat flea, *Ctenocephalides felis*, on dogs. 2010. *Jl S.Afr.vet.Ass.* Vol. 81(1): 33–36.
- JONGEJAN, F., Y UILWENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004. Vol. 129:S3-S14.
- JONSSON, N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*. 2006. Vol. 137: 1-10.
- LIMA W., S., M., F., RIBEIRO, M., P., GUIMARAES. Seasonal variation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari:Ixodidae) in cattle in Minas Gerais State, Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 2000. Vol. 32, 375-380.
- MURRELL, A., CAMPBELL JH, BARKER SC. Phylogenetic analysis of the Rhipicephalian ticks indicates that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Mol Phylog Evol.* 2000. Vol. 16:1-7.
- NARI A, H., J., HANSEN. Resistencia de los ecto y endoparásitos: soluciones actuales y futuras. *67ª sesión general. Organización Internacional de Epizootias*. París, Francia. 1999.

- ORTIZ, E.,M. Uso de ixodicidas en Mexico. II Seminario Intermancional de Parasitología Animal “Garrapatas y enfermedades que transmiten”. SARH UNAM-UAEM-IICA-INIFAP. Oaxtepec, Mor. Mex. 1991. Vol. 57-65.
- REDONDO,M., FRAGOSO, H., ORTIZ, M., MONTERO, C., LONA, J., MENDELIN, J. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac (TM) and amidine treatments. Exp. Appl. Acarol. 1999. Vol. 23:841 – 849.
- RIBEIRO, J., SPIELMAN. A. *Ixodes dammini*: Salivary anaphylatoxin inactivating activity. Exp. Parasitol. 1986. Vol. 62: 292-297.
- RODRÍGUEZ-VIVAS RI, QUIÑONES AF, FRAGOSO SH. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. Enfermedades de importancia económica en producción animal. Rodríguez-Vivas RI editor. México DF: McGraw-Hill-UADY. 2005. Vol. 571-592.
- RODRÍGUEZ-VIVAS RI, RIVAS AL, CHOWEL G, FRAGOSO SH, ROSARIO CR, GARCÍA Z, SMITH SD, WILLIAMS JJ, SCHWAGER SJ. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistance to acaricides). Veterinary Parasitology 2007; 146: 158-159.
- ROSADO-AGUILAR JA, RODRIGUEZ-VIVAS RI, GARCÍA-VÁZQUEZ Z, FRAGOSO-SÁNCHEZ H, ORTIZ-NAJERA A, ROSARIO-CRUZ R. Development of Amitraz Resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) undergoing typical Amitraz exposure in the Mexican tropics. Veterinary Parasitology 2008. Vol. 8: 297 - 301
- ROY J. PENCE. The antimetabolite imidazole as a pesticide. J. California Agriculture. January. 1965.
- SABATINI, G., KEMP, D., HUGHES, S., NARI, A., Y HANSEN, J., test to determine LC 50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. 2001. Vet. Parasitol. (95):53-62.
- SARDÁ RIBEIRO, V., AVANCINI, C., GONCALVES, K., TOIGO, E., Y VON POSER, G. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. Vet. Parasitol. 2007. Vol. (8):134 – 141.
- SENASICA – SAGARPA. 2011. Recuperado en Agosto de 2011 de <http://www.senasica.gob.mx/?id=3480> Figura 2.
- SHAW, R. Culture of an organophosphorus resistant strain of *B. microplus* and an assessment of its resistance spectrum. 1966. B Entomol Res (56):389-405.
- SOLÍS S., S.. Ecología de las garrapatas *Boophilus*: Perspectivas de un panorama. *Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten*. Morelos, México 1991. Pp. 19-30

- STONE, B., F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Aust. Vet. J.* 1962.Vol. 48:345-350
- STONE, B., F., AND HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bull. Entomol. Res.* 53:563-78. *Vet. Parasitology.* 1972. Vol. 71: 77–97

## Cuadross y Figuras de los Resultados

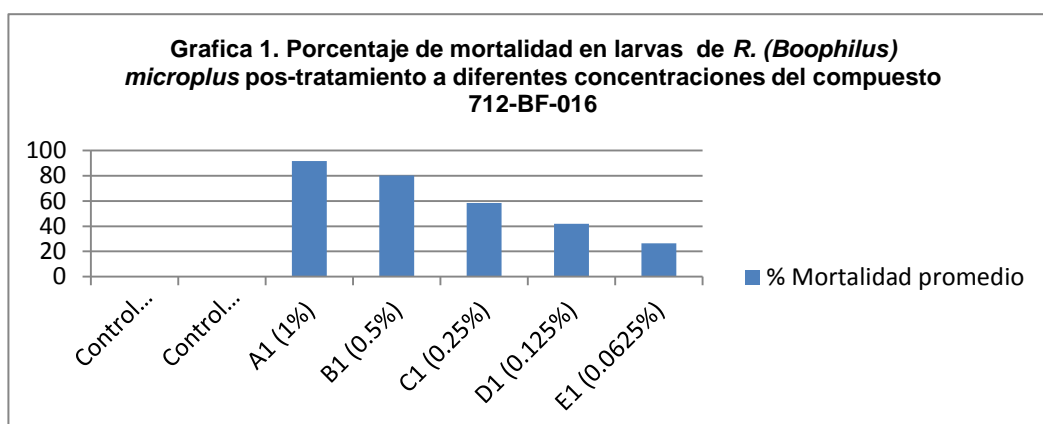
- **Cuadros del Porcentaje de mortalidad de *R. (Boophilus) microplus* por medio de la técnica de paquete de larvas de Stone y Haydoc (1962).**

**Cuadros 1.- Porcentaje de Mortalidad Larvaria de *R. (Boophilus) microplus* por medio de la técnica de paquete de larvas de Stone y Haydoc (1962).**

Concentración	Vivas	Muertas	Total	% Mortalidad	% Mortalidad promedio
Control negativo 1	108	0	108	0	0
Control negativo 2	104	0	104	0	0
A1 (1%)	10.4	136.6	147	93.1 <sup>e</sup>	91.63 <sup>e</sup>
B1 (0.5%)	22.4	123	145.4	84.5 <sup>d</sup>	80.29 <sup>d</sup>
C1 (0.25%)	50.2	90.8	141	63.9 <sup>c</sup>	58.5 <sup>c</sup>
D1 (0.125%)	72	65.8	137.8	45.1 <sup>b</sup>	42 <sup>b</sup>
E1 (0.0625%)	93.8	36.4	130.2	24.1 <sup>a</sup>	26.5 <sup>a</sup>

a,b,c,d,e. Literales distintas indican diferencia estadísticamente significativa (p <0.05)

➤ **Gráfica del Porcentaje de mortalidad de larvas de R. (*Boophilus*) *microplus***



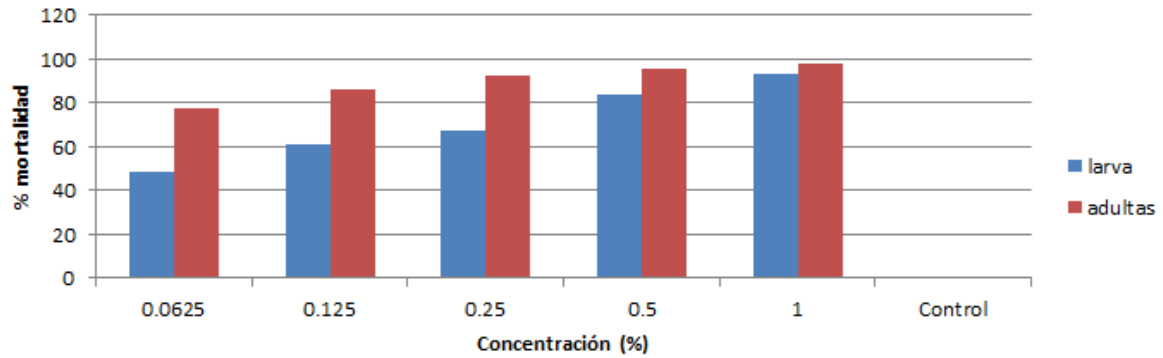
➤ **Cuadros del Porcentaje de mortalidad in vitro de del compuesto del compuesto 712-BF-016**

<b>Cuadros 2. Porcentaje de mortalidad <i>in vitro</i> de garrapatas adultas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> con el compuesto experimental 712-BF-016</b>					
Concentraciones	1%	0.50%	0.25%	0.125%	0.0625%
Porcentaje de efectividad	97.65 <sup>a</sup>	95.54 <sup>a</sup>	91.98 <sup>b</sup>	85.94 <sup>c</sup>	77.51 <sup>d</sup>
Peso promedio de huevos de adultas tratadas con el compuesto experimental 712-BF-016					
712-BF-016	0	0.01	0.19	0.32	0.37
Control (agua)	0.00887 <sup>a</sup>	0.0136 <sup>b</sup>	0.00732 <sup>c</sup>	0.00972 <sup>d</sup>	0.00754 <sup>c</sup>

a,b,c,d. diferencia estadísticamente significativa (p <0.05)

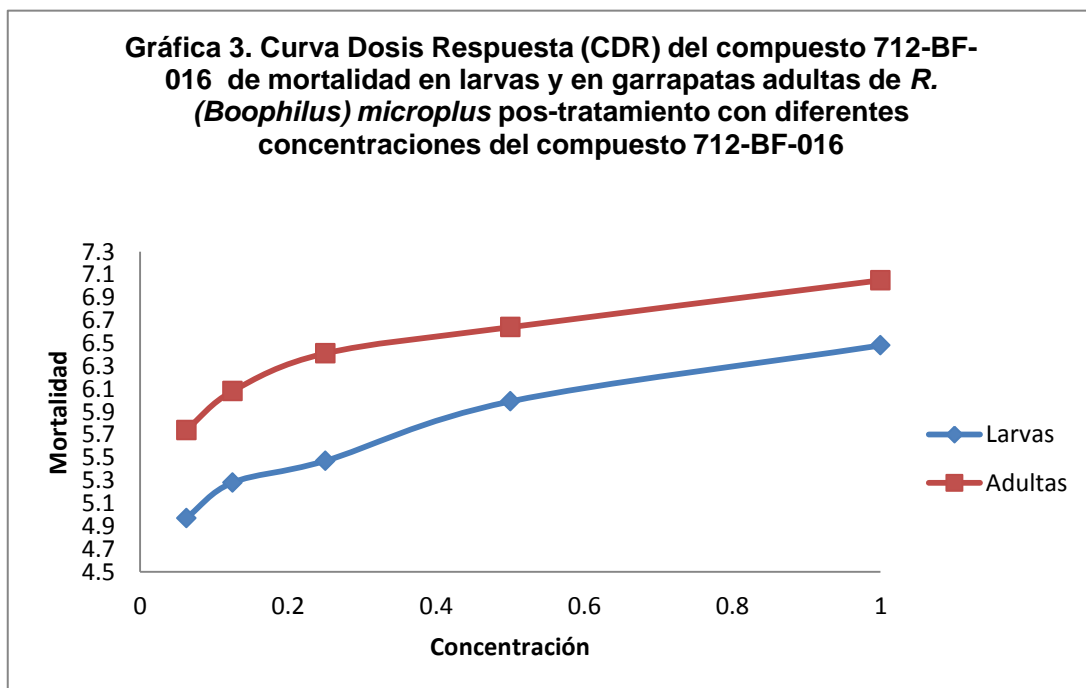
➤ **Gráfica del Porcentaje de mortalidad de larvas y garrapatas adultas de *R. (Boophilus) microplus***

Gráfica 2. Porcentaje de mortalidad de larvas y garrapatas adultas de *R. (Boophilus) microplus* pos-tratamiento con diferentes concentraciones del compuesto 712-BF-016



➤ **Análisis Probit**

Gráfica 3. Curva Dosis Respuesta (CDR) del compuesto 712-BF-016 de mortalidad en larvas y en garrapatas adultas de *R. (Boophilus) microplus* pos-tratamiento con diferentes concentraciones del compuesto 712-BF-016



**Concentración Letal 50%**

**Cuadros 3. Concentración Letal 50% del compuesto 712-BF-016 contra garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Prueba de Inmersión de Larvas (Stone y Haydock), en Prueba de Inmersión de adultas (Drummond).**

Técnica de Stone y Haydock (1962).	0.0666
Técnica de Drummond (1967).	0.0138

➤ **Cuadros del Porcentaje de efectividad del compuesto del compuesto 712-BF-016 y cipermetrina**

**Cuadros 4. Porcentaje de efectividad del compuesto 712-BF-016 y cipermetrina contra garrapatas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en ganado infestado en forma experimental**

Grupos	Concentración de fármaco	Número promedio de garrapatas antes del tratamiento	Número promedio de garrapatas después del tratamiento	% Efectividad
1	712 FB 016 al 16%	81.83 <sup>a</sup>	32.16 <sup>a</sup>	61.78 <sup>a</sup>
2	712-BF-016 al 20%	33.33 <sup>b</sup>	19.83 <sup>b</sup>	76.43 <sup>b</sup>
3	Cipermetrina al 16%	35.66 <sup>b</sup>	12.33 <sup>c</sup>	83.0 <sup>c</sup>
4	Control sin Tx	84.16 <sup>c</sup>	73.16 <sup>d</sup>	---

a,b,c,d. Literales diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )

➤ **Cuadross de Índice de oviposición y Porcentaje de eclosión**

**Cuadros 5. Índice de oviposición y porcentaje de inhibición de la ovoposición de las garrapatas colectadas del ganado tratado con el compuesto experimental 712-BF-016 o con cipermetrina**

Grupos	Concentración de fármaco	% de garrapatas que ovipositaron/grupo	Índice de oviposición	% de inhibición de oviposición
1	712-BF-016 al 16%	12.19	0.28 <sup>a</sup>	50.1 <sup>a</sup>
2	712-BF-016 al 20%	10.97	0.34 <sup>b</sup>	39.55 <sup>b</sup>
3	Cipermetrina 16%	9.18	0.24 <sup>a</sup>	57.58 <sup>c</sup>
4	Control negativo	11.57	0.57 <sup>d</sup>	---

a,b,c,d. Literales distintas indican diferencia estadísticamente significativa (p <0.05)

**Cuadros 6. Porcentaje de eclosión de huevos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de garrapatas colectadas de ganado tratado con el compuesto 712-BF-016 o cipermetrina**

Grupos	Concentración de fármaco	Número promedio de huevos	Número promedio de cascarones	% de eclosión
1	712-BF-016 - 16%	66.73	55.53	50.57 <sup>a</sup>
2	712-BF-016 - 20%	35.37	31.97	55.99 <sup>b</sup>
3	Cipermetrina - 16%	15.57	26.63	74.89 <sup>c</sup>
4	Control negativo	11.77	70.89	89.14 <sup>d</sup>

a,b,c,d. Literales distintas indican diferencia estadísticamente significativa (p <0.05)

**Apéndice 1**



***Evaluación de compuestos mediante la Técnica de Paquete de Larvas (Stone y Haydock, 1962).***

Esta técnica consiste en la exposición de larvas en 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 de análisis estadístico, ya que los efectos letales de los pesticidas están relacionados con los logaritmos de las concentraciones utilizadas (Stone et al., 1962).

En la serie de ensayos se evaluó el compuesto experimental 712-BF-016 por medio de la Técnica de paquete de larvas.

**Preparación de concentración inicial o solución madre del compuesto experimental 712 – BF - 016**

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. Es decir:

En una probeta de 25 ml se le colocó 25 ml del solvente junto con 0.0842 g del compuesto experimental 712- BF – 016

Para conocer los gramos de principio activo necesarios para preparar la solución madre se empleó la siguiente fórmula.

$$\text{g de producto} = \frac{(\%CI)}{(f \cdot 3)} \cdot \frac{(100\%)}{(\%CFT)}$$

%CI= Concentración (%) que se desea obtener

f= valor fraccionario que se asigna al volumen que se desea preparar

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

%CFT= Porcentaje de concentración de la forma técnica del químico a utilizar.

**Preparación de diluciones**

Como dilución control se utilizó la mezcla de aceite de oliva y tricloroetileno, una parte de aceite de oliva por dos partes de tricloroetileno. Es decir; 30% (30 ml) de Aceite vegetal, 60% (60 ml) de Tricloroetileno.

Preparación de dosis discriminantes en probetas de 100 ml

Concentraciones:

1. 9.8 ml de sol. Madre + 0.2 del solvente
2. 5 ml de solvente + 5 ml de Sol. 1
3. 5 ml de solvente + 5 ml de Sol. 2
4. 5 ml de solvente + 5 ml de Sol. 3
5. 5 ml de solvente + 5 ml de Sol. 4

### **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 del compuesto químico experimental a evaluar y se realizaron al menos dos repeticiones de cada dilución con sus correspondientes testigos.

La impregnación se realizó con la ayuda de una micropipeta graduada con capacidad de 1,000  $\mu$ l y se emplearon 670  $\mu$ l de la dilución correspondiente por cada papel.

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 del producto.

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

La finalidad era que si alguna larva se escapaba accidentalmente esta era atrapada en la solución jabonosa para no tener dispersión de estos artrópodos en el laboratorio.

Para esta técnica se utilizaron larvas de 14 días de edad. El llenado de paquetes se realizó colocando cada paquete, comenzando con los testigos, sobre la caja 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.

## **Incubación**

Los paquetes se colocaron en una charola y se introdujeron en un incubador marca Binder, a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C y con un rango de 80 a 90% de humedad relativa, en donde permanecieron por 24 horas.

## **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 consideran como vivas. Posteriormente se calcularon los porcentajes de respuesta de mortalidad por dilución y sus valores medios.

## **Evaluación de la Efectividad**

Para calcular el índice de mortalidad por contacto con los ixodicidas y la supervivencia larvaria se emplearon las fórmulas establecidas por la FAO (2004).

A) Para calcular la mortalidad larvaria se empleó la fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad larvaria} = (\text{larvas muertas} / \text{larvas totales}) \times 100$$

B) Para calcular la mortalidad media se empleó la fórmula:

$$\text{Media del \% de mortalidad} = (\text{mortalidad 1} + \text{mortalidad 2}) / 2$$

## **Apéndice 2**

### ***Evaluación de compuestos mediante la técnica de inmersión de hembras adultas (Drummond et al., 1967)***

#### **Preparación de Diluciones**

Preparación de concentración inicial o solución Madre:

En una probeta de 25 ml se colocó 25 ml del solvente con 0.0842 g del compuesto experimental 712- BF – 016

Preparación del solvente: Colocar 30% (30 ml) de Aceite vegetal, 60% (60 ml) de agua corriente

Preparación de dosis discriminantes en las probetas de 100 ml

Concentraciones para el grupo tratado:

1. 9.8 ml de sol. Madre + 0.2 solvente
2. 5 ml de solvente + 5 ml de Sol. 1
3. 5 ml de solvente + 5 ml de Sol. 2
4. 5 ml de solvente + 5 ml de Sol. 3
5. 5 ml de solvente + 5 ml de Sol. 4

La concentración para el grupo testigo fue de 25ml de solvente, de ambos grupos se realizaron tres réplicas de cada concentración y testigos.

### **Garrapatas**

Las garrapatas hembras adultas repletas de sangre 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 hembras adultas en un vaso de precipitados que contenía 25 ml de la dilución del químico a evaluar. Las garrapatas permanecieron inmersas durante 30 minutos.

### **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 adhirió dorsalmente con cinta doble adhesivo en cajas de Petri. Cada caja se identificó, con el nombre de la cepa, la fecha de realización de la técnica y concentración del compuesto.

Las cajas de Petri con las garrapatas se incubaron en la estufa entomológica a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura y 80-90% de humedad relativa, durante siete días.

Transcurridos los siete días de incubación, se contó el número de garrapatas que ovipositaron en cada grupo. Posteriormente se incubaron por siete 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 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 por dos horas con la finalidad de matar las larvas. Para contar los huevos eclosionados y no eclosionados, primero se homogeneizó el contenido de cada vial. Se tomó una muestra aleatoria, lo suficiente grande para llenar un campo de 100 mm<sup>2</sup>. Con ayuda de un microscopio estereoscópico se contaron los huevos sin eclosionar y los cascarones de todo el campo.

## Parámetros evaluados

La efectividad de los diferentes extractos fue evaluada a través de tres parámetros: la mortalidad de teleoginas de *R. (Boophilus) microplus*; la reducción de la oviposición (reducción de la relación huevos - garrapatas) y la disminución de la eclosión.

La efectividad fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Efectividad} = \frac{\bar{X} \text{ Garrapatas Testigo} - \bar{X} \text{ Garrapatas Tratada}}{\bar{X} \text{ Garrapatas Testigo}} \times 100$$

(Abbott, 1925)

### **Apéndice 3**

#### ***Evaluación de la efectividad de un compuesto experimental contra garrapatas *Rhicephalus (Boophilus) microplus* en becerros infestados en forma experimental***

##### **Animales**

Para un estudio de esta índole se pueden utilizar 24 becerros cruzados de “X” raza, los cuales deben pesar entre 150 y 200 kg de peso. Los animales deben estar ubicados en un rancho libre de garrapatas *R. (Boophilus) microplus* y pueden ser alimentados con gramas nativas y/o alimento concentrado y agua *ad libitum*.

Los animales deben permanecer en el mismo potrero hasta su utilización.

##### **Infestación de bovinos**

El método de infestación para los 24 becerros del experimento se realiza de la siguiente forma:

##### **Adaptación de los bovinos al establo**

Días previos a la infestación los becerros son colocados en el establo para lograr que se adaptaran a su nueva situación. Se prefiere que los animales estén limitados en su movimiento.

La alimentación de los becerros puede ser a base de alfalfa, avena y concentrado. Una vez iniciado el estudio, los animales se deben vigilar constantemente para evitar que se puedan lastimar y para que tengan alimento todo el tiempo.

Los 24 becerros pueden ser infestados con larvas de garrapatas obtenidas en el laboratorio.

Previo al inicio los animales deben ser revisados en la búsqueda de garrapatas y checar con el dueño del rancho o los vaqueros cuando fue la última desparasitación con insecticida y con qué producto.

## **Infestación**

Consiste en aplicar con un pincel sobre el dorso del becerro 2 g (40,000 larvas aproximadamente) de un mes de vida. Las larvas pueden aplicarse en diferentes intervalos de tiempo (1 a 3 días) con el fin de que factores externos como el aire, el que se pudiera rascar o lamer, o simplemente que se cayeran al momento de la colocación, impidan contar con un número adecuado de garrapatas en el lomo del bovino.

## **Tratamiento con un ixodicida (garrapaticida) o algún compuesto experimental.**

Se bañan los grupos experimentales con el producto en estudio utilizando una bomba de aspersión aplicando la dosis recomendada disuelta de 4 L a 5 L del compuesto/animal.

Como grupo de referencia siempre se debe incluir un grupo tratado con un Ixodicida comercial utilizando las dosis recomendadas por el fabricante.

Por otro lado, es sumamente importante incluir un grupo Testigo sin tratamiento el cual deberá mostrar siempre alta infestación por garrapatas.

El experimento se conduce de acuerdo a las especificaciones el protocolo tratando de evaluar siempre los diversos parámetros bajo las mismas condiciones de manejo del ganado.

Una vez finalizado el estudio se recomienda dar un baño por aspersión o sumersión al ganado utilizando un ixodicida comercial.

## **Liberación de los bovinos**

Posterior a las evaluaciones realizadas, los bovinos deben de ser regresados a los corrales para su recuperación. Como en los productos experimentales se desconoce el Tiempo de Retiro, es recomendable no consumir su leche ni su carne al menos durante el primer mes en que el animal haya estado sujeto a tratamiento.



**El presente estudio, fue publicado en:**

*Pharmacology & Pharmacy*, 2013, 4, 41-45 doi:10.4236/pp.2013.41005 Published Online January 2013  
(<http://www.scirp.org/journal/pp>) 41

## ***In Vitro and in Vivo Efficacy of an Experimental Compound against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks***

**Guadalupe Santillán-Velazquez<sup>1</sup>, Froylán Ibarra-Velarde<sup>1</sup>, Blas Flores Pérez<sup>2</sup>, Margarita Romero-Avila<sup>2</sup>, Yazmin Alcalá-Canto<sup>1</sup>, Héctor Salgado-Zamora<sup>3</sup>, Yolanda Vera Montenegro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Parasitology, Veterinary Faculty of Medicine and Zootechnics, National University Autonomus of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Faculty of Chemistry, National University Autonomus of Mexico, Mexico City, Mexico; <sup>3</sup>Laboratory of Organic Chemistry, School of Biological Sciences, National Polytechnic Institute, Mexico City, Mexico.

Email: lupitasantillanv@gmail.com

Received October 14<sup>th</sup>, 2012; revised November 20<sup>th</sup>, 2012; accepted December 17<sup>th</sup>, 2012

### **ABSTRACT**

The aim of the present study was to evaluate the ixodicide efficacy of the experimental compound 712-BF-016 against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks *in vitro* and in cattle. The *in vitro* efficacy was initially tested against *R. Boophilus microplus* larvae using the Larval Packet Test (LPT). In a 2nd study the ixodicide efficacy was tested against adult ticks using the Adult Immersion Test (AIT). Finally, a field test with the compound was carried out using 24 steers experimentally infested with *R. (Boophilus) microplus* ticks which were divided into 4 groups of 6 animals each for treatment. Groups 1 and 2 received the experimental compound at concentrations of 16% and 20%, respectively, which were applied as an aspersion in a total volume of 4 liters/animal. Group 3 was equally treated but with a commercial ixodicide containing cipermethrin at a 16% concentration. Group 4 served as untreated control. The efficacy was measured on days 1, 2, 3 after treatment as the percentage of ticks present from the treated groups, relative to the ticks pre-sent in the untreated control. The results indicated a percentage mortality of 93.21% for LPT and 98.02% for AIT. The efficacy produced in cattle was 61.78%, 76.43% and 85.34% for groups 1, 2 y 3, respectively. It is concluded that there was no concordance between the results obtained *in vitro* with those found in cattle. Possibly the excipient used for the formulation of the experimental compound was not suitable and had some influence on the results.

**Keywords:** *Rhipicephalus Boophilus microplus*; Ixodicide; LPT; AIT; Cattle