



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

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

**“Pronóstico, síntesis química y evaluación biológica de ixodicidas
seleccionados por computadora”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
CONCEPCIÓN RAMÍREZ LUBIANOS**

**TUTOR: DR. FROYLAN IBARRA VELARDE
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
COMITÉ TUTORAL**

**DRA. HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**DR. HÉCTOR JAIME SALGADO ZAMORA
DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

MÉXICO, DF., OCTUBRE 2014



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.

**“Pronóstico, síntesis química y evaluación biológica de
ixodicidas seleccionados por computadora”**

COMITÉ TUTORAL

Tutor: DR. FROYLAN IBARRA VELARDE

Vo.Bo.

Tutora: DRA HERMINIA INÉS PÉREZ MÉNDEZ

Vo.Bo.

Tutor: DR. HÉCTOR JAIME SALGADO ZAMORA

Vo.Bo.

Presenta: M. en C. F. CONCEPCIÓN RAMÍREZ LUBIANOS

Firma

Agradecimientos Institucionales

Al Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Cuerpo Académico Consolidado: Biocatálisis Aplicada a la Química Orgánica, UAM-X-CA-30, Laboratorio N-201, UAM-Xochimilco.

Al proyecto PAPIIT-DEGPA-UNAM, IN-201710, que financió parcialmente este proyecto.

A CONACyT por la Beca otorgada No 52807 para realizar estudios de posgrado en el Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo recibido a través del programa PAEP

Agradecimientos

Siempre que se alcanza una meta, se hace un recuento de las travesías que se pasan para lograrlo, así como de todas aquellas personas que estuvieron a nuestro lado, enseñando, apoyando o motivando.

En este caso he tenido a personas invaluable a mi lado.

A mi hijo Luis Fernando, eres el motor de mi vida, gracias mí niño por estar a mi lado, te amo.

A los Papas Jefes, como cariñosamente les dice mi hijo a sus abuelitos, Sr. Jorge Chávez y Sra. Julia Azpeitia, gracias por su apoyo, ya que sin el cariño con el que cuidan a mi pequeño, esta meta no la hubiera terminado en tiempo y forma, muchas gracias no tengo como pagarlo.

A mi Familia, gracias por su apoyo, son parte importante en mi vida y son ese puerto donde puedo descansar y retomar fuerzas. Gracias a mi Mamá, hermanas (Car y Nena), hermanos (Luis y Beto) y mis sobrinos (Luis Emanuel, Nadia, Ale, Vale y Julieta).

A mis Profesores Dra. Mina y Dr. Norberto, siempre lo he dicho son mi ejemplo a seguir, les agradezco todo el apoyo que siempre me han brindado académicamente y personalmente, los quiero y admiro. Muchas Gracias.

A mi tutor Dr. Froylan Ibarra, gracias por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, le agradezco todo su apoyo.

Al Dr. Héctor Salgado, por sus asesorías y su colaboración en este proyecto.

A todos mis amigos, no los mencionare en ningún orden, ya que para mí todos son especiales: Lucy, Mar, Isabel, Omar, Gaby, Hilda, Alberto, Mario, Pato, Osvaldo y Mariana. Gracias por ser parte de mi vida y dejarme ser parte de la suya.

Resumen

“Pronóstico, síntesis química y evaluación biológica de ixodicidas seleccionados por computadora”

Rhipicephalus (Boophilus) microplus es uno de los principales ectoparásitos del ganado bovino en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Este causa un impacto económico negativo a la ganadería por daños directos (daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre y disminución de parámetros productivos) e indirectos (agentes etiológicos que transmiten). El uso indiscriminado de ixodicidas en los últimos años, ha generado que *R. (B.) microplus* haya creado resistencia a los productos que se encuentran en el mercado. Esto hace necesario diseñar nuevos ixodicidas, siendo los ensayos *in silico* (estudios asistidos por computadora) una nueva alternativa para seleccionar estos, mediante el uso de modelos QSAR (Quantitative Structure-Activity Relation).

Empleando los software TOMOCOMD-CARDD y WEKA, se han llevado a cabo diversos estudios *in silico*, permitiendo el descubrimiento de compuestos activos contra enfermedades de gran impacto social. Por los resultados alcanzados con estos software, se utilizaron para la selección *in silico* de nuevos compuestos ixodicidas.

Después de este estudio se seleccionaron a los análogos del: carvacrol (éter metílico de carvacrol y acetato de carvacrol); ácido salicílico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico, 2,5-dihidroxibenzoato de metilo, 2,5-dihidroxibenzoato de etilo, 2-(α,α' -dimetoximetil)fenol, 2-metoxibenzoato de etilo y el alcohol 2-hidroxibencílico); y los análogos de isómeros del ácido salicílico, como el 4-hidroxibenzoato de metilo y 4-hidroxibenzoato de *n*-propilo. Estos fueron sintetizados, purificados y caracterizados, por métodos convencionales o *novo*, determinando su actividad ixodicida por bioensayos *in vitro*. Todos los compuestos presentaron actividad acaricida en *R. (B.) microplus*, siendo los análogos 2-metoxibenzoato de etilo, 2,5-dihidroxibenzoato de etilo, acetato de carvacrol y éter metílico de carvacrol los que presentaron mayor actividad acaricida, siendo el 2-

metoxibenzoato de etilo el más potente. Todos los compuestos presentaron mejor actividad acaricida en la etapa larvaria que en la etapa adulta de *R. (B.) microplus*, el acetato de 2-metoxibenzoato de metilo y 2,5-dihidroxibenzoato de etilo, son los mejores candidatos para continuar su estudio *in vivo*.

Abstract

"Forecast, chemical synthesis and biological evaluation of computer selected acaricides"

Rhipicephalus (Boophilus) microplus an important ectoparasite of cattle in tropical and subtropical regions of the world. This causes a negative economic impact on livestock for direct damages (damage to the skin by the action of bites, blood loss and decreased production parameters) and indirect (transmission of etiological agents). Indiscriminate use of acaricides in recent years has generated *R. (B.) microplus* resistance to products that are on the market. Therefore, it is necessary to design new acaricides, with *in silico* assays (computer aided studies) as a new alternative to drugs design, by using QSAR (Quantitative Structure-Activity Relation) models. Using TOMOCOMD-Cardd and WEKA software, we conducted several *in silico* studies, allowing the discovery of active compounds against diseases of great social impact. The results achieved with these software were used to carry out the *in silico* selection of new acaricide compounds.

After this study, carvacrol analogues were selected (carvacrol methyl ether and carvacrol acetate), as well as salicylic acid analogues (2,5-dihydroxybenzoic acid, ethyl 2,5-dihydroxybenzoate, methyl 2,5-dihydroxybenzoate, 2-(α,α' -dimethoxymethyl)phenol, ethyl 2-methoxybenzoate and alcohol 2-hydroxybenzyl). Isomers of salicylic acid such as propyl *p*-hydroxybenzoate, methyl *p*-hydroxybenzoate. These compounds were synthesized, purified and characterized by conventional methods or novo determining its acaricide activity by *in vitro* bioassays. All compounds showed acaricidal activity in *R. (B.) microplus*, the analogues 2-methoxybenzoate, 2,5-dihydroxybenzoate, carvacrol methyl ether acetate and carvacrol presented higher acaricidal activity being 2-methoxybenzoate ethyl the most potent. All evaluated compounds presented better acaricide activity against the larval stage as compared with the adult stage of *R. (B.) microplus*, ethyl 2-methoxybenzoate and ethyl 2,5-dihydroxybenzoate, being the best candidates to continue their study.

Participación en Congresos Nacionales

- **VIII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia**, “Desarrollo de base de datos para la predicción *in silico* de compuestos con posible actividad ixodícida (TOMOCOMD- CARDD)”, del 18 al 20 de Mayo 2011, León, Guanajuato.
- **XLIV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas**, “Estudio *in silico* para la predicción de compuestos con posible actividad ixodícida”, del 23 al 26 de octubre del 2011, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero, México.
- **II Congreso de Alumnos de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México**, “Estudio *in silico* y síntesis química de compuestos con posible actividad ixodícida”, 12 de abril 2012, Universidad Nacional Autónoma de México Campus Zaragoza.
- **XLV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas**, “Evaluación biológica de compuestos con actividad acaricida seleccionados *in silico*”, del 23 al 26 de septiembre del 2012, Oaxaca, Oaxaca, México.
- **XLVI Congreso Nacional y V Internacional de Ciencias Farmacéuticas**. “Evaluación y determinación de CL_{50} de análogos de carvacrol y ácido salicílico con actividad ixodícida”, del 27 al 30 de Octubre del 2013, Cancún, Quintana Roo.

Participación en Congresos Internacionales

- **Toronto International Pharmacy Symposiun**, “Assesement of the acaricidal activity of carvacrol an salicylic acid analogues on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* computer-selected”, del 27 al 29 de septiembre de 2012, Toronto, Canada.
- **XXVIII Congresso Nazionale Società Italiana Di Parassitologia**, “Assessment and determination of LC_{50} of carvacrol and salicylic acid analogues whit acaricide activity un larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*”, Roma 24-27, Giugno, 2014.

Ponencias

- **“Estudio *in silico* y síntesis química de compuestos con posible actividad ixodícida”**, 27 de Abril de 2012, Congreso de Alumnos de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- **“Evaluación biológica de compuestos con posible actividad ixodícida”**, 27 de Agosto de 2012, Congreso de Alumnos de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- **“Pronostico, síntesis química y evaluación biológica de ixodícidias seleccionados por computadora”**, 29 de Mayo de 2013, Ciclo de Seminarios del Trimestre 13-Primavera de la Maestría en Ciencias Farmacéuticas, UAM –Xochimilco.

Índice

1	Introducción	1
2	Antecedentes	2
2.1	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	2
2.2	Ciclo biológico	3
2.3	Control Químico y Resistencia	4
2.4	Evaluación de la actividad ixodicida <i>in vitro</i>	6
2.5	Diseño de nuevos fármacos basado en topología molecular	7
2.6	TOMOCOMD-CARDD (TOpological MOlecular COMputer Design-Computer-Aided Rational Drug Design)	10
2.4	Análisis Quimiométrico de los Datos	11
3	Justificación	14
4	Hipótesis	14
5	Objetivo General	14
5.1	Objetivos Específicos	15
6	Material y Métodos	16
6.1	Desarrollo de bases de datos	16
6.2	Representación gráfica en 2D de las moléculas y análisis y procesamiento quimiométrico	17
6.3	Selección, síntesis y caracterización de moléculas seleccionadas	18
6.4	Bioensayos <i>in vitro</i>	18
6.4.1	Obtención de larvas de <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i>	18

6.4.2	Prueba de Paquete Larvario (PPL)	18
6.4.3	Prueba de inmersión de larvas (PIL)	19
6.4.4	Prueba de inmersión de adultas, PIA	20
6.5	Análisis estadístico	21
7	Resultados y Discusiones	22
8	Conclusiones	39
9	Bibliografía	41
10	Anexos	49
10.1	Anexo I, Artículo Publicado	49
10.2	Anexo II, Manuscrito Enviado	56

Índice de Cuadros

Cuadro 1	Clasificación de ixodicidas por familia química	5
Cuadro 2	Porcentaje de Mortalidad larvaria de compuestos evaluados por PPL	31
Cuadro 3	Porcentaje de Mortalidad larvaria de compuestos evaluados por PIL	32
Cuadro 4	CL ₅₀ (μmol/mL) de compuestos evaluados <i>in vitro</i>	33
Cuadro 5	Concentraciones Letales 50, valores de Polarizabilidad y Peso Molecular (PM) de cada compuesto evaluado en larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus in vitro</i> .	34
Cuadro 6	Porcentaje de Reducción de Oviposición	35
Cuadro 7	Porcentaje de Tasa de Eclosión	36
Cuadro 8	Porcentaje de Eficacia del Tratamiento	37

Índice de Figuras

Figura 1	Distribución de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> en México	3
Figura 2.	Ciclo biológico <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
Figura 3	Compuestos seleccionados con TOMOCOMD-CARDD, con actividad antitripanosomiasis	10
Figura 4	Compuestos seleccionados con TOMOCOMD, con actividad contra <i>Trichomonas vaginalis</i>	11
Figura 5	Análogos de carvacrol: acetato de carvacrol (1) y éter metílico de carvacrol (2).	23
Figura 6	Análogos del ácido salicílico: ácido 2,5-dihidroxibenzoico (3), 2,5-dihidroxibenzoato de metilo (4), 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (5), 2-(α,α' -dimetoximetil)fenol (6), 2-metoxibenzoato de etilo (7) y alcohol 2-hidroxibencílico (8)	24
Figura 7	Análogos del isómero del ácido salicílico: 4-hidroxibenzoato de metilo (9) y 4-hidroxibenzoato de <i>n</i> -propilo (10)	24

1 Introducción

Rhipicephalus (Boophilus) microplus es uno de los principales ectoparásitos del ganado bovino en las regiones tropicales y subtropicales del mundo,¹ el cual causa un impacto económico negativo a la ganadería por daños directos (daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre y disminución de parámetros productivos) e indirectos (agentes etiológicos que transmiten).²

Existen diferentes métodos para controlar y/o erradicar a este parásito, entre los que destacan el tratamiento con diferentes compuestos ixodicidas como compuestos organofosforados, piretroides, amidinas, endectocidas, fenilpirazolonas e inhibidores del desarrollo. Sin embargo el uso indiscriminado de estos ixodicidas en los últimos años, ha generado que *R. (B.) microplus* haya creado resistencia a la mayoría de los ixodicidas que se encuentran en el mercado.

Esto hace necesario diseñar nuevos ixodicidas, siendo los ensayos *in silico* (estudios asistidos por computadora) una nueva alternativa para su selección, mediante el uso de modelos QSAR (Quantitative Structure-Activity Relation).

TOMOCOMD-CARDD (**TO**pological **MO**lecular **COM**puter **D**esign-**COM**puter-**A**ided **R**ational **D**rug **D**esign),³ es un programa que ayuda al diseño racional de fármacos, utilizado para el cálculo de descriptores moleculares, siendo una herramienta para el cribado virtual y selección de nuevas moléculas con potencial actividad biológica. Empleando el software TOMOCOMD-CARDD, se han llevado a cabo diversos estudios *in silico*, permitiendo el descubrimiento de compuestos activos contra enfermedades de gran impacto social. Los resultados alcanzados con este software, se usarán para llevar a cabo el estudio y selección *in silico* de nuevos compuestos ixodicidas, apoyados con el software de WEKA (**W**aikato **E**nvironment for **K**nowledge **A**nalysis), versión 3.6.3, para realizar el análisis estadístico y análisis quimiométrico de los datos. Los compuestos seleccionados se sintetizarán, purificarán y caracterizarán, por métodos convencionales o de *novo*, determinando su actividad ixodicida por bioensayos *in vitro*.

2 Antecedentes

2.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Las garrapatas se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta y se han especializado en alimentarse de sangre de mamíferos, aves y reptiles; la adaptación evolutiva de las garrapatas a la hematofagia, es la principal razón por la que se producen grandes pérdidas económicas. Sin embargo, el mayor impacto de las infestaciones por garrapatas sobre los animales y el hombre es a través de los patógenos que estas transmiten como: protozoarios (*Babesia spp* y *Theileria spp*), bacterias (*Rickettsia spp*, *Ehrlichia spp* y *Anaplasma spp*), virus (Nairovirus, Flavivirus, Asfavirus) y nemátodos (*Acanthocheilonema*). Estos patógenos se consideran responsables de más de 100,000 casos de enfermedades en humanos, en animales silvestres y domésticos, siendo los vectores más importantes de patógenos causantes de enfermedades en animales. A nivel mundial, son los segundos vectores más importantes de enfermedades en humanos después de los mosquitos.⁴

Las garrapatas están comprendidas en tres Familias Ixodidae o garrapatas duras, Argasidae o garrapatas blandas y Nuttalliellidae presente solo en África, con características de las dos familias anteriores.⁴

Existen diferentes géneros en la familia Ixodidae como: *Ixodes*, *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Nosomma*, entre otras.⁴

En la ganadería bovina mexicana, las especies de garrapatas que tienen mayor importancia son: *Boophilus microplus*, *Boophilus annulatus*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma americanum* y *Anocentor nitens*; sin embargo, las especies de mayor importancia para el ganado bovino son *Boophilus microplus* y *Amblyomma cajennense*.⁴

R. (B.) microplus es un miembro de la familia Ixodidae (garrapatas duras), y anteriormente se conocía a esta garrapata como *Boophilus microplus*, pero

recientemente *Boophilus* se ha convertido en un subgénero del género *Rhipicephalus*, de acuerdo con lo reportado por The Center For Food Security & Public Health and Institute for International Cooperation in Animal Biologics.⁵ En México, esta garrapata causa enormes pérdidas económicas al sector ganadero de aproximadamente 48 millones de dólares anuales, tanto por daños directos como: daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre y disminución de parámetros productivos y costo por el control de este parásito, así como daños indirectos por los agentes etiológicos que transmiten: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Borrelia theileri*.^{2,6}



Figura 1. Distribución de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México.

2.2 Ciclo biológico

Las garrapatas se desarrollan en la primera parte de su vida en la tierra o la hierba; sin embargo, son ectoparásitos hematófagos obligados, es decir, se tienen que alimentar de la sangre de los animales hospederos durante algunas etapas de su ciclo biológico. Las garrapatas *R. (B.) microplus* infestan preferentemente al ganado bovino, pero también se pueden encontrar en otros mamíferos (caballos, mulas, ovejas, cabras o venados). El ciclo biológico de *R. (B.) microplus* es de un solo hospedero y se divide en dos fases:

La fase de vida libre: La hembra fecundada y completamente llena de sangre, se desprende del hospedero para llevar a cabo la puesta de los huevos que se incuban de 7 a 21 días y nacen las larvas.

La fase parásita: Una vez que las larvas se trasladan a los bovinos se desarrollan hasta ninfas que, a su vez, mudan a machos o hembras posteriormente se lleva a cabo la cópula.⁷ (Figura 2).

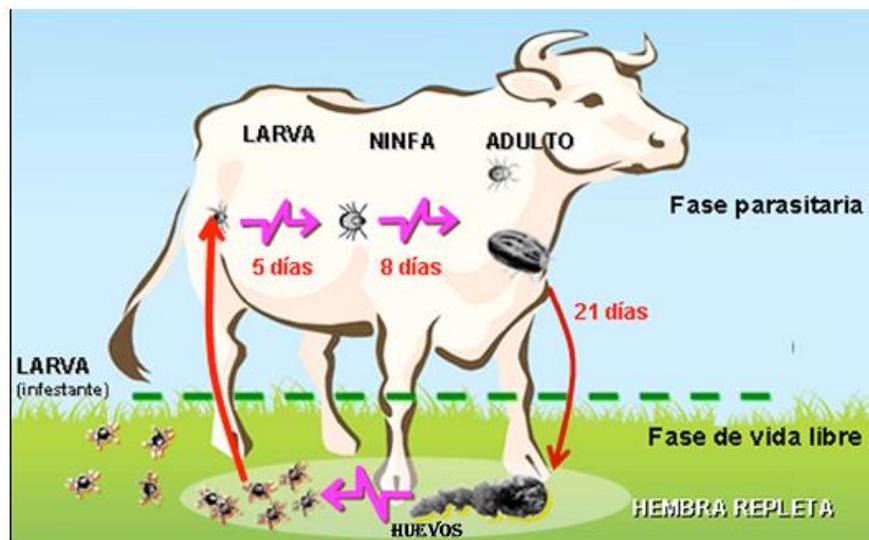


Figura 2. Ciclo biológico *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

2.3 Control Químico y Resistencia

En México, como en otras partes del mundo, los esfuerzos por controlar las infestaciones debidas a las garrapatas se han basado fundamentalmente en el control químico, mediante el uso de estos ixodicidas, los cuales se pueden clasificar por la familia química a la que pertenecen: arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides sintéticos, amidinas y actualmente ivermectinas.^{8,9} (Cuadro 1). Estos productos han sido utilizados con éxito en el control de las garrapatas; sin embargo, su uso continuo ha ocasionado la generación de cepas de garrapatas resistentes.¹⁰

Garrapaticidas de acuerdo a su grupo químico	
Grupo químico	Compuestos
Carbamatos	Crabaryl
Órganofosforados	Carbofenotión, Clorfenvinfós, Clorpinifós, Coumafós, Diazinón, Diclorvós, Dioxantión, Fenitrotión, Fentiión, Fosmet, Foxím, Malatiión, Triclorfón
Piretroides y Peritricinas	Alletrina, Cihalotrina, Cipermetrina, Deltametrina, Resmetrina
Formamidinas	Amitraz
Órganoclorados	DDT, HCH/Lindano, Toxafeno
Avermectinas	Ivermectina, Doramectina, Moxidectina

Cuadro 1. Clasificación de ixodicidas por familia química.

Debido al uso indiscriminado de ixodicidas o no completar el tratamiento recomendado, ha generado que *R. (B.) microplus*, haya creado resistencia a prácticamente a todos los ixodicidas que se encuentran en el mercado. La resistencia a los ixodicidas, es una condición genética que se transmite a una población de garrapatas por ejemplo la capacidad para adaptarse exitosamente a un ambiente tóxico le permite sobrevivir a la exposición de los ixodicidas que matan a otros individuos de la misma población.⁸

En México existen reportes de resistencia a compuestos organofosforados, organoclorados (1981), piretroides (1986) y amidinas (2002), y de cepas multiresistentes.¹¹ El hallazgo de poblaciones multiresistentes puso en relieve un problema aún más complejo; la resistencia múltiple a los pesticidas en el territorio mexicano continúa extendiéndose a razón de la presión que se ha ejercido por el empleo de ixodicidas durante los últimos años. Actualmente, poblaciones de garrapatas han sido diagnosticadas resistentes a organofosforados, piretroides y amidinas,¹² lo que implica, que su disponibilidad actual y futura se encuentra

comprometida debido al progresivo incremento de la resistencia y los altos costos de investigación para el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas.

2.4 Evaluación de la actividad ixodocida *in vitro*

La evaluación de la actividad ixodocida se realiza por bioensayos, empleando larvas de *R. (B.) microplus*, mediante dos técnicas:

- ❖ **Prueba de paquete de larvas (PPL).** Está sustentada y desarrollada en una serie de ensayos con garrapatas *R. (B.) microplus* durante muchos años en el Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), en Australia y fue adoptada por la Food and Agriculture Organization (FAO), como la principal prueba de diagnóstico de resistencia en garrapatas y evaluación de la actividad acaricida. Consiste en exponer las larvas de garrapatas en una superficie de papel filtro previamente impregnado con el compuesto a evaluar empleando como disolvente una mezcla de tricloroetileno y aceite de oliva extra virgen (2:1), la mortalidad larval se cuantifica 24 horas después.^{2,13}
- ❖ **Prueba de inmersión de larvas (PIL).** Este método conocido también como técnica de Shaw, no ha sido ampliamente usado en el diagnóstico de resistencia ni promovido por la FAO. Se han realizado estudios comparativos donde se concluye que los resultados de la prueba de inmersión pueden ser comparados con los resultados de la prueba de paquete de larvas, empleando como disolventes agua o etanol.^{2, 13}

El desarrollo de ambas pruebas requiere aproximadamente seis semanas considerando los siguientes pasos:

- A) Recolección e incubación de garrapatas repletas
- B) Postura de huevos
- C) Obtención de larvas
- D) Dilución de los productos a evaluar
- E) Realización de paquetes de larvas para la obtención de resultados
- F) Incubación de los paquetes de larvas.

Existen otros bioensayos, que se pueden utilizar para evaluar la actividad acaricida empleando ejemplares adultos de *R. (B.) microplus*, como la **Prueba de inmersión de adultas (PIA)**. Esta prueba fue descrita y desarrollada por Drummond en 1967, para determinar la eficacia de nuevos ixodicidas contra varias especies de garrapatas. Fue adaptada como prueba de resistencia en varios laboratorios, pero nunca fue estandarizada. Posiblemente su principal desventaja es que requiere de varias semanas para obtener resultados, debido al periodo para obtener garrapatas repletas. Para llevar a cabo los bioensayos es necesario, contar con un control positivo o negativo, para poder realizar la corrección de los porcentajes de mortalidad.^{2, 13} El porcentaje de mortalidad debe ser corregido de acuerdo a la fórmula aplicada por Abbot (1925).¹³

2.5 Diseño de nuevos fármacos basado en topología molecular

Muchos de los fármacos hoy disponibles en la industria farmacéutica fueron caracterizados por técnicas de cribado convencionales, que consistían básicamente en evaluar una gran variedad de compuestos tanto de origen natural como sintéticos en la mayor cantidad de ensayos biológicos posibles, elegidos aleatoriamente. Con este procedimiento, se consiguen identificar nuevas "cabezas de serie", o moléculas prototipo pertenecientes a una clase estructural determinada y con potencial para utilizarse en una indicación terapéutica concreta. Las modificaciones químicas subsiguientes tienden a producir "análogos" de esas estructuras buscando con ello una mayor actividad o una menor incidencia de efectos colaterales. Este método de descubrimiento de nuevos agentes con actividad biológica es interesante desde el punto de vista de que puede convertir a nuevas clases estructurales de compuestos en fármacos potenciales pero, al estar basado fundamentalmente en técnicas de ensayo y error, consume mucho tiempo y requiere grandes recursos económicos. Se ha estimado que el porcentaje de éxito es inferior a 1 por cada 10.000 compuestos.¹⁴

Los primeros intentos dirigidos a incrementar la probabilidad de sintetizar un análogo activo o de encontrar una nueva cabeza de serie se basaron en encontrar correlaciones entre la estructura química de una serie, de compuestos y su

actividad biológica. A este tipo de análisis se le conoce por sus siglas en inglés como estudios QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships). Los métodos que relacionan la estructura química con la actividad biológica pueden dividirse en dos grandes categorías:¹⁴ métodos topológicos/estadísticos y métodos de modelado molecular. En la aproximación topológica sólo se tiene en cuenta la estructura química "plana" de la molécula y se utilizan técnicas estadísticas (Análisis Linear Discriminante o Técnicas de Clasificación) o de reconocimiento de patrones para encontrar las ecuaciones QSAR. En los métodos de modelado, se consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones.^{15,16}

La topología molecular a través de las relaciones QSAR, es una herramienta útil para el desarrollo de nuevas moléculas. El método de conectividad molecular fue iniciado por Randić¹⁷ y desarrollado más tarde por Kier y Hall¹⁸ a partir del cual es posible identificar diferentes niveles estructurales de una molécula a través de valores numéricos conocidos como índices de conectividad o topológicos. De esta manera, cada molécula se asimila a un grafo en donde cada vértice representa un átomo y cada eje las conexiones existentes entre ellos.

A partir del grafo, se construye la matriz topológica cuyos elementos adquieren valores nulos o no en función de las conexiones existentes entre dichos elementos del grafo. El tratamiento posterior de la matriz topológica conduce a los índices de conectividad que caracterizan a ese grafo de una manera rápida y sencilla. Estos descriptores moleculares se han utilizado con éxito en la búsqueda de modelos topológico-matemáticos para la selección y diseño de nuevos compuestos activos en diferentes áreas terapéuticas y en particular en el de antiparasitarios.¹⁹

El diseño y desarrollo de nuevos fármacos con ecuaciones QSAR, están apoyados por paquetes computacionales, los cuales se conocen como estudios *in silico*, y son técnicas que tienen el potencial de mejorar significativamente el descubrimiento y desarrollo de fármacos, según la BCG (Boston Consulting Group), estas ahorran un promedio de 130 millones de USD y 0.8 años por cada

fármaco.²⁰ Algunos de los fármacos desarrollados por métodos *in silico* que ya están en el mercado son:^{21, 22}

- Sal de potasio de losartan (Antipertensión)
- Clorhidrato de dorzolamida (glaucoma)
- Mesilato de nelfinavir (SIDA)
- Zolmitriptan (migraña)
- Sulfato de indinavir (SIDA)
- Captopril (Antipertensión)
- Norfloxacin (antibacteriano)

2.6 TOMOCOMD-CARDD (TOpological MOlecular COMputer Design-Computer-Aided Rational Drug Design).³

Este software emplea varias familias de descriptores moleculares implementados en el programa, además de las bases químico-matemáticas, basado en átomos o enlaces, estocásticos y no estocásticos, índices bilineales y cuadráticos totales o locales. Este software ha permitido el descubrimiento *in silico* de varios compuestos activos contra diversas enfermedades de gran impacto social. Así por ejemplo, los modelos de relaciones cuantitativas estructura-actividad (conocidos por su siglas en inglés, QSAR) desarrollados con este paquete computacional, han posibilitado el descubrimiento de nuevos compuestos efectivos contra la malaria,²³⁻²⁵ la tricomonosis,^{26,27} la enfermedad de Chagas,^{28,29} la helmintiasis,^{30,31} y metalogénesis (inhibidores de tirosina).³²

En un estudio realizado por Montero y col en 2005,²⁸ se buscaron nuevos fármacos antitripanosomíacos, utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas (enfermedad parasitaria tropical), se realizó un análisis de clasificación y se seleccionaron cinco compuestos (**Figura 3**), se evaluó su actividad *in vitro* en

una cepa de *trypanosoma cruzi*, los compuestos mostraron una actividad antitripanosomíásica mayor al 70 %, los compuestos, 1s y 4s, mostraron actividad desde concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, específicamente el compuesto 4s, mostro porcentajes de inhibición superiores al 80% a 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo se requiere llevar a cabo más estudios para determinar el mecanismo de acción de estos compuestos y evaluar su toxicidad a las concentraciones ensayadas.

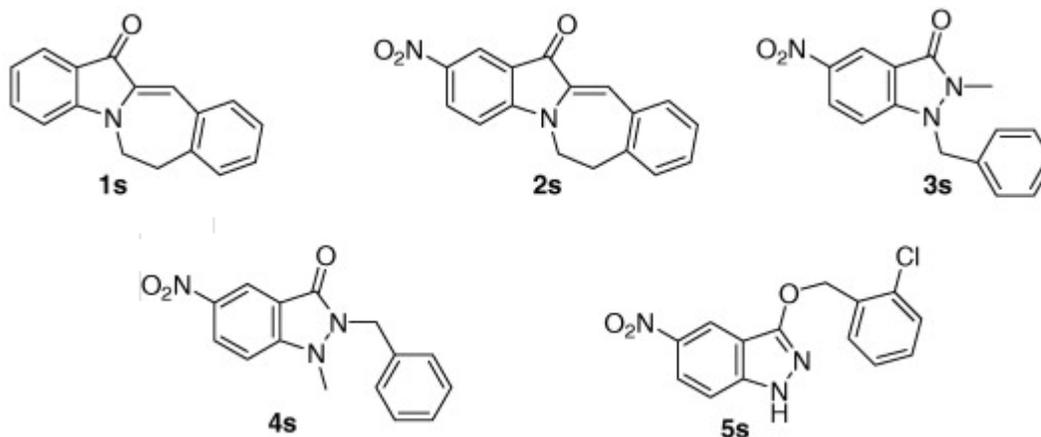


Figura 3. Compuestos seleccionados con TOMOCOMD-CARDD, con actividad antitripanosomiasis.

Otro ejemplo, donde se han obtenido resultados favorables, es en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de la tricomoniasis (enfermedad de transmisión sexual ocasionada por el protozooario *Trichomonas vaginalis*). Meneses y col en 2005, realizaron un estudio QSAR, utilizando un análisis de discriminación lineal (ADL), la prueba mostró un grado de confiabilidad mayor al 88.24%, evaluando la actividad antiprotozoaria, los compuestos seleccionados en este estudio (**Figura 4**), mostraron en general actividad contra *Trichomonas vaginalis*, utilizando concentraciones del 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, los compuestos VA7-67(92%) y VA7-69 (93%) presentaron actividad con concentraciones 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos resultados abren una puerta para estudiar estas moléculas contra otros protozoarios, así como evaluar su toxicidad y determinar sus mecanismos de acción.

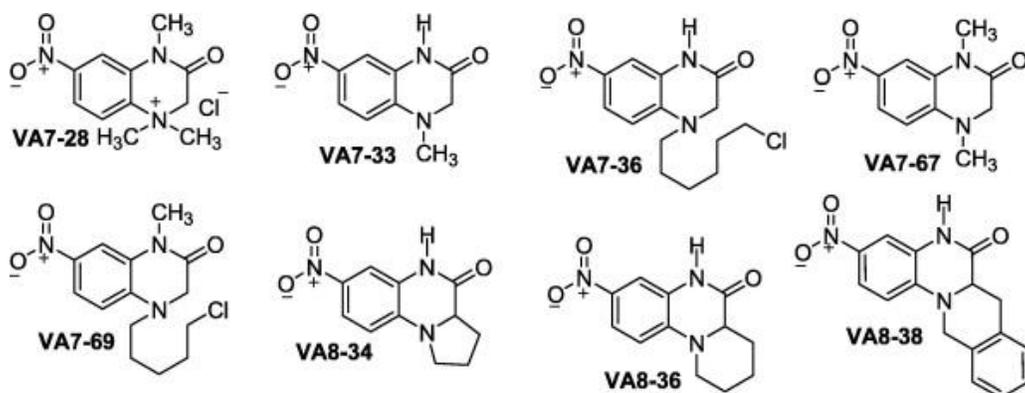


Figura 4. Compuestos seleccionados con TOMOCOMD, con actividad contra *Trichomonas vaginalis*

En este paquete computacional, se ha implementado el cálculo de varias familias de descriptores moleculares, basados en representaciones vectoriales y matriciales de la estructura molecular.²³⁻³² El programa está compuesto por cuatro sub-programas, cada uno de ellos con un módulo de dibujo y otro de cálculo, los sub-programas son:

- ❖ **CARDD** (Computed-Aided „Rational“ Drug Design)
- ❖ **CAMPS** (Computed-Aided Modeling in Protein Science)
- ❖ **CANAR** (Computed-Aided Nucleic Acid Research)
- ❖ **CABPD** (Computed-Aided Bio-Polymers Docking).

Este software ha sido desarrollado basándose en una interfaz amigable para el usuario, el cual no tiene que dominar *a priori* ningún conocimiento de programación computacional.

2.7 Análisis Quimiométrico de los Datos

Para realizar estudios QSAR, existen diferentes análisis discriminantes como: Análisis de Regresión Lineal Múltiple (RLM), Análisis Discriminante Lineal, (ADL), o técnicas de clasificación (basados en algoritmos de clasificación) como: Árboles o mapas funcionales (Functional Trees, FT), Árbol de modelo logístico (Logistic Model Trees, LMT), Regresión Logística Lineal, Perceptrón multicapa (Multilayer perceptrons, MLP), Máquinas de soporte vectores (Support Vector Machines,

SVM) y Optimización mínima secuencial (Sequential Minimal Optimisation, SMO).³³⁻³⁶

El software Waikato Environment for Knowledge Analysis (WEKA), calcula diferentes algoritmos de clasificación,³ entre los que se encuentran, los árboles de funcionales y la regresión logística lineal, estos son considerados los métodos más populares de clasificación, cada uno con sus ventajas y desventajas.

El algoritmo árbol de modelo logístico (LMT),³⁴ combina modelos de regresión logística con árboles de inducción, por lo que es un modelo análogo de árboles para problemas de clasificación. Un modelo logístico de árbol consiste básicamente en una estructura de árbol de decisión estándar con funciones de regresión logística en las hojas.³⁴

Optimización mínima secuencial (SMO), es un método rápido para entrenamiento de máquinas de soporte vectores (SVMs). El entrenamiento de una SVM requiere la solución a un gran problema de programación cuadrática (QP). SMO fracciona este gran problema en una serie de problemas más pequeños de QP. Estos problemas más pequeños son resueltos de forma analítica, lo cual reduce significativamente el tiempo del ciclo interno de procesamiento. La cantidad de memoria requerida para SMO es lineal en el tamaño del conjunto de entrenamiento, lo cual permite entrenar con grandes conjuntos de datos.³⁵⁻³⁶

Perceptrón multicapa (MLP), está basada en Redes de Neuronas Artificiales, apoyadas en algoritmos de clasificación. Es una de las arquitecturas más utilizadas para resolver problemas reales, y evalúa un conjunto de datos de entradas que permite obtener valores reales o vectores con valores reales. Todas las neuronas se relacionan con todas las neuronas, incluyendo las neuronas de la capa oculta.³⁶

En la mayoría de los estudios *in silico* se realizan análisis comparativos, utilizando más de tres técnicas estadísticas para garantizar la mayor aproximación de clasificación, entre los modelos utilizados. Sin embargo, el análisis más utilizado es el Análisis Discriminante Lineal.

En todas las pruebas de clasificación requieren ser probadas, a lo que se conoce como pruebas de entrenamiento, esto se realiza con la finalidad de evaluar la capacidad de predicción de dichos análisis.

3 Justificación

Al emplear inadecuadamente compuestos ixodicidas para controlar y/o erradicar a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se ha generado resistencia a la mayoría de los ixodicidas que se encuentran en el mercado. Esto hace necesario diseñar nuevos compuestos con propiedades ixodicidas, siendo los ensayos *in silico* una nueva alternativa para el diseño y selección de nuevos compuestos con actividad ixodicida.

Empleando el software TOMOCOMD-CARDD y WEKA, se han llevado a cabo diversos estudios *in silico*, permitiendo el descubrimiento de compuestos activos contra enfermedades de gran impacto social. Los resultados alcanzados con estos software se usaran para llevar a cabo la selección *in silico* de nuevos compuestos ixodicidas.

4 Hipótesis

Al llevar a cabo el estudio *in silico*, empleando el software TOMOMD-CARDD y WEKA, se encontrarán nuevos compuestos con actividad ixodicida.

5 Objetivo General

Desarrollar un sistema de cribado computacional capaz de seleccionar nuevos compuestos con actividad ixodicida.

5.1 Objetivos Específicos

1. Calcular los descriptores moleculares implementados en el programa TOMOCOMD-CARDD, para desarrollar y validar los modelos predictivos que permitan el descubrimiento de nuevos fármacos de forma racional.
2. Sintetizar y caracterizar espectroscópicamente los nuevos candidatos a fármacos.
3. Realizar el escrutinio *in vitro* de la eficacia ixodicida de los compuestos seleccionados por el programa TOMOCOMD-CARDD.
4. Conocer la eficacia del mejor fármaco seleccionado a través de la determinación de la Concentración Letal 50 (CL₅₀), contra una cepa susceptible de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ya adaptada en el laboratorio.

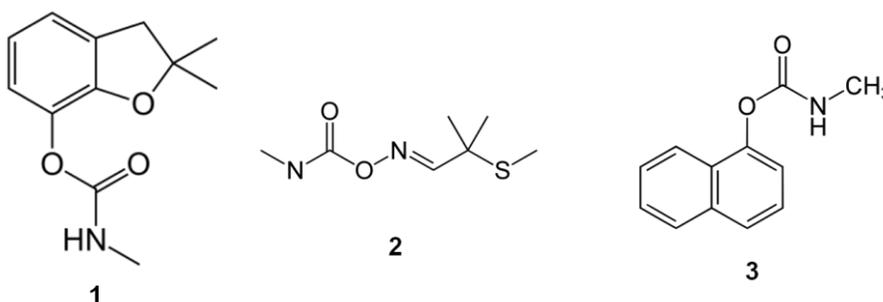
6 Material y Métodos

6.1 Desarrollo de bases de datos

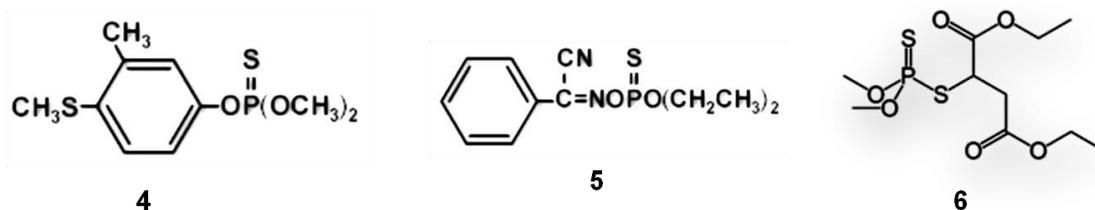
Se realizó la conformación de tres bases de datos: Moléculas activas, moléculas inactivas y análogos de moléculas activas.

Moléculas activas: Se realizó una búsqueda de moléculas con reportes fieles de su actividad ixodocida. Para la elaboración de esta primera base se efectuó una búsqueda de todos los ixodocidas comerciales, así como de aquellos que se encuentran reportados con esta actividad, evaluados *in vitro* o *in vivo*, considerando su estructura química bidimensional, número CAS y la familia química a la que pertenecen. Ejemplo de ello son las siguientes estructuras químicas como cabeza de serie para nuevos compuestos.

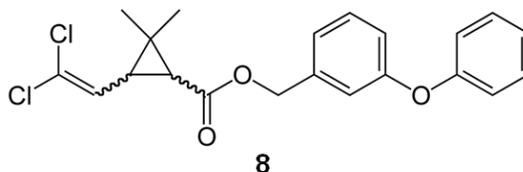
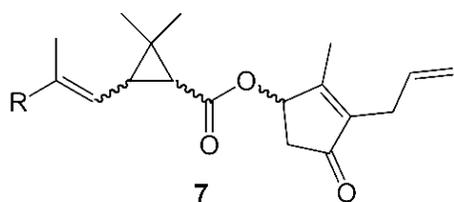
Carbamatos: Carbofurán (1; **CAS 1563-66-2**), Aldicarb (2, **CAS 116-06-3**), Carbaril (3, **CAS 63-25-2**), entre otros.



Organofosforados: Fentión (4, **CAS 55-38-9**), Foxim (5, **CAS 14816-18-3**), Malatión (6, **121-75-5**), entre otros.



Pierietrinas y Piretroides: Aletrina (7, CAS 584-79-2), Permetrina (8, CAS 52645-53-1), entre otros.



Moléculas inactivas: Se realizó una búsqueda de sin actividad ixodida, para probar la selectividad de las técnicas de clasificación, seleccionando compuestos que no presentaran ningún reporte de actividad ixodida u otra actividad antiparasitaria.

Análogos de moléculas activas: Se realizó una búsqueda de todos los compuestos relacionados con las estructuras químicas de los compuestos activos, considerando una similitud estructural mayor al 80 %.

6.2. Representación grafica en 2D de las moléculas y análisis y procesamiento quimiométrico

Se realizó la representación gráfica bidimensional en la interface del software de TOMOCOMD-CARDD, de las estructuras moleculares de las tres bases de datos, posteriormente se llevó a cabo el cálculo de descriptores moleculares bilineales estocásticos basados en átomo (polarizabilidad atómica, electronegatividad atómica de Mulliken, masa atómica, radio atómico de Van der Waals, electronegatividad atómica de Pauling).

Se empleo el software WEKA, para llevar a cabo el y procesamiento quimiométrico de los datos empleando cinco técnicas de clasificación: Perceptrón multicapa (MLP), Optimización mínima secuencial (SMO), Regresión Logística Lineal, Árbol funcional (FT) y Árbol de modelo logístico (LMT), evaluando su capacidad de clasificación con pruebas de entrenamiento, empleando para ello las bases de moléculas activas e inactivas. Posteriormente se llevó a cabo el cribado virtual de la base de los análogos de las moléculas activas.

6.3. Selección, síntesis y caracterización de moléculas seleccionadas

Se seleccionaron análogos que fueron clasificados por las 5 técnicas empleadas, considerando los siguientes criterios:

1. No tener reportes en donde *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* haya creado resistencia a la molécula activa. Ejemplo: Fipronil, Diazinón, Cipermentrina, Flumentrina, Deltametrina.
2. No considerar análogos cuya molécula activa tenga reportes de ser tóxica. Ejemplo: Lindano, DDT y Deltametrina.
3. Disponibilidad de las materias primas.

Se realizó una revisión bibliográfica de las técnicas de síntesis más adecuadas para cada compuesto. Se caracterizaron empleando espectrofotómetros de infrarrojo Perkin-Elmer, Spectrum BX, FT-IR System y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Varian 400 MHz).

6.4 Bioensayos *in vitro*

6.4.1 Obtención de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus*

Se recolectarán garrapatas adultas de bovinos previamente infectados con una cepa susceptible de *R. (B.) microplus*, las cuales fueron proporcionadas por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), ubicado en Jiutepec, Morelos, México; estas se incubaron durante un período de dos semanas a 28°C y 80 % humedad relativa (H.R.); los huevos se recolectaron en viales y se incubaron en las mismas condiciones. Después de 14 días las larvas eclosionadas serán adecuadas para el bioensayo.¹³

6.4.2 Prueba de Paquete Larvario (PPL)^{2,37}

Se preparó una solución estándar con 84.2 mg del compuesto a evaluar disolviendo este en 25 mL de una disolución 2:1 de tricloroetileno: aceite de oliva extra virgen. Se prepararon diluciones al 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.065 % de la

solución estándar, empleando como disolvente una disolución 2:1 de tricloro etileno: aceite de oliva extra virgen. Se aplicaron 670 µL de cada concentración en un papel filtro (Whatman No 1, 10 x 12 cm). Después de aplicar cada solución, se dejó secando el papel por un tiempo de 30 min a temperatura ambiente. Con los papeles impregnados, se prepararon sobres donde se colocaron 100 larvas de *R. (B) microplus* aproximadamente, los paquetes larvarios se incubaron por 24 horas a 28°C y 80 % de H.R. De cada dilución se realizaron seis repeticiones y se incluyó un control negativo en cada experimento.³⁷

Posterior a la incubación, se estimó el porcentaje de mortalidad con la cuantificación de las larvas, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y un contador manual de laboratorio. El porcentaje de mortalidad fue corregido de acuerdo a la fórmula aplicada por Abbot (1925).¹³

Ecuación 1. Formula de Abbot (1925)

$$\text{Mortalidad} = \frac{\% \text{ Mortalidad tratada} - \% \text{ Mortalidad control}}{100 - \% \text{ Mortalidad control}} \times 100$$

6.4.3 Prueba de inmersión de larvas (PIL)^{2,38}

Se realizó una adaptación de la técnica de Shaw (1966), se preparó una solución estándar con 10 mg del compuesto a evaluar disolviendo este en 50 mL de una disolución 1:10, etanol: agua. A partir de la solución estándar se prepararon diluciones de 100, 50, 25, 10 y 5 ppm, empleando como disolvente agua. Se impregnan papeles filtros (Whatman No 1, 10 x 12 cm), con 5 mL de cada dilución, se dejan 5 minutos y se retira el exceso de solución con papel adsorbente. Con los papeles impregnados, se prepararon sobres donde se colocaron 100 larvas de *R. (Boophilus) microplus*, con ayuda de un pincel, posteriormente fueron incubados los paquetes larvarios por 24 horas a 28°C y 80 % de humedad relativa. De cada dilución se realizaron seis repeticiones y se incluyó un control negativo en cada experimento.³⁷ Posterior a la incubación, se estimó el porcentaje de mortalidad con la cuantificación de las larvas, con la ayuda

de un microscopio estereoscópico y un contador manual de laboratorio. El porcentaje de mortalidad fue corregido de acuerdo a la fórmula aplicada por Abbot (1925).¹³

6.4.4 Prueba de inmersión de adultas, PIA

Esta prueba es una adaptación de la técnica descrita por Drummond (1973).³⁷⁻⁴²

Se prepararon diluciones de 250, 200, 150, 100 y 50 ppm, usando 1 mL de DMSO (sulfóxido de dimetilo) como co-disolvente, posteriormente se llevó a un volumen de 25 mL con agua destilada.

En cada dilución se sumergieron grupos de 10 hembras repletas (previamente pesadas) durante 30 min. Las garrapatas fueron recuperadas de las soluciones, se secaron y se pegaron con la superficie dorsal hacia abajo, empleando cinta de doble cara, dejándolas en cajas Petri de plástico (5,5 cm de diámetro, 1,5 cm de alto) para su incubación a 28°C, 80% de HR para completar el ciclo de vida. Al concluir el periodo de oviposición (14 días aproximadamente). Se recolectaron y pesaron los huevos en viales de vidrio tapados con algodón, estos se incubaron bajo las mismas condiciones que las garrapatas adultas, la tasa de eclosión se leyó después de 14 días.

Con los datos obtenidos, se calcularon los porcentajes de: Reducción de oviposición (% RO, **Ecuación 2**), Tasa de eclosión (% T, **Ecuación 3**), Tasa de producción de huevos (TPH, **Ecuación 4**), Eficacia del tratamiento (E, **Ecuación 5**).⁴¹

Ecuación 2. Porcentaje de Reducción de Oviposición

$$\%RO = \frac{\text{Peso de huevos del control (g)} - \text{Peso de huevos de grupo tratado (g)}}{\text{Peso de huevos del control (g)}} \times 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de Tasa de Eclosión

$$\%TE = \frac{\text{Tasa de eclosión del control} - \text{Tasa de eclosión de grupo tratado (g)}}{\text{Tasa de eclosión del control}} \times 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de Tasa de Producción de Huevos

$$\%TPH = \frac{\text{Peso de huevos(g)}}{\text{Peso hembras repletas (g)}} \times 100$$

Ecuación 5. Porcentaje de Eficacia del Tratamiento

$$\%E = \frac{\text{TPH control} - \text{TPH del tratado}}{\text{TPH del tratado}} \times 100$$

6.5 Análisis estadístico

Todos los bioensayos *in vitro* (PPL, PIL y PIA), se realizaron por sextuplicado, para determinar las desviaciones estándar de los % de mortalidad, %RO, %TE, %TPH y % E. También se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar si hay una diferencia significativa entre los compuestos evaluados, también se calculó la Concentración Letal 50 (CL₅₀), mediante una regresión Probit.

7. Resultados

En este trabajo, TOMOCOMD-CARDD se empleó para buscar compuestos con actividad ixodida, se llevó a cabo la representación gráfica en 2D de todas las moléculas de las bases de datos (83 moléculas activas, 150 moléculas inactivas y 754 análogos de moléculas activas), se calcularon descriptores moleculares bilineales estocásticos basados en átomo (polarizabilidad atómica, electronegatividad atómica de Mulliken, masa atómica, radio atómico de Van der Waals, electronegatividad atómica de Pauling), con estos datos, se llevó a cabo el análisis y procesamiento quimiométrico de los datos empleando el software de WEKA para llevar a cabo las técnicas de clasificación MLP, SMO, Regresión Logística, FT y LMT. Todas las técnicas se evaluaron mediante pruebas de entrenamiento con promedios del 98 al 100% de clasificación en cada técnica,

El estudio *in silico* arrojó 621 moléculas candidatas para ser estudiadas de las 754 moléculas analizadas. Solo se seleccionaron los análogos que fueron clasificados por las 5 técnicas empleadas, considerando los criterios mencionados en el punto 6.3 (página 18). Después de hacer la revisión de las moléculas, se seleccionaron análogos del carvacrol (acetato de carvacrol y éter metílico de carvacrol) y análogos del ácido salicílico (ácido 2,5-dihidroxibenzoico, 2,5-dihidroxibenzoato de metilo, 2,5-dihidroxibenzoato de etilo, 2-(α,α' -dimetoximetil)fenol, 2-metoxibenzoato de etilo y el alcohol 2-hidroxibencílico), también se consideraron análogos de isómeros del ácido salicílico, como el 4-hidroxibenzoato de metilo y 4-hidroxibenzoato de *n*-propilo.

Carvacrol y análogos

El carvacrol es un monoterpeno extraído del aceite esencial del *Origanum vulgare*, cuyas propiedades bactericidas,⁴³⁻⁴⁵ anticancerígenas^{46,47} y como aditivo alimentario,⁴⁸ han sido estudiadas ampliamente. Coskun y col en 2008,⁴⁹ evaluaron su actividad acaricida con larvas de *Rhipicephalus turanicus*, utilizando carvacrol al 100% a las 6 h mostró una mortalidad del 100%. Sin embargo, no se encontró reporte de que este se haya probado en *R (B) microplus*. Los ésteres y

éteres de este monoterpreno, también han sido estudiados por su actividad pesticida contra diferentes nemátodos y hongos, entre estos están el éter metílico de carvacrol y el acetato de carvacrol (**Figura 5**).⁵⁰

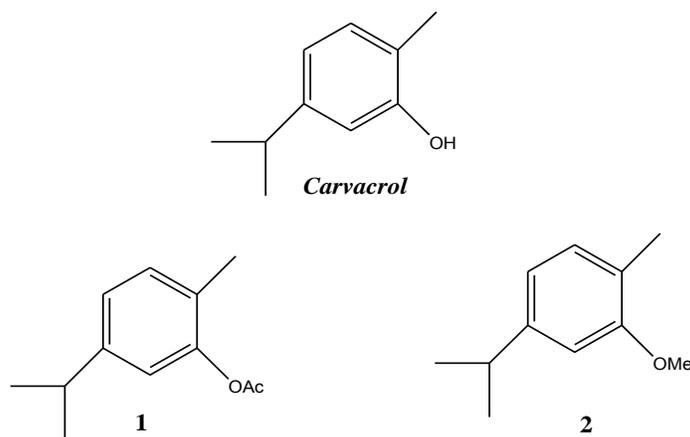


Figura 5. Análogos de carvacrol: acetato de carvacrol (1) y éter metílico de carvacrol (2).

Ácido Salicílico y análogos

El ácido salicílico, es un β -hidroxi ácido, empleado como analgésico, antipirético y antiinflamatorio no esteroideo (AINEs);⁵¹ también se ha estudiado su participación en la resistencia a patógenos en plantas,⁵² Silveira y col en 2007,⁵³ evaluaron su actividad acaricida en *Boophilus microplus*, donde su porcentaje de mortalidad fue casi nula, y empleando una concentración del 0.5% se obtuvo una mortalidad del $1.08 \pm 1.55\%$. Los derivados del ácido salicílico son de gran interés en la síntesis de fármacos,⁵⁴ así como algunos alquil ésteres de ácidos fenólicos han sido estudiados ampliamente ya que han presentado actividades biológicas como antioxidantes, antimicrobianas⁵⁵ y antibacteriales.⁵⁶ Los análogos seleccionados para ser sintetizados y evaluados *in vitro* son: el ácido 2,5-dihidroxibenzoico, 2,5-dihidroxibenzoato de metilo, 2,5-dihidroxibenzoato de etilo, 2-(α,α' -dimetoximetil)fenol, 2-metoxibenzoato de etilo y el alcohol 2-hidroxibencilico (**Figura 6**). También se consideraron análogos los isómeros del ácido salicílico, como el 4-hidroxibenzoato de metilo y 4-hidroxibenzoato de *n*-propilo (**Figura 7**).

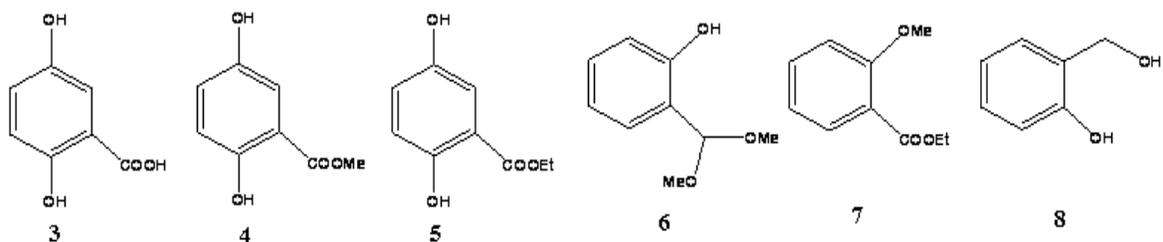


Figura 6. Análogos del ácido salicílico: ácido 2,5-dihidroxi benzoico (3), 2,5-dihidroxi benzoato de metilo (4), 2,5-dihidroxi benzoato de etilo (5), 2-(α,α' -dimetoximetil)fenol (6), 2-metoxibenzoato de etilo (7) y alcohol 2-hidroxi benzoico (8).

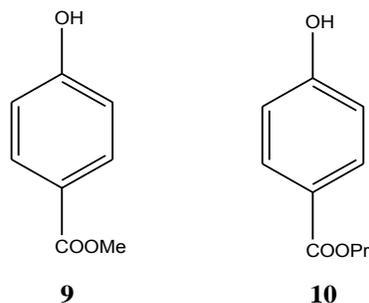


Figura 7. Análogos del isómero del ácido salicílico: 4-hidroxi benzoato de metilo (9) y 4-hidroxi benzoato de *n*-propilo (10).

Síntesis y caracterización de compuestos seleccionados

El carvacrol (Sigma-Aldrich) y ácido salicílico (J.T. Baker) fueron adquiridos comercialmente. El alcohol 2-hidroxi benzoico (8), fue proporcionado por el Dr. Héctor Salgado Zamora obtenido por una técnica *novo* de reducción. El análogo ácido 2, 5-dihidroxi benzoico (3), así como los isómeros del ácido salicílico: propil-*p*-hidroxi benzoato de metilo (9) y metil-*p*-hidroxi benzoato de propilo (10) se adquirieron comercialmente de Sigma-Aldrich.

Los análogos acetato de carvacrol (1), éter metílico de carvacrol (2), 2,5-dihidroxi benzoato de metilo (4), 2,5-dihidroxi benzoato de etilo (5), 2-(α,α' -

dimetoximetil) fenol (**6**), 2-metoxibenzoato de metilo (**7**), se prepararon como se describe en la literatura.⁵⁷⁻⁶¹ Todos los compuestos fueron purificados por columna cromatografía y posteriormente se caracterizaron por IR (Espectrofotómetro de infrarrojo Perkin-Elmer, Spectrum BX, FT-IR System) y RMN (Resonancia Magnética Nuclear, Varian 400 MHz).

Acetato de carvacrol (1): Se sintetizó bajo las condiciones reportadas por Briard y col. en 2008.⁵⁷ El compuesto fue aislado como un líquido ámbar con un rendimiento del 79.86%; IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2959, 2928, 2866, 1761 (C=O), 1621, 1576, 1506, 1457. El espectro de ¹HNMR, corresponde a lo reportado por Ben Arfa y col. en 2006.⁵⁷

Éter metílico de Carvacrol (2): Se sintetizó bajo las condiciones reportadas por Pilyugin y col en 2004.⁵⁸ Se obtuvo un líquido amarillo con un rendimiento del 83.17%; IR (CHCl₃, cm⁻¹): 2955, 2924, 2867, 1610, 1583, 1511, 1462. El espectro ¹HNMR concuerda con lo reportado por Ben Arfa y col en 2006.⁵⁷

2,5-dihidroxibenzoato de metilo (4): Se sintetizó bajo las condiciones reportadas por Yan y col. en 2010.⁶⁰ Se obtuvo un sólido blanco con un p.f de 85-87°C y un rendimiento del 85.12%; IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3350 (-OH), 2950, 2919, 1678 (C=O), 1618, 1484, 1438. ¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz), δ 3.9 (s, 3H, -CH₃), 6.9-7.3 (m, 3H, Ar-H), 10.3 (s, 2H, -OH); ¹³CNMR (CDCl₃, 75 MHz), δ 170.2, 155.7, 147.7, 124.1, 118.5, 114.7, 112.1, 52.4.

2,5-dihidroxibenzoato de etilo (5): Se sintetizó bajo las condiciones reportadas por Yan y col. en 2010.⁶⁰ Se obtuvo un líquido ámbar con un rendimiento del 41.52 %. IR (CHCl₃, cm⁻¹): 3350 (-OH), 2950, 2919, 1678 (C=O), 1618, 1484, 1438. ¹HNMR (CDCl₃, 400 MHz), δ 1.4 (t, 3H, -CH₃), 4.4 (q, 2H, -CH₂-), 6.9-7.3 (m, 3H, Ar-H), 10.2 (s, 2H, -OH); ¹³CNMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 169.8, 155.8, 147.7, 123.9, 118.4, 114.7, 112.4, 61.5, 14.1.

2-(α , α' -dimetoximetil) fenol (6): Para la obtención de este análogo, se sintetizó a partir del 2-hidroxibenzaldehído. Primero se llevo a cabo la síntesis del intermediario **2-acetoxibenzaldehído**, esta se realizó de acuerdo a lo reportado por Briard y col. en 2008.⁵⁷ De este se obtuvo un líquido ámbar con un rendimiento del 90%; IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3060, 2857, 2857, 1752 (C=O), 1691, 1635, 1601, 1578. El espectro de $^1\text{HNMR}$ es similar al reportado por Liable y col. en 2001.⁶¹ Después se sintetizó el **2-(α,α' -dimetoximetil)fenol (6)**, bajo las condiciones reportadas por Liable y col. en 2001.⁶¹ Se obtuvo un líquido ámbar con un rendimiento del 88.56%. IR (CHCl_3 , cm^{-1}): 3350, 3052, 2938, 2835, 2351, 2049, 1926, 1803, 1657, 1641, 1619, 1578. El espectro $^1\text{HNMR}$, es similar a lo reportado por Liable y col. en 2001.⁶¹ se obtuvo un rendimiento global de reacción de 79.70%.

2-metoxibenzoato de metilo (7): Se sintetizó bajo las condiciones reportadas por Yan y col. en 2010.⁶⁰ Se obtuvo un aceite amarillo con un rendimiento del 59.15 %, los espectros obtenidos de IR y $^1\text{HNMR}$ muestran señales similares a lo reportado por Sher y col en 2007.⁵⁴

Cabe mencionar que no se busco la optimización de ninguna de las técnicas empleadas, sin embargo, los porcentajes obtenidos fueron de productos purificados, para poder llevar a cabo los bioensayos.

Evaluación de la actividad acaricida *in vitro* en larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Como ya se mencionó, existen dos técnicas de evaluación *in vitro* en etapa larvaria, la prueba de paquete larvario (PPL, compuestos liposolubles) y la prueba de inmersión de larvas (PIL, compuestos hidrosolubles), el tipo de prueba dependió de la solubilidad del compuesto a evaluar. Todos los compuestos se evaluaron por sextuplicado, para el cálculo de su desviación estándar, así como llevara cabo el análisis estadístico correspondiente.

Los compuestos evaluados por PPL fueron: acetato de carvacrol (**1**), éter metílico de carvacrol (**2**), 2,5-dihidroxibenzoato de metilo (**4**), 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (**5**), 2-(α , α' -dimetoximetil) fenol (**6**), 2-metoxibenzoato de metilo (**7**), también se evaluó la actividad del carvacrol por esta técnica (**Cuadro 2**). Los compuestos evaluados por PIL fueron: ácido 2, 5-dihidroxibenzoico (**3**), alcohol 2-hidroxibencílico (**8**), propil-*p*-hidroxibenzoato de metilo (**9**) y metil-*p*-hidroxibenzoato de propilo (**10**), también se evaluó la actividad del ácido salicílico en esta cepa, ya que los resultados reportados por Silveira y col. en 2007, fueron en garrapatas *R (B) microplus* de una granja de la localidad de Coronel Pacheco en el Estado de Minas Gerais en Brasil (**Cuadro 3**).

Todos los compuestos evaluados presentaron actividad ixodocida en *R. (B.) microplus*, siendo los análogos alcohol 2-hidroxibencílico (15.96 ± 2.98 , **8**), 2-(α , α' -dimetoximetil) fenol (26.29 ± 2.46 , **6**), ácido 2, 5-dihidroxibenzoico (27.62 ± 5.42 , **3**), metil-*p*-hidroxibenzoato de propilo (34.14 ± 4.33 , **10**), 2,5-dihidroxibenzoato de metilo (46.49 ± 0.78 , **4**), los análogos que presentaron % de mortalidad menores del 50%. Los compuestos que presentaron mayor % de mortalidad fueron, el acetato de carvacrol (67.83 ± 2.07 , **1**), éter metílico de carvacrol (71.69 ± 1.57 , **2**), 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (89.14 ± 1.61 , **5**), 2-metoxibenzoato de metilo (91.92 ± 1.66 , **7**) y propil-*p*-hidroxibenzoato de metilo (79.31 ± 7.52 , **9**), el ácido salicílico (92.62 ± 6.17 , **Cuadro 3**) y carvacrol (35.85 ± 3.18 , **Cuadro 2**), también fueron evaluados en esta cepa.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), y se encontró una diferencia significativa entre los compuestos **1** y **2** con respecto a la actividad del carvacrol, sus análogos fueron más activos que este, los compuestos **5** y **7**, no presentaron una diferencia contra el ácido salicílico, sin embargo los resultados que se obtuvieron en la cepa proporcionada por el CENAPA, no son similares a lo reportado por Silveira y col. en 2007, en esta cepa el ácido salicílico, fue casi inactivo, esto tal vez puede ser, porque la cepa de la localidad de Coronel Pacheco en el Estado de Minas Gerais en Brasil, sea una cepa resistente.

Los compuestos **1**, **2**, **5**, **7** y **9** no presentaron diferencia significativa entre sus actividades; sin embargo, comparada con los compuestos **8**, **6**, **3**, **10** y **4** si hay diferencia entre sus % de mortalidad. Para determinar su concentración letal 50 (CL₅₀), se llevó a cabo la conversión de las concentraciones porcentuales a micromoles sobre mililitro (μM/mL), y esta se calculó mediante una regresión Probit (**Cuadro 4**).

Los compuestos que presentaron una CL₅₀ menor a 10 μM/mL, se consideraron para ser evaluados en garrapata adulta (PIA), ya que de acuerdo a la literatura estos compuestos pueden ser considerados en estudios *in vivo*, en este caso el acetato de carvacrol (5.10 μM/mL, **1**), éter metílico de carvacrol (6.00 μM/mL, **2**), 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (2.04 μM/mL, **5**) y el 2-metoxibenzoato de metilo (0.91 μM/mL, **7**), siendo este último el más potente.

El carvacrol tiene una CL₅₀ de 59.72 μM/mL, comparado con las CL₅₀ de sus análogos, estos resultaron más activos y potentes, realizando un análisis estructural, ambos tienen protegido el grupo hidroxilo, el compuesto **1** con un grupo acetil (-OAc) y el **2** con la formación de un éter metílico (-OMe). Entre estos, no hay diferencia significativa en su actividad. Estos grupos incrementan la polarizabilidad de la molécula, empleando el programa de ACDLabs se calculó el valor de polarizabilidad (α) de cada compuesto (**Cuadro 5**), la cual está ligada a la liposolubilidad de la molécula, lo que facilita su difusión a través de las membranas, el carvacrol tiene un valor de $18.68 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$, el compuesto **1** de $20.59 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$ y el **2** de $22.43 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$.

Comparando al ácido salicílico con sus análogos más activos, al ácido salicílico tiene un grupo de ácido carboxílico y un grupo hidroxilo (-OH) en orto, su polarizabilidad calculada fue de $13.90 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$. Sin embargo, no se logró calcular su CL₅₀, ya que a concentraciones menores 0.25%, no hubo mortalidad, por lo que los datos fueron insuficientes. El análogo **7** del ácido presenta los dos

grupos derivatizados, el ácido carboxílico a éster etílico y el grupo hidroxilo a un éter metílico. Con estas modificaciones estructurales se incremento su polarizabilidad a $19.55 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$ y fue el compuesto mas potente con la CL_{50} de $0.91 \mu\text{M/mL}$. El compuesto **5** presenta el ácido carboxílico derivatizado a éster etílico y dos grupos $-\text{OH}$ en posiciones **2** y **5**, el valor de polarizabilidad calculado fue de $18.40 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$ y su CL_{50} fue de $2.04 \mu\text{M/mL}$. Estos sustituyentes incrementaron su actividad con respecto a los demás compuestos que tenían grupos hidroxilos libres o derivatizados en éteres metílicos y los compuestos con grupos de ácidos carboxílicos libres o derivatizados en esteres metílicos, mostraron menos actividad ixodocida.

Sin embargo, se realizó una correlación de Pearson, entre la polarizabilidad y la actividad acaricida (CL_{50}), donde no se encontró una relación entre estas variables, es decir en este estudio la regla de 5 de Lipinski⁶² no se aplica en este aspecto.

Los compuestos más potentes fueron evaluados en garrapatas adultas (**PIA**), en este caso los compuestos acetato de carvacrol (**1**), éter metílico de carvacrol (**2**), 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (**5**), 2-metoxibenzoato de metilo (**7**), con los datos recopilados se calcularon los porcentajes de: Reducción de oviposición (% RO, **Ecuación 2**), Tasa de eclosión (% T, **Ecuación 3**), Tasa de producción de huevos (TPH, **Ecuación 4**), Eficacia del tratamiento (E, **Ecuación 5**), cabe mencionar que aunque el carvacrol⁶³ y ácido salicílico⁴⁹ ya han sido evaluadas sobre *R. (B.) microplus* en etapa larvaria. No hay informes de evaluación sobre la garrapata adulta de esta especie; por lo tanto, se evaluó su actividad acaricida en esta etapa del ciclo de vida de *R. (B.) microplus*.

Todos los compuestos presentaron un %RO (**Cuadro 6**), similar en cada una de las diluciones. Al realizar el ANOVA, no se encontró diferencia significativa entre los análogos, este comportamiento fue similar en los valores de %TE (**Cuadro 7**) y %E (**Cuadro 8**). Los % de RO, TE y E del ácido salicílico y carvacrol, fueron los mas bajos, en comparación con sus análogos. Al realizar el ANOVA

correspondiente se encontró que si hay una diferencia significativa entre la actividad de los análogos y éstos.

Todos los compuestos evaluados presentaron mayor actividad acaricida en la etapa de larva en comparación con la etapa adulta de *R. (B.) microplus*. El 2-metoxibenzoato de etilo (7) y 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (5), fueron los compuestos más potentes y por tanto los mejores candidatos para continuar su estudio *in vivo*.

Como parte de la difusión de esta investigación, se participó en 2 congresos internacionales, 5 congresos nacionales y 3 ponencias nacionales. Con la publicación de un artículo en *Experimental and Applied Acarology*, en Marzo del 2013: **In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on Rhipicephalus (Boophilus) microplus**, en el No 61 (2), pp 251-257, doi: 10.1007/s10493-013-9688-4, con factor de impacto de 1.85, **Anexo 1**.

También se envió un manuscrito, a la revista *Veterinary Parasitology* con factor de impacto de 2.611, **Assessment and determination of LC₅₀ of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of Rhipicephalus (Boophilus) microplus**, enviado el 30 de Mayo del 2014, con No Vetpar-D-14-8416, **Anexo 2**.

Cuadro 2. Porcentaje de Mortalidad larvaria de compuestos evaluados por PPL

Conc. (%)	Carvacrol	Acetato de carvacrol	Éter metílico de carvacrol	2,5-dihidroxibenzoato de metilo	2,5-dihidroxibenzoato de etilo	2-(α , α' -dimetoximetil)fenol	2-metoxibenzoato de etilo
	(1)	(2)	(4)	(5)	(6)	(7)	(7)
1	35.85 \pm 3.18	67.83 \pm 2.07	71.69 \pm 01.57	46.49 \pm 0.78	89.14 \pm 1.61	26.29 \pm 2.46	91.82 \pm 1.66
0.5	31.55 \pm 3.30	46.77 \pm 16.65	59.41 \pm 01.64	43.90 \pm 0.61	73.94 \pm 4.82	21.92 \pm 2.66	80.67 \pm 0.46
0.25	27.75 \pm 3.95	45.42 \pm 00.26	57.06 \pm 18.82	38.46 \pm 0.59	66.3 \pm 1.63	16.38 \pm 1.40	83.81 \pm 1.59
0.125	20.20 \pm 3.13	46.38 \pm 00.32	31.20 \pm 02.61	25.46 \pm 3.48	44.69 \pm 0.36	13.12 \pm 1.03	73.37 \pm 3.65
0.0625	14.52 \pm 3.28	36.48 \pm 01.90	17.56 \pm 03.18	21.61 \pm 5.09	44.94 \pm 1.13	10.02 \pm 0.13	46.98 \pm 10.69

Cuadro 3. Porcentaje de Mortalidad larvaria de compuestos evaluados por PIL

Conc. (%)	Ácido salicílico Calculado	Ácido salicílico Reportado*	Ácido 2,5- dihidroxibenzoico (3)	Alcohol 2- hidroxibenílico (8)	4- hidroxibenzoato de metilo (9)	4- hidroxibenzoato de <i>n</i> -propilo (10)
1	92.62±6.17	0	27.62±5.42	15.96±2.98	79.31±7.52	34.14±4.33
0.5	12.88±1.32	1.08±1.55	13.68±3.06	1.89±0.78	49.47±7.34	10.71±1.28
0.25	0	0.64±1.05	2.18±0.84	0	15.50±2.97	0
0.125	0	0	0	0	4.21±1.22	0
0.0625	0	0	0	0	1.19±0.49	0

*Resultado reportado por Silveira y col. 2007

Cuadro 4. CL₅₀ (μmol/mL) de compuestos evaluados *in vitro*

Compuesto	CL₅₀ (μmol/mL)
Carvacrol	59.72
Acetato de carvacrol (1)	5.10
Éter metílico de carvacrol (2)	6.00
Ácido salicílico	**
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (3)	35.69
2,5-dihidroxibenzoato de metilo (4)	30.32
2,5-dihidroxibenzoato de etilo (5)	2.04
2-(α,α'-dimetoximetil)fenol (6)	333.13
2-metoxibenzoato de etilo (7)	0.91
Alcohol 2-hidroxibencilico (8)	**
4-hidroxibenzoato de metilo (9)	11.61
4-hidroxibenzoato de n-propilo (10)	**

**No se calculo (Datos insuficientes)

Cuadro 5. Concentraciones Letales 50, valores de Polarizabilidad y Peso Molecular (PM) de cada compuesto evaluado en larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus in vitro*.

Compuesto	PM (g/mol)	Polarizabilidad (α)	CL ₅₀ ($\mu\text{mol/mL}$)
Carvacrol	150	$18.68 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	59.72
Acetato de carvacrol (1)	192	$20.59 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	5.10
Éter metílico de carvacrol (2)	164	$22.43 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	6.00
Ácido salicílico	138	$13.90 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	**
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (3)	155	$14.64 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	35.69
2,5-dihidroxibenzoato de metilo (4)	169	$16.56 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	30.32
2,5-dihidroxibenzoato de etilo (5)	183	$18.40 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	2.04
2-(α,α' -dimetoximetil)fenol (6)	168	$18.16 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	333.13
2-metoxibenzoato de etilo (7)	180	$19.55 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	0.91
Alcohol 2-hidroxibencilico (8)	124	$13.71 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	**
4-hidroxibenzoato de metilo (9)	152	$15.82 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	11.61
4-hidroxibenzoato de n-propilo (10)	180	$19.49 \pm 0.5 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$	**

****No se puede calcular (datos insuficientes)**

Cuadro 6. Porcentaje de Reducción de Oviposición

Conc. ppm/mL	Carvacrol	Ácido salicílico	Éter metílico de carvacrol	Acetato de carvacrol	2,5-dihidroxi-benzoato de etilo	2-metoxi-benzoato de etilo
250	15.71± 3.26	-1.26±3.19	26.72± 1.06	25.80±0.27	26.56±1.07	27.00±1.50
200	6.48±4.26	-1.89±0.98	23.59± 1.22	21.42±3.12	21.45±3.02	24.60±2.64
150	0.02±1.45	-11.05±5.7	20.29± 1.99	11.30±1.52	14.02±2.398	22.33±8.91
100	0.09±2.36	-8.76±2.93	16.03± 3.06	6.85±0.49	7.20±3.20	13.91±2.43
50	-2.62±1.21	-7.27±7.39	11.13± 2.39	2.34±1.57	6.20±0.2	11.21±0.68

Cuadro 7. Porcentaje de Tasa de Eclósión

Conc. ppm/mL	Carvacrol	Ácido salicílico	Éter metílico de carvacrol	Acetato de carvacrol	2,5-dihidroxibenzoato de etilo	2-metoxibenzoato de etilo
250	7.95±0.37	7.09±1.71	12.90±0.42	10.95±0.47	15.59±1.07	13.52±0.75
200	8.17±1.49	6.19±2.39	11.65±0.28	9.15±0.51	11.22±1.42	10.84±0.89
150	6.93±1.97	5.69±2.49	10.29±0.23	7.75±0.63	8.81±0.36	9.82±0.73
100	5.26±1.36	3.99±1.31	9.03±1.06	6.71±0.81	7.01±0.65	8.11±0.50
50	0.26±0.28	0.52±0.21	8.30±0.74	6.03±0.84	6.43±0.92	6.81±0.40

Cuadro 8. Porcentaje de Eficacia del Tratamiento

Conc. ppm/mL	Carvacrol	Ácido salicílico	Éter metílico de carvacrol	Acetato de carvacrol	2,5-dihidroxibenzoato de etilo	2-metoxibenzoato de etilo
250	16.76±2.27	1.11±2.22	26.76±1.12	26.33±0.19	27.29±0.75	27.97±1.05
200	9.36±2.97	-1.31±0.68	23.33±0.85	22.50±2.17	22.77±2.10	24.21±1.84
150	0.98±1.01	-7.86±3.97	21.88±1.39	11.22±1.05	15.36±15.36	17.97±6.20
100	1.26±1.64	-6.47±2.04	18.26±2.13	7.45±0.34	6.81±2.23	15.77±1.69
50	-2.26±0.84	-8.12±5.14	11.53±1.66	2.98±1.10	6.68±0.14	11.87±0.47

8. Conclusiones

Se llevó a cabo el cribado *in silico* empleando los software TOMOCOMD-CARDD y WEKA, en busca de nuevos compuestos con actividad ixodocida. Las técnicas de clasificación fueron efectivas en rangos del 98 al 100%. En función a este estudio, se seleccionaron los análogos de carvacrol y ácido salicílico, también se consideraron análogos de isómeros del ácido salicílico.

Los análogos acetato de carvacrol (**1**), éter metílico de carvacrol (**2**), 2,5-dihidroxibenzoato de metilo (**4**), 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (**5**), 2-(α , α' -dimetoximetil) fenol (**6**), 2-metoxibenzoato de metilo (**7**), se prepararon como se describe en la literatura, y fueron purificados y caracterizados por IR y RMN. Los demás compuestos fueron adquiridos comercialmente.

Todos los compuestos evaluados presentaron actividad ixodocida en *R. (B.) microplus*, siendo los análogos **3**, **4**, **8**, **6** y **10**, los análogos que presentaron % de mortalidad menores al 50%. Los compuestos que presentaron mayor % de mortalidad fueron, el acetato de carvacrol (**1**), éter metílico de carvacrol (**2**), 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (**5**), 2-metoxibenzoato de metilo (**7**) y propil-*p*-hidroxibenzoato de metilo (**9**), el ácido salicílico y carvacrol, también fueron evaluados en esta cepa.

Se encontró una diferencia significativa entre la actividad del carvacrol y sus análogos, siendo el acetato de carvacrol (**1**) y el éter metílico de carvacrol (**2**) más activos que este.

Los análogos ácido salicílico el 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (**5**) y 2-metoxibenzoato de metilo (**7**), no presentaron una diferencia significativa contra la actividad ixodocida que presento el ácido salicílico. Siendo el compuesto -metoxibenzoato de metilo (**7**) el más potente.

Se evaluaron en garrapata adulta (PIA), el acetato de carvacrol (**1**), éter metílico de carvacrol (**2**), 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (**5**), 2-metoxibenzoato de metilo (**7**), todos los compuestos presentaron un %**RO**, similar en cada una de las diluciones al realizar la ANOVA no se encontró diferencia significativa entre los análogos, este comportamiento fue similar en los valores de %**TE** y %**E**. Los % de **RO**, **TE** y **E** del ácido salicílico y carvacrol, fueron menos activos, en comparación con sus análogos, al realizar la ANOVA correspondiente se encontró que si hay una diferencia significativa entre la actividad de los análogos y éstos.

Todos los compuestos evaluados presentaron mayor actividad acaricida en la etapa de larvaria en comparación con la etapa adulta de *R. (B.) microplus*, el 2-metoxibenzoato de etilo (**7**) y 2,5-dihidroxibenzoato de etilo (**5**), presentaron los mejores resultados de actividad ixodicida, por lo cual son candidatos para continuar su estudio *in vivo*.

9. Bibliografía

1. Borges LM, Sousa LA, Barbosa Cda S, (2011), Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rev Bras Parasitol Vet*, 20 (2): 89-96.
2. Alonso M, Rodríguez R, Fragoso H, Rosario R, (2006), Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas, *Arch Med Vet*, 38 (2): 105-114.
3. Marrero Y, Romero V, TOMOCOMD software. Central University of Las Villas. (2002). TOMOCOMD (TOpological MOlecular COMputer Design) for Windows, version 1.0 is a preliminary experimental version; in future a professional version will be obtained upon request to Y. Marrero: yovanimp@qf.uclv.edu.cu
4. Domínguez D, Rosario R, Almazán C, Saltijeral J, De la Fuente J, (2010), *Boophilus microplus*: biological and molecular aspects of acaricide resistance and their impact on animal health, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12:181 – 192.
5. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/rhipicephalus-microplus.pdf>, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino*, The Center For Food Security & Public Health and Institute for International Cooperation in Animal Biologics. (Fecha de consulta: 10-Agosto-2012).
6. Rosario R, Guerrero F, Miller R, Rodríguez R, Dominguez D, Cornel A, Hernández R, George E, (2005), Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *J Med Entomology*, 42: 1020-1025.
7. Garris G, (1991), Control of ticks, *Vet Clin N Am-small*. 21(1): 173 –183.
8. Rosario R, Almazan C, Miller R, Domínguez D, Hernández R, de la Fuente J, (2009), Genetic basis and impact of tick acaricide resistance, *Frontiers in Bioscience*, 14: 2657-2665.

9. Sharma A, Kumar R, Kumar S, Nagar G, Kumar Singh N, Singh Rawat S, Dhakad M, Rawat A, Ray D, (2012), Deltamethrin and cypermethrin resistance status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from six agro-climatic regions of India, *Vet Parasitol*, 188:337-345.
10. Rodríguez R, Alonso M, Rodríguez F, Santamaría V, Rosario R, (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol*, 136 (3-4): 335-342.
11. Soberanes N, Santamaría M, Fragoso H, García Z, (2002), Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata *Boophilus microplus* en México, *Téc Pecu Méx*, 40(1): 81-92.
12. Rosado J, Rodríguez R, García Z, Fragoso H, Ortiz A, Rosario R., (2008), Development of amitraz resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) undergoing typical amitraz exposure in the Mexican tropics, *Veterinary Parasitology*, 152: 349-353.
13. Bravo M, Coronado A, Henríquez H (2008) Sucesptibilidad de larvas y adultos de *Boophilus microplus* al ixodicida coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela, *Zootecnia Trop* 26 (1): 41-46.
14. Sheridan R, Venkataraghavan R, (1987), New Methods in Computer-Aided Drug Design, *Acc Chem Res*, 20:322-329.
15. Langridge R, Ferrin T, Kuntz I, Connolly M, (1981), Real Time Color Graphics in Studies of Molecular Interactions, *Science*, 211:661- 666.
16. <http://www.fis.unam.mx/~ramon/CursoDF/Material%20Didactico/Varios/MetodosComputacionalesDisenoFarmacos.pdf>, Gano F, Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid. (Fecha de consulta: 10-Agosto-2012).
17. Galvez J, Garcia R, de Julian J, Soler R, (1995), Topological Approach to Drug Design. [Erratum to document cited in CA122:177672]. *J Chem Inform Comput Sci*, 35(5):938.

18. Gozalbes R, Brun M, Garcia R, Galvez J, Girard P, Doucet J, (2000), Anti-Toxoplasma activities of 24 quinolones and fluoroquinolones in vitro: prediction of activity by molecular topology and virtual computational techniques, *Antimicrob Agents Chemother*, 44(10):2771-2776.
19. García R, Espinoza N, Galarza R, Moreno M, Rojas B, Roldan L, Sanchez M, Gálvez J, (2008), Aplicación de la topología molecular en la predicción de la inhibición de *Trypanosoma cruzi* Hexokinasa y un grupo de derivados bifosfonatos, *Ars Pharm*, 49 (3): 199-209.
20. Watson C, (2003), Predictive *in silico* models in drug discovery Biosilico, 1 (3): 83-84.
21. <http://www.educacionquimica.info/include/downloadfile.php?pdf=pdf949.pdf>, Medina J., López F., Castillo R., Diseño de fármacos asistido por computadora (Fecha de consulta: 20 - Agosto - 2014)
22. Lozano J, Scior T, (2012), ¿Qué sabe Ud. acerca de...QSAR?, *Rev Mex Cienc Farm*, 43 (2): 82-84.
23. Marrero Y, Montero A, Romero C, Iyarreta M, Mayón M, García R, (2005), Non-Stochastic and Stochastic Linear Indices of the “Molecular Pseudograph’s Atom Adjacency Matrix”: Application to “*in silico*” Studies for the Rational Discovery of New Antimalarial Compounds, *Bioorg Med Chem*, 13:1293-1304.
24. Marrero Y, Iyarreta M, Montero A, Romero C, Brandt C, Avila P, Kirchgatter K, Machado Y, (2005), Ligand-Based Virtual Screening and *in silico* Design of New Antimalarial Compounds Using Non-Stochastic and Stochastic Total and Atom-type Quadratic Maps, *J Chem Inf Comput Sci*, 45:1082-1100.
25. Montero A, García R, Marrero Y, Machado Y, Nogal J, Martínez A, Arán V, Ochoa C, Meneses A, Torrens F, (2006), Non-stochastic Quadratic Fingerprints and LDA-Based QSAR Models in Hit and Lead Generation Through Virtual Screening: Theoretical and Experimental Assessment of a Promising Method for the Discovery of New Antimalarial Compounds, *Eur J Med Che*, 41 (4): 483-493.

26. Marrero Y, Machado Y, Pereira D, Escario J, Barrio A, Nogal J, Ochoa C, Aran V, Martinez A, Garcia R, Montero A, Torrens F, Meneses A, (2005), A Computer-Based Approach to the Rational Discovery of New Antitrichomonas Drugs by Atom-Type Linear Indices, *Curr Drug Discov Technol*, 2: 245-265.
27. Meneses A, Marrero Y, Machado Y, Montero A, Montero D, Escalario J, Nogal J, Ochoa C, Arán V, Martínez A, García R, (2005), A Linear Discrimination Analysis Based Virtual Screening of Trichomonacidal Lead-Like Compounds. Outcomes of *in silico* Studies Supported by Experimental Results, *Bioorg Med Chem Lett*, 17: 3838-3843.
28. Montero A, Vega M, Marrero Y, Rolón M, Gómez A, Escario J, Arán V, Martinez A, Meneses A, (2005), A Novel Non-Stochastic Quadratic Fingerprints-based Approach for the "*in silico*" Discovery of New Antitrypanosomal Compounds, *Bioorg Med Chem*, 13: 6264-6275.
29. Vega M, Montero A, Marrero Y, Rolón M, Gómez A, Escario J, Arán V, Meneses A, Torrens F, (2006), A. New Ligand-Based Approach for the Discovery of Antitrypanosomal Compounds, *Bioorg Med Chem Letter*, 16(7):1898-1904.
30. Marrero Y, Castillo J, Olazabal E, Serrano H, Morales A, Castañedo N, Ibarra F, Huesca A, Sánchez AM, Torres F, Castro EA, (2005), Atom-Type and Total Molecular Linear Indices as a Promising Approach for Bioorganic & Medicinal Chemistry: Theoretical and Experimental Assessment of a Novel Method for Virtual Screening and Rational Design of New Lead Anthelmintic, *Bioorg Med Chem*, 13:1005-1020.
31. Marrero Y, Castillo J, Olazabal E, Serrano H, Morales A, Castañedo N, Ibarra F, Huesca A, Jorge E, del Valle A, Torrens F, Castro EA, (2004), *TOMOCOMD-CARDD*, a Novel Approach for computer-aided "rational" drug design: I. Theoretical and experimental assessment of a promising method for computational screening and *in silico* design of new anthelmintic compounds, *J Comput Aided Mol Des*, 18:615-633.

32. Casañola G, Khan M, Marrero Y, Ather A, Sultankhodzhaev M, Torrens F, (2006), New Tyrosinase Inhibitors Selected by Atomic Linear Indices-Based Classification Models, *Bioorg Med Chem Letter*, 16:324-330.
33. <http://users.dsic.upv.es/~jorallo/docent/doctorat/weka.pdf>, Hernández J, Ferri C, Práctica de Minería de Datos, (fecha de consulta: 10-Agosto-2012)
34. Jiao Y, Chen R, Ke X, Chu K, Lu Z, Herskovits Ed, (2010), Predictive models of autism spectrum disorder based on brain regional cortical, *Neuroimage*, 50(2): 589–599.
35. Chen P, Fan R, Lin C, (2006), A study on SMO-type decomposition methods for support vector machines. IEEE transactions on neural networks, *Neural Networks Council*, 17(4):893-908.
36. Platt J, (2000), Fast Training of Support Vector Machines using Sequential Minimal Optimization, en Platt J, *Advances in kernel methods*, MIT Press Cambridge, 185-208.
37. Ducornez S, Barré N, Miller R, Garine M, (2005), Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test, *Vet Parasitol*, 130: 285-292.
38. Cutullé C, Lovis L, D'Agostino B, Balbiani G, Moricia G, Citroni D, Reggi J, Caracostantogolo J (2013) In vitro diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina, *Vet Parasitol*, 192:296– 300, doi:[10.1016/j.vetpar.2012.10.014](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.014).
39. Sabatini G, Kemp D, Hughes H, Nari A, Hansen J (2008) Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Vet Parasitol*, 95:53-62, doi:[10.1016/S0304-4017\(00\)00406-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00406-4).
40. White H, Plummer P, Kemper C, Miller R, Davey R, Kemp D, Hughes S., Smith C, Gutierrez J (2004), An In Vitro Larval Immersion Microassay for Identifying and Characterizing Candidate Acaricides, *Med Entomol*, 41(6): 1034-1042, doi:0022-2585/04/1034-1042\$04.00/0 _ 2004.

41. Domingues L, Giglioti R, Feitosa K, Fantatto R, Dias M, De Sena M, Pereira G, Becharaa G, De Souza A (2013), In vitro activity of pineapple extracts (*Ananas comosus*, Bromeliaceae) on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae), *Exp Parasitol*, 134:400–404, doi:[10.1016/j.exppara.2013.03.021](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.021).
42. Castro E, Rifran L, Piaggio J, Gil A, Miller R, Shumaker T, (2009), In vitro tests to establish LC₅₀ and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization, *Vet Parasitol*, 162:120-128.
43. Du W, Olsen C, Avena R, McHugh T, Levin C, Friedman M, (2008), Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods, *J Agric Food Chem*, 56 (9):3082-8.
44. Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G, (2007), Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils, *J. Agric Food Chem*, 55 (12): 4863-70.
45. Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D, (2007), Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity, *J Agric Food Chem*, 55 (15): 6300-6308.
46. Yin Q, Yan F, Zu X, Wu Y, Wu X, Liao M, Deng S, Yin L, Zhuang Y, (2012), Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2, *Cytotechnology*, 4(1):43-51.
47. Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula dhas K, Kamaraj S, Divya MG, Decaki T, (2012), Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats, *Mol Cell Biochem*, 360(1-2):51-60.
48. Ultee A, Smid E, (2001), Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*, *Int J Food Microbiol*, 64 (3): 373-8.

49. Coskun S, Girisgin O, Kürkcüoğlu M, Malyer H, Girisgin A, Kirimer N, Baser K, (2008), Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae), *Parasitol Res*, 103 (2): 259–261.
50. Narkhede H, More U, Dalal D, Mahulikar P, (2008), Solid-Supported synthesis of bio-active carvacrol compounds using microwaves, *Synthetic Commun*, 38: 2413–2418.
51. Mackowiak P.A, (2000), Brief History of Antipyretic Therapy, *Clin Infect Dis Suppl* 5:S154-156.
52. Rangel G, Castro E, Beltran E, Reyes H, García E, (2010), El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas, *Biológicas*, 12(2): 90- 95.
53. Silveira A, Daemon E, Goncalves G, (2007), Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol. Salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestri 1887) (Acarie:Ixodidae) larve, *Parasitol Res*, 101(3):809-811.
54. Sher M, Tam T, Ahmed Z, Rashid M, Fischer C, Langer P, (2007) Efficient Synthesis of Salicylates by Catalytic [3 + 3] Cyclizations of 1,3-Bis(silyl enol ethers) with 1,1,3,3-Tetramethoxypropane, *J Org Chem*, 72: 6284-6286.
55. Merkl R, Hrádková I, Filip V, Smidrkal J, (2010), Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters, *Czech J Food Sci*, 28: 275-279.
56. Ooshiro A, Kaji M, Katoh Y, Kawaide H, Natsume M, (2011), Antibacterial activity of alkyl gallates and related compounds against *Ralstonia solanacearum*, *J Pestic Sci*, 36: 240–242.
57. Briard E, Zoghbi S, Imaizumi M, Gourley J, Shetty H, Hong J, Cropley V, Fujita M, Innis R, Pike V (2008) Synthesis and evaluation in monkey of two sensitive ¹¹C-labeled aryloxyanilide ligands for imaging brain peripheral benzodiazepine receptors *in vivo*, *J Med Chem*, 51(1):17–30.

58. Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P, (2006), Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, *Lett Appl Microbiol*, 43:149–154.
59. Pilyugin V, Sapozhnikov Y, Sapozhnikova N, (2004), Acyl derivatives of 2-aminobenzimidazole and their fungicide activity, *Russ J Gen Chem*, 74 (5): 738-743.
60. Yan Y, Qin B, Ren C, Chen X, Kwan Y, Ye R, Zhang D, Su H, Zeng H, (2010), Synthesis, structural investigations, hydrogen-deuterium exchange studies, and molecular modeling of conformationally stabilized aromatic oligoamides, *J Am Chem Soc*, 132(10): 5869-5879.
61. Liable L, Incarvito C, Rheingold A, (2001), Biometallic reactivity preparation and properties of bimetallic complexes formed by binucleating ligands bearing 4- and 6-coordinate site, *Inorg Chem*, 40 (9): 2147-2155.
62. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney P, (2001), Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv Drug Deliver Rev*, 46: 3-26
63. Ramírez C, Ibarra F, Pérez H, Manjarrez N, Salgado H, González Y (2014) In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus Boophilus* microplus, *Exp Appl Acarol* , 61:251–257, doi:10.1007/s10493-013-9688-4.

10 Anexos

10.1 Anexo I, Artículo Publicado

Exp Appl Acarol (2013) 61:251–257
DOI 10.1007/s10493-013-9688-4

In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Ramírez L. Concepción · Ibarra V. Froylán · Pérez M. Herminia I · Manjarrez A. Norberto · Salgado Z. Héctor J · González C. Yaniel

Received: 3 January 2013 / Accepted: 17 March 2013 / Published online: 1 April 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a tick that causes huge economic losses in cattle. The indiscriminate use of acaricides has generated resistance to most compounds present on the market. This makes further investigation on other potential acaricides necessary, the in silico assay being an alternative to the design of new compounds. In the present study a biosilico assay was performed using TOMOCOMD-CARDD (TOPOlogical MOlecular COMputer Design-Computer-Aided Rational Drug Design) and WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis) software. Two carvacrol and four salicylic acid derivatives, synthesized by conventional methods and evaluated with the larval packet test on larvae of *R. (B.) microplus* were selected. All evaluated compounds presented acaricidal activity; however, ethyl 2-methoxybenzoate (91.8 ± 1.7 % mortality) and ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (89.1 ± 1.6 % mortality) showed greater activity than salicylic acid. With regard to the carvacrol analogues, carvacrol acetate (67.8 ± 2.1 % mortality) and carvacrol methyl ether (71.7 ± 1.6 % mortality) also showed greater activity than carvacrol (35.9 ± 3.2 % mortality). TOMOCOMD-CARDD and WEKA software were helpful tools in the search for alternative structures with potential acaricidal activity on *R. (B.) microplus*.

R. L. Concepción (✉) · I. V. Froylán
Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico city, Mexico
e-mail: connyramlub@yahoo.com.mx

R. L. Concepción · P. M. Herminia I · M. A. Norberto
Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico city, Mexico

S. Z. Héctor J
Departamento de Química Orgánica, Escuela Nacional Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico city, Mexico

G. C. Yaniel
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Cuba

Keywords *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* · Acaricidal activity · Carvacrol · Salicylic acid

Introduction

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is one of the main ectoparasites of cattle in tropical and subtropical regions in the world (Borges et al. 2011), producing a negative economic impact on account of damages to the skin caused directly by blood loss and the decrease in productive parameters and indirectly by transmitted etiological agents (Alonso et al. 2006). Although there are different methods to control this parasite, treatment with different acaricides compounds such as organophosphates, pyrethroids, amidines, endectocides, phenyl pyrazolones and growth inhibitors, has caused *R. (B.) microplus* to generate resistance to practically most of the acaricides present on the market. This makes the design of new acaricides, necessary such as in silico assays (computer aided studies), a new alternative in the selection of compounds using QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) models. Employing TOMOCOMD-CARDD (Topological Molecular Computer Design-Computer-Aided Rational Drug Design) software (Marrero 2002), many in silico assays take place, thus facilitating the discovery of several active compounds for the treatment of diseases of important social impact such as: malaria (Marrero et al. 2005a, b; Montero et al. 2006), trichomonosis (Marrero et al. 2005c, Meneses et al. 2005), Chagas disease (Montero et al. 2005; Vega et al. 2006), helminthiasis (Marrero et al. 2005d, 2004) and cancer (Casañola et al. 2006). Because of the good results obtained with TOMOCOMD-CARDD, it was decided to use the software supported on the WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis) software version 3.6.3 for the analysis and chemometrical processing of data in an in silico assay in search of new acaricides.

Carvacrol is a monoterpene extracted from the essential oil of *Origanum vulgare*; its bactericide properties (Du et al. 2008; Di Pasqua et al. 2007; Cristani et al. 2007; Ben Arfa et al. 2006), anticancer properties (Yin et al. 2012; Jayakumar et al. 2012) and food additive properties (Ultee and Smid 2001) have been studied. It has also been evaluated for acaricidal activity with *Rhipicephalus turanicus* (Coskun et al. 2008). Salicylic acid is a β -hydroxy acid used as a nonsteroidal analgesic, anti-inflammatory and antipyretic agent (NSAIDS) (Mackowiak 2000; Sher et al. 2007); its involvement in pathogen resistance on plants has also been evaluated (Rangel et al. 2010). Silveira et al. in 2007, studied its acaricidal activity in *R. (B.) microplus* where the percentage of mortality was almost null.

The purpose of this study was to evaluate the acaricide activity of carvacrol analogues (carvacrol acetate and carvacrol methyl ether) as well as salicylic acid analogues (ethyl 2, 5-dihydroxybenzoate, methyl 2,5-dihydroxybenzoate, 2-(α,α' -dimethoxymethyl)phenol and ethyl 2-methoxybenzoate), (Fig. 1), selected by the in silico assay.

Materials and methods

Employing TOMOCOMD-CARDD software a 2D in silico assay was performed, such assay threw the candidate molecules with acaricidal activity were carvacrol and salicylic acid analogues. Carvacrol and salicylic acid were purchased from Aldrich Chemical and J.T. Baker, respectively. Carvacrol and salicylic acid analogues were prepared as described in literature (Briard et al. 2008, Pilyugin et al. 2004; Yan et al. 2010; Liable et al. 2001; Ben Afra et al. 2006) (see Fig. 1).

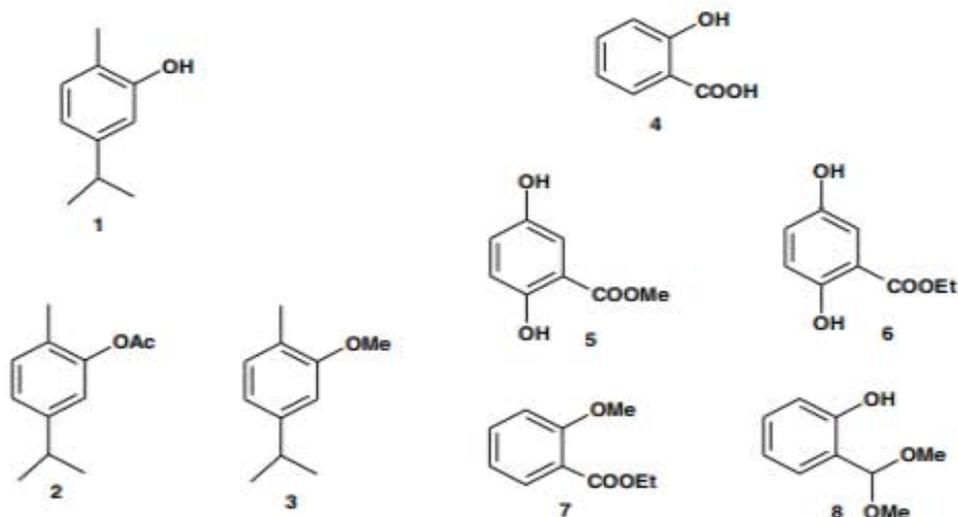


Fig. 1 Carvacrol (1) analogues: carvacrol acetate (2) and carvacrol methyl ether (3). Salicylic acid (4) analogues: methyl 2,5-dihydroxybenzoate (5), ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (6), ethyl 2-methoxybenzoate (7), 2-(α,α' -dimethoxymethyl)phenol (8)

Obtaining larvae of *Rhipicephalus (B.) microplus*

Adult ticks from cattle previously infected with a susceptible strain of *R. (B.) microplus* were kindly donated by the Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) located in Jiutepec, Morelos, Mexico, incubated for a two-week period at 28 °C and 80 % relative humidity; the eggs were then collected in vials and incubated under the same conditions. After 14 days the hatched larvae were suitable for the bioassay.

Bioassay (larval packet test)

Dilutions of each compound were prepared at concentrations of 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 and 0.0625 % (w/v) using trichloroethylene and extra virgin olive oil 2:1. 670 μ l for each concentration were applied in a filter paper (Whatman No. 1, 10 \times 12 cm). Once the solution was applied, the paper was left to dry for 30 min at room temperature. With the impregnated papers, envelopes were made in which approximately 100 larvae of *R. (B.) microplus* were placed. Afterwards the packages were incubated for 24 h at 28 °C and 80 % of relative humidity. From each solution six repetitions were carried out and a negative control was included in every experiment (Ducornez et al. 2005).

After incubation, the percentage of mortality was estimated with the larvae quantification with the aid of a stereoscopic microscope and a manual laboratory counter.

The percentage of mortality was corrected according to the formula applied by Abbot (1925) (Bravo et al. 2008).

$$\% \text{ Mortality} = \left(\frac{(\% \text{ treated mortality} - \% \text{ control mortality})}{100 - \% \text{ control mortality}} \right) \times 100$$

Statistical analysis

Medial and standard deviation of the percentage of mortality corrected by the formula mentioned above was calculated. An independent sample T test was conducted to determine which of the analogues had the best acaricide activity, as well as a comparison with carvacrol and salicylic acid respectively.

Results and discussion

From the *in silico* assay TOMOCOMD-CARDD and WEKA softwares were employed by means of data base of 621 possible molecules out of 754 analyzed molecules, and under the criteria described above carvacrol and salicylic acid analogues were selected. In a study conducted by Coskun et al. in 2008, related to the acaricide activity of carvacrol on *R. turanicus*, they reported that pure carvacrol within 6 h presented a mortality of 100 %. However, no report has been found concerning the assessment of acaricidal activity of this compound on *R. (B.) microplus*; therefore, it was necessary for us to evaluate the carvacrol acaricidal activity on this strain. We found an acaricide activity of 35.85 ± 3.18 % of mortality at a concentration of 1 % (w/v) (Table 1).

The T test demonstrated that carvacrol acetate as well as carvacrol methyl ether presented greater activity than carvacrol, although no other significant difference was found between these two analogues.

Silveira et al. in 2007 evaluated the acaricide activity of salicylic acid on *R. (B.) microplus* whose mortality percentage was almost null at a concentration of 0.5 % (w/v); however, all the selected analogues from the *in silico* assay, presented greater activity than salicylic acid (Table 2).

The T test demonstrated that ethyl 2,5-dihydroxybenzoate as well as ethyl 2-methoxybenzoate presented greater activity with no significant difference between these molecules.

Ethyl 2,5-dihydroxybenzoate, ethyl 2-methoxybenzoate and the carvacrol analogues (carvacrol acetate and carvacrol methyl ether) were then compared with no significant difference found on the acaricide activity of such molecules. These results demonstrate that *in silico* assays based on QSAR models are a useful tool for the development of new potential acaricides.

It is important to highlight that since the results obtained under *in vitro* conditions are promisorily acceptable, probes under *in vivo* conditions (cattle) are required to evaluate different formulations and concentrations. Further studies need to be conducted to determine the real potential of the selected molecules in the present paper.

Table 1 Effect of carvacrol and its analogues on *Rhipicephalus (B.) microplus* larvae *in vitro* (% mortality)

Conc. (%)	Carvacrol	Carvacrol acetate	Carvacrol methyl ether
1	35.85 ± 3.18	67.83 ± 2.07	71.69 ± 1.57
0.50	31.55 ± 3.30	46.77 ± 1.65	59.41 ± 1.64
0.250	27.25 ± 3.95	45.42 ± 0.26	57.06 ± 1.82
0.125	20.20 ± 3.13	46.38 ± 0.32	31.20 ± 2.61
0.0625	14.52 ± 3.28	36.48 ± 1.90	17.56 ± 3.18

Table 2 Effect of salicylic acid analogues on *Rhipicephalus (B.) microplus* larvae in vitro (% mortality)

Conc. (%)	Salicylic acid ^a	Methyl 2, 5-dihydroxybenzoate	Ethyl 2, 5-dihydroxybenzoate	Ethyl 2-methoxybenzoate	2-(α,α' -dimethoxymethyl)phenol
1	0	46.49 ± 0.78	89.14 ± 1.61	91.82 ± 1.66	26.29 ± 2.46
0.5	1.08 ± 1.55	43.90 ± 0.61	73.94 ± 4.82	80.67 ± 0.46	21.92 ± 2.66
0.25	0.64 ± 1.05	38.46 ± 0.59	66.30 ± 1.63	83.81 ± 1.59	16.38 ± 1.40
0.125	0	25.46 ± 3.48	44.69 ± 0.36	73.37 ± 3.65	13.12 ± 1.03
0.0625	0	21.61 ± 5.09	44.94 ± 1.13	46.98 ± 10.69	10.02 ± 0.13

^a Results reported by Silveira et al. in (2007)

Conclusion

TOMOCOMD-CARDD and WEKA software was a helpful tool in the search for alternative structures with potential acaricidal activity on *R. (B.) microplus*. Derivatives of carvacrol and salicylic acid: ethyl 2,5-dihydroxybenzoate, ethyl 2-methoxybenzoate, carvacrol acetate and carvacrol methyl ether, obtained from the in silico assay showed higher acaricidal than did the parent structures.

Acknowledgments M. Sc. Concepción Ramírez Lubianos gratefully acknowledges the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México for a doctoral scholarship No 52807. Study partially supported by projects PAPIIT-DEGPA UNAM (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica—Dirección General Asuntos del Personal Académico) IN-201710 and PAPIME (Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza) PE204211.

References

- Alonso M, Rodríguez R, Fragoso H, Rosario R (2006) Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Arch Med Vet 38: 105–114. Available: <http://www.scielo.cl/pdf/amv/v38n2/art03.pdf>. Accessed 12 April 2012
- Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. Lett Appl Microbiol 43:149–154. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x
- Borges LM, Sousa LA, Barbosa Cda S (2011) Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev Bras Parasitol Vet 20(2):89–96. doi:10.1590/S1984-29612011000200001
- Bravo M, Coronado A, Henríquez H (2008) Suceptibilidad de larvas y adultos de *Bophilus microplus* al ixodicida coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. Zootecnia Trop 26 (1): 41–46. Available: <http://www.bioline.org.br/request?zr08006>. Accessed 10 Mar 2012
- Briard E, Zoghbi S, Imaizumi M, Gourley J, Shetty H, Hong J, Cropley V, Fujita M, Innis R, Pike V (2008) Synthesis and evaluation in monkey of two sensitive 11C-labeled aryloxyanilide ligands for imaging brain peripheral benzodiazepine receptors in vivo. J Med Chem 51(1):17–30. doi:10.1021/jm0707370
- Casañola G, Khan M, Marrero Y, Ather A, Sultankhodzaev M, Torrens F (2006) New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. Bioorg Med Chem Letter 16:324–330. doi:10.1016/j.bmcl.2005.09.085
- Coskun S, Girisgin O, Kürkcüoğlu M, Malyer H, Girisgin AO, Kirimer N, Baser KH (2008) Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. Essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). Parasitol Res 103 (2): 259–261. doi: 10.1007/s00436-008-0956-x
- Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D (2007) Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. J Agric Food Chem 55(15):6300–6308. doi:10.1021/jf070094x

- Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G (2007) Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 55(12):4863–4870. doi:10.1021/jf0636465
- Du WX, Olsen CE, Avena RJ, McHugh TH, Levin CE, Friedman M (2008) Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods. *J Agric Food Chem* 56(9):3082–3088. doi:10.1021/jf703629s
- Ducornez S, Barré N, Miller R, Garine M (2005) Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified larval packet test. *Vet Parasitol* 130:285–292. doi:10.1016/j.vetpar.2005.04.018
- Jayakumar S, Madankumar A, Asokkumar S, Raghunandhakumar S, Gokula dhas K, Kamaraj S, Divya MG, Decaki T (2012) Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Mol Cell Biochem* 360(1–2):51–60. doi:10.1007/s11010-011-1043-7
- Liabe L, Incarvito C, Rheingold A (2001) Biometallic reactivity preparation and properties of bimetallic complexes formed by binucleating ligands bearing 4- and 6-coordinate site. *Inorg Chem* 40(9):2147–2155. doi:10.1021/ic0012625
- Mackowiak PA (2000) Brief history of antipyretic therapy. *Clin Infect Dis Suppl* 5:S154–S156. doi:10.1086/317510
- Marrero Y, Romero V (2002) TOMOCOMD software. Central University of Las Villas. TOMOCOMD (TOPological MOlecular COMputer Design) for Windows, version 1.0 is a preliminary experimental version; in future a professional version will be obtained upon request to Y. Marrero: yovanimp@qf.uclv.edu.cu; ymarrero77@yahoo.es
- Marrero Y, Castillo J, Olazabal E, Serrano H, Morales A, Castañedo N, Ibarra F, Huesca A, Jorge E, del Valle A, Torrens F, Castro EA (2004) TOMOCOMD-CARDD, a novel approach for computer-aided “rational” drug design: I. Theoretical and experimental assessment of a promising method for computational screening and in silico design of new anthelmintic compounds. *J Comput Aided Mol Des* 18:615–633. doi:10.1007/s10822-004-5171-y0
- Marrero Y, Castillo J, Olazabal E, Serrano H, Morales A, Castañedo N, Ibarra F, Huesca A, Sánchez AM, Torres F, Castro EA (2005a) Atom, atom-type and total molecular linear indices as a promising approach for Bioorganic and Medicinal Chemistry: theoretical and experimental assessment of a novel method for virtual screening and rational design of new lead anthelmintic. *Bioorg Med Chem* 13:1005–1020. doi:10.1016/j.bmc.2004.11.040
- Marrero Y, Iyarreta M, Montero A, Romero C, Brandt C, Avila P, Kirchgatter K, Machado Y (2005b) Ligand-based virtual screening and in silico design of new antimalarial compounds using non-stochastic and stochastic total and atom-type quadratic maps. *J Chem Inf Comput Sci* 45:1082–1100. doi:10.1021/ci050085t
- Marrero Y, Montero A, Romero C, Iyarreta M, Mayón M, García R (2005c) Non-stochastic and stochastic linear indices of the “Molecular pseudograph’s atom adjacency matrix”: application to “in silico” studies for the rational discovery of new antimalarial compounds. *Bioorg Med Chem* 13:1293–1304. doi:10.1016/j.bmc.2004.11.008
- Marrero Y, Machado Y, Pereira D, Escario J, Barrio A, Nogal J, Ochoa C, Aran V, Martínez A, García R, Montero A, Torrens F, Meneses A (2005d) A computer-based approach to the rational discovery of new antitrichomonas drugs by atom-type linear indices. *Curr Drug Discov Technol* 2:245–265. doi:10.1016/j.jmgm.2006.09.007
- Meneses A, Marrero Y, Machado Y, Montero A, Montero D, Escalario J, Nogal J, Ochoa C, Arán V, Martínez A, García R (2005) A linear discrimination analysis based virtual screening of trichomonacidal lead-like compounds. Outcomes of in silico studies supported by experimental results. *Bioorg Med Chem Lett* 17:3838–3843. doi:10.1016/j.bmc.2005.05.124
- Montero A, Vega M, Marrero Y, Rolón M, Gómez A, Escario J, Arán V, Martínez A, Meneses A (2005) A novel non-stochastic quadratic fingerprints-based approach for the “in silico” discovery of new anti-trypansomal compounds. *Bioorg Med Chem* 13:6264–6275. doi:10.1016/j.bmc.2005.06.049
- Montero A, García R, Marrero Y, Machado Y, Nogal J, Martínez A, Arán V, Ochoa C, Meneses A, Torrens F (2006) Non-stochastic quadratic fingerprints and LDA-based QSAR models in hit and lead generation through virtual screening: theoretical and experimental assessment of a promising method for the discovery of new antimalarial compounds. *Eur J Med Chem* 41(4):483–493. doi:10.1016/j.ejmech.2005.12.010
- Pilyugin V, Sapozhnikov Y, Sapozhnikova N (2004) Acyl derivatives of 2-aminobenzimidazole and their fungicide activity. *Russ J Gen Chem* 74(5):738–743. doi:10.1023/B:RUGC.0000039088.87053.eb
- Rangel G, Castro E, Beltran E, Reyes H, García E (2010) El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas* 12(2): 90–95. Available <http://www.biologicas.umich.mx/documentos/no12/diciembre/Dic-art4.pdf>. Accessed 9 May 2012

- Sher M, Tam Dang TH, Ahmed Z, Rashid M, Fischer C, Langer P (2007) Efficient synthesis of salicylates by catalytic [3 + 3] cyclizations of 1, 3-bis(silyl enol ethers) with 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane. *J Org Chem* 72:6284–6286. doi:10.1021/jo070974a
- Silveira A, Daemon E, Goncalves G (2007) Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrì 1887) (Acaric: Ixodidae) larve. *Parasitol Res* 101(3):809–811. doi:10.1007/s00436-007-0560-5
- Ultee A, Smid EJ (2001) Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* 64(3):373–378. doi:10.1016/S0168-1605(00)00480-3
- Vega M, Montero A, Marrero Y, Rolón M, Gómez A, Escario J, Arán V, Meneses A, Torrens F (2006) A new ligand-based approach for the discovery of antitrypanosomal compounds. *Bioorg Med Chem Letter* 16(7):1898–1904. doi:10.1016/j.bmcl.2005.12.087
- Yan Y, Bo Q, Ren C, Chen X, Kwan Y, Yr R, Zhang D, Su H, Zeng H (2010) Synthesis, structural investigations, hydrogen-deuterium exchange studies, and molecular modeling of conformationally stabilized aromatic oligoamides. *J Am Chem Soc* 132(10):5869–5879. doi:10.1021/ja100579z
- Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, Deng SW, Yin LL, Zhuang YZ (2012) Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology* 4(1):43–51. doi:10.1007/s10616-011-9389-y

10.2 Anexo II, Manuscrito Enviado

Assessment and determination of LC₅₀ of carvacrol and salicylic acid analogues with acaricide activity in larvae and adult ticks of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Concepción Ramírez L.^{1, 2}, Froylán Ibarra V.¹, Herminia I. Pérez M.², Norberto Manjarrez A.², Héctor J. Salgado Z.³, Lucia Ortega C.²

Abstract

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is a tick that causes huge economic losses in cattle. The indiscriminate use of acaricides has generated resistance to most compounds present on the market. Carvacrol and salicylic acid have been widely studied for their biological activities and have been evaluated in different strains of *Rhipicephalus*. This makes further investigation on other potential acaricides necessary. In the present research, carvacrol analogues were selected (carvacrol methyl ether (1) and carvacrol acetate (2)), as well as salicylic acid analogues (2,5-dihydroxybenzoic acid (3), ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (4), methyl 2,5-dihydroxybenzoate (5), 2-(α , α' -dimethoxymethyl)phenol (6), ethyl 2-methoxybenzoate (7) and alcohol 2-hydroxybenzyl (8)). Isomers of salicylic acid such as propyl *p*-hydroxybenzoate (9) methyl *p*-hydroxybenzoate (10) were also considered to assess their acaricide activity *in vitro*.

Keywords

Rhipicephalus (Boophilus) microplus, Acaricidal activity, Carvacrol, Salicylic acid

Introduction

R. (B.) microplus is one of the main ectoparasites of cattle in tropical and subtropical regions in the world (Borges et al. 2011). The exportation of cattle to the United States is an economically important activity regarding Mexican livestock, since it generates foreign exchange at about \$ 700 million USD annually (González et al. 2012). In Mexico, this tick causes huge economic losses in the livestock sector of approximately 48 million dollars because of direct damage to the skin by the action of bites, blood loss and indirect damage by the transmission of the etiological agent, thus decreasing production and causing cost parameters for the control of these parasites such as: *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*,

Babesia bigemina, *Babesia bovis*, *Borrelia theileri*. (Alonso et al. 2006; Rosario et al. 2011).

Since the indiscriminate use of acaricides has caused *R. (B.) microplus* to create resistance to most acaricides available, it is necessary to find new compounds with acaricide activity. Carvacrol (Du et al. 2008; Di Pasqua et al. 2007; Cristani et al. 2007; Yin et al. 2012; Jayakumar et al. 2012; Ultee et al. 2001) and salicylic acid (Rangel et al. 2010; Mackowiak 2000) have been studied extensively for their biological activities and have been evaluated in different strains of *Rhipicephalus* (Coskun et al. 2008; Silveira et al. 2007). In a previous study acaricidal activity was assessed with carvacrol analogues (carvacrol methyl ether (**1**) and carvacrol acetate (**2**)) as well as salicylic acid analogues (ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (**4**), methyl 2,5-dihydroxybenzoate (**5**), 2-(α,α' -dimethoxymethyl)phenol (**6**) and ethyl 2-methoxybenzoate (**7**); these compounds were evaluated by the larval packet test (Ducomet et al. 2005), where ethyl 2-methoxybenzoate (**7**, $91.8 \pm 1.7\%$ mortality), ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (**4** $89.1 \pm 1.6\%$ mortality), carvacrol methyl ether (**1**, $71.7 \pm 1.6\%$ mortality) and carvacrol acetate (**2**, $67.8 \pm 2.1\%$ mortality) had the highest acaricidal activity (Ramirez et al. 2013).

To complement this study, two more salicylic acid analogues (2, 5-dihydroxybenzoic acid (**3**) and alcohol 2-hydroxybenzyl (**8**)), as well as two isomers (propyl *p*-hydroxybenzoate (**9**) and methyl *p*-hydroxybenzoate (**10**)) were analyzed to determine the mortality rate; and the Lethal Concentration 50 (LC₅₀) of all compounds were determined in order to assess the most potent compounds; then they were evaluated on the adult tick of *R. (B.) microplus*.

Materials and methods

Carvacrol, salicylic acid and 2, 5-dihydroxybenzoic acid (**3**) were purchased from Aldrich Chemical and J.T. Baker, respectively. Carvacrol and salicylic acid analogues (carvacrol methyl ether (**1**), carvacrol acetate (**2**), ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (**4**), methyl 2,5-dihydroxybenzoate (**5**), 2-(α,α' -dimethoxymethyl)phenol (**6**), ethyl 2-methoxybenzoate (**7**)) were prepared as described in the literature (Briard et al. 2008; Pilyugin et al. 2004; Yan et al. 2010; Liable et al. 2001; Ben Afra et al. 2006). Alcohol 2-hydroxybenzyl (**8**) was provided

by Ph Héctor J. Salgado Z. obtained by a *Novo* technique, and isomers of salicylic acid, propyl *p*-hydroxybenzoate (**9**) and methyl *p*-hydroxybenzoate (**10**) were purchased from Aldrich Chemical.

Obtaining larvae of *Rhipicephalus (B.) microplus*

Adult ticks from cattle previously infected with a susceptible strain of *R. (B.) microplus* were donated by the Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) located in Jiutepec, Morelos, México; they were incubated for a two-week period at 28°C and 80 % relative humidity; the eggs were then collected in vials and incubated under the same conditions. After 14 days the hatched larvae were suitable for the bioassay (Bravo et al. 2008).

Bioassay (*Larval immersion test, LIT*)

A standard solution was prepared by dissolving 84.2 mg of the compound in 2 mL of ethanol, subsequently brought to a volume of 25 mL with distilled water. Serial dilutions were prepared at 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 and 0.065% of the standard solution, using distilled water as a solvent. Solutions were applied on filter paper (Whatman No. 1, 10 x 12 cm); the paper was allowed to dry for a period of 30 min at room temperature; afterwards the papers were bent to form envelopes. 100 larvae of *R. (B.) microplus* were placed inside the envelope with a brush; then larval packages were incubated for 24 hours at 28°C and 80 % relative humidity. The experiment was carried out with six replicates for each dilution, a negative control being used. After the 24 hour period, the dead larvae were quantified and mortality rate was calculated, with the aid of a stereoscopic microscope and a laboratory manual counter. Later on the mortality rate was corrected according to the formula applied by Abbot (1925) (Bravo et al. 2008; Sabatini et al. 2001).

$$\text{Corrected \% mortality} = \frac{\% \text{ test mortality} - \% \text{ control mortality}}{100 - \% \text{ control mortality}} \times 100$$

Bioassay (Adult immersion test, AIT)

The following protocol was modified from an earlier test described by Drummond (1973) (Sabatini et al. 2001; White et al. 2004; Cutullé et al. 2013).

Serial dilutions were prepared at 250, 200, 150, 100 and 50 ppm, using 1mL of DMSO (dimethyl sulfoxide) as a co-solvent which was subsequently brought to a volume of 25 mL with distilled water.

A group of 10 engorged females were weighed and immersed for 30 min in the dilution. Ticks were recovered from the solutions, dried and stuck dorsal surface down on double sided tape on the perforated lid of a plastic Petri dish (5.5 cm diameter, 1.5 cm high). The eggs fell idown to the base of the Petri dish, thus facilitating their collection. The holes in the lid provided air circulation and the Petri dishes were incubated at 28°C, 80% RH to complete the life cycle. At the end of oviposition (14 days), the eggs were weighed and transferred to adapted plastic syringes, identified and sealed with cotton. The eggs were put back into the incubator under the same conditions for larval hatching. The hatching rate was read after 14 days and the data obtained were used to determine the percentage of the reduction of oviposition (% **OR**) and hatching (% **HR**) as described by Domingues et al. in 2013, as well as the egg production rate (**EPR**) to calculate the treatment efficacy (**E**), according to Drummond et al. (1973).

$$OR = \frac{\text{mean weight of eggs in controls (g)} - \text{mean weight of eggs in treated groups (g)}}{\text{mean weight of eggs in controls (g)}} \times 100$$

$$HR = \frac{\text{hatching rate in controls} - \text{hatching rate in treated group}}{\text{hatching rate in controls}} \times 100$$

$$EPR = \frac{\text{weight of eggs (g)}}{\text{weight of females (g)}} \times 100$$

$$E = \frac{EPR \text{ control} - EPR \text{ treated}}{EPR \text{ controls}} \times 100$$

Statistical Analysis

The mean % and corrected mortality rate using Abbot's formula and its standard deviation was calculated. Lethal concentration 50 (LC₅₀) was calculated by using a Probit regression. Regarding AIT, all tests were performed in triplicate, and only the media and standard deviation were reported; a one-way ANOVA was performed and if significant differences were detected a Dunnett test was performed.

Results and discussion

The acaricide activity of salicylic acid analogues and isomers in *R. (B.) microplus* larvae was evaluated, employing the LIT technique. (Table 1)

Table 1 Effect of salicylic acid and its analogues on *R. (B.) microplus* larvae in vitro (% mortality) by LIT

Conc. (%)	Salicylic acid	2,5-dihydroxybenzoic acid (3)	alcohol 2-hydroxybenzyl (8)	propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate (9)	methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate (10)
1	92.62±6.17	27.62±5.42	15.96±2.98	34.14±4.33	79.31±7.52
0.5	12.88±1.32	13.68±3.06	1.89±0.78	10.71±1.28	49.47±7.34
0.25	0	2.18±0.84	0	0	15.50±2.97
0.125	0	0	0	0	4.21±1.22
0.0625	0	0	0	0	1.19±0.49

Where the ANOVA gave an F value of 0.91, no significant differences between the salicylic acid analogues were indicated.

With the results obtained in the previous study (Ramírez et al. 2013), the LC₅₀ was calculated with a probit regression of all compounds tested in larval *R. (B.) microplus*.

Table 2. CL₅₀ of each compound evaluated in larvae *R. (B.) microplus in vitro*.

Compuesto	CL ₅₀ (μmol/mL)
Carvacrol	59.72
carvacrol methyl ether (1)	6.00
carvacrol acetate (2)	5.01
Salicylic acid	**
2,5-dihydroxybenzoic acid (3)	35.69
ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (4)	2.04
methyl 2,5-dihydroxybenzoate (5)	30.32
2 - (α, α'-dimethoxymethyl) phenol (6)	333.13
ethyl 2-methoxybenzoate (7)	0.91
alcohol 2-hydroxybenzyl (8)	**
propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate (9)	**
methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate (10)	11.61

** Cannot compute (insufficient data)

As can be seen in Table 2, ethyl 2-methoxybenzoate (7) was the most potent compound followed by ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (4), carvacrol acetate (2) and carvacrol methyl ether (1), while 2-(α, α'-dimethoxymethyl)phenol was the least potent. The first 4 compounds were submitted for evaluation with the AIT.

With the recopilated data of the selected compounds, parameters such as ovoposition reduction (OR, Table 3), hatching inhibition rate (HR, Table 4) and efficacy (E, Table 5) were determined.

Although carvacrol (Ramírez et al. 2013) and salicylic acid (Silveira et al. 2007) have already been evaluated on *R. (B.) microplus* larvae, there are no reports of evaluation on adult tick in this species; therefore, acaracidal activity on this stage of life cycle of *R. (B.) microplus* was evaluated.

Table 3. Mean results for ovoposition reduction (OR), of carvacrol, salicylic acid and analogues

Conc. ppm/mL	Carvacrol	Salicylic acid	carvacrol methyl ether (1)	carvacrol acetate (2)	ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (4)	ethyl 2-methoxybenzoate (7)
250	15.71± 3.26	-1.26±3.19	26.72± 1.06	25.80±0.27	26.56±1.07	27.00±1.50
200	6.48±4.26	-1.89±0.98	23.59± 1.22	21.42±3.12	21.45±3.02	24.60±2.64
150	0.02±1.45	-11.05±5.7	20.29± 1.99	11.30±1.52	14.02±2.398	22.33±8.91
100	0.09±2.36	-8.76±2.93	16.03± 3.06	6.85±0.49	7.20±3.20	13.91±2.43
50	-2.62±1.21	-7.27±7.39	11.13± 2.39	2.34±1.57	6.20±0.2	11.21±0.68

Table 4. Mean results for hatching inhibition rate (HR), of carvacrol, salicylic acid and analogues

Conc. ppm/mL	Carvacrol	Salicylic acid	carvacrol methyl ether (1)	carvacrol acetate (2)	ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (4)	ethyl 2-methoxybenzoate (7)
250	7.95±0.37	7.09±1.71	12.90±0.42	10.95±0.47	15.59±1.07	13.52±0.75
200	8.17±1.49	6.19±2.39	11.65±0.28	9.15±0.51	11.22±1.42	10.84±0.89
150	6.93±1.97	5.69±2.49	10.29±0.23	7.75±0.63	8.81±0.36	9.82±0.73
100	5.26±1.36	3.99±1.31	9.03±1.06	6.71±0.81	7.01±0.65	8.11±0.50
50	0.26±0.28	0.52±0.21	8.30±0.74	6.03±0.84	6.43±0.92	6.81±0.40

Table 5. Mean results for acaricidal efficacy percentage (E), of carvacrol, salicylic acid and analogues

Conc. ppm/mL	Carvacrol	Salicylic acid	carvacrol methyl ether (1)	carvacrol acetate (2)	ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (4)	ethyl 2-methoxybenzoate (7)
250	16.76±2.27	1.11±2.22	26.76±1.12	26.33±0.19	27.29±0.75	27.97±1.05
200	9.36±2.97	-1.31±0.68	23.33±0.85	22.50±2.17	22.77±2.10	24.21±1.84
150	0.98±1.01	-7.86±3.97	21.88±1.39	11.22±1.05	15.36±15.36	17.97±6.20
100	1.26±1.64	-6.47±2.04	18.26±2.13	7.45±0.34	6.81±2.23	15.77±1.69
50	-2.26±0.84	-8.12±5.14	11.33±1.66	2.98±1.10	6.68±0.14	11.87±0.47

Regarding OR, the ANOVA gave an F value of 9.26, indicating a statistical difference between the parental compounds and the analogues; however, no significant difference between the analogues was found. In the case of HR, the ANOVA gave an F value of 3.78, thus indicating with the Tukey test a significant difference between the compounds and salicylic acid, demonstrating that salicylic acid is not an effective compound on adult ticks, nor is E with an F value of 8.23.

Conclusion

All evaluated compounds presented better acaricide activity at the larval stage as compared with the adult stage of *R. (B.) microplus*, ethyl 2-methoxybenzoate (7) and ethyl 2,5-dihydroxybenzoate (4), being the best candidates to continue their study.

Acknowledgements

M. Sc. Concepción Ramírez Lubianos gratefully acknowledges the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México for a doctoral scholarship No 52807

Study partially supported by projects PAPIIT-DEGPA UNAM (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Tecnológica- Dirección General Asuntos de Personal Académico) IN-201710 and PAPIME (Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza) PE204211.

References

- Alonso M, Rodríguez R, Fragoso H, Rosario R (2006) Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas, *Arch Med Vet*, 38: 105-114. Available: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=173013748003#>, accessed 12-april-2012.
- Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P (2006) Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure, *Lett Appl Microbiol*, 43:149–154. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x
- Bravo M, Coronado A, Henríquez H (2008) Suceptibilidad de larvas y adultos de *Bophilus microplus* al ixodicida coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela, *Zootecnia Trop* 26 (1): 41-46. Available: <http://www.bioline.org.br/request?zt08006>, accessed 10-March-2012.
- Briard E, Zoghbi S, Imaizumi M, Gourley J, Shetty H, Hong J, Cropley V, Fujita M, Innis R, Pike V (2008) Synthesis and evaluation in monkey of two sensitive ¹¹C-labeled aryloxyanilide ligands for imaging brain peripheral benzodiazepine receptors *in vivo*, *J Med Chem* 51(1):17–30. doi: 10.1021/jm0707370
- Coskun S, Girisgin O, Kürkcüoğlu M, Malyer H, Girisgin AO, Kirimer N, Baser KH (2008) Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil

- against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae), [Parasitol Res](#) 103 (2): 259–261. doi: 10.1007/s00436-008-0956-x
- Cristani M, D'Arrigo M, Mandalari G, Castelli F, Sarpietro MG, Micieli D, Venuti V, Bisignano G, Saija A, Trombetta D (2007) Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity, [J Agric Food Chem](#) 55 (15): 6300-6308. doi: 10.1021/jf070094x
 - Cutullé C, Lovis L, D'Agostino B, Balbiani G, Moricia G, Citroni D, Reggi J, Caracostantogolo J (2013) In vitro diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina, [Vet Parasitol](#), 192:296– 300, doi:10.1016/j.vetpar.2012.10.014
 - Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G (2007) Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils, [J. Agric Food Chem](#) 55 (12): 4863-70. doi: 10.1021/jf0636465
 - Domingues L, Giglioti R, Feitosa K, Fantatto R, Dias M, De Sena M, Pereira G, Becharaa G, De Souza A (2013) In vitro activity of pineapple extracts (*Ananas comosus*, Bromeliaceae) on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae), [Exp Parasitol](#), 134:400–404, doi:10.1016/j.exppara.2013.03.021
 - Du WX, Olsen CE, Avena RJ, McHugh TH, Levin CE, Friedman M (2008) Storage stability and antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7 of carvacrol in edible apple films made by two different casting methods, [J Agric Food Chem](#) 56 (9):3082-8. doi: 10.1021/jf703629s
 - Ducomet S, Barré N, Miller R, Garine M (2005) Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified larval packet test, [Vet Parasitol](#) 130: 285-292. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.04.018
 - Drummond R, Crust S, Trevino J, Gladney W, Graham O (1973) *B. annulatus* and *B. decoloratus*; laboratory tests of insecticides; [J Econ Entomol](#), 66:130–133.
 - Liable L, Incarvito C, Rheingold A (2001) Biometallic reactivity preparation and properties of bimetallic complexes formed by binucleating ligands

- bearing 4- and 6-coordinate site, *Inorg Chem* 40 (9): 2147-2155. doi: 10.1021/ic0012625
- Mackowiak P.A (2000) Brief history of antipyretic therapy, *Clin Infect Dis Suppl* 5:S154-156. doi: 10.1086/317510
 - [Jayakumar S](#), [Madankumar A](#), [Asokkumar S](#), [Raghunandhakumar S](#), [Gokula dhas K](#), [Kamaraj S](#), Divya MG, Decaki T (2012) Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats, *Mol Cell Biochem* 360 (1-2):51-60. doi:10.1007/s11010-011-1043-7
 - Pilyugin V, Sapozhikov Y, Sapozhnikova N (2004) Acyl derivatives of 2-aminobenzimidazole and their fungicide activity, *Russ J Gen Chem* 74 (5): 738-743. doi:10.1023/B:RUGC.0000039088.87053.eb
 - Ramírez C, Ibarra F, Pérez H, Manjarrez N, Salgado H, González Y (2014) In vitro assessment of the acaricidal activity of computer-selected analogues of carvacrol and salicylic acid on *Rhipicephalus Boophilus* microplus, *Exp Appl Acarol* , 61:251–257, doi:10.1007/s10493-013-9688-4
 - Rangel G, Castro E, Beltran E, Reyes H, García E (2010) El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas, *Biológicas* 12(2): 90- 95. Available <http://www.biologicas.umich.mx/documentos/no12/diciembre/Dic-art4.pdf>, accessed 9-May-2013.
 - [Rosario R](#), [Fernández M](#), [Rojas E](#), [García Z](#), [Fajardo J](#) (2011) Manual de Control Integral de la Garrapata *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *Microplus* del Ganado Bovino en el Estado de México, 17-21
 - Sabatini G, Kemp D, Hughes H, Nari A, Hansen J (2008) Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Vet Parasitol*, 95:53-62, doi:10.1016/S0304-4017 (00) 00406-4
 - Silveira A, Daemon E, Goncalves G, (2007) Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid, and methyl salicylate on *Boophilus*

microplus (Canestri 1887) (Acarie: Ixodidae) larve, *Parasitol Res* 101(3):809-811. doi:10.1007/s00436-007-0560-5

- Ultee A, Smid EJ (2001) Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*, [Int J Food Microbiol](#) 64 (3): 373-8. doi:[10.1016/S0168-1605\(00\)00480-3](#)
- White H, Plummer P, Kemper C, Miller R, Davey R, Kemp D, Hughes S., Smith C, Gutierrez J (2004), An In Vitro Larval Immersion Microassay for Identifying and Characterizing Candidate Acaricides, *Med Entomol*, 41(6): 1034-1042 , doi:0022-2585/04/1034\$1042\$04.00/0 _ 2004
- Yan Y, Bo Q, Ren C, Chen X, Kwan Y, Yr R, Zhang D, Su H, Zeng H (2010) Synthesis, structural investigations, hydrogen-deuterium exchange studies, and molecular modeling of conformationally stabilized aromatic oligoamides, *J Am Chem Soc* 132(10): 5869-5879. doi:10.1021/ja100579z
- Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, Deng SW, Yin LL, Zhuang YZ (2012) Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2, *Cytotechnology* 4(1):43-51. doi:10.1007/s10616-011-9389-y