

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA CENTROAMERICANO DE MAESTRÍA EN ENTOMOLOGÍA

ESTANDARIZACIÓN DE UN BIOENSAYO ACARICIDA SOBRE
Rhipicephalus (Boophilus) microplus Y *R. sanguineus* s.l. (IXODIDA: IXODIDAE)

NATHANIEL KADOCH ZÚÑIGA

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

-2013-

57

18 MAR 2014

Oba

ESTANDARIZACIÓN DE UN BIOENSAYO ACARICIDA SOBRE
Rhipicephalus (Boophilus) microplus Y *R. sanguineus* s.l. (IXODIDA: IXODIDAE)

Tesis

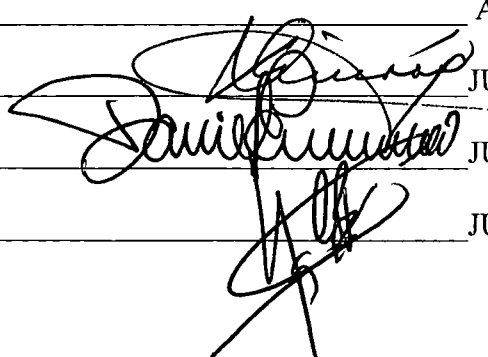
Sometida para optar al título de Maestro en Ciencias

Con énfasis en Entomología

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

APROBADO:

ASESOR
JURADO
JURADO
JURADO



DEDICATORIA

A mi familia,
A mi esposa,
A mis amigos,
A mis clientes,
A sus mascotas...

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Dionisio Olmedo, asesor de este trabajo, por la asesoría en las extracciones y compra de los solventes, cristalería y papel filtro usados en estos ensayos.

A los doctores Dora Isabel Quiroz y Daniel Emmén, de la Universidad de Panamá y al magíster Sergio Bermúdez del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, por sus recomendaciones durante el desarrollo de este trabajo y la revisión de los borradores.

A los señores Ángel, Ricardo y Elizabeth, Bibliotecarios del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, por su tiempo y apoyo en la consecución de material bibliográfico para este trabajo.

Al magíster Roberto Miranda del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, ya que durante su jefatura de la Sección de Entomología Médica, ofreció el espacio físico del laboratorio de resistencia del instituto, para ensayar parte de lo que aquí presentamos.

A la Universidad de Panamá, específicamente al doctor Alexander Pérez, Director Médico del Complejo Hospitalario Veterinario de Corozal, y al Programa Centroamericano de Maestría en Entomología, a los doctores Héctor Barrios, Enrique Medianero, Cheslavo Koritkowski, y la Vickelda Pérez, secretaria del Programa, por cederme espacio físico para desarrollar los intentos de cría de garrapatas en caninos y conejos, para los bioensayos con garrapatas y por coordinar la parte administrativa para finalizar este trabajo.

A mi esposa Indira Simón, por ayudarme durante el desarrollo de los bioensayos, y por darme ánimo y apoyo anímico durante esta fase de desarrollo profesional.

A mis padres, Ramón Kadoch y Santos Zúñiga, mis hermanos Aimee y Guillermo Alegría, y a mi tía Marian Tibí, por el apoyo económico y moral durante estos años en la Maestría.

Al doctor Cesar J. Maure, Director Ejecutivo de Cuarentena Agropecuaria, por cederme el tiempo solicitado y el espacio en las instalaciones del Laboratorio de Entomología en Paso Canoas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria	
Agradecimientos	
Índice de Contenidos.....	I
Índice de Cuadros.....	IV
Índice de Figuras.....	IIV
Abreviaturas.....	IIIV
Resumen	1
Summary	2
I. Introducción	3
1.1 Situación actual de las garrapatas en el mundo y su importancia de estudio.....	4
1.2 Importancia en Salud Pública.....	5
1.3 Taxonomía del género <i>Rhipicephalus</i> Koch, 1844 y del subgénero <i>Boophilus</i> Curtice, 1891.....	7
1.4 Biología de <i>Rhipicephalus sanguineus s.l.</i> Latreille	9
1.5 Biología de <i>Rhipicephalus(Boophilus) microplus</i> Canestrini.....	11
1.6. Resistencia a plaguicidas.....	12
1.7 Mecanismos de resistencia.....	13
1.8 Situación actual de los estudios de garrapatas en Panamá y enfermedades transmitidas por garrapatas en Panamá.....	14
1.9 Bioensayos en entomología.....	17
1.9.1 Descripción de los solventes y concentraciones utilizadas	19

Dimetilsulfóxido	19
Diclorometano	19
<i>n</i> -Heptano	19
Etanol	20
1.9.1 Descripción de los insecticidas evaluados.....	20
Diclorvos	20
Permetrina	21
1.9.2 Descripción del extracto natural evaluado.....	21
<i>Simaba cedron</i> Planch.	21
Justificación.....	22
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	25
II. Materiales y métodos.....	26
2.1 Colecta de garrapatas	27
2.2 Cría de garrapatas <i>R. sanguineus</i> s.l. y larvas de <i>R. (B.) microplus</i>	28
2.3 Paquete larval.....	29
2.4. Conteo de garrapatas.....	31
2.5.Solventes y productos: concentraciones utilizadas.....	33
2.6. Análisis de datos.....	37
III. Resultados y Discusión	38
3.1 Efecto del DMSO.....	38
3.2 Efecto del Diclorometano.....	42
3.3. Efectos del <i>n</i> -Heptano.....	44

3.4 Efecto del Etanol.....	46
3.5 Efecto del Diclorvos.....	49
3.6 Efecto de la Permetrina.....	53
3.7 Efecto de la Fracción de <i>S. cedron</i> en n-heptano.....	55
IV. Conclusiones y Recomendaciones.....	59
4.1 Conclusiones	60
4.2 Recomendaciones	61
Literatura citada	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Hemoparásitos de interés veterinario y en salud pública transmitidos por garrapatas <i>R. sanguineus</i> s.l. y <i>R. (B). microplus</i>	7
Cuadro 2 Números y especies de garrapatas colectadas por localidad, a partir de las cuales se obtuvieron las larvas usadas en los bioensayos.....	27
Cuadro 3 Diluyentes empleados en los ensayos con larvas de garrapatas utilizando la Técnica de Paquete Larvario modificada.....	34
Cuadro 4 Acaricidas empleados en los ensayos con larvas de garrapatas utilizando la Técnica de Prueba Paquete Larvario modificada.....	34
Cuadro 5 Efecto del DMSO en larvas de <i>R. sanguineus</i> s.l. expuestas a diferentes concentraciones de solventes, usando la Prueba de Paquete Larvario modificada (LPTm).....	40
Cuadro 6 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> expuestas a diferentes concentraciones de Dimetil sulfóxido (DMSO), usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).. ..	41
Cuadro 7 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. sanguineus</i> s.l. expuestas a Diclorometano, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).....	43
Cuadro 8 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> expuestas a Diclorometano, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm)....	44

Cuadro 9 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. sanguineus</i> s.l. expuestas a n-Heptano, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).....	45
Cuadro 10 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> expuestas a n-Heptano, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).....	45
Cuadro 11 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. sanguineus</i> s.l. expuestas a diferentes concentraciones de Etanol, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).....	47
Cuadro 12 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> expuestas a diferentes concentraciones de Etanol, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).	48
Cuadro 13 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. sanguineus</i> s.l., expuestas diferentes concentraciones de diclorvos (NUVAN®), usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).....	50
Cuadro 14 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. (B.) microplus</i> expuestas a diferentes concentraciones de diclorvos (NUVAN®), usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).	51
Cuadro 15 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. sanguineus</i> s.l. expuestas a concentraciones de Permetrina, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).....	54

Cuadro 16 Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de <i>R. sanguineus</i> s.l. expuestas a diferentes concentraciones de extracto oleoso de <i>S. cedron</i> , usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).	55
Cuadro 17 Grado de susceptibilidad resumido de las larvas de <i>R. sanguineus</i> s.l. y <i>R. (B.) microplus</i> a los diferentes diluyentes empleados utilizando la Técnica de Paquete Larvario modificado	57
Cuadro 18. Grado de susceptibilidad resumido de las larvas de <i>R. sanguineus</i> s.l. y <i>R. (B.) microplus</i> a los diferentes acaricidas empleados utilizando la Técnica de Paquete Larvario modificado.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de la morfología de la hembra y el macho de <i>R. sanguineus</i> s.l.	8
Figura 2 Esquema de <i>R. (B.) microplus</i>	9
Figura 3 Hembras teleóginas de <i>R. sanguineus</i> s.l. (A) y <i>R. (B.) microplus</i> (B) colocadas en las platos de Petri mientras ovipositaban	28
Figura 4 A: impregnación del papel filtro (96 cm ²) con 1 ml de solvente. B: secado del papel filtro.....	29
Figura 5 Procedimientos para la elaboración de un Paquete Larvario.....	30
Figura 6 Conteo de garrapatas en el estereoscopio.....	31
Figura 7 Huevos de <i>R. sanguineus</i> s.l. y larvas de <i>R. (B.) microplus</i> en jeringillas.....	32
Figura 8 Extracción de las larvas de una jeringuilla y vista de la trampa que se usó para impedir el escape de las larvas en cada bioensayo	33

ABREVIATURAS

LPT	Prueba de Paquete Larvario
<i>R. sanguineus</i> s.l.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> sensu lato
<i>R. (B.) microplus</i>	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
<i>S. cedron</i>	<i>Simaba cedron</i>
DMSO	dimetilsulfoxido

RESÚMEN

Las garrapatas de la familia Ixodidae, tienen importancia tanto en salud pública como en medicina veterinaria, por el efecto económico directo de su parasitismo y por ser vectores de hemopatógenos en animales y humanos. Es poca la información publicada de resistencia *in vitro* en poblaciones de garrapatas panameñas, y se desconoce el estado actual de la resistencia a plaguicidas en Panamá. Además los autores de estudios de resistencia en garrapatas, no se ponen de acuerdo con la metodología a usar para probar productos comerciales y naturales en condiciones de laboratorio. Para ello, se colectaron hembras ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. y *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, de caninos y bovinos en Panamá. Las mismas fueron colocadas en platos de Petri hasta su oviposición, y sus huevos mantenidos en jeringuillas de 3ml a temperatura y humedad ambiental hasta su eclosión. Las larvas así obtenidas, se usaron en una Prueba de Paquete Larvario, para evaluar la toxicidad de solventes orgánicos como etanol 95%, 75% y 50%, diclorometano, *n*-heptano, dimetilsulfoxido al 1% y 5%, un plaguicida comercial (diclorvos), plaguicida patrón (permetrina) y un extracto oleoso de semilla de *Simaba cedron*. En los resultados, *R. sanguineus* s.l., presentó baja mortalidad en los ensayos con etanol, DMSO al 1%; con el *n*-heptano y diclorometano hubo mortalidad mayor al 20%, y con el DMSO al 5% se obtuvo una mortalidad mayor al 90%; hubo elevada resistencia a la permetrina pero resultó ser medianamente susceptible al diclorvos; con el extracto oleoso de semilla de *S. cedron* obtuvo mortalidades del 50% diluido al 5% y de 70% diluido al 10%. En *R. (B.) microplus*, hubo de baja a nula mortalidad en los ensayos con etanol, DMSO y *n*-heptano, pero se mostró susceptible al diclorvos, obteniendo un 100% de mortalidad en todas las concentraciones probadas. Ambas especies fueron susceptibles al solvente diclorometano, donde se obtuvieron mortalidades mayores al 20%.

SUMMARY

Ticks belonging to Ixodidae family are important in public health as well as in veterinary medicine, because of the economic effect of the parasitism and because they are vectors of pathogens in animals and people. Few studies have been carried out and published about Panamanian resistance in ticks, and their actual resistance to pesticides is unknown in Panama. Besides, authors in tick resistance disagree about the right methodology to prove commercial and natural products in lab conditions. For this reason, were collected engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* s.l. and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, from dogs and bovines from Panama. Ticks were kept in petri dishes until egg-laying, and eggs were kept in syringes until their hatching. Larvae were used to evaluate the Larvae Package Test, to evaluate the organic solvents toxicity (ethanol, dichloromethane, n-Heptane, dimethylsulfoxide, diclorvos, permethrin), as well as an oily botanic extract from seeds of *Simaba cedron*. *R. sanguineus* s.l. showed low mortality with ethanol 50%, 75% and 95% and DMSO 1%; their showing mortality more than 20% with dichlorometan and *n*-heptane and with 5% DMSO their showed mortality more than 90%; their showed high resistance to permethin but susceptible to diclorvos; with the *S. cedron* oil their mortality were more than 50% in 5% dilution and 70% with the 10% dilution. In other hand, *R. (B.) microplus* showed low to none mortality with ethanol, DMSO and *n*-heptane, but highly susceptible to diclorvos in all test concentrations (100% mortality). Both ticks species showed more than 20% mortality with diclorometano.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación actual de las garrapatas en el mundo y la importancia de su estudio

El orden Ixodida posee cerca de 870 especies de garrapatas, divididas en tres familias y 18 géneros reconocidos. Las garrapatas de la familia Ixodidae, conocidas comúnmente como “garrapatas duras”, cuentan con 685 especies correspondientes a 12 géneros. Sólo en la Región Neotropical, se tienen identificadas 117 especies de garrapatas de la familia Ixodidae, repartidas en cinco géneros: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Pereira *et al.*, 2008).

Muchas especies de garrapatas de la familia Ixodidae, están ampliamente distribuidas en la región tropical y subtropical y son de extrema importancia sanitaria y económica. Casi el 80% de la población mundial de ganado bovino, se encuentra expuesta a las parasitosis por garrapatas. Las especies de garrapatas y las enfermedades que transmiten, difieren por la región ecológica donde se desarrollan, pero su impacto en la salud animal es importante en donde estas ocurran (FAO, 2004).

La importancia de las garrapatas en la salud animal, radica en su capacidad de transmitir agentes infecciosos, ocasionar anemias, envenenamiento, parálisis y lesiones directas sobre sus hospederos durante la hemofagia (Pereira *et al.*, 2008). En el ganado bovino, las pérdidas económicas son resultado de merma en la producción láctea, pérdida de peso, descartes de cueros, y los gastos ocasionados por la compra de productos para su control (FAO, 2004). En caninos, especialmente mascotas, aún no se contabilizan las inversiones económicas en consultas, exámenes de laboratorio,

medicamentos y plaguicidas para control de las poblaciones de garrapatas (experiencia personal).

1.2 Importancia en Salud Pública

En materia de salud pública, es conocida la capacidad de ciertas especies de garrapatas, de transmitir a humanos y animales, patógenos con capacidad zoonótica comunes en animales silvestres y domésticos, entre los que se destacan ciertas especies de bacterias intracelulares (*Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Haemobartonella*, *Rickettsia*, *Hepatozoon*) y protozoarios sanguíneos, como son *Babesia*, *Theileria*, e incluso *Leishmania* (Dantas-Torres, 2008 y 2010).

En Pernambuco, Brasil, se constató el parasitismo de *R. sanguineus* s.l., en cuatro propietarios de mascotas. Este es el primer reporte de *R. sanguineus* s.l., parasitando humanos en Brasil (Dantas-Torres et al, 2005). El mismo es de importancia dado que se ha encontrado borreliosis de Lyme y *Rickettsia rickettsii* en esta garrapata, y las personas expuestas al parasitismo, tiene elevadas probabilidades de sufrir de estas enfermedades. Otro estudio tipo encuesta, indicó que el 63% de las mujeres y 78% de los hombres, trabajadores en clínicas veterinarias, reportaron presencia de *R. sanguineus* s.l. sobre su cuerpo luego de manejar perros parasitados con ella, más no se pudo constatar su parasitismo (Louly et al, 2006).

En Brasil, se reporta un caso de parasitosis en humanos, causado por *R. (B.) microplus*. El mismo se da en un área rural, en ganado de leche para subsistencia, y

con fuerte parasitismo sobre equinos y caninos (Soares et al, 2007). Son pocos los reportes de parasitismo en humanos, que impliquen a esta garrapata.

En Colombia, se ha encontrado alta prevalencia de anticuerpos contra *Bartonella henselae*, *B. quintana* y *Babesia microti*, en humanos expuestos y no expuestos a animales domésticos (Buevas et al, 2008).

Labruna et al (2011), indica la presencia de 13 especies de *Rickettsia* en América Latina, el Caribe, donde consideraron los hospederos humanos y animales. Entre los vectores de las mismas se encuentran garrapatas de la familia Ixodidae, pulgas (Siphonaptera) y piojos (Phtiraptera).

Se ha detectado ADN de *Leishmania infantum* en estructuras internas de garrapatas *R. sanguineus* s.l. Este protozooario es causante de la leishmaniasis visceral en América del Sur y países mediterráneos, afectando tanto caninos como seres humanos. Estas investigaciones dan un nuevo giro al conocimiento de las parasitosis transmitidas por garrapatas, ya que el vector común de este protozooario, son las chitras de la familia Psychodidae (Diptera) (Dantas-Torres et al, 2010; Solano-Gallego et al, 2012). En el cuadro 1 se encuentran los parásitos que han sido detectados en *R. sanguineus* s.l. y *R. (B). microplus*.

Cuadro 1. Hemoparásitos de interés veterinario y en salud pública transmitidos por garrapatas *R. sanguineus* s.l. y *R. (B.) microplus*. Tomado de * Solano-Gallego, 2011; ** Dantas-Torres, 2008; *** Papalardo y Breitschwerdt, 2001; ^Mancitire y Vincent-Johnson, 2001; ^^Pereira et al, 2008

<i>R. (B.) microplus</i>	<i>R. sanguineus</i> s.l.
<i>Anaplasma marginale</i> ^^	<i>Anaplasma platys</i> **
<i>Babesia bovis</i> ^^	<i>Ehrlichia canis</i> **
<i>Babesia bigemina</i> ^^	<i>Bartonella vinsonii</i> ***
	<i>Babesia canis</i> *
	<i>Babesia gibsoni</i> *
	<i>Babesia vogeli</i> *
	<i>Coxiella burnetii</i> **
	<i>Hepatozoon canis</i> **^
	<i>Leishmania infantum</i> **
	<i>Rickettsia rickettsii</i> **
	<i>Rickettsia conorii</i> **
	<i>Theileria equi</i> **

1.3 Taxonomía del género *Rhipicephalus* Koch, 1844 y del subgénero *Boophilus* Curtice, 1891

El género *Rhipicephalus*, de origen africano, cuenta con aproximadamente 70 especies reconocidas en el mundo. Estudios filogenéticos incluyen las cinco especies del género *Boophilus* (*R. (B.) annulatus*, *R. (B.) decoloratus*, *R. (B.) geigy*, *R. (B.) kohlsi*, y *R. (B.) microplus*), considerándose este último un subgénero de *Rhipicephalus* (Barros-Battesti et al, 2006; Pereira et al, 2008) La evidencia morfológica y molecular, indican que el género *Rhipicephalus* es parafilético con respecto a *Boophilus*, por lo tanto se le considera un subgénero del primero (Mullen y Barker, 2003). En el continente americano, además de *R. (B.) microplus*, se encuentra

R. (B.) annulatus, restringiéndose su presencia al noreste de México, por lo tanto fuera de la región Neotropical (Pereira et al, 2008).

Características diagnósticas del género Rhipicephalus Koch, 1844 (adaptado de Murrell y Barker, 2003): ojos presentes, hipostoma y palpos cortos adultos con basis capituli hexagonal, placas adanales en los machos con ángulo posterior cercano al borde ventral del opistosoma, placas accesorias usualmente presentes en machos, segmento 1 del palpo sin espina, dentición del hipostoma 3/3 o 4/4, machos con o sin proceso caudal, con o sin ornamento. Especie tipo: *R. sanguineus*.

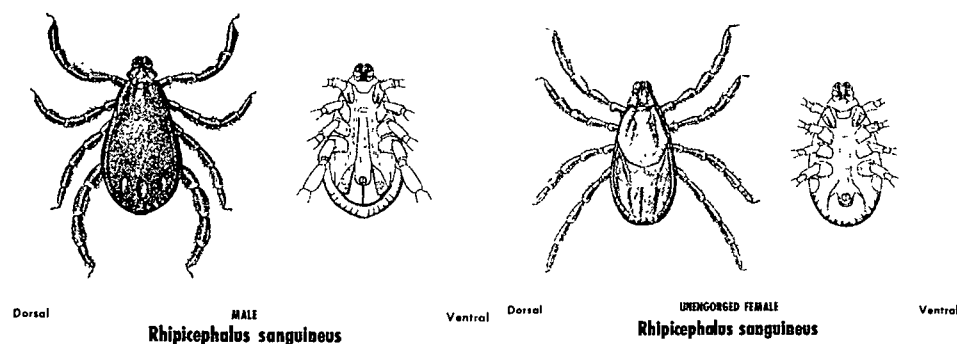


Figura 1. Esquema de la morfología de la hembra y el macho de *R. sanguineus* s.l. (extraído de Strickland et al, 1976)

Características diagnósticas del subgénero Boophilus Curtice, 1891 (adaptado de Murrell y Barker, 2003): sin ornamentos, machos con placas accesorias y adanales, surco anal poco aparente (hembras) o ausente (machos), festones ausentes, palpos crestados lateral y dorsalmente. Especie tipo: *R. (B.) annulatus* (Say, 1821) Newman, 1897.

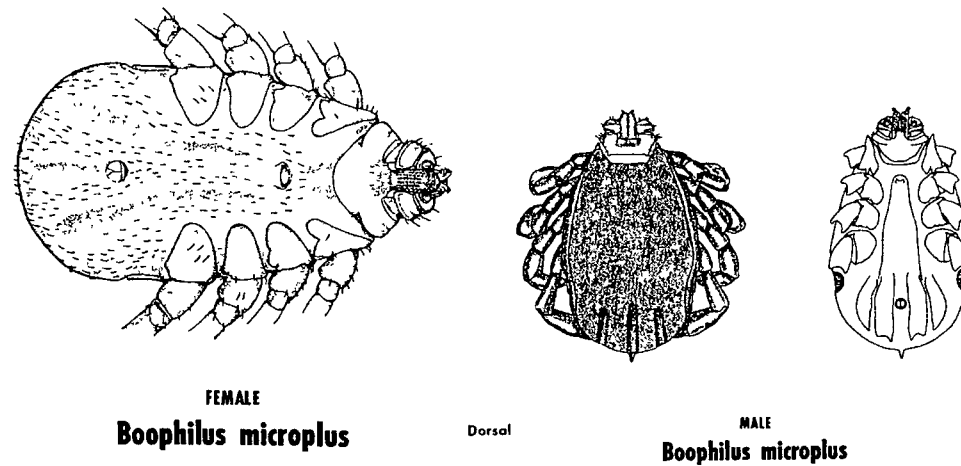


Figura 2. Esquema de *R. (B.) microplus* (extraído de Strickland et al, 1976)

1.4 Biología de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. Latreille

R. sanguineus s.l. o garrapata marrón del perro, de ciclo trioxeno (tres hospederos) está ampliamente distribuida en todo el mundo, parasitando no solo caninos sino también otros hospederos, incluyendo seres humanos (Dantas-Torres, 2010).

Se le reconoce por ser vector de patógenos comunes a animales y humanos, entre los cuales incluyen: *Babesia canis*, *B. vogeli*, *B. microti*, *B. gibsoni* Ehrlichia *canis*, *Rickettsia conorii*, *R. rickettsi*, *Coxiella burnetii*, *Hepatozoon canis* y *Haemobartonella canis* (Barros-Battesti et al. 2006; Solano-Gallego; Baneth, 2011).

Muchos especímenes identificados primariamente como *R. sanguineus*, actualmente representan especies muy relacionadas con la misma, por lo que se habla de un complejo de especies, las cuales se distribuyen en África, Europa, Cercano y

Lejano Oriente. Estas incluyen el grupo *R. sanguineus*, las cuales incluyen *R. sanguineus* s. str., *R. turinacus* Pomerantsev, 1936 y *R. camicasi* Morel, Mouchet, Rodhain, 1976 (Barros-Battesti et al. 2006). En el Neotrópico, se han realizado estudios que indican diferencias morfológicas, genéticas, biológicas y vectoriales de consideración, entre poblaciones suramericanas de *R. sanguineus* s.l., lo cual hace pensar en la existencia de un complejo de especies en el continente americano (Moraes-Fhilo et al, 2008; Burlini et al, 2010; Moraes- Fhilo et al 2011; Nava et al, 2012).

El período de alimentación de *R. sanguineus* s.l., varía entre dos días (larvas) hasta varias semanas (adultos), dependiendo del estadio de desarrollo en que se encuentre y del hospedero (las hembras se mantienen mayor tiempo en conejos que en perros). Pueden variar los sitios donde se adhiere para alimentarse (pliegue interdigital, pabellón de la oreja, región inguinal y axilas). Esta especie copula sobre el hospedero, y la ingesta de sangre estimula la ovogénesis en la hembra y la espermatogénesis en el macho. Las hembras pueden ovipositar un promedio de 2000 a 4000 huevos y pueden producir cuatro generaciones por año. El tiempo de incubación puede variar entre seis días hasta varias semanas. En nuestras condiciones, este tiempo varía entre 18-22 días (observación personal).

Hay razas de perros, susceptibles y otras resistentes a la infestación por garrapatas, lo cual puede repercutir en la sobrevivencia de estos organismos. Ejemplo de ello es la raza Cocker Spaniel, la cual es susceptible a la infestación, mientras los Beagle, presentan marcada resistencia a la proliferación de garrapatas (Louly et al,

2009). Los perros de áreas urbanas, como suburbanas y rurales, pueden presentar infestaciones, dependiendo de la resistencia innata y del uso de plaguicidas ambientales o desparasitantes internos o externos (observación personal).

1.5 Biología de *R. (B.) microplus* Canestrini

La especie *R. (B.) microplus*, de ciclo monóxeno (un hospedero), originaria de Asia, fue introducida a los países tropicales y subtropicales de América, por importación de ganado desde ese continente. Con excepción de Chile, se distribuye desde el norte de Argentina hasta México, y las islas del Caribe (Pereira et al, 2008, Barros-Battesti et al, 2006).

R. (B.) microplus es reconocida por ser el vector de la llamada “Tristeza Parasitaria”, condición causada por protozoarios del género *Babesia* y bacterias del género *Anaplasma*. La hembra transmite transovarialmente *Babesia bovis* y *B. bigemina*, a las larvas, que una vez infectadas, pueden transmitir *B. bovis*. La transmisión de *B. bigemina*, ocurre mientras los estadios de ninfa y adultos se alimentan en los bovinos (Pereira et al, 2008).

R. (B.) microplus, parasita de preferencia bovinos, pero es capaz de alimentarse de otras especies animales como bovinos silvestres y humanos, a falta de otras fuentes de alimento (Soares et al, 2007). La duración de su ciclo parasítico varía entre 18 a 30 días. La hembra es capaz de ovipositar entre 2000 a 4000 huevos, lo que representa el 50-60% del peso de la hembra (Barros-Battesti et al, 2006). Se especula, que las garrapatas en fase parasítica (larvas, ninfas y adultos), representan el 5% de su

población total. El 95% restante, se encuentra en el pasto que incluyen hembras ingurgitadas en fase de preoviposición y oviposición, huevos en incubación y larvas en estado no parasítico (Pereira et al, 2008).

1.6 Resistencia a plaguicidas

La resistencia de las garrapatas a los plaguicidas, es un fenómeno inherente. Es el resultado de la exposición prolongada de poblaciones de garrapatas a desparasitantes químicos subdosificados. La sobrevivencia y por ende la reproducción de las garrapatas menos afectadas por los desparasitantes, hace más resistentes a las siguientes generaciones. La resistencia a un acaricida o insecticida puede ser descrita como una reducción de la susceptibilidad de un parásito al acaricida o insecticida cuando este es usado a la concentración recomendada y de acuerdo a todas las recomendaciones para su uso (FAO, 2004).

Según Giorghiu y Lagunes-Tejeda (1991), en 1989 había 481 especies de artrópodos resistentes a plaguicidas. El 58,8% son plagas agrícolas y el 41,2% (198 especies) tienen interés médico y veterinario. Al Orden Acarina, que incluye ácaros y garrapatas, le corresponde el 14,1% (71 especies) resistentes hasta esa fecha. De este total, 21 especies de ácaros son resistentes a diferentes compuestos orgánicos usados en su control, encontrándose poblaciones de garrapatas resistentes al DDT, ciclodienos, organofosforados, piretroides amidinas y lactonas macrocíclicas.

En Costa Rica se reportó la presencia de *R. (B.) microplus* totalmente susceptible a compuestos organofosforados (89.6%). En el mismo estudio, hay

presencia de poblaciones de garrapatas resistentes a piretroides (76%) en un total de 414 fincas ganaderas muestreadas dentro de un programa nacional para detección de resistencia y control de esta especie de garrapata. También se reporta el registro de 50 productos comerciales para control de garrapatas en Costa Rica (Álvarez et al, 1999; Álvarez, 1999).

La resistencia cruzada, es el mecanismo desarrollado por los artrópodos para sobrevivir a la exposición de insecticidas relacionados químicamente (por ejemplo, coumaphos, clorpiriphos, u otro organofosforado), usando un patrón de desintoxicación genético. Resistencia múltiple, es el desarrollo de varios mecanismos de desintoxicación a varias clases de insecticidas no relacionados químicamente, como por ejemplo la resistencia a productos piretroides, organofosforados, formaminidas, etc (Fernandez et al, 2008).

1.7 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia en garrapatas son de varios tipos:

- a. *La resistencia por comportamiento:* se presenta cuando un artrópodo modifica su conducta para evitar el contacto con el insecticida (Alonso-Díaz et al, 2006).
- b. *La resistencia por disminución de la penetración:* se presenta cuando se modifica el exoesqueleto para inhibir o retardar la penetración del químico, teniendo que ver la concentración de lípidos que puede facilitar o retardar el paso del plaguicida a través de la estructura (Alonso-Díaz et al, 2006).

c. *La resistencia metabólica*: caracterizada por el aumento de la capacidad de detoxificar o eliminar los productos acaricidas usados para tratarlos. Se da por dos mecanismos: aumento en la expresión enzimática responsable del metabolismo de los químicos (citocromo P450, monooxigenasas, esterasas, glutatión-S-transferasas); aumento de la especificidad de esas enzimas al sustrato (Fernández et al, 2008).

d. *La resistencia por insensibilidad del sitio de acción*: se caracteriza por mutación del nucleótido de la región codificadora de un gen. Esa mutación, puede conferir el cambio de un aminoácido, trayendo como consecuencia, una alteración de la estructura tridimensional de la proteína formadora del receptor. Esto reduce o bloquea la ligación de la molécula al sitio de acción, resultando en la resistencia (Fernández et al, 2008)

1.8 Situación actual de los estudios de garrapatas y enfermedades transmitidas por garrapatas en Panamá

Los primeros reportes de garrapatas y enfermedades asociadas a su parasitismo en el Istmo de Panamá, datan del tiempo de la construcción de Canal. Darling (1913) hizo el primer reporte de Piroplasmosis (=Babesiosis) equina para Panamá y América, en un equino de trabajo que murió de la infección en la antigua Zona del Canal de Panamá. El agente causal de la conocida Fiebre Biliar era *Piroplasma* (=Babesia) *caballi* Nuttall, (1910). Se colectaron garrapatas del cadáver, las cuales fueron identificadas como *Dermacentor nitens* y *Amblyomma cajennense*.

Clark (1918) diagnosticó *Babesia bigemina*, usando una técnica de impronta de cerebro (consiste en presionar levemente un pequeño trozo de tejido sobre un portaobjeto, secarlo al aire y luego teñirlo), en 29 terneros importados de los Estados Unidos, y que murieron en fincas de Corozal y Miraflores, antigua Zonal del Canal. Se obtuvieron de los cadáveres garrapatas que se identificaron como *Margaropus annulatus australis* (actualmente *R. (B.) microplus*). También detectó *B. bigemina* en 125 muestras de bovinos criollos de todo el país y en 135 de 150 bovinos importados de Colombia. Adicionalmente reportó el mismo organismo en 4 de 10 ciervos capturados en Chagres. De igual manera *Piroplasma canis* en 3 de 24 caninos de cacería importados .

Hace 30 años, las pérdidas económicas causadas por *R. (B.) microplus* en el hato ganadero nacional, ascendían a 9 millones de dólares. En el mismo trabajo, se prueban 12 productos comerciales para control de ectoparásitos, y se indica la presencia de cepas panameñas de *R. (B.) microplus* resistentes a compuestos organofosforados, usando la Prueba de Inmersión de Adultos (Morán, 1982). Posteriormente, se probó la eficacia *in vitro* de 14 productos comerciales en *R. (B.) microplus*, colectadas de tres localidades de la provincia de Chiriquí, usando la Prueba de Inmersión de Adultos, encontrando variaciones en la actividad de los mismos (Caballero et al, 1994).

En un estudio de resistencia de *R. (B.) microplus* a piretroides en países centroamericanos, entre las 83 cepas evaluadas se reportó una cepa de campo

colectada en Panamá (Hacienda C. Espina) con resistencia específica a la flumetrina (Hagen et al, 1999).

En lo referente a *R. sanguineus* s.l., el primer reporte de resistencia a clordano y lindano en Panamá, data de 1958 (Wharton y Roulston, 1970) y para 1971, se reporta su resistencia al BHC (Georgiu & Lagunes-Tejeda, 1991). Trabajos recientes reportaron la resistencia a plaguicidas en una población de *R. sanguineus* s.l., colectada en el Centro de Cuarentena Veterinaria del Ejercito, en Corozal (actualmente, Centro Hospitalario Veterinario de Corozal, de la Universidad de Panamá). La población resultó altamente resistente al DDT, permetrina y coumaphos, medianamente resistente al Amitraz, y no resistente al fipronil. Los resultados de una electroforesis en gel, reportó una elevada actividad de esterasas en la cepa panameña, actividad ausente en las cepas Center Point y Kerrville, usadas en estos ensayos (Miller et al, 2001; Miller et al, 2002).

Estudios sobre la distribución de ectoparásitos en Panamá, reportaron que en el 74% de 57 localidades visitadas, había *R. sanguineus* s.l. parasitando caninos (Bermúdez y Miranda, 2011; Bermúdez et al. 2011). Otros estudios de prevalencia de infecciones transmitidas por garrapatas en equinos, caninos y humanos, han sido llevados a cabo en el Valle de Antón, encontrándose prevalencia de *R. rickettsii* en un equino (Bermúdez et al, 2010). También, es importante destacar la capacidad de *R. sanguineus* s.l. de parasitar humanos, ya que es la garrapata más frecuentemente encontrada parasitando personas que habitan áreas urbanas, seguida de *A. cajennense* s.l. que es más común en las áreas rurales (Bermúdez et al, 2012).

1.9 Bioensayos en Entomología

Los bioensayos son algunos de los métodos utilizados para la detección de resistencia en garrapatas. Existen diferentes metodologías para realizarlos. Estos métodos incluyen la detección de susceptibilidad y resistencia y consisten en la aplicación tópica, inmersión, inyección y exposición a papeles impregnados (Wharton y Roulston, 1970; Amaral, 1993). La aplicación de estos bioensayos *in vitro* es para estadios de vida libre, como larvas y hembras próximas a ovipositar.

La Prueba de Paquete Larvario es un tipo de estos bioensayos. Esta prueba fue desarrollado por Stone y Haydock (1962) en Australia y es tomada por la FAO, como su prueba oficial de diagnóstico de resistencia en garrapatas (FAO, 1971). Esta se basa en la dilución del producto de grado técnico, o del producto comercial, en una mezcla de tricloroetileno o cloroformo y aceite de oliva (proporción 2:1), que luego se diluye para obtener concentraciones decrecientes. Estos papeles impregnados, se dejan secar, se doblan haciendo una especie de sobre, dentro del cual se introducen un aproximado de 100 larvas, las cuales se exponen a los plaguicidas o acaricidas impregnados en el papel, por 24 o 48 horas, dependiendo del tipo de producto a probar (Stone y Haydock, 1962 ; FAO, 1971).

La literatura reciente resulta escasa acerca de la toxicidad de solventes orgánicos sobre diferentes estadios de la vida de las garrapatas. Se han usado las pruebas de inmersión de hembras adultas y larvas, y la prueba del Paquete Larvario modificada en *R. (B.) microplus* en Brasil (Chagas et al, 2002; Chagas et al, 2003;

Gonçalves et al, 2007) y en la India sobre hembras de *Haemaphysalis bispinosa* (Ravindran et al, 2011).

El etanol diluido en agua es utilizado en diferentes concentraciones y el dimetilsulfóxido (DMSO), son sustancias que han sido usadas con cierto éxito como solventes y controles negativos del Timol. El Timol es un terpenoide extraído de plantas de las familias Apiaceae y Lamiaceae, con actividad acaricida, y ha sido evaluado en larvas, adultos y huevos de *R. sanguineus* s.l. y *R. (B.) microplus*, usando diferentes técnicas como el paquete larvario e inmersión de garrapatas (Novelino et al, 2007; Daemon et al, 2009; Monteiro et al, 2010; Sclarik et al, 2011).

Borges et al (2011) presenta un extenso resumen de ensayos realizados en garrapatas para probar la efectividad de extractos o principios activos derivados de las mismas.

No existen reportes de ensayos *in vitro* de actividad biológica sobre garrapatas usando plantas de la familia Simaroubaceae, solo se conocen hasta el momento los resultados de una tesis de maestría desarrollada en Brasil (Pires, 2006).

Es necesario destacar que no hay reportes previos de ensayos usando solventes como el Diclorometano y *n*-Heptano en las especies utilizadas en estos ensayos ni en otras especies de garrapatas, así tampoco como datos del DMSO en concentraciones del 1% y 5% sobre *R. sanguineus* s.l., usando la técnica de paquete larvario. También es necesario decir que no hay reporte de actividad *in vitro* del diclorvos de grado técnico en garrapatas.

1.9.1 Descripción de los solventes utilizados

Los principales solventes usados en la extracción de principios activos de origen natural, y desarrollo de bioensayos son los siguientes:

Dimetilsulfóxido (DMSO) >99,9%: incoloro e inodoro, es un líquido estable, miscible en agua, etanol, en la mayoría de los compuestos orgánicos polares, y en muchas sales inorgánicas. Se considera un solvente versátil. Es usado en la industria y en los laboratorios de química, como un medio para llevar a cabo reacciones químicas. Debido a su aparente baja toxicidad y a su alta permeabilidad en la piel, se ha usado de manera extensiva en estudios de sistemas biológicos, inclusive en humanos (Parker, 1982).

El DMSO es un solvente práctico para redissolver compuestos orgánicos, por su capacidad de solubilizar un amplio rango de compuestos, y por su baja toxicidad (Quiroz et al, 2006)

Diclorometano (CH₂Cl₂): líquido volátil, incoloro, de olor penetrante. Soluble en etanol y éter, ligeramente soluble en agua. Solvente orgánico de grado técnico, usado ampliamente en química farmacéutica, para extraer principios activos de diferentes partes de plantas. Es de uso peligroso por ser tóxico, carcinógeno y narcótico. Usado para disolver pintura y procesar plásticos, fabricar y para la extracción de solventes (Sax y Lewis, 1987).

***n*-Heptano (CH₃(CH₂)₅CH₃):** líquido volátil, incoloro. Soluble en etanol, éter, cloroformo, insoluble en agua. Inflamable, tóxico en el ambiente y por inhalación.

Solvente orgánico, usado para extraer la fracción apolar (oleosa) de plantas. Utilizado como solvente, para medir octanaje en combustibles y en síntesis orgánica (Sax y Lewis, 1987).

Etanol (C₂H₅OH): líquido incoloro, volátil, miscible en agua, metanol, éter, cloroformo y acetona. Se utiliza con fines culinarios y como bebida alcohólica, se usa ampliamente en la industria y en el sector farmacéutico. Es clasificada como droga depresora, no acumulativa. El grado de intoxicación es determinado por la concentración de etanol en el cerebro (Sax y Lewis, 1987).

Tricloroetileno y aceite de oliva (2:1): la mezcla de tricloroetileno a dos partes con aceite de oliva, es recomendada por Stone & Haydock (1962) y escogida por la FAO (1971) como el solvente estándar de plaguicidas de grado técnico usando papel filtro. No hay reportes de efecto tóxico cuando se usa como control en ensayos de paquete larvario.

1.9.2 Descripción de los insecticidas evaluados

Diclorvos (2,2-Diclorovinil Dimetil Fosfato): compuesto organofosforado, muy volátil por su elevada presión de vapor, poco persistente en el ambiente (Yu, 2008). Es un fumigante usado para control de miasis (*Cochliomya hominivorax*, *Dermatobia hominis*), moscas picadoras (*Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans*) en ganado bovino, y para control de moscas en instalaciones de animales, según las recomendaciones del fabricante. Hay diferentes productos comerciales que combinan el diclorvos con un piretroide o con otro organofosforado (Martins et al, 2008)

Permetrina (3-fenoxibenzil(±)cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato): piretroide de Tipo I, que incluye piretrina, resmetrina, aletrina, tetrametrina, bifentrín y metoxiflutrín. La permetrina de grado técnico tiene aproximadamente 40% de isómero *cis* y 60% de isómero *trans*. Su isómero activo es (1R)-*cis*-permetrina. Son sumamente solubles en agua, baja presión de vapor, lo cual les confiere mínima volatilidad y fotoestable. Pueden persistir más allá de 10 días (Yu, 2008).

1.9.3 Descripción del extracto natural evaluado

Simaba cedron Planch: árbol o arbusto de la familia Simarubaceae, cuyos principios activos se conocen como cuasinoideos. Estos compuestos son de sabor amargo, y le imprimen esta particular característica a todas las partes de la planta (corteza, hojas, madera, frutos). Los cuasinoideos tienen diferentes actividades biológicas como desinflamatorio, detoxificantes, desparasitante, antiprotozoarios (contra *Plasmodium*, *Babesia* y *Trypanosoma*), repelentes de insectos, anti-alimentario y actividad insecticida (Guo et al, 2005). El cedrón, como comúnmente se le conoce en nuestras latitudes a la semilla, también se usó como coadyuvante para manejar las mordeduras de víboras venenosas (Heckadon-Moreno, 2005).

La experiencia previa con semillas de cedrón, se circunscribe solo al procesamiento y aislamiento de un nuevo cuasinoide, proveniente de un extracto en diclorometano (Osorio-Herrera et al, 2005). Del mismo estudio, se modificó la técnica para separar los aceites de la semilla, y obtener una fracción más pura, con el mismo solvente (Olmedo y Kadoch, datos sin publicar). Otros cuasinoideos aislados de

diferentes partes del *S. cedron* se citan a continuación: cedronolactona A, cedronolactona B y D, cedronolactona E, nilocitina, dihidronilocitín, piscimidol, bourjutinolona A, glancaurobolol y glancaurobolona (Guo et al, 2005).

Se decidió probar este producto, dada la experiencia de propietarios de mascotas, que usaron semilla de cedrón molida diluida en etanol, y con ello mantenían relativamente libre de garrapatas y de otros artrópodos parásitos a sus mascotas. Se decidió trabajar con los aceites extraídos de las semillas, ya que esta es uno de los remedios vegetales mayormente usados por la población panameña, y a la vez, uno de los menos estudiados.

Se usó el extracto oleoso en *n*-heptano, por el volumen extraído, la facilidad que implica su almacenamiento y disolución. Actualmente no hay pruebas que este extracto oleoso contenga cuasinoides (Dionisio Olmedo, comunicación personal)

1.10 Justificación

Hasta el momento, el uso indiscriminado de plaguicidas, tanto en la ganadería como en animales de compañía, está creando un ambiente de disconformidad en los propietarios de mascotas y ganaderos. Un aumento en las concentraciones de plaguicidas para los baños, puede intoxicar tanto al animal, como a la persona que los aplica. Se ha visto la necesidad de disminuir el intervalo entre tratamientos y muchas veces se aplican mezclas de productos con corto intervalo. Por ejemplo, se asperja hoy y a los tres días se aplica un producto inyectable, o se mezclan dos productos diferentes buscando efecto de sinergia.

En Panamá se comercializan plaguicidas de marcas y genéricos, los cuales varían en su forma de dosificación y concentraciones, por ejemplo: concentrados emulsionables, polvos solubles, productos “pour on”, “spot on”, baños secos, jabones y champús con plaguicidas, pastas comestibles, lociones, pastillas, inyectables. Se puede encontrar en el mercado amitraz al 12,5% y 20,8% o un diclorvos 50% y otro al 100% de principio activo.

Muchos de los plaguicidas registrados en Panamá, recomendados para control de *R. (B.) microplus* y *R. sanguineus* s.l., necesitan ser evaluados, para medir los niveles de resistencia de las garrapatas de Panamá para cada grupo de plaguicida usado (organofosforados, piretroides, amidinas, lactonas macrocíclicas, etc.), y recomendar las concentraciones adecuadas. Para ello es necesaria la implementación de ensayos *in vitro*, con el fin de detectar en condiciones de laboratorio, los productos que pueden ejercer control de las garrapatas y descartar los que resultan ineficientes para que no constituyan un gasto innecesario para el estado panameño.

Todos los productos comerciales existentes presentan una toxicidad de moderada a elevada y una persistencia en el ambiente que puede ser de varios días hasta semanas, convirtiéndose así, en un potencial riesgo ambiental y sanitario para la población animal, humana y vegetal del país.

Muchos compuestos naturales tienen baja solubilidad en agua, por lo que requieren ser disueltos en solventes orgánicos, antes de ser usados en bioensayos. Por lo tanto es necesario determinar la toxicidad de los solventes utilizados.

Este estudio es importante ya que nos brindará información científica sobre el efecto de solventes que se utilizan para la separación de principios activos o extractos de productos naturales. La mayoría de ellos son usados como vehículos y pueden presentar la desventaja de ser tóxicos. En este tipo de bioensayos se debe procurar que los solventes o vehículos utilizados en los diferentes preparados de estos productos con actividad plaguicida, sean los de menor toxicidad posible para que no interfieran con la acción de los productos que se desean probar.

Objetivo General

Validar un bioensayo *in vitro* útil para evaluar los productos acaricidas sintéticos y de origen natural en *R. sanguineus* y *R. (B.) microplus* colectadas en Panamá.

Objetivo Especifico

Determinar la inocuidad de algunos solventes más usados en la extracción de productos naturales con actividad acaricida en *R. sanguineus* s.l. y *R. (B.) microplus* usando la Prueba de Paquete Larvario modificada.

Evaluar dos plaguicidas sintéticos en *R. sanguineus* s.l. y *R. (B.) microplus* utilizando la prueba de paquete larvario modificada.

Evaluar una fracción oleosa de la semilla de *Simaba cedron* en *R. sanguineus* s.l utilizando la Prueba de Paquete Larvario modificada

CAPITULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Colecta de garrapatas

En total se colectaron 240 hembras adultas teleóginas (hembras a punto de ovipositar) de *R. sanguineus* s.l. y 130 de *R. (B.) microplus* en Ciudad de Panamá, Los Santos y Chiriquí. Las *R. sanguineus* s.l., fueron colectadas en clínicas veterinarias y en casas donde vivían perros con elevada parasitosis y las hembras de *R. (B.) microplus* fueron colectadas directamente del cuerpo de los bovinos en una finca en La Estrella, Bugaba, Chiriquí. Inmediatamente, los especímenes se colocaron en recipientes plásticos para su adecuado transporte. Los bioensayos se realizaron entre los años 2010 y 2012 (Cuadro 2), en los laboratorios del Programa Centroamericano de Maestría en Entomología.

Cuadro 2. Números y especies de garrapatas colectadas por localidad, a partir de las cuales se obtuvieron las larvas usadas en los bioensayos.

Procedencia	Ciudad Panamá	Los Santos	Chiriquí
1. Especie de garrapatas	<i>R. sanguineus</i> s.l.	<i>R. sanguineus</i> s.l.	<i>R. B. microplus</i> y <i>R. sanguineus</i> s.l.
2. Cantidad de garrapatas	60	90	90 de <i>R. sanguineus</i> s.l., 130 de <i>R. B. microplus</i>
3. Fecha de colecta	5-Nov-10	7-Nov-11	10-Abr-2012 (<i>R. sanguineus</i> s.l.) 19-Abr-2012 (<i>R. B. microplus</i>)

2.2 Cría de garrapatas

En el laboratorio, las garrapatas se lavaron con agua, se secaron con papel toalla, y se adhirieron dorsalmente con cinta de doble contacto en platos Petri, donde las hembras ovipositaron. Las hembras se colocaron de manera que los huevos de diferentes garrapatas no se mezclaran. Las garrapatas de diferentes especies se colocaron en diferentes platos Petri (Fig. 1).

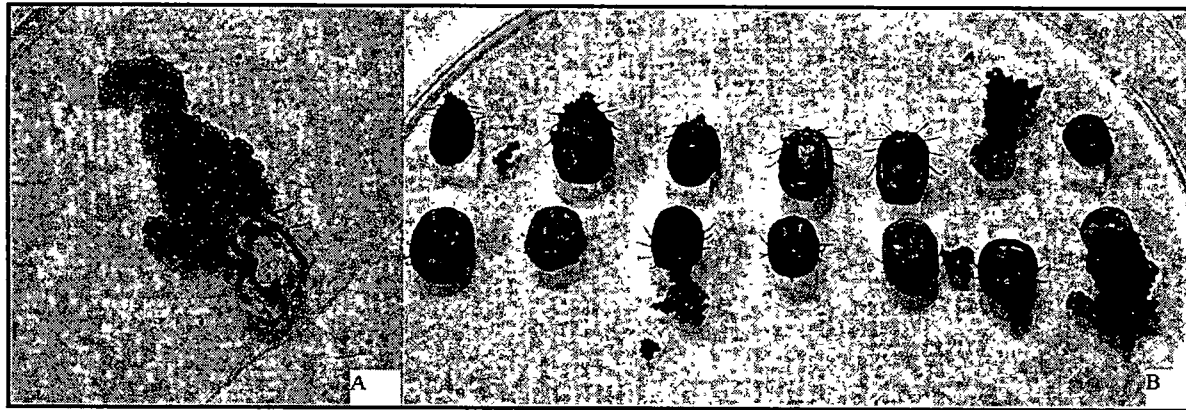


Figura 3. Hembras teleóginas de *R. sanguineus* s.l. (A) y *R. (B.) microplus* (B) colocadas en las platos de Petri mientras ovipositaban.

Una vez que las garrapatas ovipositaban, los huevos eran removidos con un pincel y colocados en una jeringuilla con un tapón de algodón en los extremos, para evitar que se escaparan las larvas una vez que emergían (Fig. 2). En el sitio de la incubación, las temperaturas se mantuvieron entre 27 y 30 °C, con una humedad relativa no mayor a 90%. Los parámetros ambientales de temperatura y humedad fueron medidos con un termómetro de máximo-mínimo VEE GEE®.

2.3 Prueba de Paquete Larvario (LPT)

Es la técnica adoptada por la FAO (1971) para medir la susceptibilidad de garrapatas a acaricidas, a partir de bioensayos desarrollados por Stone y Haydock (1962), y que consiste en colocar larvas de garrapatas en un paquete de papel filtro, tratado con una cantidad conocida del acaricida técnico, diluido en tricloroetileno y aceite de oliva (Miller et al, 2001 y 2002).

En esta investigación se hicieron paquetes larvarios modificados por Kadoch y Olmedo (datos sin publicar) que consistían de papel filtro marca Whatman #1, cortado de forma rectangular en pedazos de 12 cm x 8 cm (96 cm²). Cada papel filtro fue impregnado con 1 ml del solvente a probar, y secados por 30 minutos antes de colocar las larvas (Fig. 4).

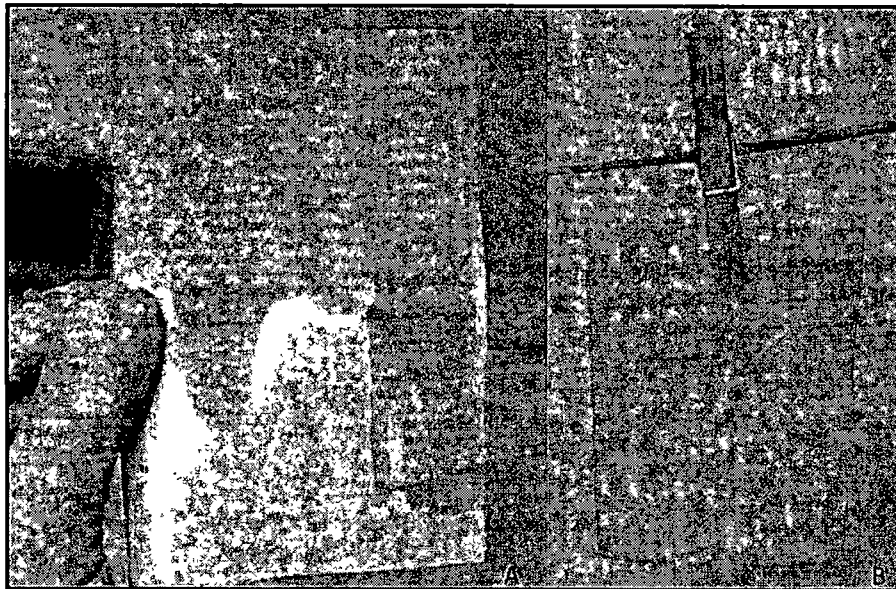


Figura 4. A: impregnación del papel filtro (96 cm²) con 1 ml de solvente. B: secado del papel filtro.

Una vez que el papel filtro estaba seco, los papeles fueron doblados a la mitad, y se colocaron las garrapatas. La cantidad de garrapatas variaba en cada prueba, y era aproximadamente la capacidad que tiene un pincel #5 de tomar garrapatas en una sola puesta. Después haber puesto las garrapatas en el papel filtro, se doblaban rápidamente las orillas del papel filtro, formando un cartucho. Las tres orillas de papel que quedaron libres fueron prensadas con ganchos “binder clips” o “bulldog” de 2 pulgadas (Fig. 5).

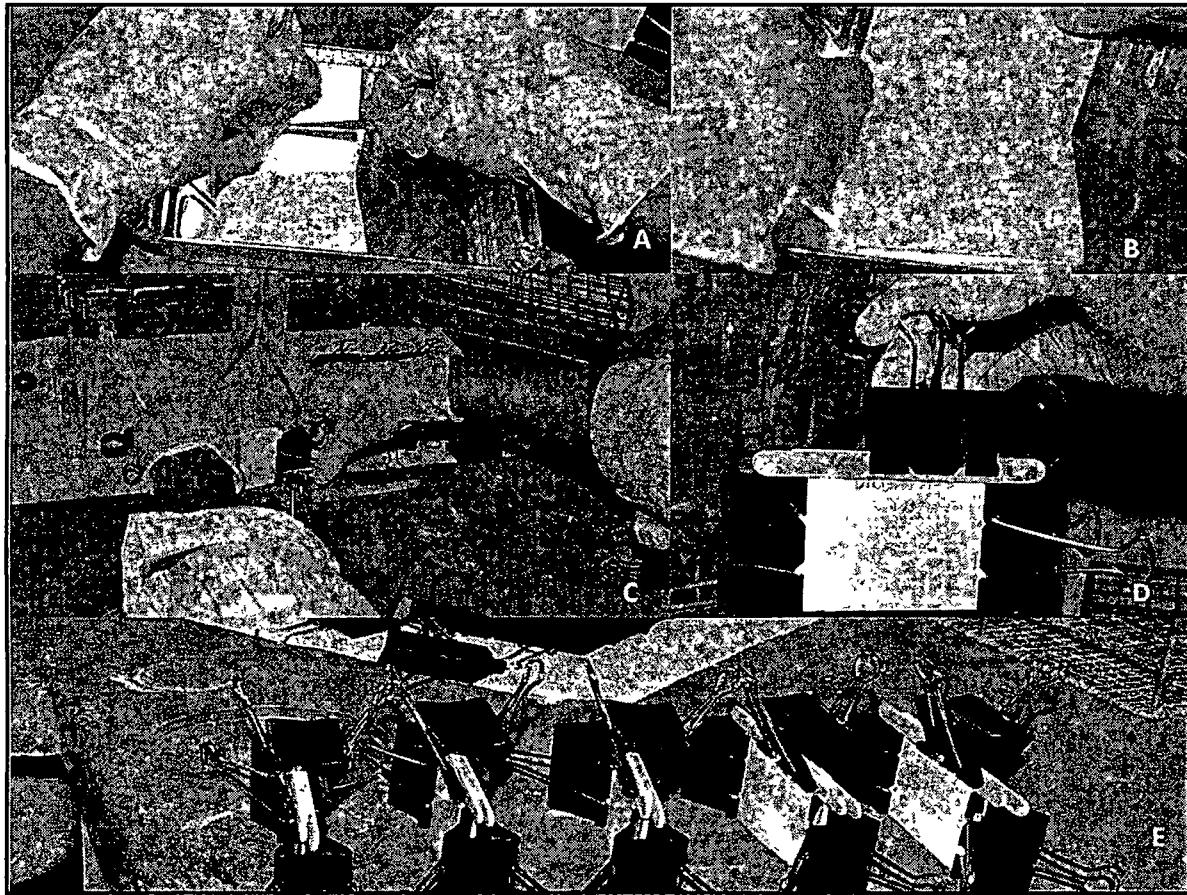


Figura 5. Procedimientos para la elaboración de un Paquete Larvario. A: puesta de garrapatas en el papel filtro. B: el papel filtro se dobla. C: El papel filtro se prensa en sus extremos libres. D: papel filtro totalmente sellado. E: paquetes larvales listos.

2.4 Conteo de garrapatas

Después de 24 horas de exposición se abrieron los paquetes larvales, y fueron contadas las garrapatas vivas y las muertas. Cuando las garrapatas presentaban movimiento solamente en sus extremidades, pero sin desplazamiento, fueron consideradas vivas. Para el conteo de las garrapatas se utilizó una trampa construida con una hoja de papel y cinta adhesiva a los costados, alrededor del estereoscopio, de manera que las garrapatas se quedaran pegadas en la cinta adhesiva si se salían del papel (Fig. 6).

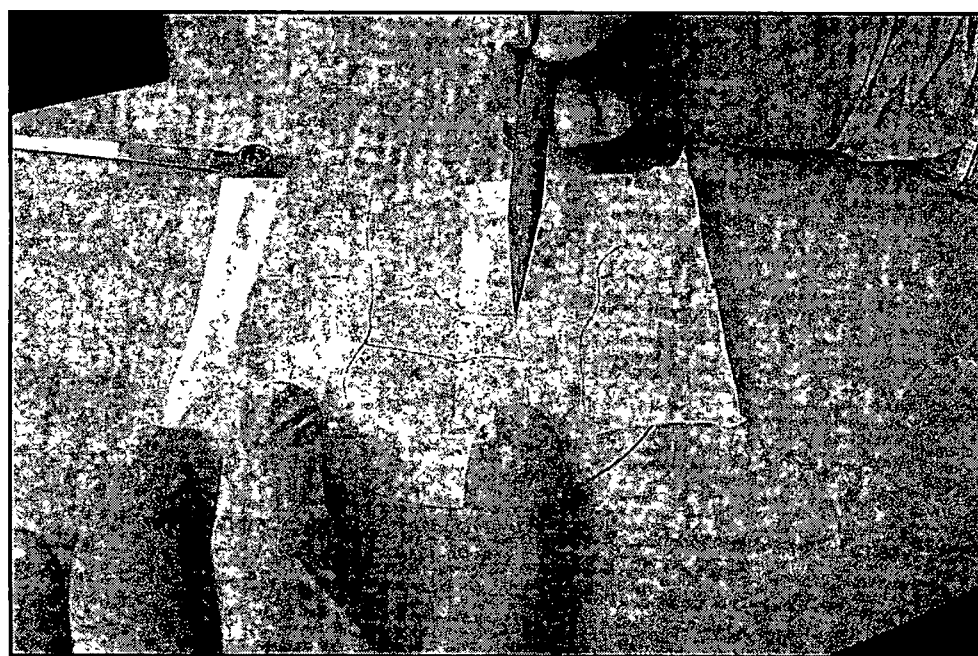


Figura 6. Conteo de garrapatas en el estereoscopio.

Con el estereoscopio se determinó si las larvas estaban muertas o vivas, pero con baja movilidad, para lo cual eran estimuladas con un pincel o lápiz.

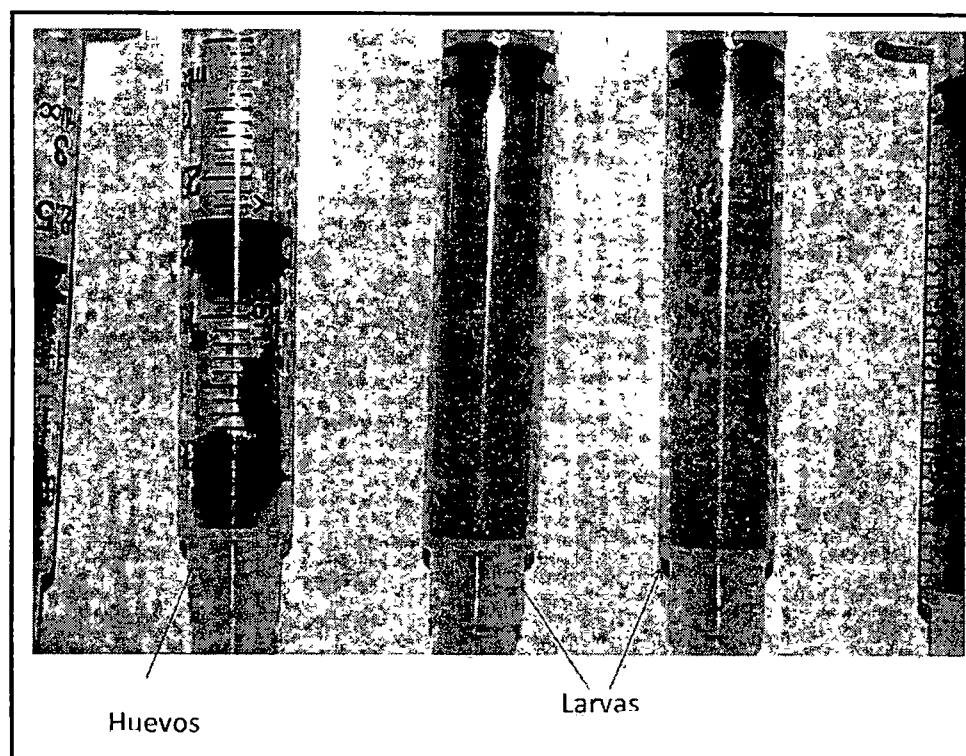


Figura 7. Huevos de *R. sanguineus* s.l. y larvas de *R. (B.) microplus* en jeringillas.

Al realizar los experimentos, se tomaban las garrapatas de las jeringuillas, y se colocaban en el paquete larval. Para extraer las larvas, se introducía cuidadosamente un pincel dentro de la jeringuilla, intentando tomar la mayor cantidad posible de larvas. Para evitar que las larvas que escaparan, se utilizó una trampa de papel con cinta adhesiva en los bordes (Fig. 3). Para los ensayos, se utilizaron especímenes que tenían entre 7 y 21 días de haber eclosionado.



Figura 8. Extracción de las larvas de una jeringuilla y vista de la trampa que se usó para impedir el escape de las larvas en cada bioensayo.

2.5 Solventes y concentraciones utilizadas

Para los experimentos se utilizaron solamente las larvas. Se evaluaron ocho sustancias diferentes a saber: cinco diluyentes, dos acaricidas comerciales y un producto natural (Cuadro 3). En todos los casos se hicieron tres repeticiones para cada experimento. Como control para los ensayos con solventes, se usó agua destilada. Para los ensayos con diclorvos y permetrina, el control fue tricloroetileno más aceite de oliva (proporción 2:1) y en los ensayos con la fracción oleosa de *S. cedron* se utilizó etanol al 95%.

Vehículo solvente primario para acaricidas es el aceite de oliva. Adicionalmente se requiere un solvente volátil para impregnar el papel de filtro, y se recomienda el

tricloetileno o cloroformo, según recomendaciones de la FAO (1971). Los acaricidas empleados en estos ensayos fueron de un mínimo de 95% de pureza.

Cuadro 3. Diluyentes empleados en los ensayos con larvas de garrapatas utilizando la Técnica de Paquete Larvario modificada...

	Sustancias	Concentración	Especie de garrapata
Solventes	Dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma-Aldrich.	1%, 5%	<i>R. sanguineus</i> s.l. <i>R. (B.) microplus</i>
	Diclorometano J.T. Baker.	Puro	<i>R. sanguineus</i> s.l. <i>R. (B.) microplus</i>
	N-Heptano J.T. Baker.	Puro	<i>R. sanguineus</i> s.l. <i>R. (B.) microplus</i>
	Etanol J.T. Baker.	95%, 75% y 50%	<i>R. sanguineus</i> s.l. <i>R. (B.) microplus</i>
	Tricloroetileno Sigma-Aldrich + aceite de oliva.	2 :1	<i>R. sanguineus</i> s.l. <i>R. (B.) microplus</i>

Cuadro 4. Acaricidas empleados en los ensayos con larvas de garrapatas utilizando la Técnica de Prueba Paquete Larvario modificada.

Insecticidas comerciales	Diclorvos (Nuvan® EC1000)	1%, 0.2%, 0.1% 0.02% y 0.001%	<i>R. sanguineus</i> s.l. <i>R. (B.) microplus</i>
	Permetrina grado técnico	2%, 1%, 0.50% y 0.25%	<i>R. sanguineus</i> s.l.
Producto natural	Fracción oleosa de <i>Simaba cedron</i>	10%, 5%, 2.5% y 1.25%	<i>R. sanguineus</i> s.l.

Dimetilsulfoxido (DMSO)

Se probó la toxicidad del DMSO al 1% y 5% en *R. sanguineus* s.l. y *R. (B.) microplus*. En los ensayos realizados con *R. sanguineus* s.l. se utilizó un total de 1262 larvas. El dimetil sulfoxido, cuya presentación comercial es de una pureza del 99.9%, se preparó una solución madre a partir de la cual se prepararon las diluciones al 1% y 5% para realizar los bioensayos. En los experimentos con DMSO y *R. (B.) microplus* se utilizaron 1207 larvas. Se usó como control agua destilada.

Diclorometano

Para la evaluación del diclorometano de grado técnico, se hicieron cuatro experimentos con *R. sanguineus* s.l. en los que se utilizaron 1387 larvas en cuatro experimentos (A,B,C y D). En los ensayos con *R. (B.) microplus* se utilizaron 456 larvas.

***n*-Heptano**

Para el *n*-heptano de grado técnico se realizaron 3 ensayos con *R. sanguineus* s.l. en los cuales se usaron un total 808 larvas en tres ensayos (A, B y C). Con *R. (B.) microplus*, en los que se utilizaron 580 larvas y dos ensayos.

Etanol

Se midió la toxicidad del etanol en tres concentraciones diferentes (95, 75 y 50 %). En los nueve ensayos realizados con *R. sanguineus* s.l. se usaron 2224 larvas en cinco ensayos (A,B, C, D y E). Para los ensayos con *R. (B.) microplus*, se usaron 848 larvas.

Diclorvos (NUVAN ®)

Tanto para *R. sanguineus* s.l. como para *R. (B) microplus* se hicieron dos ensayos, con tres repeticiones cada uno. En los ensayos con *R. sanguineus* s.l. se utilizaron 4683 larvas. Para los ensayos con *R. (B.) microplus* se usaron 4275 larvas. Como diluyente y control se utilizó Tricloroetileno (CHCl:CCl₂) + Aceite de oliva.

Permetrina

La permetrina fue probado solamente en *R. sanguineus* s.l. en ocho ensayos realizados. Se utilizaron un total de 2804 larvas. Se utilizó como diluyente y control el tricloroetileno + aceite de oliva.

Fracción en *n*-heptano de semilla de *S. cedron* Planch.

Se utilizaron 786 g de semillas secas y molidas de *S. cedron*, colectadas en Coclé. Las mismas fueron maceradas en dos litros de *n*-heptano por tres días consecutivos, para extraer el mayor porcentaje de compuestos solubles en el solvente. La solución resultante fue filtrada y concentrada en un evaporador rotatorio a 50°C hasta separar el solvente (*n*-heptano) del extracto propiamente dicho. El resultado fue una fracción oleosa con un peso final de 101,47 g, y un porcentaje de rendimiento del 12,91% de la semilla seca.

Fueron analizados 5 diluciones del extracto usando etanol al 95% como solvente y control. En los ensayos se utilizaron un total de 2313 larvas de *R. sanguineus* s.l

2.6 Análisis de datos

Los datos fueron analizados con estadística descriptiva usando Excel. En los experimentos donde la mortalidad de los controles fue mayor a 5%, se corrigió la mortalidad con la fórmula de Abbott (Abbott, 1925; Yu, 2008). Los experimentos, donde la mortalidad de los controles fue entre 0-5%, no necesitaron corrección.

La fórmula de Abbott es la siguiente:

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

Para los resultados, seguimos el criterio de Yu (2008), que indica que una mortalidad mayor al 20%, son poco confiables y se recomienda repetir los ensayos.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se utilizaron 23,416 larvas distribuidas de la siguiente forma: 17,206 larvas de *R. sanguineus* s.l. y 6,210 de *R. (B.) microplus* en el ensayo de Paquete Larvario.

3.1 EFECTO DEL DMSO

El DMSO causó una baja mortalidad (menos de 1 hasta el 8%) en *R. sanguineus* s.l. en los ensayos realizados al 1%, que equivale al 5% de mortalidad promedio cuando se corrigen los resultados con el control negativo empleado (Cuadro 5).

En el bioensayo con *R. sanguineus* s.l., se observó una alta mortalidad con DMSO al 5%. No hay referencias previas del efecto del DMSO en esta especie de garrapata, ni a dosis equivalentes a las usadas en este estudio.

El DMSO es un solvente aniónico, el cual es ampliamente usado en medicina veterinaria como desinflamatorio del Sistema Nervioso Central y osteoarticular. Es miscible en agua y etanol; puede ser usado en concentraciones de 1%, con nula o poca toxicidad de acuerdo con experiencias previas. Concentraciones mayores, pueden ser tóxicas, sobre todo si es usada en pruebas de inmersión (Chagas, 2003).

Cuadro 5. Efecto del DMSO en larvas de *R. sanguineus* s.l. expuestas a diferentes concentraciones de solventes, usando la Prueba de Paquete Larvario modificada (LPTm)

DIMETIL SULFOXIDO					
Repeticiones	1	2	3	Total	Promedio
Experimento A, 1%					
n	84	112	73	269	-
mueustos	3	5	2	10	-
% mortalidad	3.57	4.46	2.74	-	3.59±0.86
Mortalidad corregida					6.84
Experimento B, 1%					
n	69	76	71	216	-
mueustos	2	3	3	8	-
% mortalidad	2.90	3.95	4.23	-	3.69±0.70
Mortalidad corregida					8.48
Experimento C, 1%					
n	165	109	196	470	-
mueustos	0	0	1	1	-
% mortalidad	0.00	0.00	0.51	-	0.17±0.29
Mortalidad corregida					5.60
Experimento A, 5%					
n	81	103	123	307	-
mueustos	75	98	112	285	-
% mortalidad	92.59	95.15	91.06	-	92.93±2.07
Mortalidad corregida					86.35
CONTROL					
n	84	46	86	216	
mueustos	3	4	6	13	
% mortalidad	3.57	8.70	6.98		6.41±2.61

El efecto letal del DMSO en nuestro estudio, puede ser explicado por el daño celular que algunos autores reportan que este solvente puede causar, debido a su liposulibilidad, la cual puede remover la capa serosa de las garrapatas, liberando el ingrediente activo dentro del tegumento (Ravindran et al, 2011). De igual manera se ha reportado que los efectos tóxicos producidos por este agente sobre garrapatas adultas

son comparativamente menores, pero resultan en efectos inhibitorios de la eclosión de los huevos, en ensayos con hembras de *R. (B.) annulatus* (Ravindran et al, 2011).

En el caso de *R. (B.) microplus*, el DMSO al 1% y 5% se aplicó a 348 larvas obteniendo 1.27% de mortalidad (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de *R. (B.) microplus* expuestas a diferentes concentraciones de Dimetil sulfóxido (DMSO), usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).

DIMETIL SULFÓXIDO (DMSO)					
Repeticiones	1	2	3	Total	Promedio
Experimento A, 1%					
n	148	138	74	360	-
muertos	5	2	3	10	-
% mortalidad	3.38	1.45	4.05	-	2.96±1.35
Experimento B, 1%					
n	111	161	126	398	-
muertos	4	2	0	6	-
% mortalidad	3.60	1.24	0.00	-	1.62±1.83
Experimento A, 5%					
n	92	123	133	348	-
muertos	2	2	0	4	-
% mortalidad	2.17	1.63	0.00	-	1.27±1.13
CONTROL					
n	78	97	54	229	
muertos	4	8	0	12	
% mortalidad	5.13	8.25	0		4.46±4.16

Existen pocos reportes acerca de los efectos biológicos del DMSO en bioensayos con garrapatas. Chagas et al (2003), encontró que el DMSO al 25%, causó mortalidad del 22.5% en 24 horas, usando una Prueba de Paquete Larvario modificada con *R. (B.) microplus*.

Gonçalves et al (2007), en ensayos con *R. (B.) microplus*, usando la prueba de inmersión de larvas, reportó una mortalidad del 5% con DMSO al 1%.

Sharma et al, (2012), usando la técnica de inmersión de adultos con *R. (B.) microplus*, probó cuatro concentraciones de DMSO (1, 5, 10 y 20%), encontrándose una mortalidad del 10.0+/-5.8% en la solución de DMSO al 20%. Las garrapatas fueron sumergidas por dos minutos en las soluciones y los resultados se observaron después de 14 días.

Resende et al (2012), usando la prueba de paquete larvario, realiza ensayos con DMSO al 1%, en donde *A. cajennense* como *D. nitens*, tuvieron una leve mortalidad, por debajo del 5% (3.1+/-2.2% y 1.2+/-3.7%, respectivamente).

3.2 EFECTO DEL DICLOROMETANO

El diclorometano causó una alta mortalidad en los dos primeros ensayos con *R. sanguineus* s.l., en los que, murieron 73 larvas de las 478 empleadas, en comparación con los siguientes dos ensayos en los que murieron 13 de 909 larvas. El máximo porcentaje de mortalidad fue de 22.4%, y el menor 0% (Cuadro 7). Los efectos del diclorometano sobre *R. (B.) microplus* fueron similares a los obtenidos con *R. sanguineus* s.l. (Cuadro 8).

En nuestro estudio hubo poca variabilidad en cuanto a la mortalidad de *R. sanguineus* s.l. y *R. (B.) microplus*. No se esperaba que el diclorometano causara mortalidad en las larvas ya que es extremadamente volátil, y se usa como solvente de extractos botánicos. Sin embargo, si hay un secado inapropiado de papel filtro, los

residuos del diclorometano pueden causar mortalidad debido a acumulación de monóxido de carbono en los tejidos vivos (Parker, 1983).

Cuadro 7. Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de *R. sanguineus* s.l. expuestas a Diclorometano, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).

DICLOROMETANO					
Repeticiones	1	2	3	Total	Promedio
Experimento A					
n	86	59	65	210	-
Muertos	1	7	5	13	-
% Mortalidad	1.16	11.86	7.69	-	6.90±5.39
Experimento B					
n	91	100	77	268	-
Muertos	21	22	17	60	-
% Mortalidad	23.08	22.00	22.08	-	22.39±0.60
Experimento C					
n	158	166	161	485	-
Muertos	0	0	0	0	-
% Mortalidad	0.00	0.00	0.00	-	0.00
Experimento D					
n	137	169	118	424	-
Muertos	0	8	5	13	-
% Mortalidad	0.00	4.73	4.24	-	2.99±2.60
CONTROL					
n	78	97	54	229	
muertos	4	8	0	12	
% mortalidad	5.13	8.25	0		4.46±4.16

Las mortalidades resultantes de los ensayos, se puede deber a un efecto residual, que haya quedado en el papel filtro. Hay que recordar que este compuesto es volátil, y dentro del organismo se metaboliza a monóxido de carbono. Uno de los factores de esta elevada mortalidad, puede deberse al corto tiempo de secado de los papeles filtro, posterior a la impregnación de los mismos.

Cuadro 8. Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de *R. (B.) microplus* expuestas a Diclorometano, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm)

DICLOROMETANO					
Repeticiones	1	2	3	Total	Promedio
Experimento A					
n	69	75	47	191	
Muertos	3	3	8	14	
% Mortalidad	4.35	4.00	17.02		8.46±7.42
Experimento B					
n	81	102	82	265	
Muertos	18	15	19	52	
% Mortalidad	22.22	14.71	23.17		20.03±4.64
CONTROL					
n	78	97	54	229	
muertos	4	8	0	12	
% mortalidad	5.13	8.25	0		4.46±4.16

3.3 EFECTO DEL *n*-HEPTANO

En el experimento A realizado con *R. sanguineus* s.l., el *n*-heptano causó una alta mortalidad en las larvas (47,55%), lo que equivale a 61 de un total de 121 larvas. (Cuadro 9). Sin embargo en los experimentos B y C, la mortalidad disminuyó notablemente. Esto pudo deberse a un secado inapropiado del papel filtro en el experimento A, pero corregido en los experimentos B y C.

El *n*-heptano no ha sido utilizado anteriormente como solvente de extractos orgánicos en pruebas de garrapatas y por lo tanto no existe documentación disponible para discutir estos resultados. Como en el caso del diclorometano, no se esperaba una alta mortalidad de larvas de *R. sanguineus* s.l. y *R. (B.) microplus*, utilizando la técnica del paquete larval, debido a que es un solvente muy volátil (Cuadros 9 y 10).

Cuadro 9. Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de *R. sanguineus* s.l. expuestas a n-Heptano, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).

n HEPTANO					
Repeticiones	1	2	3	Total	Promedio
Experimento A					
n	47	28	46	121	-
Muertos	19	9	33	61	-
% Mortalidad	38.78	32.14	71.74	-	47.55±21.21
Experimento B					
n	140	112	111	363	-
Muertos	9	0	0	9	-
% Mortalidad	6.43	0	0	-	2.14±3.71
Experimento C					
n	107	99	118	324	-
Muertos	5	6	5	16	-
% Mortalidad	4.67	6.06	4.24	-	4.99±0.95
CONTROL					
n	78	97	54	229	
muertos	4	8	0	12	
% mortalidad	5.13	8.25	0		4.46±4.16

Cuadro 10. Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de *R. (B.) microplus* expuestas a n-Heptano, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).

n HEPTANO					
Repeticiones	1	2	3	Total	Promedio
Experimento A					
N	78	84	91	253	-
Muertos	7	4	19	30	-
% Mortalidad	8.97	4.76	20.88	-	11.54±8.36
Experimento B					
N	113	128	116	357	-
Muertos	1	0	11	13	-
% Mortalidad	0.88	0.00	9.48	-	3.46±5.24
CONTROL					
n	78	97	54	229	
muertos	4	8	0	12	
% mortalidad	5.13	8.25	0		4.46±4.16

Los ensayos con n-Heptano sobre *R. (B.) microplus*, demostraron mortalidades de bajas a medias (Cuadro 10).

3.4 EFECTO DEL ETANOL

En los ensayos realizados con *R. sanguineus* s.l. y etanol al 95%, la mortalidad corregida más alta observada fue de 11.44% (Cuadro 23). En las concentraciones al 50 y al 75 % el porcentaje de mortalidad fueron de 4.04% y 7.58% respectivamente (Cuadro 11).

Estudios de inmersión realizados en ninfas no ingurgitadas e ingurgitadas de *R. sanguineus* s.l., utilizando etanol al 100%, no demostraron efectos tóxicos (Melo et al, 2012^a y 2012^b).

En estudios realizados en Brasil el etanol a concentraciones de 5, 25, 50 y 75% no mostró toxicidad en ensayos con larvas ingurgitadas, pero a una concentración mayor (etanol 100%) la mortalidad encontrada fue de 68,29 % (Calmon et al, 2012).

A diferencia del experimento anterior con *R. sanguineus* s.l., en los experimentos realizados con *R. (B.) microplus*, no se observó mortalidad en ninguna de las concentraciones empleadas (Cuadro 12).

Cuadro 11. Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de *R. sanguineus* s.l. expuestas a diferentes concentraciones de Etanol, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).

ETANOL					
Repeticiones	1	2	3	Total	Promedio
Experimento A, 95%					
N	69	78	103	250	-
Muertos	21	5	7	33	-
% Mortalidad	30.43	6.41	6.80	-	14.55±13.76
Mortalidad corregida					3.15
Experimento B, 95%					
N	54	69	42	165	-
Muertos	9	17	11	37	-
% Mortalidad	16.67	24.64	26.19	-	22.5±5.11
Mortalidad corregida					11.44
Experimento C, 95%					
N	59	158	154	371	-
Muertos	0	0	0	0	-
% Mortalidad	0.00	0.00	0.00	-	0
Mortalidad corregida					6.01
Experimento D, 95%					
N	208	180	100	488	-
Muertos	0	1	0	1	-
% Mortalidad	0.00	0.56	0.00	-	0.19±0.32
Mortalidad corregida					5.62
Experimento A, 75%					
N	76	82	93	251	-
Muertos	4	4	8	16	-
% Mortalidad	5.26	4.88	8.60	6.25	6.25±2.05
Mortalidad corregida					4.04
Experimento A, 50%					
N	80	111	107	298	-
Muertos	2	5	2	9	-
% Mortalidad	2.50	4.50	1.87	-	2.96±1.37
Mortalidad corregida					7.58
CONTROL					
n	84	46	86	216	
muertos	3	4	6	13	
% mortalidad	3.57	8.70	6.98		6.41±2.61

Cuadro 12. Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de *R. (B.) microplus* expuestas a diferentes concentraciones de Etanol, usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).

ETANOL					
Repeticiones	1	2	3	Total	Promedio
95%					
N	95	178	103	376	-
Muertos	0	0	0	0	-
% Mortalidad	0	0	0	-	0
75%					
N	130	134	192	456	-
Muertos	0	0	0	0	-
% Mortalidad	0	0	0	-	0
50%					
N	171	123	98	392	-
Muertos	0	0	0	0	-
% Mortalidad	0	0	0	-	0
CONTROL					
n	78	97	54	229	
muertos	4	8	0	12	
% mortalidad	5.13	8.25	0		4.46±4.16

En un estudio similar al nuestro, realizado por Chagas et al (2003), no reporta mortalidad mayor al 5% en los ensayos con etanol. Gonçalvez et al (2007) en otros estudios realizados mediante inmersión de larvas en etanol, no reportó mortalidad en ensayos con *R. (B.) microplus*.

Resende et al (2012) en otros estudios usando la técnica de paquete larvario en larvas de otras especies tales como *A. cajennense* y *D. nitens*, no reportan mortalidad con etanol.

A diferencia de los estudios anteriores, Sharma et al (2012) reportó una mortalidad del 15.0+/-5.0% en solución de etanol al 50% y de 30.0 +/-5.8% con etanol al 100%, usando la técnica de inmersión de adultos con *R. (B.) microplus*.

Por lo tanto, nuestros hallazgos indican que el etanol es un solvente promisorio para llevar a cabo evaluaciones de acaricidas de origen vegetal.

3.5 EFECTO DEL DICLORVOS

La máxima mortalidad de *R. sanguineus* s.l. con diclorvos se dio a una concentración de 1%, tratamiento en el cual murió el 100% de las larvas. La mortalidad fue disminuyendo gradualmente (Cuadro 13), a medida que la dilución del ingrediente activo iba aumentando hasta alcanzar una mortalidad de aproximadamente 60%, cuando la dilución era de 0.001%.

El tratamiento con diclorvos aplicado a *R. (B.) microplus*, resultó en una mortalidad del 100% de las larvas en todas las concentraciones usadas (Cuadro 14), lo que parece indicar que esta especie es más susceptible a este agente de control que *R. sanguineus* s.l.

Esta alta susceptibilidad de *R. (B.) microplus* al diclorvos, puede deberse al origen de la población de garrapatas empleadas en este estudio la cual provenía de una finca en la que solamente se utilizaba Amitraz (formamidina), por lo que esta población de garrapatas nunca estuvo expuesta a ningún organofosforado, en consecuencia, esta población de garrapatas resultó totalmente susceptible a este tipo de compuestos.

Cuadro 13. Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de *R. sanguineus* s.l., expuestas diferentes concentraciones de diclorvos (NUVAN®), usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm)

Diclorvos										
	EXPERIMENTO A					EXPERIMENTO B				
Repeticiones	1	2	3	Tota l	Promedi o	1	2	3	Tota l	Promedi o
1%										
N	156	151	113	420	-	139	92	125	356	-
Muertos	156	151	113	420	-	139	92	125	356	-
% Mortalidad	100.0 0	100.0 0	100.0 0	-	100.00±0	100.0 0	100.0 0	100.0 0	-	100.00±0
0.2%										
N	122	82	122	326	-	210	169	225	604	-
Muertos	113	78	120	311	-	203	164	218	585	-
% Mortalidad	92.62	95.12	98.36	-	95.37±2.8 8	96.67	97.04	96.89	-	96.87±0.1 9
0.1%										
N	153	131	168	452	-	311	189	227	727	-
Muertos	124	108	152	384	-	251	144	190	585	-
% Mortalidad	81.05	82.44	90.48	-	84.65±5.0 9	80.71	76.19	83.70	-	80.20±3.7 8
0.02%										
N	143	134	151	428	-	177	190	133	500	-
Muertos	113	90	113	316	-	139	130	88	357	-
% Mortalidad	79.02	67.16	74.83	-	73.67±6.0 1	78.53	68.42	66.16	-	71.04±6.5 9
0.001%										
N	158	194	189	541	-	200	144	173	517	-
Muertos	86	108	97	291	-	127	94	88	309	-
% Mortalidad	54.43	55.67	51.32	-	53.81±2.2 4	63.50	65.28	50.87	-	59.88±7.8 6
CONTROL										
N	191	169	151	511	-	224	241	167	632	-
Muertos	0	0	0	0	-	0	0	3	3	-
% Mortalidad	0.00	0.00	0.00	-	0.00	0	0	1.8	-	0.6±1.04

Por el contrario, la población de *R. sanguineus* s.l. usada provenía de mascotas que suelen ser tratadas frecuentemente con diferentes productos acaricidas, lo que pudo haber determinado, su mayor nivel de resistencia al diclorvos.

Cuadro 14. Tamaño de muestra y mortalidad de larvas de *R. (B.) microplus* expuestas a diferentes concentraciones de diclorvos (NUVAN®), usando la Prueba de Paquete Larvario Modificada (PPLm).

Diclorvos										
	EXPERIMENTO A					EXPERIMENTO B				
Repeticiones	1	2	3	Total	Promedio	1	2	3	Total	Promedio
1%										
N	87	106	164	357	-	107	117	137	361	-
Muertos	87	106	164	357	-	107	117	137	361	-
% Mortalidad	100	100	100	-	100±0	100	100	100	-	100±0
0.2%										
N	133	166	143	442	-	69	102	130	301	-
Muertos	133	166	143	442	-	69	102	130	301	-
% Mortalidad	100	100	100	-	100±0	100	100	100	-	100±0
0.1%										
N	189	159	160	508	-	95	93	89	277	-
Muertos	189	159	160	508	-	95	93	89	277	-
% Mortalidad	100	100	100	-	100±0	100	100	100	-	100±0
0.02%										
N	84	51	145	280	-	125	114	147	386	-
Muertos	84	51	145	280	-	125	114	147	386	-
% Mortalidad	100	100	100	-	100±0	100	100	100	-	100±0
0.001%										
N	95	75	71	241	-	193	173	124	490	-
Muertos	95	75	71	241	-	193	173	124	490	-
% Mortalidad	100	100	100	-	100±0	100	100	100	-	100±0
CONTROL										
N	69	137	114	320	-	168	54	90	312	-
Muertos	6	10	0	16	-	12	6	25	43	-
% Mortalidad	8.70	7.30	0.00	-	5.33±4.67	7.14	11.11	27.78	-	15.34±10.95

La concentración sugerida por el fabricante (1.5mg/mL), equivale en este estudio a una dilución entre 0.02% y 0.001%, que produjeron una mortalidad entre 80% y 71% en *R. sanguineus* s.l.. Sin embargo, esta dosis es 100% letal cuando fue utilizada en el control de *R. (B) microplus*. El diclorvos no es comúnmente usado en control de garrapatas en mascotas, sin embargo sí son comúnmente utilizados productos que contienen coumaphos (otro compuesto organofosforados), los cuales pueden producir resistencia cruzada con otros compuestos de la misma familia de plaguicidas.

Son pocos los reportes de uso del diclorvos en bioensayos con garrapatas. En Brasil, Novelino et al (2007), usando la prueba de paquete larvario en *R. (B.) microplus*, usó como control positivo clorfenvinfos+diclorvos, obteniendo como resultado un 100% de mortalidad. También en Brasil, Martins et al (2008), sin especificar qué tipo de ensayo *in vitro* se realizó, reportó una efectividad de aproximadamente de 88% en el control de garrapatas, con la misma combinación de plaguicidas.

Es importante puntualizar que el diclorvos tiene una presión de vapor elevada, lo que lo hace muy volátil. En experimentos realizados en *Musca domestica*, se demostró que el diclorvos es más tóxico, exponiendo los insectos a papeles impregnados con el producto, que si fuera inyectado dentro del abdomen (Yu, 2008).

3.6 EFECTO DE LA PERMETRINA

Los diferentes porcentajes de mortalidad observados en este estudio, no siguen un patrón en relación con los porcentajes de ingrediente activo usados (Cuadro 15).

La dosis recomendada normalmente para este producto es de 0.25%. en este trabajo, esta dosis sólo produjo una mortalidad de aproximadamente 20% (cuadro 27). La permetrina es un ingrediente común en jabones líquidos utilizados comúnmente para bañar perros, lo que puede haber mantenido a las poblaciones de *R. sanguineus* en contacto continuo con este producto, esto pudo haber influido en el nivel de susceptibilidad demostrado en este estudio.

No existen reportes de trabajos similares a este estudio; sin embargo debemos mencionar aquí un estudio realizado por Miller et al (2001), quienes usando la prueba de paquete larvario, reportó una cepa de *R. sanguineus* s.l. resistente a permetrina, colectada de la Estación de Cuarentena de Corozal, antigua Zona del Canal. La cepa denominada “Panama”, presentó una concentración letal 50 de 4,2%. Estos resultados comparados con los obtenidos en nuestro estudio indican que las poblaciones de *R. sanguineus* no parecen haber variado su resistencia a la permetrina.

Otros estudios como los de Fernandes (2000) en Brasil, reportan susceptibilidad a la permetrina y cipermetrina, y resistencia a la deltametrina. Usando la prueba de inmersión de larvas en *R. sanguineus* s.l., la mortalidad reportada para la permetrina en este experimento fue de 86.9% y 100%, a una concentración de 0.125% y 0.25% respectivamente.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

Los solventes con mayor potencial para ser empleados en bioensayos para evaluar productos tanto naturales como comerciales fueron: DMSO, etanol y tricloroetileno+aceite de oliva.

El n-heptano, puede ser usado en bioensayos con larvas de *R. (B.) microplus*, pero no con *R. sanguineus* s.l..

El diclorometano no parece ser un solvente adecuado para realizar bioensayos con larvas de garrapatas de estas dos especies.

El diclorvos causó más del 50% de mortalidad a la dilución más baja ensayada que fue de 0.001%, tanto en *R. sanguineus* como en *R. (B.) microplus*.

La permetrina al 2% sólo presentó una mortalidad de aproximadamente 42% en los ensayos con *R. sanguineus* s.l..

El extracto de *S. cedron* produjo una mortalidad mayor del 50% a una dosis mínima del 5% en el ensayo con *R. sanguineus* s.l.

R. sanguineus s.l. resultó altamente resistente a la permetrina.

R. sanguineus s.l. y de *R. (B.) microplus*, son altamente susceptibles al diclorvos, compuesto organofosforado recomendado como insecticida, pero poco utilizado en nuestro medio.

4.2 RECOMENDACIONES

Realizar más estudios como este para obtener datos actualizados de resistencia a productos químicos para control de garrapatas, en las dos especies aquí estudiadas.

Desarrollar estudios sobre la biología de estas dos especies de garrapatas bajo las condiciones ecológicas de nuestro país, que nos permitan interpretar mejor su comportamiento.

Estandarizar bioensayos para evaluar extractos vegetales, usando pruebas de inmersión tanto de hembras adultas como de larvas, para comparar estos resultados con la los obtenidos mediante el empleo del paquete larvario modificado.

Desarrollar una colonia de animales de laboratorio con el fin de mantener poblaciones de garrapatas de interés médico y veterinario, para estandarizar los ensayos.

Normar el uso de plaguicidas para el control de ectoparásitos en Panamá, ya que el uso indiscriminado de éstos está mermando la efectividad de los productos comerciales disponibles.

Comparar las resistencias relativas (RR) a los productos existentes en el mercado en poblaciones diferentes de garrapatas de animales de producción y de compañía, de acuerdo un historial de uso de plaguicidas y las pruebas de resistencia realizadas sobre esas poblaciones.

Proponer la creación de un programa para detección de resistencia en garrapatas, el cual se debe hacer en conjunto con trabajo taxonómico y de identificación de Ixodidos de importancia en animales de producción, ya que se sabe poco acerca de las especies de garrapatas que parasitan animales en las diferentes regiones ecológicas y productivas del país.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econom. Ent.* **18**: 263-265.
- Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Fragoso-Sanchez, H. y Rosario-Cruz, R. (2006) Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch. Med. Vet.* **38**(2): 105-114.
- Álvarez, V. (1999) Situación actual de la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) en Costa Rica. Situación de otras garrapatas. En: Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y las enfermedades que transmiten. Seminario de Parasitología Veterinaria, IICA. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Álvarez, V., Bonilla, R. Chacón, I. (1999) Situación de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) a organofosforados y piretroides en Costa Rica. *Ciencias Veterinarias.* **22** (2): 41-60.
- Amaral, N.K. (1993). Guidelines for the evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1883) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileña de Parasitología Veterinaria.* **2**(2): 144-151.
- Barros-Battesti, D.M., Arzua, M. y Bechara, G.H. (2006). Garrapatos de Importancia Medico-Veterinaria da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. Sao Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan. Brasil. 223pp
- Bermúdez, C.S.E., *et al.* (2010). Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. *Vet. Parasitol.* doi:10.1016/j.vetpar.2010.11.020
- Bermúdez, S.E. y Miranda, R.J. (2011^a). Distribución de los ectoparásitos de *Canis lupus familiaris* (Carnivora: Canidae) de Panamá. *Revista MVZ Córdoba,* **16**(1):2274-2282.
- Bermúdez, S.E., Miranda, R.J. y Medianero, E. (2011^b). Ectoparásitos en mamíferos domésticos en Panamá Oriental con notas acerca de su importancia médica y veterinaria. *Scientia.* **21**(1):19-32.
- Bermúdez, S.E.C., Castro, A., Hesser, H., Liefting, Y., García, G. y Miranda, R.J. (2012). Ticks (Ixodida) on humans from central Panama, Panamá (2010-2011). *Experimental and Applied Acarology.* **56**(1) doi:10.1007/s10493-012-9564-7.
- Borges, L.M.F., Sousa, L.A.D. y Barbosa, C.S. (2011) Perspectives for the use of plants extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Brasilian Journal of Veterinary Parasitology, Jaboticabal.* **20** (2): 89-96.

- Buelvas, F., Albis, N., Buelvas, I., Miranda, J., y Mattar, S. (2008). Alta prevalencia de anticuerpos contra *Bartonella* y *Babesia microti* en poblaciones rurales y urbanas en dos provincias de Cordoba, Colombia. *Revista de Salud Pública*. **10**(1): 168-177.
- Burlini, L., Teixeira, K.R.S., Szabó, M.P.J y Famadas, K.M. (2010) Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: it there a geographical pattern? *Exp. Appl. Acarol.* **50**:361-374.
- Caballero, S., Guerra, P. y Pitano, T. (1994). Actividad in vitro de ectoparasiticidas comerciales contra *Boophilus microplus* en tres ecosistemas lecheros de Chiriquí. *Ciencia Agropecuaria*.**8**: 113-126.
- Calmon, F., Serna, T. O. S., Zeringota, V., Matos, R.S., Monteiro, C.M.O. y Daemon, E. (2012) Sensibilidade de garrapatas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) a solventes. En: XXXV Semana de Biología y XXXIII Mostra de Produção Científica, UFJF, Minas Gerais. Disponible en: sembioufjf2012.webnode.com
- Chagas, A.C.S., Passos, W.M., Prates, H.T., Leite, R.C., Furlong, J. y Fortes, I.C.P. (2002) Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brasilian Journal of Veterinaray Research and Animal Science*, Sao Paulo. **39**(5): 247-253.
- Chagas, A.C.S., Leite, R.C., Furlong, J., Prates, H.T., Passos, W.M.. (2003). Sensibilidade do garrapato *Boophilus microplus* a solvents. *Ciencia Rural, Santa Maria*, **33**(1): 109-114.
- Clark ,H. C. (1918) Piroplasmosis of cattle in Panama, value of the brain film in diagnosis. *The Journal of Infection Diseases*. **22**(2): 159-168.
- Daemon, E., Monteiro, C.M.O., Rosa, L.S., Clemente, M.A. y Arcoverde A. (2009) Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latrielle, 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. **105**: 495-497.
- Dantas-Torres, F., Figueredo, L.A. y Brandao-Filho,S. (2005) *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**(1): 64-67.
- Dantas-Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari:Ixodidae): From taxonomy to control, *Veterinary Parasitology*, **152**:173-185.

- Dantas-Torres, F. (2010) Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites and Vectors*. **3**:26.
- Dantas-Torres, F., Lorusso, V., Testini, G., Paiba-Cavalcanti, M., Figueredo, L.A., Stanneck, D., Mencke, N., Brandao-Filho, S.P., Alves, L.C. y Otranto, D. (2010). Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research*. **106**:857-860.
- Darling, S.T. (1913) Equine piroplasmiasis in Panama. *The Journal of Infectious Diseases*. **13**(2): 197-202.
- FAO, (1971). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides: tentative method for larvae of cattle tick, *Boophilus spp.* - FAO Method N°7. FAO Plant Protection Bulletin. **19**: 15-18.
- FAO, (2004). Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. Animal Production and Health Division. Rome.
- Fernandes, F.F. (2000). Atividade in vitro de permetrina, cipermetrina e deltametrina sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)(Acari, Ixodidae). Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia. **56** (6) (citado el 18 de junio de 2013), pp.621-626.
Disponibile en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000600012&lng=en&nrm=iso
- Georghiu, G.P., y A. Lagunes. (1991). The occurrence of resistance to pesticides in arthropods: A index of cases reported through 1989. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Roma.
- Gonçalves, K., Toigo, E. and Ascoli, B., Von Poser, G. y Riveiro, V.L.S. (2007). Effects of solvents and surfactant agent on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*, *Parasitol Res*, **100**: 1267-1270.
- Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R.W., Walker, L.A. y Sindelar, R.N. (2005). Biologically active quassinoids and their chemistry: potencial leads for drugs desing. *Current Medicinal Chemistry*. **12**: 173-190.
- Hagen, S.J., Kopp, A. y Liebisch, A. (1999) Estudios de resistencia a acaricidas en la garrapata bovina *Boophilus microplus* en América Central. Memorias del IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Puerto Vallarta, Jalisco. México. Pp. 33.
- Hackman, R.H. (1982). Structure and function in tick cuticle. *Annual Review of Entomology*. **27**: 75-95.

- Heckadon-Moreno, S. (2004). Naturalists on the Isthmus of Panama: A hundred years of natural history on the biological bridge of the Americas. Smithsonian Tropical Research Institute, Panama, 271p.
- Labruna, M.B., Mattar, S., Navas, S., Bermudez, S., Venzal, J., Dolz, G., Abarca, K., Romero, L., de Sousa, R., Oteo, J., y Zabala-Castro, J. (2011). Rickettsiosis en America Latina, el Caribe, España y Portugal. *Revista MVZ Córdoba*. **16**(2): 2435-2457.
- Lopez Sáez, J.A. y Pérez Soto, J. (2008). Etnofarmacología y actividad biológica de *Quassia amara* (Simaroubaceae: Estado en cuestión. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. **7** (5): 234-246. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85670502>
- Louly, C.C.B., Fonseca, I.N., Oliveira, V.F., Borges, L.M.F. (2006). Ocorrência de *R. sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, do município de Goiânia, Goiás. *Goiania* **7**(1):103-106.
- Louly, C.C.B., Soares, S.F., Silveira, D.N., Neto, O.J.S., Silva, A.C., y Borges, L.M.F. (2009). Differences in the susceptibility of two breeds of dogs, English Cocker Spaniel and Beagle, to *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *International Journal of Acarology*. **35** (1):25-32.
- Macintire, D.K. y Vincent-Johnson, N. (2001) Hepatozoonosis canina. En: Kirk's: *Terapeutica Veterinaria de Pequeños Animales XII Ed.* John D. Bonagura. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Martins, J.R., Furlong, J., Prata, M.C.A. y Doyle, R.L.(2008) Acaricide resistance in Brazil and the use of mixtures as chemical alternative for tick control. En: VI Seminario Internacional de Parasitología Animal, Boca del Río, Veracruz. 3 al 5 de septiembre. 5 p.
- Melo, D.R., Monteiro, C.M.O., Zeringota, V., Senra, T.O.S., Matos, R.S., Calmon, F., Lima, L., Novato, T. y Daemon, E. (2012a) Ação de solventes sobre ninfas não ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). En: XXXV Semana de Biología y XXXIII Mostra de Produção Científica, UFJF, Minas Gerais. Disponible en: sembiougjf2012.webnode.com
- Melo, D.R., Monteiro, C.M.O., Serna, T.O.S., Zeringota, V., Calmon, F., Matos, R.S., Lima, L., Novato, T. y Daemon, E. (2012b). Efeito de solventes sobre ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). En: XXXV Semana de Biología y XXXIII Mostra de Produção Científica, UFJF, Minas Gerais. Disponible en: sembiougjf2012.webnode.com

- Miller, R.J., Davey, R.B. y George, J.E. (2002). Modification of the Agriculture Organization Larval Packet Test to measure Amitraz-susceptibility against Ixodidae, *J. Med. Entomol.* **39**(4): 645-651
- Miller, R.J., George, J.E., Guerrero, F., Carpenter, L. y Welch, J.B., (2001). Characterization of the resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama, *J. Med. Entomol.*, **38**(2): 298-302.
- Monteiro, C.M.O., Daemon. E., Silva, A.M.R., Maturano, R. y Amaral, C. (2010) Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research.* **106**: 615-619. DOI 10.1007/s00436-009-1709-1
- Moraes- Philo, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F., Richtzenhain, L.J. y Labruna, M.B. (2011) Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica.* **117**: 51-55.
- Moraes- Philo, J., Pacheco, R., Ogrzewalska, M., Brandao, P., Richtzenhain, L. y Labruna, M. Genetic analysis of different population of *Rhipicephalus sanguineus* from South America, Mexico, Spain and South Africa: VI international conference on ticks and tick-borne pathogens (TTP-6). Buenos Aires, Argentina 21-26, 2008. Book of Proceedings. Poster 272. 370 p.
- Morán, C. (1982). Uso de insecticidas en el control de garrapatas y la Resistencia de estas a los mismos. En: Parrillón, G., Trujillo, E. y Martiz, P. Uso de plaguicidas en Panamá, su efecto en la salud y el medio ambiente. Memoria del Seminario. Divisa, Panamá. 22-24 de abril. 160 p.
- Murrell, A. y Barker, S.C. (2003). Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology.* **56**: 169-172.
- Nava, S., Mastropaolo, M., Venzal, J.M., Mangold, A. y Guglielmone, A.A. (2012) Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Veterinary Parasitol.* **190**:547-555.
- Novelino, A.M.S., Daemon, E. y Soares, G.L.G. (2007). Evaluation of the acaricide effect of thymol, menthol, salicylic acid and methyl salicylate on *Boophilus microplus* (Canestrini 1887) (Acari: Ixodidae) larvae. *Parasitology Research.* **101**: 809-811.
- Noyes, J.N. (2010) Encyrtidae of Costa Rica (Hymenoptera: Chalcidoidea), 3. *Memoirs of the American Entomological Institute.* Vol. 84.

- Osorio-Herrera, S., Gaitán-Ibarra, R., Díaz-Castillo, F., Olmedo, D. y Gupta, M. (2005). Aislamiento y caracterización de un nuevo quasinoide a partir del extracto en diclorometano de semillas de *Simaba cedron* Planch. *Actualidad Biológica* 27 (suplemento 1): 43-48.
- Ocampo R. (Ed.), 1995. Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. CATIE, Informe Técnico N° 267, Turrialba, Costa Rica, 185 p.
- Pappalardo, B.L. y Breitschwerdt, E.B. (2001) Infección por *Bartonella vinsonii* en perros. En: Kirk's: Terapeutica Veterinaria de Pequeños Animales XII Ed. John D. Bonagura. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Parker, S.P. (Editor) (1983) McGraw-Hill Encyclopedia of Chemistry. McGraw-Hill Book Company, New York. 1195pp.
- Pereira, M.C., Labruna, M.B., Szavo, M.P.J. y Klafke, G.M. (2008). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biología, Controle e Resistencia. MedVet. Sao Paulo. 169pp.
- Pires, J.E.P. (2006). Efeitos dos extractos aquoso e etanolico de planta *Simarouba versicolor*, St. Hill sobre larvas e teleoginas de garrapatos *Boophilus microplus*, Canestrini 1887 e *Rhipicephalus sanguineus*, Latreille, 1806. Tesis. Universidad Federal de Piauí, Teresina, Brasil. 49p. Disponible en: [http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ciencianimal/arquivos/files/DM_JEPP\(1\).pdf](http://www.ufpi.br/subsiteFiles/ciencianimal/arquivos/files/DM_JEPP(1).pdf)
- Quiroz, D.I., Emmen, D.A., Dominguez, E., Heller, M.V., Coley, P.D. y Kursar, T.A.(2006) A rapid, efficient method for the bioassay of extracts, fractions and compounds for activity against tropical aphids. *International Journal of Pest Management*. 52 (4): 333-342. .
- Ravindran, R., Juliet, S., Ajith Kumar, K.G., Sunil, A.R., Amithamol, K.K., Nair, S.N., Chandrasekhar, L., Sujith, S., Bandyapadhyay, A., Rawat, A.K.S. y Ghosh, S. (2011). Effects of solvents and surfactants against *Haemaphysalis bispinosa*. *Tropical Biomedicine*. 28(3): 482-486.
- Ravindran, R., Juliet, S., Golapan, A.K.K., Kavalimakkil, A.K., Ramankutty, S.A., Nair, S.N., Nayayanan P.M. y ghosh ,S. (2011). Toxicity of DMSO, Triton X 100 and Tween 20 against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Jornal of Parasitic Diseases*. 35 (2): 237-239.
- Recende, J.D.S.A., Daemon, E., Monteiro, C.M.O., Maturano, R., Prata, M.C.A. y Rodriguez, A.F.S.F. (2012). Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor*

- nitens* (Newman, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. *Experimental Parasitology*. **131**: 139-142.
- Sax, N.I. y Lewis, R.J. (1987) *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. 11th Edición. Van Nostrans Reinhold Company, New York. 1275p.
- Scolarik, M.G., Daemon, E., Monteiro, C.A.O. y Maturano R. (2011) Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. *Parasitology Research*. DOI 10.1007/s00436-011-2539-5
- Sharma, A.K., Kumar, S., Tiwari, S.S., Srivastava, S., Kumar, R., Ray, D.D., Chaundhuri, P., Ajay, K.S.R., Bandyopadhyay, A., y Ghosh, S. (2012). Comparative acaricidal properties of different solvents and surfactants on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Indian Journal of Animal Science*. **82** (2): 154-158.
- Soares, J.F., Sangioni, L.A., Vogel, F.S.F. y da Silva, C.F.B . (2007) Parasitosis em ser humano por *B. microplus* (Acari:Ixodida) em Santa Maria, RS, Brasil. *Ciencia Rural, Santa Maria*, **37**(5):1495-1497.
- Solano-Gallego, L. y Baneth, G. (2011). Babesiosis in dogs and cats- expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*. **8**(181): 48-60.
- Solano-Gallego, L., Rossi, L., Scroccaro, A.M., Mortarsi, F., Caldin, M., Furlanello, T. y Trotta, M. (2012). Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors*. **5**:98.
- Souza-Chagas, A. C., Leite, R. C. Furlong , J., Prates, H. T., Passos, W. (2003). Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solvents. *Ciência Rural, Santa Maria*. **33** (1):109-114.
- Stone, B.F. y Haydock, K.P. (1962). A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) *Bulletin of Entomological Research*. **53**:389-405.
- Strickland, R.K. Gerrish, R.R., Hourrigan, J.L. and Schubert, G.O., 1976. Ticks of veterinary importance. *Agriculture Handbook no. 485, Animal and Plant Health Inspection Service, US Department of Agriculture*, 122 p.
- Wharton, R.H. y Roulston, W.J. (1970). Resistance of ticks to chemicals. *Annual Review of Entomology*. **15**:381-4.

Yu, Simon (2008). Toxicology and biochemistry of insecticides. CRC Press, Taylor and Francis Group. Florida, USA. 251 p.