



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCIÓN SALUD ANIMAL

***Rhipicephalus microplus:***  
**Control mediante el uso de Aceite Esencial Crudo de**  
**Aguaribay (*Schinus molle* L.)**

Proyecto de investigación presentado como  
parte de los requisitos para optar al grado de  
**MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS**  
**VETERINARIAS**

AUTOR

**Matías Oscar Lapissonde**

Méd. Veterinario

**VERA (Santa Fe) - 2017**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS  
MENCION SALUD ANIMAL**

***Rhipicephalus microplus:*  
Control mediante el uso de Aceite Esencial Crudo de  
Aguaribay (*Schinus molle* L.)**

**Proyecto de investigación presentado para optar al grado de  
MAGISTER SCIENTIAE EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Autor: Méd. Vet. Matías Oscar Lapissonde**

**Director: Ing. Químico Heriberto Victor Elder**

**Codirectora: Méd. Vet. MSc María Florencia Bono Battistoni**

**JURADO**

**Dra. Cecilia Baravalle**

**Dr. Darío Ezequiel Manzoli**

**Dr. Santiago Nava**

**VERA (Santa Fe) - 2017**

**DEDICATORIA**

A mis hijos Joaquín Oscar y Lautaro, por ser la Razón de mi Vida.

A mis padres Cocho y Susana, los ejemplos a seguir.

A mis hermanos Paula, Valeria, Carolina y Martín por formar el hogar que me cobija.

A Heriberto Elder, mi maestro en la ciencia y la vida.

A Cecilia, mi todo.

## AGRADECIMIENTOS

**Antonio Rubén “tío Pato” Lapissonde** por el diseño de todo el material de campo para los ensayos.

**Asociación Cooperadora del Centro Operativo Experimental Dr. Tito Livio Coppa** por su incentivo y apoyo económico.

**Cesar Mattos** por su permanente asesoramiento.

**Darío Gilabert** por su incansable colaboración en los trabajos a campo.

**Diego Martín Avancini** por su inagotable ayuda en todo el ensayo y su apoyo incondicional en los momentos difíciles.

**El Torito S.A.** por su aporte del lugar de trabajo.

**Enzo Faba** por estar siempre para cualquier necesidad durante toda mi vida.

**María Florencia Bono Battistoni** por confiar en mí y regalarme su preciado tiempo.

**Gustavo López Valencia** por haberme capacitado en el maravillo mundo de las garrapatas y ser una fuente permanente de consulta.

**Heriberto Elder** por haberme iniciado en el hermoso camino de la investigación.

**Luis Augusto Schaumburg y Ana María Centis** por prestarme el campo y los animales para todos los ensayo en forma incondicional.

**Marcelo Signorini** por todo el análisis estadístico que sin él hubiese sido imposible hacerlo.

**Pablo Carletti** mi gran amigo.

**Personal del Centro Operativo Experimental Dr. Tito Livio Coppa**

**Ramón Espíndola** por su constante trabajo a campo en aquellos inicios.

**Rodolfo Comussi** por haber confiado en mí.

**Silvia Guala** por sus invaluable y permanentes aportes intelectuales.

**Sebastián Volkart** por el instrumental.

**Ulises Cuore** por ser mi permanente fuente de consulta.

## ABREVIATURAS

- (% C) Porcentaje de Control
- (%E) Porcentaje de eclosión
- (AEC) Aceite Esencial Crudo
- (DDVP) diclorvós
- (DL50) dosis letal 50
- (DVB) Diarrea Viral Bovina
- (HR%) Humedad Relativa Ambiente Porcentual
- (I.E.R.) Índice de eficacia reproductiva
- (IBR) Rinotraquetis Infecciosa Bovina
- (INTA) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- (IR) Índice de Reproducción
- (NEA) Noreste Argentino
- (NOA) Noroeste Argentino
- (P.S.) Porcentaje de Supervivencia de teleoginas ingurgitadas
- (PE) Prueba de Establo
- (PE) Prueba de Establo
- (RC) Resistencia cruzada
- (RE) Reproducción Estimada
- (RM) Resistencia múltiple
- (SAC) sabor, aroma y color

## INDICE

RESUMEN .....	XI
SUMMARY .....	XII

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1- DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....	1
1.2- OBJETIVOS .....	4
1.2.1- Objetivos generales:.....	4
1.2.2- Objetivos específicos: .....	4
1.3- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO .....	5
1.4- HIPOTESIS .....	5
CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1 - <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	6
2.1.1 - Taxonomía (Parola y Raoult, 2001).....	9
2.1.2 - Ciclo de vida.....	10
2.1.3 - Morfología.....	13
2.1.4 - Efectos del parásito .....	14
2.2- APECTOS GENERALES DE LOS MÉTODOS DE CONTROL .....	17
2.2.1- Marco legal.....	17
2.2.2- Acaricidas químicos .....	17
2.2.3- Rotación de pasturas .....	18
2.2.4- Uso del fuego.....	18
2.2.5- Vacunas .....	19
2.2.6- Control a través de productos de origen natural.....	19
2.3 - RESISTENCIA A LOS GARRAPATICIDAS.....	22
2.4- EXTRACTOS VEGETALES.....	27
2.4.2- Generalidades sobre la biosíntesis .....	31
2.4.3- Composición del aceite esencial crudo (AEC).....	32
2.4.4- <i>Schinus molle</i> L. ....	32
CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
3.1. MATERIALES.....	37
3.1.1. Producto ensayado .....	37
3.1.3- Animales .....	40
3.1.4- Teleoginas y larvas .....	41
3.2. METODOS .....	49
3.2.1 PRUEBA DE LABORATORIO ( <i>in vitro</i> ).....	49

3.2.1.1. Protocolo del Test de Inmersión de Adultos.....	49
3.2.2 PRUEBA DE ESTABLO ( <i>in vivo</i> ).....	53
3.2.2.1. Descripción de la Prueba.....	53
3.2.3- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	61
3.2.3.1- Análisis estadístico de la prueba <i>in vitro</i> .....	61
3.2.3.2- Análisis estadístico de la prueba <i>in vivo</i> .....	61
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	63
4.1- DE LA PRUEBA <i>in vitro</i> .....	63
4.1.1- Peso inicial de las teleoginas.....	64
4.1.2- Cantidad de teleoginas que ovipusieron.....	64
4.1.3- Porcentaje de eclosión (% E).....	65
4.1.4- Reproducción Estimada (RE).....	66
4.1.5- Porcentaje de Control (%C).....	66
4.2- DE LA PRUEBA <i>in vivo</i> .....	67
4.2.1- Cantidad de larvas por gramo.....	67
4.2.2- Porcentaje de teleoginas recuperadas.....	69
4.2.3- De la infestación previa al tratamiento.....	70
4.2.4- Efectos del tratamiento.....	70
4.2.4.1- Caída de teleoginas.....	70
4.2.4.2- Peso de las teleoginas.....	71
4.2.4.3- Cantidad de teleoginas incubadas que ovipusieron.....	71
4.2.4.4- Peso de los huevos.....	72
4.2.4.5- Porcentaje de Eclosión (% E).....	72
4.2.4.6- Reproducción Estimada (RE).....	72
4.2.4.7- Índice de Reproducción (IR).....	73
4.2.4.10- Porcentaje de Eficacia.....	73
4.2.4.11- Porcentaje de Control (% C).....	74
CAPITULO V. DISCUSIÓN.....	75
5.1- Discusión sobre la Prueba <i>in vitro</i> : Test de Inmersión de Adultos.....	75
5.2- Discusión sobre la Prueba <i>in vivo</i> : Prueba de Establo.....	78
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	81
CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	82

CAPITULO VIII. ANEXO .....	96
----------------------------	----

### INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1:</b> Composición del AEC <i>S. molle</i> L y sus fracciones.....	32
<b>Tabla N° 2:</b> Peso inicial de las teleoginas (g).....	60
<b>Tabla N° 3:</b> Cantidad de teleoginas que ovipusieron.....	61
<b>Tabla N° 4:</b> Porcentaje de eclosión Prueba <i>in vitro</i> .....	61
<b>Tabla N° 5:</b> Reproducción Estimada (RE) Prueba <i>in vitro</i> .....	62
<b>Tabla N° 6:</b> Porcentaje de Control prueba <i>in vitro</i> .....	62
<b>Tabla N° 7:</b> Resultados de la Prueba de Inmersión de Adultos.....	63
<b>Tabla N° 8:</b> Cantidad de larvas por gramo para Prueba de Establo.....	64
<b>Tabla N° 9:</b> Cantidad de larvas por gramo ensayo posterior.....	65
<b>Tabla N° 10:</b> Regresión lineal de la cantidad de larvas por g Prueba de Establo.....	65
<b>Tabla N° 11:</b> Regresión lineal de la cantidad de larvas por g ensayo posterior.....	66
<b>Tabla N° 12:</b> Porcentaje de teleoginas recuperadas en el grupo Control.....	66
<b>Tabla N° 13:</b> Comparación de las medias de teleoginas caídas en ambos grupos previo al tratamiento.....	67
<b>Tabla N° 14:</b> Comparación de las medias de teleoginas caídas en ambos grupos luego al tratamiento.....	67
<b>Tabla N° 15:</b> Efecto del tratamiento sobre el peso de las teleoginas.....	68
<b>Tabla N° 16:</b> Efecto del tratamiento sobre el número total de teleoginas que ovipusieron.....	68
<b>Tabla N° 18:</b> Análisis del % E de los huevos post tratamiento.....	69

<b>Tabla N° 19:</b> Análisis del % E de los huevos post tratamiento.....	70
<b>Tabla N° 20:</b> Análisis del IR de ambos grupos.....	70
<b>Tabla N° 22:</b> Porcentaje de sobrevivencia de hembras ingurgitadas.....	71
<b>Tabla N° 23:</b> Porcentaje de Control en los diferentes estadios del ciclo.....	71

### INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1:</b> Esquema del ciclo de vida:.....	12
<b>Fig. 2 y 3:</b> Morfología del <i>R. microplus</i> .....	14
<b>Fig. 4:</b> Biosíntesis de metabolitos secundarios del AEC.....	33

### INDICE DE FOTOS

<b>Foto 1:</b> Bureta con AEC de <i>Schinus molle</i> L.....	31
<b>Foto 2:</b> Aguaribay ( <i>S. molle</i> ).....	31
<b>Foto 3:</b> Establo para ensayo <i>in vivo</i> .....	36
<b>Foto 4:</b> Establo para ensayo <i>in vivo</i> con media sombra.....	36
<b>Foto 5:</b> Bandeja para recolección de teleoginas.....	37
<b>Foto 6:</b> Piso de rejas de madera.....	37
<b>Foto 7:</b> Teleoginas en infestación natural.....	39
<b>Foto 8:</b> Lavado de teleoginas.....	39
<b>Foto 9:</b> Selección de teleoginas para incubación.....	40
<b>Foto 10:</b> Teleoginas en Placa de Petri.....	40
<b>Foto 11:</b> Huevos en tubos para incubación.....	41
<b>Foto 12:</b> Larvas obtenidas por incubación en estufa.....	41
<b>Foto 13:</b> Peso de larvas para infestaciones.....	42

<b>Foto 14:</b> Larvas para recuento.....	44
<b>Foto 15:</b> Recuento de larvas con Programa ImageJ.....	44
<b>Foto 16:</b> Tubos para cultivo de huevos.....	45
<b>Foto 17:</b> Tubos con larvas finalizada la eclosión.....	46
<b>Foto 19:</b> Infestación con aplicador.....	53
<b>Foto 20:</b> Tratamiento con aspersor.....	54

## RESUMEN

Con el objetivo de una mayor producción de proteínas de origen animal el control de los parásitos que afectan a la ganadería bovina es fundamental. El (*Rhipicephalus microplus*) es uno de los que más afectan a la producción ganadera. En este sentido los medicamentos sintéticos son muy efectivos, pero poseen el riesgo de contaminación de las carnes y sus derivados, además de perjudicar al medio ambiente. Asimismo los parásitos generan resistencia a los mismos disminuyendo su eficacia. Con el propósito de generar una alternativa complementaria, se realizó el presente ensayo donde se midió la capacidad de controlar la reproducción del *R. microplus*. Se testearon *in vitro* emulsiones en agua destilada de aceite esencial crudo (AEC) de aguaribay (*Schinus molle* L.) a las concentraciones de 2,5 – 5 y 10 % utilizando la Prueba de Inmersión de Adultos e *in vivo* al 5 % mediante la Prueba de Establo. *In vitro* controlaron la reproducción (% C) el 58 %; 99,8 % y 100 % respectivamente. Mientras que *in vivo* controló el 90,8 %. El AEC de *S. molle* L., si bien se debe seguir investigando, puede transformarse en una alternativa o complemento a los tratamientos acaricidas sintéticos.

## SUMMARY

With the objective of a greater production of animal proteins, it is very important to control the common tick of the bovine (*Rhipicephalus microplus*). For this reason, synthetic drugs that are very effective have been developed but they have the risk of contamination of the meat and its derivatives. In addition it harms the environment. What is more, they have the disadvantage that the parasites generate resistance to the product, resulting in a decrease of efficiency.

The present essay, in which the ability to control the reproduction of *R. microplus* was measured, was performed in order to generate an alternative to these products. For this, emulsions were prepared in vitro in Aguaribay (*Schinus molle* L.) crude essential oil distilled water (AEC) at concentrations of 2.5-5 and 10% using the Adult Immersion Test (Drummond et al., 1973) and *in vivo* at 5% using the Stable Test (Roulston y Wilson, 1968). The *in vitro* test had a percentage of control of the reproduction (% C) of 58%; 99.8% and 100%, respectively. While the *in vivo* one controlled 90.8% of *R. microplus* reproduction.

The AEC *S. molle* L., although it must be further investigated, can be transformed into an alternative or complement to the synthetic acaricidal treatments.

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1- DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

A nivel mundial en la ganadería bovina una de las mayores pérdidas económicas se produce debido a las enfermedades parasitarias, especialmente la que ocasiona la garrapata común del bovino, *Rhipicephalus microplus*.

El término parásito se define como: organismo que vive sobre otro organismo viviente o dentro del mismo y a expensas del cual obtiene ciertas ventajas (Newman Dorland, 1986).

En epidemiología se concibe la enfermedad como una alteración del estado óptimo de producción y productividad, ocasionada por la relación dinámica establecida entre el hospedador, el agente causal y el ambiente. En el caso de los parásitos la relación hospedador - parásito, es a veces tan sutil que sería muy difícil demostrar el efecto del parásito en la producción de la enfermedad (Villar Cleves, 1997). No siempre se establece un adecuado equilibrio en la relación entre el hospedador y el parásito ya que por ejemplo la Gastroenteritis Verminosa Bovina puede provocar la muerte a un ternero de corta edad. Lo mismo que una alta carga de *Rhipicephalus microplus* sobre un individuo (Kopp Gómez, 2011).

Las consecuencias de las enfermedades que ocasiona la garrapata son la disminución de la ganancia de peso del bovino y las infecciones que trasmite. Según la FAO (2004) por cada 1400 garrapatas adultas por año, se pierde un kilo de carne por animal. Por ejemplo, estudios de la dinámica poblacional en Guatemala han determinado que un

bovino puede ser infestado por 25000 a 95000 garrapatas por año con una media de 55000; esto es una pérdida de 18 a 68 kg de carne por animal (Kopp Gómez, 2011).

Por sus hábitos hematófagos, las garrapatas en general, son importantes vectores de un amplio rango de microorganismos; tanto virus, bacterias, rickettsias como protozoos. Siendo los principales transmitidos por el *R. microplus*: *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *B. bovis*.

Las garrapatas son vectores efectivos porque: permiten que sus hospedadores las cambien de hábitat ya que se adhieren fuertemente a ellos, extendiendo el problema a otras regiones. El período de alimentación es lento y esto permite que puedan ingerir muchos patógenos. Pueden vivir largos períodos sin conseguir hospedadores. Por ejemplo en el *R. microplus* *A. marginale*, *Babesia bigemina* y *B. bovis* pueden realizar transmisión trans-estadial y también pueden ser pasados de generación en generación a través de los ovarios de la hembra (transmisión vertical) (López Valencia y Otoniel Vizcaíno, 1992).

Es imposible el desarrollo de una ganadería rentable sin el control de la garrapata común del vacuno, para lo cual es indispensable el uso de acaricidas. El uso de tratamientos con productos de origen sintéticos, trajo como consecuencia el desarrollo sucesivo de poblaciones resistentes a los principios activos utilizados para su control (Anziani y Guglielmo, 2005). Se ha detectado el desarrollo de cepas resistentes de *R. microplus* a la gran mayoría de los agentes químicos en gran parte del mundo, lo que disminuye la eficiencia de los acaricidas (FAO, 2004).

Los acaricidas más comunes para el control de la garrapata son en primer lugar los piretroides, seguido por las formamidinas y las avermectinas, aplicadas solas o combinadas con piretroides (Anziani y Guglielmono, 2005). Actualmente también está disponible el fluazurón y fiponil. Todos ellos son producto uni-moleculares.

A pesar de las innumerables investigaciones relacionadas a la biología, ecología y epidemiología de las garrapatas y al variado arsenal de la industria químico farmacéutica es aún difícil controlar este parasitismo en forma compatible con la producción (Bordin, 1998).

El estudio de productos naturales para su uso en el control de parásitos externos del ganado bovino ha cobrado importancia en el campo de la medicina veterinaria. Los extractos derivados de especies vegetales, como ser los aceites esenciales, que resultan menos tóxicos y más degradables en el medio ambiente, han sido estudiados con buenos resultados para el control de la garrapata, y entre ellos se pueden citar los aceites esenciales de las flores y hojas de *Cunila lythrifolia* (Apel *et al.* 2009), de los frutos de la Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), (Farias *et al.*, 2007), de *Hesperozygis ringens*, (Borges *et al.*, 2011 - Ribeiro *et al.*, 2010); de semillas de comino (*Cuminum cyminum* L.), de bayas de pimienta de Jamaica (*Pimenta dioica* (L) Merr) y de hojas y flores de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) (Martinez-Velazquez *et al.*, 2011); de citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) (Martins, 2006); de la madera de Palo santo (*Bulnesia sarmientoi*) (Gil *et al.*, 2013); flores y hojas de Espliego (*Lavandula angustifolia*) (Pirali-Kheirabadi y Silva, 2010); hojas, frutos y flores de Citronela (*Cymbopogon winterianus*), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Aroeira (*Schinus molle*)

(Torres, 2010); hojas de Citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), (Olivo *et al.*, 2008)

Por ser una planta nativa y luego de haberla probado, con buenos resultados, en mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) y en varroa (*Varroa destructor*) se decidió estudiar el efecto acaricida de los aceites esenciales del aguaribay (*Schinus molle* L.) sobre el *R. microplus*.

## **1.2- OBJETIVOS**

### **1.2.1- Objetivos generales:**

Estudiar el efecto del AEC de aguaribay (*Schinus molle* L.), sobre la reproducción del *R. microplus* tanto *in vitro* como *in vivo* y generar conocimientos sobre la utilización de antiparasitarios veterinarios amigables con el medio ambiente.

### **1.2.2- Objetivos específicos:**

Determinar *in vitro* el efecto sobre la reproducción de este parásito en diferentes concentraciones de AEC.

Establecer la concentración más adecuada para realizar la prueba *in vivo*.

Determinar el Porcentaje de Control de la reproducción que puede alcanzar *in vivo* este AEC a la concentración determinada mediante la prueba de laboratorio.

### **1.3- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO**

La importancia del presente estudio se basa en presentar una alternativa o complemento para resolver algunos de los inconvenientes que presentan el uso de los antiparasitarios sintéticos y propender a preservar la salud de las personas que aplican los productos parasiticidas o están en contacto con ellos.

Aumentar el valor de la carne bovina al disminuir las posibilidades de que contengan residuos de productos sintéticos.

Tomando como base las experiencias anteriores del uso del AEC de aguaribay como acaricida en *Varroa destructor* - ex *jacobsoni* (Guala *et al*, 2011) se intentará demostrar la posibilidad de ser utilizado a futuro como tratamiento alternativo o complementario para el control de *R. microplus*.

### **1.4- HIPOTESIS**

El AEC de aguaribay posee efecto garrapaticida sobre *R. microplus*. Esta acción la realiza por contacto, por lo que al ser aplicada sobre el parásito le provoca la muerte o dificulta su reproducción.

## CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - *Rhipicephalus microplus*

Los artrópodos son un grupo diverso de invertebrados, conteniendo más del 80% de las especies animales conocidas y ocupan casi todos los hábitats conocidos. Ellos incluyen familias como las moscas, cangrejos, ciempiés y arañas. Dentro de esta gran variedad de especies, un pequeño grupo ha desarrollado la habilidad de vivir directa y exclusivamente de otros animales (denominados hospedadores) a los cuales se los clasifica como parásitos. Solo un 10 % de estos parásitos se alimentan de animales domésticos.

Las garrapatas son ácaros de la Super-familia Ixodoidea que se encuentran ampliamente distribuidos por todo el planeta. Existen muchas especies con diferentes características, pero deben parasitar a otro ser vivo para poder completar su ciclo de vida (Wall y Shearer, 2001). Es decir que son ectoparásitos hematófagos obligados prácticamente de todos los vertebrados terrestres; principalmente mamíferos, aves, reptiles y algunos anfibios, y aunque han sido considerados parásitos cosmopolitas, numerosas especies están restringidas a regiones (hábitats) específicas (Estrada Peña *et al.*, 2006).

En una revisión taxonómica publicada en el año 2010 se reconocen 896 especies de garrapatas divididas en tres familias: Nuttalliellidae con solo una especie: *Nuttallia namaqua*.; Argasidae con 193 especies e Ixodidae conteniendo 702 especies en 14 géneros: *Amblyomma* (130 especies, de las cuales 17 se incluyen en *Aponomma*, un género que aún es válido para algunos autores); *Anomalohimalaya* (3), *Bothriocroton*

(7, incluidas anteriormente en *Aponomma*), *Cosmiomma* (1), *Cornupalpatum* (1), *Compluriscutula* (1), *Dermacentor* (34) *Haemaphysalis* (166); *Hyalomma* (27), *Ixodes* (243), *Margaropus* (3), *Nosomma* (2), *Rhipicentor* (2) y *Rhipicephalus* (82, incluyendo 5 especies del antiguo género *Boophilus*; aún válido para muchos autores) (Horak *et al.*, 2010).

En Argentina la especie más extendida como parásito del bovino es *R. microplus*; vive sobre la piel de su hospedador. Es totalmente dependiente del mismo por lo que se la clasifica como parásito obligado (Wall y Shearer 2001) de ciclo directo porque requiere un solo hospedador para completar su ciclo.

*R. microplus* es introducida y es específica del bovino, a los cuales infesta severamente y afecta su productividad. Los hallazgos sobre otros hospedadores, incluido el hombre, son frecuente, pero esta garrapata depende de la presencia de vacunos para su subsistencia. Otros hospedadores ocasionales incluyen la comadreja overa (Guglielmone y Nava, 2005), caballos, caprinos, cerdos domésticos, corzuelas (*Mazama americana*), liebres europeas (*Lepus europaeus*), perros, ovinos, tapires (*Tapirus terrestres*) y zorros del género *Lycalopex* (Ivancovich y Luciani, 1992).

*R. microplus* alcanzó a colonizar la zona Pampeana, pero una campaña oficial de erradicación la eliminó en el área sur de su distribución. En la actualidad, está presente, desde el norte de Santa Fe y Córdoba hasta la frontera con Bolivia, Paraguay y Brasil, incluyendo las dos provincias fitogeográficas del dominio Amazónico y en las provincias del Chaco y Espinal (Guglielmone y Nava, 2005).

Esta especie es la garrapata más importante que afecta al ganado vacuno y, por ello, su presencia se ha convertido en un problema para el sector ganadero, en dos aspectos:

El primero es el económico, en el cual la capacidad de este parásito para producir daño, afecta al ganado provocando anemia, inapetencia y hasta muerte. Además, el daño aumenta al convertirse en un vector de agentes patógenos como *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp (Gutiérrez Osorio, 2006).

El segundo, desde el punto de vista productivo; la aparición y reproducción de esta garrapata trae como consecuencia la disminución en la producción de carne y leche, repercutiendo, de esta manera, en las ganancias económicas potenciales (Gutiérrez Osorio, 2006). Asimismo este parásito causa efectos muy graves por las lesiones en la piel del hospedador; disminuyendo la calidad del cuero (Gashaw y Mersha 2013).

En este punto es importante mencionar que este artrópodo es un problema importante para el ser humano ya que sus efectos provocan disminución en la obtención de proteína animal e incrementan los costos de su producción. Además, tan importante como lo anterior, es el impacto sobre el medio ambiente que producen los tratamientos que deben realizarse para controlarla y los residuos que quedan en la carne.

En los últimos quince años se están produciendo severos cambios en la producción bovina del Noreste Argentino (NEA) y Noroeste Argentino (NOA) impulsados, mayormente, por el avance en todo el país de la agricultura. Las superficies de pastoreo en general se han reducido pero el stock bovino de ambas regiones permanece relativamente estable o incluso parece haber aumentado levemente en algunas regiones del NEA. En el centro y norte de Santa Fe el avance de la frontera agrícola y la intensificación de la agricultura es muy notorio, pero al mismo tiempo también la carga

animal se está incrementando en las áreas remanentes e históricamente consideradas como ganaderas. El aumento de la carga animal también se observa en zonas del NOA como por ejemplo en el norte de Córdoba y el sur de Santiago del Estero en las cuales la introducción de las pasturas subtropicales está impulsando una profunda intensificación de las actividades ganaderas y modificando las condiciones ecológicas de los parásitos. El mayor número de animales por unidad de superficie exacerba los problemas causados por parásitos internos como los nematodos gastrointestinales o externos como las garrapatas y requiere de un mayor uso de productos antiparasitarios para su control (Anziani y Guglielmo, 2005).

Como ya se mencionó, por sus hábitos hematófagos, las garrapatas en general, son importantes vectores de un amplio rango de microorganismos; virus, bacterias, rickettsias y protozoos. Siendo los principales *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *B. bovis* (López Valencia y Otoniel Vizcaíno, 1992). Además predisponen a la miasis.

#### **2.1.1 - Taxonomía (Parola y Raoult, 2001)**

Phylum:..... Arthropoda

Clase:..... Arachnida

Subclase:.....Acari

Orden:..... Parasitiforme

Suborden:.....Ixodida

Familia:.....Ixodidae

Subfamilia:....Rhipicephalinae

Género:.....*Rhipicephalus*

Especie:.....*microplus*

### 2.1.2 - Ciclo de vida

En general las garrapatas tienen 4 estadios, huevo, larva, ninfa y adulto. El dimorfismo sexual es evidente únicamente en el estadio adulto, por lo tanto cuando se habla de un macho o de una hembra se está haciendo referencia a un individuo adulto (Barandika Iza, 2012).

El ciclo biológico de las diferentes especies de garrapatas ixódidas tienen en común que poseen un único estadio de ninfa, las hembras aumentan de tamaño durante la alimentación (ocasionalmente hasta 100 veces el tamaño original) y la fecundación tiene lugar mientras se alimentan en el hospedador (Anderson y Magnarelli, 2008).

Tras la fecundación, las hembras ingieren sangre hasta su repleción; una vez saciadas se desprenden del hospedador y comienzan la oviposición. Tras un periodo pre-ovipositor las hembras depositan hasta 3.000 huevos en un ciclo continuo de oviposición. La puesta de huevos es rápida, alcanzándose el pico de producción entre el tercer y el quinto día tras el comienzo de la puesta, para ir descendiendo gradualmente. En general, la gran mayoría de los huevos son depositados en los primeros 10 días, en los 5-10 días posteriores continua la puesta de un número menor de huevos, tras la cual las exhaustas hembras morirán (Sonenshine, 1991).

El ciclo de *R. microplus* se divide en dos fases: una parasitaria, en la cual la garrapata se desarrolla sobre el bovino, y otra no parasitaria o de vida libre, que se cumple fuera del hospedador, en las pasturas (Fig. 1). La fase no parasitaria comienza cuando las hembras ingurgitadas (teleoginas) se desprenden del bovino y caen al suelo para poner sus huevos. Esta fase no parasitaria se subdivide en varios períodos (Nava *et al.*, 2011).

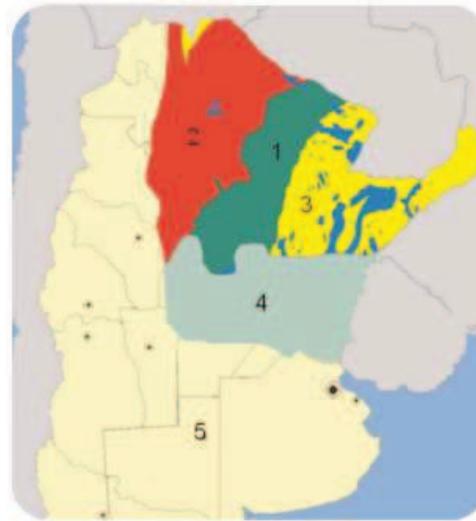
1. Período de pre-oviposición: espacio de tiempo transcurrido entre la caída de la teleogina y la postura de los primeros huevos, que normalmente es de 2 a 6 días, aunque puede extenderse hasta un mes en otoño o invierno.
2. Período de oviposición: desde que las teleoginas comienzan la oviposición hasta que ponen su último huevo.

La duración relativamente constante de la fase parasitaria del *R. microplus* le confiere capacidad para realizar más de un ciclo anual. El número y la duración de ciclos anuales van a estar determinados por la duración de la fase no parasitaria, la cual es influenciada por factores abióticos como la temperatura y la humedad del ambiente. En zonas tropicales, la garrapata común del bovino puede desarrollar hasta 5 ciclos anuales, pero en áreas más meridionales, como el norte de Santa Fe, sólo tiene capacidad para completar entre 2 o 3 ciclos anuales (Nava *et al.*, 2011).

En Argentina se distribuye principalmente en zonas tropicales y subtropicales del NEA y NOA ubicadas al norte de los paralelos 30°-31° S, con excepción de la región andina. Se la encuentra en las provincias de Salta, Tucumán, Jujuy, Santiago del Estero, Santa Fe (al norte del paralelo 30° S), Córdoba, Catamarca, Formosa, Misiones, Corrientes y Chaco (Nava *et al.*, 2011).

La distribución de la garrapata en Argentina está relacionada a dos factores ambientales: el déficit hídrico y las temperaturas. En este sentido, la presencia de la garrapata requiere de inviernos benignos (mayoría de los meses con temperaturas superiores a 14,5 °C) y déficit hídricos bajos (climas relativamente húmedos). La aptitud ecológica de cada región para *R. microplus* se puede clasificar en función de estas dos variables (Nava *et al.*, 2011):

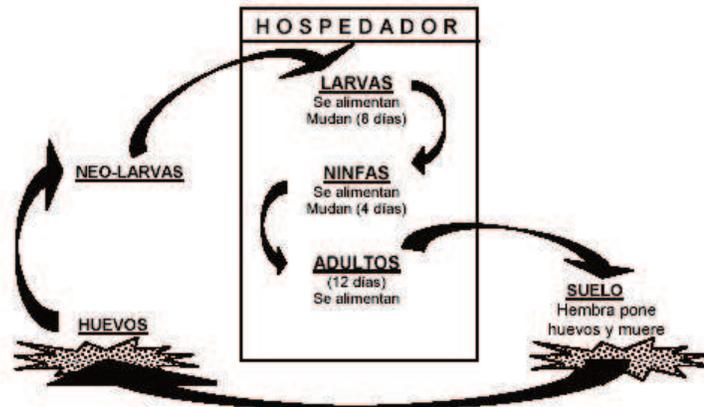
- 1) Área intermedia: déficit hídrico anual < 200 mm; 3-4 meses del año con  $T^{\circ} < 15.4^{\circ}\text{C}$ ;
- 2) Área **intermedia**: déficit hídrico anual < 200-500 mm; 3-4 meses del año con  $T^{\circ} < 15.4^{\circ}\text{C}$ ;
- 3) Área favorable: déficit hídrico anual < 200 mm; 1 mes del año con  $T^{\circ} < 15.4^{\circ}\text{C}$ ;
- 4) Área erradicada por la campaña de lucha contra la garrapata;
- 5) Área naturalmente libre



**Fig. 1:** Clasificación de la aptitud ecológica de cada región para *R. microplus*. (Nava *et al.*, 2011)

**Cambiar todos los números y paginación de las figuras por el agregado es ésta del mapa**

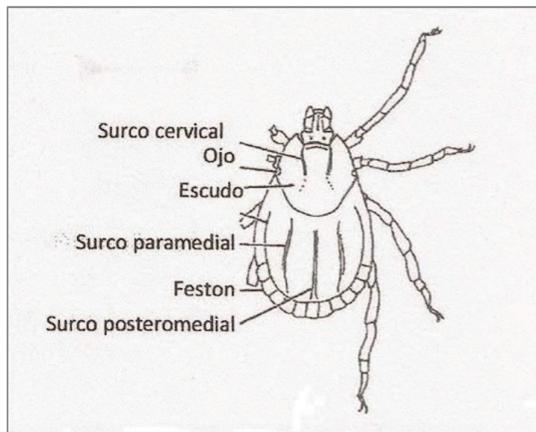
**Fig. 1:** Esquema del ciclo de vida (Cetrá, 2001).



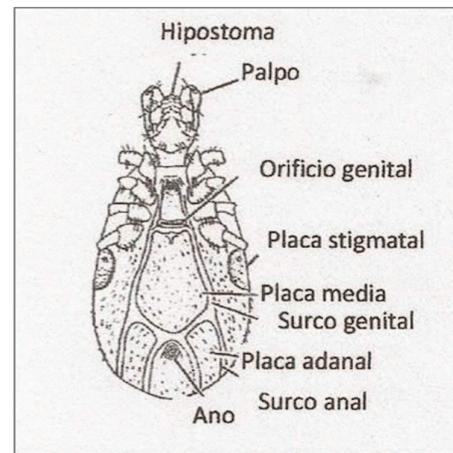
### 2.1.3 - Morfología

Las garrapatas duras poseen un escudo dorsal (scutum) y su aparato bucal (capitulum) sobresale cuando se lo observa desde arriba. Las garrapatas del género *Rhipicephalus* poseen un capitulum (*basis capitulum*) con base hexagonal. La placa espiracular tiene forma redonda u ovalada y los pedipalpos son pequeños, comprimidos y acanalados dorso lateralmente. Los machos tienen placas adanales y accesorias. El surco anal está ausente o poco definido en las hembras y levemente visible en los machos. Las garrapatas *R. microplus* adultas poseen un capitulum corto y derecho. Las patas son de color amarillo pálido y existe un amplio espacio entre el primer par de patas y el hipostoma (trompa). El cuerpo tiene forma entre ovalada y rectangular. El escudo es ovalado y más ancho en la porción anterior. El hipostoma es corto y derecho (Fig. 2 y 3). Las ninfas de esta especie poseen un scutum de color marrón anaranjado. El cuerpo tiene forma ovalada y es más ancho en la porción anterior. El color del cuerpo varía de marrón a azul grisáceo, con áreas blancas en la parte anterior y en los bordes. Las larvas de *R. microplus* poseen un capitulum corto y derecho y un cuerpo de color marrón o crema. Las larvas poseen seis patas en lugar de ocho (Institute for International Cooperation in Animal Biologic, 2007).

El capítulo tiene una sustancia quitinosa que le permite proteger su sistema nervioso y está compuesta por dos órganos de corte llamados quelíceros, los cuales rasgan la piel del hospedador e introducen el órgano de succión (hipostoma) y dos apéndices o palpos, situados al lado del hipostoma, protegiéndolo, que actúan como soporte para adherirse al hospedador (Gutiérrez Osorio, 2006). Éstos están conformados por cuatro segmentos; en el último se encuentra el órgano palpal, por medio del cual la garrapata detecta las zonas más delgadas de la piel y donde existe mayor irrigación sanguínea (Fig. 2 y 3) (Parra *et al.*, 1999).



**Fig. 2.** Vista dorsal de una hembra



**Fig. 3.** Vista ventral de un macho

#### 2.1.4 - Efectos del parásito

La pérdida de sangre como consecuencia de la alimentación de los parásitos es una de las principales causas que afectan la productividad. Las garrapatas duras concentran la sangre que ingieren eliminando agua de la misma que devuelven al hospedador. Teniendo en cuenta el proceso anterior, se ha calculado que cada hembra de las especies de gran tamaño puede expoliar hasta 2 - 4 g de sangre, lo que explica las anemias

agudas que frecuentemente se observan en animales con infestaciones intensas (Manzano Román *et al.*, 2013).

Se puede mencionar que se considera que una teleogina puede llegar a succionar de 0,5 a 3 ml. de sangre durante su ciclo parasitario; esto quiere decir que, en zonas medianamente infestadas, la pérdida de sangre puede alcanzar de 40 a 50 litros por animal en un año, cifra que aumenta si la infestación es intensa, es decir que esta cantidad de sangre, por ejemplo, nunca pasará por la ubre para la producción de leche (Kopp Gómez, 2011). Cada garrapata hembra que completa su ciclo parasitario en los bovinos ocasiona una disminución del incremento de peso corporal de 0,3 hasta 1,0 g del hospedador que parasita.

Por cada 1400 garrapatas adultas por año, FAO ha establecido la pérdida de un kilo de carne por animal. Por ejemplo, estudios de la dinámica poblacional en Guatemala han determinado que un bovino cría de 25000 a 95000 garrapatas por año con una media de 55000, esto es una pérdida de 18 a 68 kilos de carne por animal (Kopp Gómez, 2011).

Diferentes países han hecho estimaciones de las pérdidas ocasionadas por las garrapatas en la ganadería; FAO en 1984, indicó que la infestación por garrapatas y los costos involucrados en su control, significan una pérdida mundial para la ganadería bovina de U.S \$7.3 dólares por cabeza / año. Las estimaciones realizadas en Queensland son de un costo de U\$S 141 millones en 1999 (Jonsson *et al.*, 2001). En estos costos también influyen los pesticidas necesarios para prevenir las infestaciones y la disminución en la producción de carne y leche; más aún cuando los garrapaticidas son ineficientes (Blandon, 2006). En Texas los costos por pérdidas físicas y erogaciones

para controlar esta especie mediante el programa de baños de inmersión obligatorio se estimó en U\$S 1 322 724 132 (Dietrich y Adams, 2000).

En EUA, antes de la erradicación de los vectores *R. microplus* y *R. annulatus*, las pérdidas económicas indirectas por la Babesiosis fueron estimadas en tres mil millones de dólares. Si las garrapatas no hubieran sido erradicadas de EUA, las pérdidas anuales de la industria ganadera serían aproximadamente de mil millones de dólares (Domínguez-García, 2010)

La industria del cuero es también afectada de manera importante pues, del ganado infestado con garrapatas se obtiene material de inferior calidad debido a las cicatrices derivadas de sus picaduras.(Guglielmone y Mangold, 2002).

En un trabajo realizado por Späth *et al* (1994) estimaron la pérdida anual provocada por esta garrapata y las enfermedades asociadas en la República Argentina, utilizando precios en U\$S del período julio-septiembre 1992. La pérdida total se estimó en U\$S 185.802.273. De estos, U\$S 120.551.636 (63,6%) fueron adjudicados al efecto físico de la infestación (daños en cueros, merma en la ganancia de peso y mortalidad); U\$S 34.086.687 (18,0%) al efecto físico de los hemoparásitos (mortalidad y morbilidad). Los costos por el control del *R. microplus* (pesticidas, mano de obra, costo de mantenimiento del capital de las instalaciones utilizadas para la aplicación de pesticidas por inmersión y costos del estado) ascendieron a U\$S 26.305.113 (14%). En tanto que el costo del control de los hemoparásitos alcanzó U\$S 4.859.287 (2,6%). En suma el 83,2 % de las pérdidas se adjudicaron a los efectos físicos del problema y el 16,7% a los costos por el control del *R. microplus* como de los hemoparásitos del vacuno.

## **2.2- APECTOS GENERALES DE LOS MÉTODOS DE CONTROL**

El principal método de control involucra el uso de acaricidas sintéticos. Se ha detectado el desarrollo de cepas resistentes de *R. microplus* a los diferentes agentes químicos en gran parte del mundo lo que disminuye la eficiencia de los acaricidas (FAO, 2004). Además, la contaminación ambiental y la contaminación de la carne y leche están asociadas con éste tipo de medio de control (Sonenshine, 1993; Borges *et al.*, 2011).

### **2.2.1- Marco legal**

El control de *R. microplus*, en Argentina, está reglamentado por el SENASA y este es el organismo rector que a través de la “ley de lucha obligatoria contra la garrapata” (Ley N°12566) indica los procedimientos que productores y veterinarios deben seguir en las distintas áreas del país. En la provincia de Santa Fe, la reglamentación está dada por la Resolución Provincial N°1144/14 (Plan Provincial de Control y Erradicación de la Garrapata común del Ganado Bovino de la Provincia de Santa Fe), mediante la cual se incorporaron departamentos (San Cristóbal, San Justo, San Javier y Garay) y parte de Vera, 9 de Julio y General Obligado a la zona con garrapatas debido a las re-infestaciones que se sucedieron durante los últimos años. De estos lugares se la había erradicado, pero la falta de controles ha llevado a la situación actual de estar presente nuevamente.

### **2.2.2- Acaricidas químicos**

En actualidad la utilización de acaricidas químicos es la principal herramienta disponible. La técnica de aplicación más común es el baño de inmersión, que en

ausencia de resistencia a los productos utilizados constituye un método eficaz y de bajo costo. El manejo incorrecto de los baños (instalaciones deficientes, errores en la preparación del pie de baño y en la reposición, acumulación de costras y sedimentos por mala limpieza, ausencias de controles periódicos del nivel del baño, animales incorrectamente sumergidos) actúa en detrimento de la eficacia de esta herramienta de control. Otros métodos que pueden ser utilizados son los baños de aspersión, la vía tópica (“pour on”) y el empleo de inyectables (Nava *et al.*, 2011).

### **2.2.3- Rotación de pasturas**

Este método se sustenta en el conocimiento de la ecología del *R. microplus*, específicamente en la duración de la fase de vida libre de su ciclo biológico. Tiene como objetivo disminuir la infestación con garrapatas de las pasturas. Mediante el uso diferido de las pasturas se intenta incrementar la mortalidad de las larvas en su fase de vida libre por inanición. La rotación de pasturas como una estrategia para el control de la garrapata común del bovino permite minimizar el uso de acaricidas y los consecuentes riesgos de aparición de resistencia a estos compuestos químicos. Sin embargo, la subutilización de las pasturas que conlleva el empleo de este método acarrea un costo económico que debe ser tenido en cuenta (Nava *et al.*, 2011).

### **2.2.4- Uso del fuego**

Esta es una práctica con muchas desventajas, principalmente en lo referido al manejo. Asimismo, la eficacia de este método para eliminar una proporción significativa de las garrapatas presentes en las pasturas no está comprobada fehacientemente (Nava *et al.*, 2011).

### **2.2.5- Vacunas**

Existen dos vacunas contra la garrapata común del bovino, una producida en Australia (TickGARD®) y la otra en Cuba (GAVAC®). Ninguna de las dos fue lanzada comercialmente en Argentina. Ambas vacunas se formularon con el antígeno Bm86 de células intestinales de *R. microplus*. A diferencia de la inmunidad pasiva, que en garrapatas se da básicamente en forma de hipersensibilidad cuando las larvas se fijan al bovino, la inmunidad adquirida provocada por estas vacunas actúa sobre la capacidad reproductiva de las garrapatas hembras. Hasta el momento, los resultados dispares arrojados por los test de eficacia de estas vacunas en condiciones de campo han limitado su uso extendido como un método alternativo para el control de la garrapata común del bovino (Nava *et al.*, 2011).

### **2.2.6- Control a través de productos de origen natural**

A partir de los años 70 y como surgimiento de los grupos ecologistas, comenzó a haber una mayor preocupación sobre la utilización indiscriminada de los productos químicos nocivos para el medio ambiente en el combate de las plagas agrícolas. Los insecticidas pasan a ser desarrollados para tener una selectividad específica para las plagas. La preocupación sobre la bio-degradabilidad fue otros de los puntos a tener en cuenta para disminuir los impactos ambientales (Vivan, 2005).

Debido a esto desde hace décadas se vienen desarrollando alternativas de control de parásitos a base de plantas. Los buenos resultados demostrados hasta el momento indudablemente estimulan a aumentar el estudio de este tipo de acaricida.

La toxicidad de una planta contra los insectos y/o ácaros es una cualidad insecticida/acaricida necesaria para protegerse de los parásitos que puedan afectarla. Para su uso como terapia antiparasitaria se deben considerar varios aspectos, tales como: forma de extracción y conservación de los extractos, eficacia en varias concentraciones, ausencia de toxicidad para los mamíferos y animales superiores, fácil obtención, manipulación, aplicación y viabilidad económica (Viegas Junior, 2003; Vivan, 2005). Este problema refleja la dificultad de controlar los extractos de plantas debido, entre otros aspectos, por el alto número de compuestos químicos presentes (Evans, 1996).

La ventaja de la alta bio-degradabilidad, de este tipo de productos desde el punto de vista ecológico, se transforma en una desventaja terapéutica ya que pierden estabilidad química al ser sometidos a las acciones del medio ambiente. Esta particularidad está dada por la degradación causada por la luz del día, la temperatura, el pH y la acción de los microorganismos (Mulla y Su, 1999).

Si bien la complejidad y múltiples acciones de los componentes pueden resultar en un obstáculo para detectar los principios más activos, el desarrollo de la resistencia a los mismos por parte de los parásitos se retarda (Mulla y Su, 1999; Magadum *et al.*, 2009; Borges *et al.*, 2011).

Pueden producirse oscilaciones en los resultados debido a las condiciones edafoclimáticas, cultivo y almacenamiento del material recogido (Heimerdinger, 2006). Por ejemplo, el almacenamiento de los frutos de *Melia azedarach* durante 5 meses a temperatura ambiente causa decaimiento de su efecto acaricida (Sousa *et al.*, 2008). Yakkundi *et al* (1995) observaron un 5 % de reducción en azadiractina después de un

mes de almacenamiento de semillas de *Azadirachta indica* y 35 % luego de 4 meses. Borges *et al.*, (2011) observaron disminución de azadiractina y salanina después de almacenarlas durante 6 meses.

Aunque la composición química de los compuestos de las plantas está determinada por las características genéticas de las mismas, los factores edafo-climáticos tienen alta influencia (Lapa, 1999). Por consiguiente la composición química de los extractos de las plantas varían de acuerdo al origen de la misma. Esto fue observado en diferentes componentes de los frutos de *M. azedarach* provenientes de distintas partes del mundo (Morgan y Thornton, 1973; Arias y Hirschmann, 1988; Cabral, 1996). En resultados relacionados con la acción contra *R. microplus* en particular, Sousa *et al* (2008) observaron variaciones en la eficacia comparando extractos de *M. azedarach* obtenidos de diferentes regiones de Goiás y Mato Grosso, Brasil. De 8 extractos testados: en 5 se observaron rangos desde 86,8 a 100 % en el control de la reproducción; mediana eficiencia (41,8 y 51,2) en 2 y ningún efecto en el restante.

Pese a los inconvenientes mencionados existen muchos trabajos donde se ha evaluado la acción de diferentes productos naturales para controlar la garrapata común del bovino con resultados muy promisorios. Por solo citar algunas especies estudiadas: Chagas *et al* (2014) demostró que utilizando aceite esencial de *Cymbopogon* spp. y *Corymbia citriodora* logró controlar al *R. microplus* tanto *in vitro* como *in vivo*. Hübner *et al.* (2015) evaluaron aceites de *Ocimum* spp sobre larvas. Peixoto *et al* (2015) con *Lippia alba* también demostró efectos *in vitro* sobre larvas y teleoginas así como Pazinato *et al* (2014) con aceite de *Melaleuca alternifolia* pudo demostrar el control de la reproducción en forma *in vitro*.

### 2.3 - RESISTENCIA A LOS GARRAPATICIDAS

La resistencia se define como la detección por medio de pruebas sensitivas, de un aumento significativo de individuos dentro de una misma especie y población de parásitos capaces de tolerar dosis de droga que han probado ser letales para la mayoría de individuos de la misma especie (FAO, 2004). El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo que aparece por selección genética (Lee *et al.*, 1999).

La resistencia cruzada (RC) es el mecanismo que utilizan especies de insectos resistentes para sobrevivir a la exposición de insecticidas relacionados químicamente, usando un patrón de detoxificación genérico. La resistencia múltiple (RM) es la utilización de varios mecanismos hacia la acción de varias clases de insecticidas no relacionados químicamente (Metcalf, 1989).

Los artrópodos y por extensión los ácaros e insectos son organismos más antiguos que el hombre con aproximadamente 400 millones de años. Están genéticamente bien evolucionados y se los considera de gran longevidad como especie. Su adaptación y resistencia permiten su sobrevivencia enmarcándolos perfectamente en el paradigma darwiniano de mutación-evolución y por consiguiente la sobrevivencia del más fuerte (Bordin, 1998).

Esta situación se debe a la mutabilidad potencial del parásito (presión selectiva sobre los individuos resistentes), al grado variable de desafío relacionado con la variabilidad epidemiológica entre períodos favorables y adversos, a la capacidad bioquímica de la especie, uso inadecuado de algunas prácticas terapéuticas, dosificaciones inadecuadas u otros factores. A veces la resistencia está instalada en una población de garrapatas antes

que éstas entren en contacto con el pesticida. Eso ocurre por la existencia en la población de algún individuo naturalmente resistente (Bordin, 1998)

También pueden producirse alteraciones genética (mutaciones) por el uso inadecuado de los productos acaricidas tornándose resistentes algunos individuos. Esto se denomina establecimiento de un alelo resistente. Con la continuidad en el uso de ese producto se aumenta el número de garrapatas con esa característica de resistencia una vez que mueran los individuos sensibles y los resistentes se reproduzcan entre ellos produciendo cada vez más resistentes y menos individuos sensibles. Esto se denomina propagación del alelo resistente, por presión de selección (Bordin, 1998).

Los garrapaticidas en su gran mayoría van decayendo en su eficiencia permitiendo que las garrapatas en contacto con ellos sobrevivan y de esa manera activen su sistema enzimático de defensa, transmitiendo a su descendencia todos los caracteres de resistencia adquiridos. Bordin (1998) afirma que si los garrapaticidas eliminasen siempre el 100 % de los individuos, no existirían los problemas de resistencia. Esto explica porque los productos con elevado poder residual desarrollan resistencia de forma más rápida que los demás. En ese caso hay un contacto casi permanente en varios niveles con todas las formas jóvenes que infestan y se desarrollan en el cuerpo de animal. La principal característica de la resistencia presentada por las garrapatas son genéticas y de carácter irreversible.

La velocidad con que se desarrolla la resistencia en una población depende principalmente de la frecuencia inicial de los genes que confieren resistencia, la intensidad de selección, el grado de dominancia del gen y la relativa capacidad del genotipo (Stone, 1972).

En general, la frecuencia de genes que confieren resistencia es muy baja en poblaciones que no han estado bajo presión de selección. La velocidad de mutación natural o espontánea para estos genes es baja (de 1/100.000 a 1/1.000.000) (Fragoso *et al.*, 1995).

El desarrollo de la resistencia se divide en tres fases (Fragoso *et al.*, 1995):

Fase de establecimiento: es cuando surge el alelo resistente en una población; habitualmente este proceso se efectúa por mutaciones naturales y en forma independiente a la presión de selección.

Fase de desarrollo: es el aumento del número de individuos resistentes y ocurre por la tasa de sobrevivencia preferencial sobre los individuos susceptibles después del uso de productos químicos. En este proceso pueden seguirse dos modos de selección:

a) **rápida**, ocurre cuando el gen que confiere resistencia es dominante o parcialmente dominante y permite la selección de heterocigotos.

b) **lenta**, cuando los alelos son recesivos o son inefectivos en forma aislada.

Fase de emergencia: ocurre por una elevada tasa de presión de selección, es una fase corta y el alelo resistente es lo suficientemente común en la población para manifestar una reducción de la efectividad del ixodicida.

Mientras permanezcan las técnicas actuales de control de los parásitos seguirán estando presente las probabilidades de desarrollo de resistencia a los futuros antiparasitarios (Rosario y Hernández, 2001).

En las última dos décadas, se encontraron poblaciones de *R. microplus* resistentes a los acaricidas piretroides en Corrientes, Santa Fe, Salta, Chaco, Santiago del Estero y norte de Córdoba (Nava et al., 2011)

Esta situación es de especial relevancia, debido a que el espectro de alternativas a los piretroides para baños por inmersión es muy pequeño. Los últimos acaricidas disponibles en el mercado para utilizar en bañaderos químicos son las formamidinas (amitraz). En 2010 fue detectado un foco de garrapatas resistentes al amitraz en la provincia de Corrientes, en el departamento de Santo Tomé (Cutullé et al., 2013).

Por otro lado, Clark y Sánchez (1983) publicaron resultados que muestran la intoxicación de los animales sometidos a consecutivos baños de acaricidas químicos y que, sumados al “estrés” físico del tratamiento, predisponen a los bovinos a otras enfermedades.

La resistencia a los garrapaticidas comerciales ha surgido como un problema en varios países, especialmente con relación a *R. microplus*. La aplicación de los garrapaticidas se realiza mayoritariamente a través de pulverizaciones, baños de inmersión y en forma parenteral y no siempre se realizan en forma conveniente. Se puede decir en términos generales que el uso de los garrapaticidas está dirigido por la presión del mercado, existiendo un gran vacío de información técnica con relación a la mejor manera de utilizarlos y también hay poco conocimiento sobre la bio-ecología de las garrapatas (Martins, 2004).

La dependencia del control químico trae como consecuencias problemas de impacto ambiental, elevados costos y desarrolla resistencia. Todos estos problemas enfatizan la

necesidad de investigar alternativas viables de control sobre este ectoparásito. Es importante el conocimiento de la evolución de la resistencia a los garrapaticidas ya que ayudarían al conocimiento del tratamiento integral del problema (Guglielmone *et al.*, 2007)

Como se mencionó anteriormente, existen otras drogas de utilidad para el control de la garrapata común del bovino en nuestro país, como son las lactonas macrocíclicas, el fluazurón y el fipronil.

Van Leeuwen *et al.*, (2010) afirma que en México, EE.UU. y muchas otras regiones de Sud América se han encontrado poblaciones de *R. microplus* que son resistentes a los organofosforados, piretroides y recientemente al amitraz y que la mayoría de los casos estudiados han demostrado que se trata de cambios en la sensibilidad del sitio de destino debido a mutaciones puntuales, o el secuestro / metabolismo del acaricida antes de que alcance el sitio diana debido a los cambios cuantitativos o cualitativos en las principales enzimas de desintoxicación que poseen los ácaros (esterasas, P450 monooxigenasas y gluta-S-transferasa).

En el marco de los mecanismos de formación de la resistencia, la plasticidad del genoma de los ácaros ha facilitado el desarrollo de la misma hacia los insecticidas más importantes, y mientras permanezcan las técnicas de uso actuales, permitirá el desarrollo de resistencia a insecticidas futuros (Rosario y Hernández, 2001).

Según Guerrero *et al* (2012) ya comienzan a entenderse a nivel molecular los mecanismos de resistencia para los piretroides. Existe una comprensión básica de los mecanismos metabólicos que respaldan la resistencia a los organofosforados en las

garrapatas, sin embargo, la resistencia del sitio de destino parece compleja. Se sabe muy poco acerca de los mecanismos de resistencia al amitraz, fipronil y las lactona macrocíclica.. Existe un consenso general de que los avances en la genómica de garrapatas acelerarán el desarrollo de nuevos objetivos moleculares y nuevas herramientas de diagnóstico para la detección de resistencia a los acaricidas, lo que a su vez puede mejorar las estrategias para el control de garrapatas.

A continuación se presenta una lista de los diferentes diagnósticos de resistencia publicados en los últimos años:

1. Piretroides, Organofosforados, mezclas Piretroides + Organofosforados, Fipronil y Amitraz en Uruguay (Cuore *et al.*, 2012). Al
2. Amitraz, diazinon; cipermetrina, chlorpyrifos, diclorvós (DDVP), etión, butóxido de piperonilo en Brasil (Koller *et al.*, 2009).
3. Deltametrina en Nueva Caledonia (Ducornez *et al.*, 2005).
4. Fipronil en Brasil (Castro-Janer *et at*, 2010 a)
5. Fipronil en Uruguay (Castro-Janer *et at*, 2010 b)
6. Ivermectina y Fipronil en Uruguay (Castro-Janer *et at*, 2011)
7. Cipermetrina en Argentina (Provincias de Santa Fe, Chaco, Corrientes, Formosa, Misiones, Córdoba y Salta). (Guglielmone *et al*, 2006)
8. Fluazurón en Brasil (Reck *et al*, 2014)

#### **2.4- EXTRACTOS VEGETALES**

Los aceites esenciales están formados por una mezcla de componentes volátiles, son parte del metabolismo de un vegetal, y en su composición se hallan Terpenos,

Alcoholes, Ácidos, Esteres, Aldehídos, por sólo mencionar algunas familias de compuestos que les confieren aroma, sabor y color característicos. Se obtienen habitualmente por extracción con vapor de agua o solventes y también mediante operaciones mecánicas, según su origen.

Se les llama aceite por su apariencia física y su consistencia que es bastante parecida a los aceites grasos, pero se distinguen de ellos, porque estos últimos están formados por esterres glicéridos de ácidos grasos no saturados. En un aceite esencial tal como se lo obtiene a partir del material vegetal se ha llegado a identificar en su composición más de 200 compuestos químicos, siendo algunos de ellos solo trazas, pero que en el contexto general pueden ser muy activos (Lidster *et al.*, 2012).

Los AEC son generalmente líquidos a la temperatura ambiente, y poseen el sabor, aroma y color peculiar de las plantas de las cuales se extraen. Por exposición al aire y a la luz los aceites esenciales se tornan espesos y se colorean intensamente. El olor es variable y constituye su característica más definida; son muy poco solubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos, por ejemplo en acetona, éter, pentano, alcohol etílico (Bandoni, 2002; Guenther, 1972)

Los aceites esenciales son generalmente solubles entre ellos, para hacer mezclas especiales, como en el caso de los perfumes.

Su función en las plantas básicamente está asociada a mecanismos de atracción, que tienen que ver con la polinización y repelencia, constituyendo un medio de defensa frente a depredadores (microorganismos, hongos, insectos, ácaros, herbívoros).

Por lo común los AEC son elaborados en el plasma y vertidos en vacuolas que se encuentran en el citoplasma. Químicamente varían mucho de unas a otras especies vegetales, de ahí la gran variedad de sabor, aroma y color (SAC) (Bandoni, 2002).

Dentro de sus compuestos hay algunos que por sí solos tienen un gran valor comercial por el uso que se puede hacer de los mismos: medicinal, cosmético y alimenticio. Dichos compuestos confieren a cada aceite propiedades intrínsecas, que son los que determinan sus usos; por ejemplo en el caso de las Mentas (*Menta arvensis* L.) (*Menta pipertita* L.), el componente principal es el mentol; en el Orégano (*Origanum vulgare*) son el timol y el carvacrol; en la Lavanda (*Lavandula*, lavanda, alhucema, espliego o cantueso) el acetato de linalilo; en el Lemon Grass (*Cymbopogon* spp) el citral; estos compuestos mayoritarios presentes en el AEC son los que le dan valor comercial (Bandoni, 2002).

#### **2.4.1- Ciclo de formación de los aceites esenciales**

Tanto en animales como en vegetales, la energía para los fenómenos vitales proviene de una cadena de oxidaciones y reducciones, en las que se producen sustancias (metabolitos) útiles para el crecimiento o reproducción del organismo, o inútiles y hasta tóxicas (Domínguez, 1988).

Entre los numerosos tipos de sustancias producidos por una planta, los alcaloides, aceites esenciales, terpenoides, glicósidos, flavonoides; pueden o no encontrarse en un determinado vegetal; carecen de función definida en el metabolismo y, por su abundancia o ausencia, proporcionan a una planta características químicas útiles para su clasificación botánica o su aprovechamiento por el hombre (Domínguez, 1988).

En la Figura 4 aparece una interrelación de los productos primarios y secundarios del metabolismo vegetal. Si se toman en cuenta los objetivos de la fotoquímica, la discusión se limitará a la biogénesis de los compuestos secundarios, y se recuerda que en las reacciones participan las enzimas, que son catalizadores orgánicos complejos muy efectivos y estereo-selectivos. La introducción o eliminación de un grupo CO<sub>2</sub> es fácil, con intervención de la tiamina (vitamina B1). Un grupo amino es introducido o substituido por un carbonilo con participación de la piridoxina o sus derivados. En la hidrogenación o deshidrogenación intervienen los derivados de la nicotinamida o de la riboflavina (vitamina B2). Además es fácil la introducción o eliminación de grupos metilo, unidos a un nitrógeno o un oxígeno; pero no la producción de grupos etoxi o N-etil. De acuerdo a su probable origen biogénico, los compuestos naturales pueden ser: acetogéninas, (derivados del ácido shikímico) e isoprenoides (derivados del ácido mevalónico) (Domínguez, 1988)

**Manzoli, lo mismo que Baravalle indica colocar más cerca de este párrafo a la figura 4**

Con la finalidad de conocer los compuestos que forman parte de la composición del AEC, nos centraremos en la ruta de los derivados del ácido mevalónico, los isoprenoides.

Los isoprenoides son compuestos frecuentes en los aceites esenciales, que derivan del isopreno (2-metilbutadieno-1,3) por la unión “cabeza-cola” de dos moléculas de isopreno (monoterpenos), tres (sesquiterpenos), cuatro (diterpenos) y así sucesivamente.

Se ha encontrado que en la biosíntesis de los llamados isoprenoides, el ácido mevalónico (ácido 3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), se convierte en el reactivo pirofosfato de isopentilo o su isómero. Al reaccionar estos, se forma el pirofosfato de geranilo con el esqueleto de un monoterpeno. La unión de éste con su isómero alílico origina un triterpeno. La unión similar del pirofosfato de farnesilo con otra de pirofosfato de isopentilo origina un diterpeno (Domínguez, 1988)

#### **2.4.2- Generalidades sobre la biosíntesis**

La diversidad de las estructuras terpénicas naturales, hace que sea difícil o al menos comprometido, cualquier intento de generalización. Por ello se considerará únicamente el estudio de los mecanismos particulares, que justifiquen la existencia de los principales esqueletos encontrados, a medida que se vaya describiendo la estructura de los mismos.

Sin embargo es indispensable hacer hincapié sobre el hecho de que la existencia de los terpenos (y de los esteroides) está condicionada por tres secuencias reaccionales fundamentales:

- Formación del “isopreno activo” a partir del acetato vía ácido mevalónico
- Acoplamiento “cabeza-cola” de las dos unidades de C<sub>5</sub>, que justifica la existencia de mono, sesqui, di y politerpenos.
- Acoplamiento “cola-cola” de las unidades C<sub>15</sub> o C<sub>20</sub> que justifica la existencia de triterpenos, esteroides y carotenos.

### **2.4.3- Composición del aceite esencial crudo (AEC)**

Los AEC son mezclas complejas y muy variables de constituyentes. Los principales componentes de un aceite esencial son: monoterpenos (acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos), sesquiterpenos (acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos), no terpenoides, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, compuestos oxigenados, como ser alcoholes, aldehídos, cetonas, epóxidos, epoxicetonas, ésteres, éteres, fenoles, ácidos y sulfuros. Los terpenoides forman parte de un grupo o familia muy numeroso de sustancias que estructuralmente contienen un esqueleto isopentánico repetido. Dos unidades isoprenicas originan una unidad terpénica (monoterpenoides). Tres unidades isoprenicas son 1,5 unidades terpénicas (sesquiterpenoides),  $2n$  unidades isoprenicas producen  $n$  unidades terpénicas, constituyendo los politerpenoides (di, tri, tetra terpenoides) Los monoterpenoides y sesquiterpenoides se encuentran muy difundidos en la naturaleza, en diferentes especies vegetales, son sustancias volátiles de olor generalmente agradable, y que existen en hojas, flores, frutos, tallos, semillas y raíces. Por lo general los terpenoides presentes en los aceites esenciales pertenecen a las estructuras siguientes: hemiterpenoides (C<sub>5</sub>), monoterpenoides (C<sub>10</sub>), sesquiterpenoides (C<sub>15</sub>) y algunos diterpenoides (C<sub>20</sub>) (Bruneton, 1991).

### **2.4.4- *Schinus molle* L.**

El aguaribay (*S. molle* L.), familia Anacardiaceae conocido también con otros nombres, como por ejemplo, “molle”, “pimienta del diablo”, “terebinta”, “pimientero”, es un árbol de gran porte y de follaje persistente. Puede alcanzar 8-10 metros de altura, presenta la corteza rugosa de color rojizo; la copa está formada por ramificaciones

flexibles de aspecto rugoso. Las hojas son compuestas, imparipinnadas de 5-9 pares de folíolos lanceolados, agudos, aserrados, de hasta 5 cm de largo. Las flores son amarillentas, dispuestas en amplias panojas axilares y terminales. El fruto es una drupa verdosa (inmaduro) o pardo rojiza (maduro), de más o menos 0,5 cm de diámetro (Dimitri, 1988; Cabrera, 1976). (Foto 2)

**Foto 1:** Bureta con AEC de *Schinus molle* L



El fruto contiene la mayor

**Foto 2:** Aguaribay (*S. molle*)



orden

decreciente, las flores, las hojas y por último los tallos (Bandoni, 2002).

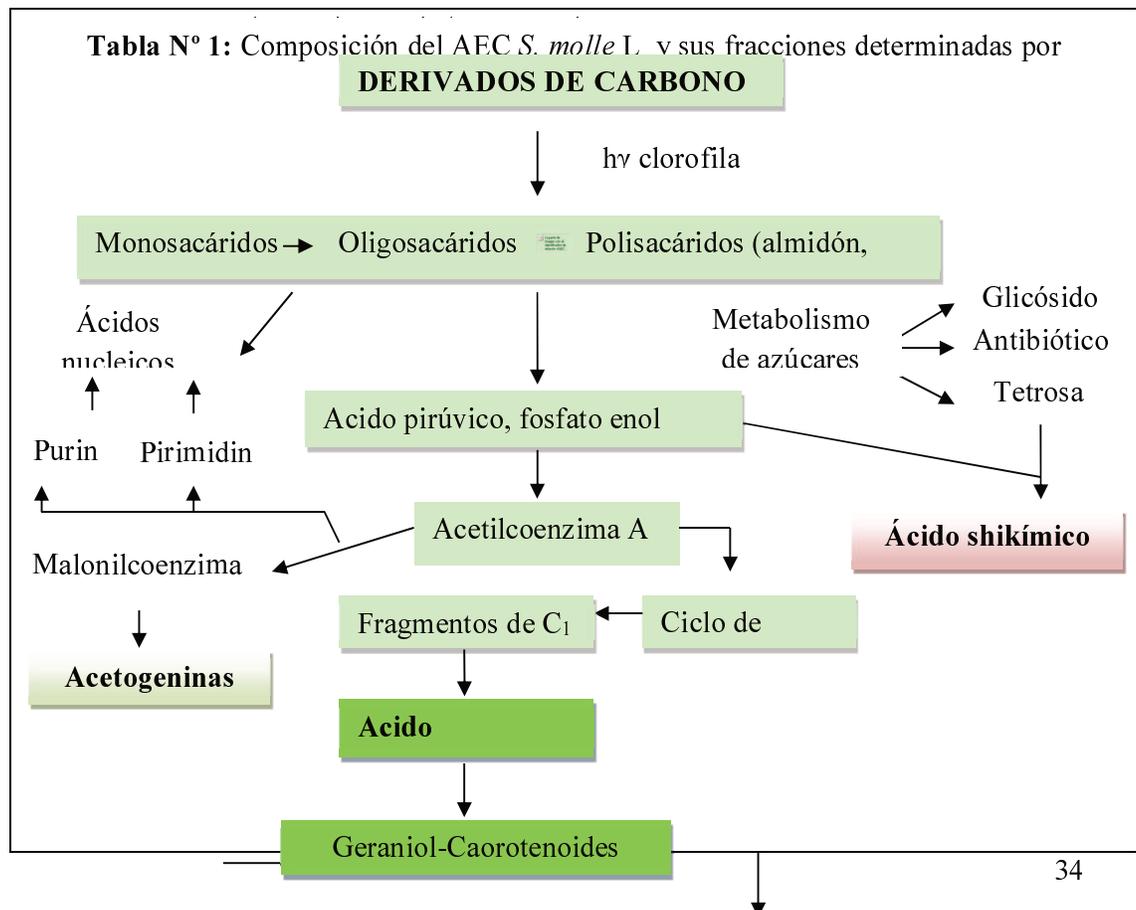
Según la norma IRAM 18608-1, se define aceite esencial de *S. molle* L. al producto obtenido por arrastre con vapor de agua de los frutos y hojas de *Schinus molle* L. El perfil cromatográfico para éste indica la presencia de alfa-pineno, beta-pineno, sabineno, terpinen-4-ol y germacreno D (Viturro *et al.*, 2010).

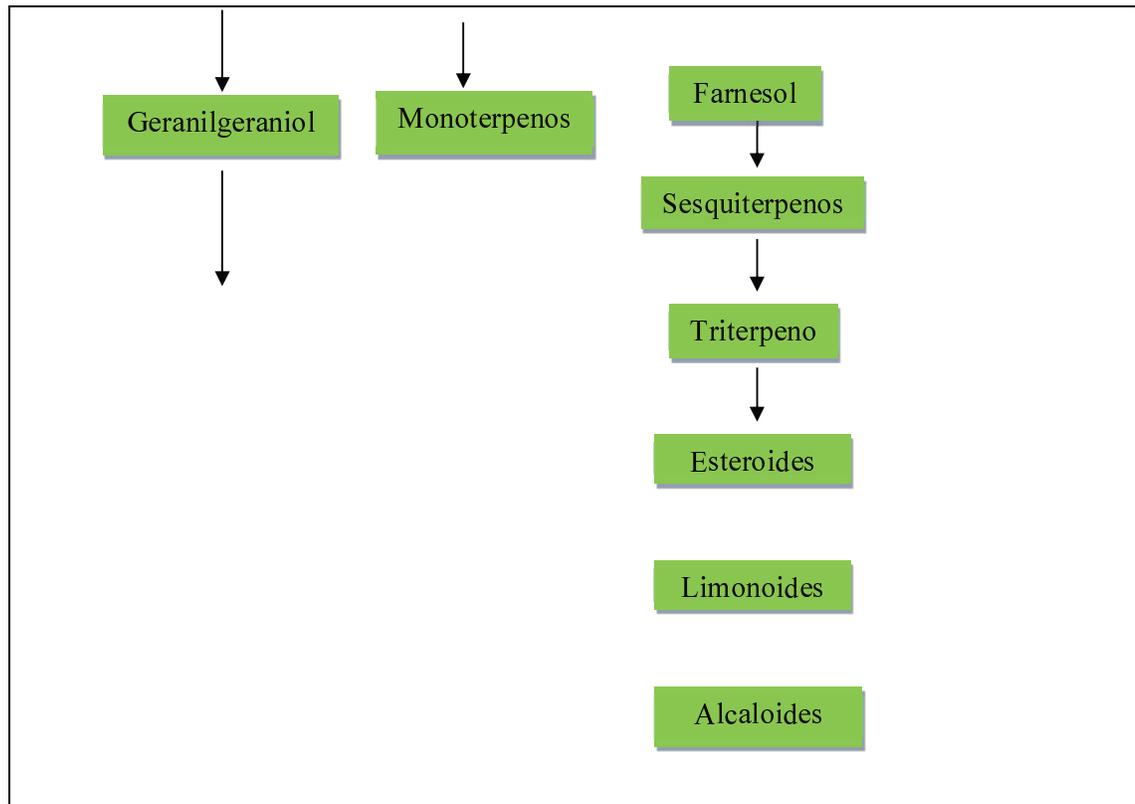
El color que caracteriza al AEC de *Schinus molle* L. (Foto 1) es amarillo ámbar y el aroma se lo puede caracterizar como penetrante, de poca perdurabilidad en el tiempo y de fácil expansión en el ambiente (Bandoni, 2002).

La composición del AEC del *S. molle* L. se muestra en la Tabla N° 1.

Compuesto	%	Compuesto	%
alfa tuyeno	0,9	alfa terpineol	0,3
alfa pineno	9,0	Mirtenal	0,4
Canfeno	0,2	Verbenona	trazas

Sabineno	29,5	alfa copaeno	0,3
Mirceno	0,8	beta elemeno	1,1
beta pineno	10,1	alfa gurjuneno	T
alfa felandreno	trazas	beta cariofileno	4,4
alfa terpineno	0,7	alfa humuleno	0,5
para cimeno	2,7	allo aromadendreno	1,2
Limoneno	5,0	gama muroleno	0,2
beta felandreno	0,9	germacreno D	4,6
gama terpineno	1,3	Viridifloreño	0,2
sabineno hidrato cis	0,2	alfa muroleno	T
Terpinoleno	0,3	Biciclogermacreno	2,1
sabineno hidrato trans	0,2	gama cadineno	1,8
hidrato de sabineno acetato cis	0,3	delta cadineno	1,2
trans pinocarveol	0,5	alfa cadineno	0,2
sabina cetona	0,3	Espatulenol	2,1
Pinocarvona	0,2	oxido de cariofileno	1,3
terpinen-4-ol	7,4	1,10-di epi cubenol	0,4
Mirtenol	0,3	tau cadinol	3,0
<b>TOTAL</b>			<b>96,1</b>





#### 2.4.5- Toxicidad del AEC de *Schinus molle* L.

Antes de realizar el presente ensayo se realizaron trabajos para determinar el grado de toxicidad del aceite esencial crudo de *S. molle* L.

En uno de ellos se evaluó la toxicidad tanto aguda como crónica en ratas (Lapissonde *et al.*, 2009) no pudiendo demostrarse resultados adversos por la ingestión oral del mismo.

En otro de los ensayos realizados con el objetivo de investigar la toxicidad crónica arrojó que la dosis letal 50 (DL50) del *S. molle* L. suministrado en forma oral en ratas es de 1750 mg/kg y comienzan a aparecer lesiones hepáticas a los 550 mg/kg. Se debe

tener en cuenta que al haber sido realizado en ratas, la extrapolación a otras especies debe tomarse con precaución (Lapissonde *et al.*, 2012).

El estudio de la toxicidad sub-crónica realizado en el año 2012 por el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, indicó que se evidenciaron cambios en algunos de los parámetros fisiológicos estudiados que se pudieran asociar a alteraciones hepáticas relacionadas con la administración de 4 dosis de 150 mg/kg cada una, con un intervalo de 7 días entre ellas (día 0, 7, 14 y 21).

## CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo consistió en testear emulsiones de AEC de Aguaribay (*S. molle* L.) en agua destilada para comprobar el efecto sobre la reproducción de la garrapata común del bovino (*R. microplus*) tanto *in vitro* como *in vivo*.

*In vitro* se utilizó la Prueba de Inmersión de Adultos (Drummond *et al.*, 1973) e *in vivo* la Prueba de Establo (Roulston *et al.*, 1968).

### 3.1. MATERIALES

#### 3.1.1. Producto ensayado

El AEC de Aguaribay, se obtuvo mediante una operación de arrastre con vapor de agua (Bandoni, 2002) a través de la masa vegetal constituida por frutos molidos y hojas, contenida en un canasto dentro del equipo extractor, luego se condensó el vapor de agua + aceite esencial y finalmente se decantó para su separación. Los frutos y hojas fueron obtenidos de árboles del Centro Operativo Experimental Ángel Gallardo perteneciente al Ministerio de la Producción de la Provincia de Santa Fe.

*In vitro* se testearon emulsiones en agua destilada de AEC de *Schinus molle* L. al 2,5%; 5 % y 10 %. Para el lote Control se utilizó agua destilada.

*In vivo*, se testó la emulsión al 5 % por haber sido la que demostró buenos resultados en la prueba *in vitro* sin existir diferencias estadísticamente significativas con la emulsión al 10 %, pero sí con la concentración al 2,5 %.

### 3.1.2- Corrales

En un establecimiento pecuario ubicado aproximadamente a 5 km de la ciudad de Vera (Santa Fe); se construyeron 6 corrales individuales techados con pisos de rejas de maderas que permitieron la recolección de las teleoginas que fueron cayendo diariamente en bandejas especiales construidas con caños de PVC, hierro y agropol que se colocaron debajo del piso de cada box.

**Foto 3:** Establo para ensayo *in vivo*.



**Foto 4:** Establo para ensayo *in vivo* con media sombra.



**Foto 5:** Bandeja para recolección de teleoginas.



**Foto 6:** Piso de rejas de madera para permitir la caída de las teleoginas a la bandeja de recolección.



### **3.1.3- Animales**

Se utilizaron 6 vaquillas de aproximadamente 7 meses de edad, de raza mestiza (Brangus x Limangus), pelaje colorado, de 150 a 180 kg de peso vivo aproximadamente; provenientes del establecimiento donde se realizó el ensayo; libres de ectoparásitos y sin tratamientos previos con garrapaticidas

#### **Protocolo de ingreso**

Los bovinos que ingresaron a la prueba fueron identificados individualmente mediante caravanas y se inmunizaron contra Rinotraquetis Infecciosa Bovina (IBR), Diarrea Viral Bovina (DVB) y enfermedades Clostridiales mediante la aplicación de vacunas con microorganismos inactivados a razón de dos dosis con intervalo de 21 días y fueron desparasitados con Fenbendazol al 10 % vía oral. Para protegerlas contra la Babesiosis y Anaplasmosis Bovina se utilizó la vacuna que produce y comercializa el

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en la Estación Experimental Rafaela – Santa Fe. Se las inmunizó a los 4 meses de vida aproximadamente.

### **3.1.4- Teleoginas y larvas**

Para la obtención de teleoginas y larvas se utilizaron las siguientes acciones:

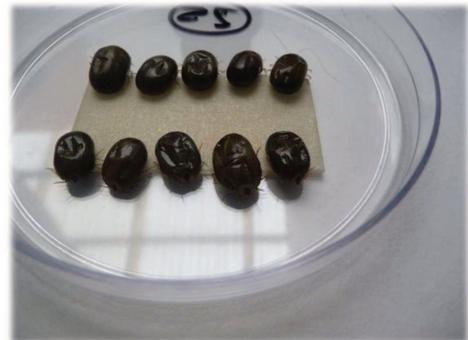
1. Se recolectaron garrapatas ingurgitadas (teleoginas) de animales infestados naturalmente, desprendiéndolas en forma manual. Los mismos se encontraban en el establecimiento donde se construyeron los corrales. (Foto 7)
2. Las teleoginas recogidas se llevaron al laboratorio; se las lavó con agua corriente en un colador de malla fina para quitar toda suciedad (Foto 8); se enjuagaron con agua destilada y finalmente se las secó con papel adsorbente. Fueron seleccionadas las más vitales, descartando las muertas, lesionadas, deformes o decoloradas (Foto 9). Como vitales se clasificaron a aquellas teleoginas que podían desplazarse sin inconvenientes durante el tiempo que llevaba la selección de las mismas, descartando las que a pesar de mover sus patas no se desplazaban del lugar.
3. Se las colocó en placas de Petri de plástico descartables fijadas con cinta adhesiva de papel por su parte ventral para evitar la migración. (Foto 10)
4. La incubación se realizó en estufa a una temperatura de 27 a 28° C y con una humedad relativa ambiente porcentual (HR%) de 70 - 80 % durante 14 días; período durante el cual se considera que oviponen la totalidad de las teleoginas.



**Foto 9:** Selección de teleoginas para incubación.



**Foto 10:** Teleoginas en placa de Petri para incubación y obtención de huevos.



5. Los huevos obtenidos se incubaron bajo las mismas condiciones anteriores en tubos de vidrio de 20 cc de capacidad y tapados con algodón durante 25 días. (Foto 11 y 12)

6. Las larvas se mantuvieron en las mismas condiciones durante un período de 14 días para permitir su maduración.

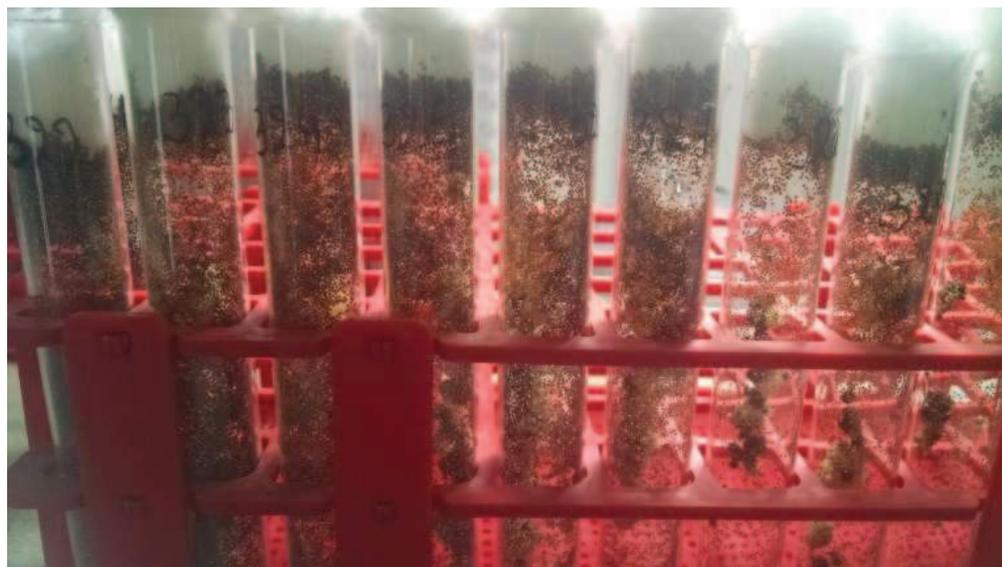
7. Estas larvas fueron colocadas sobre las vaquillas en un mismo día. Los animales se mantuvieron en los boxes descritos anteriormente durante 10 días.

8. El día 18 se comenzó a recolectar las teleoginas que caían en forma natural a las bandejas colocadas debajo del piso de rejas de madera de los corrales. Las mismas fueron llevadas al laboratorio; lavadas, seleccionadas bajo los mismos criterios mencionados arriba y finalmente conservadas en heladera a 8° C durante dos días. Tiempo necesario para retrasar la oviposición y así poder completar la recolección del número suficiente de teleoginas para realizar el Test de Inmersión de Adultos en un mismo día.

**Foto 11:** Huevos en tubos para incubación.



**Foto 12:** Larvas obtenidas por incubación en estufa.



El procedimiento anterior se repitió para la obtención de las larvas utilizadas en la realización de la Prueba de Establo (*In vivo*).

Para realizar las infestaciones se realizaron las siguientes acciones:

1. Con hojas de papel de 12 x 12 cm aproximadamente, se armaron sobres que fueron colocados sobre la balanza y luego se taró a 0 la misma.
2. De los tubos que contenían las larvas y con pincel se tomaron alícuotas similares para cada animal, las cuales fueron colocadas dentro de los sobre para pesarlas. Foto 13.
3. Los sobres fueron llevados al campo donde estaban los corrales. Se los abrió y pegó en colocador especialmente diseñado para ese fin.
4. Con el colocador se pasaron los sobres de papel por la zona dorsal de cada vaquilla. Foto 19.

**Foto 13:** Peso de larvas para infestaciones.



5. Durante los 25 días previos al tratamiento, dos veces por semana, se repitió el procedimiento cada día de infestación y para cada animal.
6. Para conocer la cantidad de larvas colocadas a cada animal se realizó el siguiente protocolo:
  - a) En la primera infestación y luego de cargar los 6 papeles se tomaron alícuotas de los tubos utilizados. Las mismas fueron pesadas directamente en el platillo de la balanza.
  - b) Una vez obtenido el peso se las colocaron en placas de Petri descartables y se les agregó alcohol para matarlas y poder disgregar la masa larvas (Foto 14°)
  - c) Con pinza de disección se desparramaron las larvas para que queden distribuidos en forma homogénea. Se esperó el tiempo necesario para que el alcohol se evapore.

- d) Luego se obtuvieron fotografías de cada placa para finalmente contar la cantidad de larvas con el programa ImageJ en formato manual (Foto 15).

**Foto 14:** Larvas para recuento.



**Foto 15:** Recuento de larvas con Programa ImageJ.



### 3.1.5- Tubos para incubación de huevos

Para realizar la incubación de los huevos que se obtuvieron de las incubaciones tanto de los ensayos *in vitro* como *in vivo* se diseñaron y armaron tubos de vidrio de 20 cc de capacidad a los cuales se les extrajo el fondo con moladora y piedra especial para cortar vidrios. Éstos fueron anexados a regatones de plástico mediante mangueras plásticas transparentes con la finalidad de que las larvas, una vez nacidas, asciendan por las paredes de los tubos. Luego de finalizadas las eclosiones se desacoplaron las tres partes (tubo de vidrio, manguera y regatón de plástico) dejando la mayoría de las larvas aisladas de los huevos lo que permitió realizar una mejor lectura de la eclosión de los huevos (Fotos 16 a 18)

**Foto 16:** Partes para armar los tubos para incubación de huevos.



**Foto 17:** Tubos para cultivo de huevos finalizada la eclosión.



**Foto 18:** Tubos con larvas finalizada la eclosión luego de quitar el regatón.



## **3.2. METODOS**

### **3.2.1 PRUEBA DE LABORATORIO (*in vitro*)**

Se utilizó el Test de Inmersión de Adultos. El mismo fue desarrollado por Drummond y colaboradores (1973) y fue utilizado para determinar la relativa eficiencia de los nuevos acaricidas contra diferentes especies de garrapatas. Se lo adaptó para los test de resistencia en muchos laboratorios (FAO, 1984). El uso de esta técnica permite comparar la eficiencia de distintos acaricidas en garrapatas de diferentes regiones (Martins, 2004).

Se realizaron cinco réplicas por cada concentración de emulsión, utilizando placas de Petri descartables con 10 teleoginas cada una. Como testigo también se usaron 5 placas con la misma cantidad de garrapatas y como tratamiento solo agua destilada.

#### **3.2.1.1. Protocolo del Test de Inmersión de Adultos**

**Objetivo:** evaluar el comportamiento reproductivo de las garrapatas tratadas a través de la Reproducción Estimada (RE) (Ecuación N°1) y determinar el Porcentaje de Control (% C) (Ecuación N°2) de su reproducción.

**Preparación de los productos a testear:** las emulsiones de AEC de *S. molle* L. fueron preparadas inmediatamente antes de ser utilizadas. En un tubo de vidrio de 30 cc se agregaron mediante pipetas de vidrio y pro-pipeta la cantidad de agua destilada y AEC suficientes para preparar 20 cc de la emulsión madre a las concentraciones antes mencionadas. A su vez estas emulsiones se fraccionaron en 5 alícuotas de 4 cc cada una al momento de realizar la inmersión de las teleoginas.

**Formación de los grupos de teleoginas:** las teleoginas recolectadas, una vez lavadas y secadas como se indicó anteriormente, se las colocó bajo una lámpara utilizada como fuente lumínica y calórica. Se tomaron los mismos criterios de selección antes mencionados para determinar la vitalidad de las mismas. Se formaron grupos homogéneos de 10 teleoginas cada uno realizando los siguientes pasos:

1. División del total de teleoginas en cuatro grupos homogéneos según su tamaño.
2. Cada grupo se volvió a dividir en nuevos grupos para mejorar la distribución por tamaño.
3. Se colocaron los distintos lotes en recipientes de vidrio.
4. Tomando cada recipiente conteniendo las teleoginas y comenzando con las más grandes se fue colocando una en cada placa siguiendo el orden de la numeración en forma descendente hasta agotar la cantidad de cada grupo. Con el siguiente se comenzó en forma ascendente y así sucesivamente hasta completar la cantidad de 10 en cada placa.
5. Se pesó cada grupo de 10 teleoginas y se registraron los datos en planilla *ad hoc*.

#### **Procesamiento de la muestra (día 0)**

Se agitó durante 1 minuto cada tubo con la solución madre a los efectos de formar una correcta emulsión. De cada una de éstas se tomaron las alícuotas para cada uno de los 5 tubos de vidrio para cada concentración. Se volvió a agitar durante 1 minuto cada uno de esos tubos inmediatamente antes de colocar las teleoginas. Se sumergieron las teleoginas durante 1 minuto agitando suavemente los tubos para evitar la separación del aceite y agua y permitir el correcto contacto de todas las garrapatas con el producto. Finalmente se vertió el contenido en coladores metálico eliminando el líquido para

luego ir colocando; con pinza de disección para evitar el contacto con los dedos minimizando la posibilidad de quitar emulsión, las teleoginas en las cajas de Petri correspondiente adhiriéndolas con cinta adhesiva de papel por la parte ventral de las mismas. Para el grupo testigo, el procedimiento fue el mismo pero se utilizó agua destilada como tratamiento. Todas las placas se incubaron en estufa a 27° - 28° C y humedad relativa de 70 - 80 % durante 14 días.

#### **Procesamiento de la muestra (día +14)**

Se retiraron las placas de la estufa y en planilla *ad hoc* se registró la cantidad de teleoginas que ovipusieron. Luego y con espátula de metal se separaron los huevos de las kenoginas (garrapata que finalizó la oviposición) y se retiraron las cintas conteniendo las garrapatas. Para pesar las masas de huevos, éstas fueron tomadas con pinza de disección y espátula y colocadas directamente en la balanza. Finalmente se pusieron los huevos en los tubos preparados para este fin y puestos a incubar bajo las mismas condiciones anteriores durante 25 días.

#### **Procesamiento de la muestra (día +39)**

Se extrajeron los tubos de la estufa para luego retirar los regatones de cada uno. Estos fueron colocados en un recipiente de plástico con tapa para finalmente ser sometidos a temperatura de -15° C en freezer durante 24 hs para matar las larvas que no habían ascendido por las paredes de los tubos. El extremo abierto de los tubos fue tapado con algodón para luego ser sometidos al mismo procedimiento que los regatones.

Transcurridas las 24 hs el contenido de cada regatón fue volcado en placas de Petri para determinar la eclosión de los huevos, la cual se realizó mediante observación

directa y con la ayuda de lupa estereoscópica comparando la masa total de huevos eclosionados versus los no eclosionados expresado en porcentaje de eclosión. El cálculo se realizó estimando la masa de huevos eclosionados comparada con la masa total. Los huevos se consideraron eclosionados cuando se observó la cáscara de color blanco semitransparente y el huevo vacío. Como no eclosionado a aquellos que mantuvieron su forma y consistencia original o aquellos en los cuales se observó la larva muerta dentro del mismo o que solo pudo exteriorizar parte de su cuerpo, es decir que no era una larva viable.

### **Procesamiento de los datos obtenidos**

Con los datos obtenidos se calculó:

- Peso inicial de las teleoginas: con los datos de los pesos obtenidos bajo la metodología descrita en el apartado 3.2.1.1 se realizaron las comparaciones de pesos entre todos los grupos con el objetivo de comprobar la homogeneidad de los mismos.
- Cantidad de teleoginas que ovipusieron: se contabilizó la cantidad de teleoginas que fueron capaces de poner huevos luego de los tratamientos.
- Porcentaje de eclosión (%E): luego de estimar este parámetro, como se describió en el apartado 3.2.1.1, se evaluó y comparó la diferencia entre todos los grupos.
- Reproducción Estimada (RE): es la evaluación de la capacidad de reproducirse que ha tenido cada grupo de teleoginas testado. Ecuación N° 1.

- Porcentaje de control (% C): es el grado de control que ha tenido cada producto testeado sobre la reproducción de cada grupo de teleoginas tratadas expresado en porcentaje. Ecuación N° 2.

$$(1) \text{ Reproducción estimada (RE)} = \frac{\text{peso de huevos} \times \% \text{ de eclosión}}{\text{Peso inicial de las hembras}}$$

$$(2) \text{ Porcentaje de control (\%C)} = \frac{(RE_{\text{control}} - RE_{\text{tratado}}) \times 100}{RE_{\text{control}}}$$

### 3.2.2 PRUEBA DE ESTABLO (*in vivo*)

Para el ensayo *in vivo* se utilizó la Prueba de Establo (PE) descrita por Roulston y Wilson (Roulston y Wilson, 1968) citado por Cuore *et al* (2007). La misma consiste en realizar infestaciones sucesivas con larvas a animales que son alojados individualmente en boxes, cuyos pisos son de rejillas que permiten la recolección de las teleoginas que vayan cayendo diariamente en bandejas especiales colocadas debajo de este piso.

Para llevar a cabo el ensayo fue necesario que al momento de realizar el tratamiento con el producto que se probó los animales poseyeran todos los estadios de vida que la hembra de este parásito desarrolla naturalmente sobre el animal (larvas, metalarvas, ninfas, metaninfas y teleoginas). Debido a que el ciclo de *R. microplus* dura entre 18 y 26 días, se comenzaron a realizar las infestaciones, a razón de dos por semana, 25 días previos al tratamiento. Para estas se utilizaron 5.779 mg de larvas las cuales fueron obtenidas como se describió oportunamente.

#### 3.2.2.1. Descripción de la Prueba

Esta prueba se realizó con el fin de determinar:

- 1- El efecto del producto ensayado sobre los diferentes estadios de vida de las garrapatas que se encontraban sobre el animal.
- 2- La eficacia del producto sobre la reproducción de aquellas teleoginas que sobrevivieron al tratamiento y cayeron los días posteriores.
- 3- Comprobar el porcentaje de control que posee el producto testeado sobre el desarrollo de las larvas utilizadas para realizar la infestaciones.

### **Formación de los grupos**

Se formaron dos grupos de 3 animales cada uno según la parasitosis que presentaron cada uno el día que se realizó el tratamiento (día 0), determinada por la cantidad de teleoginas que se habían colectado los días previos y por la determinación visual de la infestación de cada uno.

### **El ensayo**

El mismo constó de las siguientes etapas: Infestación, Tratamiento, Recolección, e Incubación.

1- Infestación: a partir de 25 días previos al tratamiento (día -25), con una frecuencia de 2 veces por semana y hasta el día 0, se infestó a cada vaquilla con aproximadamente 100 a 270 mg de larvas de *R. microplus* (3.678 larvas cada 100 mg. aproximadamente) (Tabla N° 19) obtenidas mediante el procedimiento descrito anteriormente teniendo la

precaución de que las mismas fueran homogéneas entre todos los animales cada día de infestación.

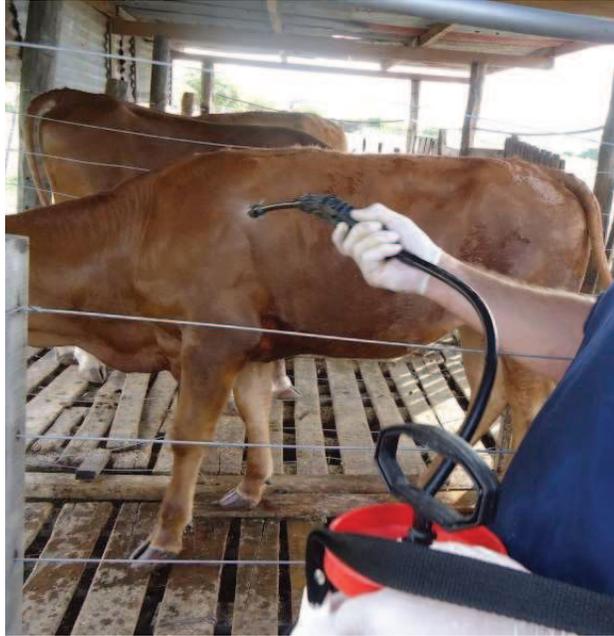
Las larvas se aplicaron a lo largo de la línea media dorsal del animal con aplicador *ad-hoc*. Foto 19.

2- Tratamiento: se realizó un solo tratamiento el día 0 por la tarde con aspersor manual (Foto 20) mojando completamente los animales.

**Foto 19:** Infestación con aplicador.



**Foto 20:** Tratamiento realizado con aspersor.



Al grupo Tratamiento se le aplicó la emulsión en agua destilada de *S. molle* L. al 5% y al otro (Grupo Control) se le aplicó agua destilada a razón de 5 litros respectivamente a cada animal.

3- Recolección: Desde el día -3 hasta y hasta la finalización del ensayo el día 25, se recolectaron diariamente (entre las horas 8 y 9 am) las teleoginas que fueron cayendo de todos los animales.

4- Incubación: Esta etapa se realizó con el fin de estudiar el comportamiento reproductivo de las teleoginas que cayeron del grupo tratado y que sobrevivieron al tratamiento en relación a las del grupo Control.

Las teleoginas recolectadas y seleccionadas diariamente se procesaron de igual modo a lo descrito para el Test de Inmersión de Adultos tomando como tratamiento el realizado a los animales el día 0.

Se registró el número de garrapatas caídas por animal y se las clasificó en: lesionadas, decoloradas, deformes, muertas y vivas. A su vez a las vivas (fueron las que se incubaron) se las catalogó según sus pesos en:

1. Grandes:  $\geq 0,200$  g
2. Medianas: entre 0,199 y 0,100 g
3. Pequeñas:  $\leq 0,099$  g

Cuando el número de teleoginas recogidas en un día y por animal superaron las 20 garrapatas, para formar el grupo a incubar se utilizaron cantidades de ácaros grandes, medianos y pequeños en la misma proporción que las recolectadas con la finalidad de que el grupo incubado fuera representativo del total caído. Si el número recolectado fue inferior a 20, se incubó la totalidad de las garrapatas.

### **Procesamiento de los datos obtenidos**

Con los datos obtenidos se calculó:

- Cantidad de larvas por gramo: como se expuso previamente; en la primer infestación se pesaron alícuotas de las larvas que se iban a colocar en los animales y se las contó con el programa ImageJ con la finalidad de conocer la cantidad que había por unidad de peso y por lo tanto conocer cuántas se colocaban a cada vaquilla y luego poder calcular el porcentajes de las mismas que llegaron a teleoginas.
- Cantidad de larvas utilizadas: se multiplicó la cantidad de g de cada infestación y cada animal por la cantidad de larvas que había por g según se explicó en el punto anterior.

- Porcentaje de teleoginas recuperadas: Para calcular esto se tomó en cuenta el dato de las teleoginas caídas durante todo el ensayo del grupo Control ya que en los Tratados la sobrevivencia de las mismas estuvo condicionada por el efecto del producto aplicado (la cantidad de teleoginas caídas en este grupo se utilizó para los demás cálculos) con el objetivo de calcular la cantidad de teleoginas obtenidas sobre las larvas colocadas en cada animal.
- De la infestación previa al tratamiento: inicialmente se analizó el número de teleoginas caídas de ambos grupos en los 3 días previos al tratamiento para determinar si las infestaciones realizadas en cada grupo fueron efectivas y homogéneas. Es decir que si la cantidad de teleoginas caídas en cada grupo no arrojó diferencias estadísticas, las infestaciones fueron similares.
- Caída de teleoginas: como se explicó en el párrafo anterior, una vez comprobado que las infestaciones en ambos grupos fueron homogéneas se analizó el efecto del tratamiento sobre la caída de teleoginas a lo largo de los 25 días que duró el ensayo. El objetivo fue comprobar si en del grupo tratado caían menos teleoginas que del control.
- Peso de las teleoginas: este cálculo se realizó para comprobar si existió alguna diferencia entre las teleoginas caídas en cada grupo luego del tratamiento.
- Cantidad de teleoginas incubadas que ovipusieron: se midió la capacidad de oviponer que tuvieron las teleoginas del grupo Tratamiento comparadas con las del Control contabilizando la cantidad de hembras que pusieron huevos en cada grupo.
- Peso de los huevos: este parámetro es necesario para otras fórmulas, pero también se comparó si existió diferencia entre ambos grupos.

- Porcentaje de Eclosión: mediante esta fórmula se calcula la cantidad de huevos que eclosionan luego de finalizada la incubación y se expresa en porcentaje, siendo el numerador la cantidad de huevos eclosionados y el denominados la totalidad de huevos puestos por la teleogina. Este parámetro también es necesario para otras fórmulas, pero también se lo comparó entre ambos grupos.
- Reproducción Estimada (RE): es la evaluación de la capacidad de reproducirse que han tenido las teleoginas caídas de ambos grupos durante todo el ensayo. Ecuación N° 3
- Índice de Reproducción: (IR): mide el desempeño reproductivo de las teleoginas caídas y que han sobrevivido al tratamiento comparadas con las caídas del grupo control. Ecuación N° 4
- Porcentaje de Eficacia: calcula la eficacia que tuvo el producto testado relacionando el número de garrapatas caídas antes y después del tratamiento comparándolo entre los grupos Control y Tratado. Para obtener dicho resultado se utilizó la Ecuación N° 8 descripta por Roulston *et al.*, (1968) utilizando el Porcentaje de Supervivencia de teleoginas ingurgitadas (P.S.). Ecuación N° 7.
- Porcentaje de control (% C): es el grado de control que ha tenido el producto testado sobre la reproducción de las hembras surgidas de las larvas utilizadas en el grupo Tratado para el ensayo expresado en porcentaje; para su cálculo se lo compara con la reproducción que desarrollaron las garrapatas del grupo Control. (Ecuación N° 9.

$$(3) \text{ Reproducción estimada (RE)} = \frac{\text{peso de huevos} \times \% \text{ de eclosión}}{\text{Peso de las hembras}}$$

(4) **Índice de Reproducción (IR)**

$$= \frac{\text{Números de teleoginas caídas}}{\text{Número de terneros}} \times \frac{\text{g de Huevos}}{\text{Número teleoginas incubadas}} \times \% \text{ de Eclosión}$$

$$(5) \text{H T} = \left( 1 - \frac{\text{N}^\circ \text{ teleog. CONTROL antes Tto.} \times \text{N}^\circ \text{ telog. Tto. después Tto.}}{\text{N}^\circ \text{ teleog. CONTROL después Tto.} \times \text{N}^\circ \text{ telog. Tto. antes Tto.}} \right) \times 100$$

$$(6) \text{Índice de eficacia reproductiva (I. E. R.)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de huevos}}{\text{Peso de las teleoginas}}$$

$$(7) \text{Porcentaje de Supervivencia} = \left( \frac{A \times D}{B \times C} \right) \times 100$$

A: Número de garrapatas en animales del grupo Control antes del tratamiento.

B: Número de garrapatas en animales del grupo Control después del tratamiento.

C: Número de garrapatas en animales del grupo Tratado antes del tratamiento.

D: Número de garrapatas en animales del grupo Tratado después del tratamiento.

$$(8) \text{Porcentaje de Eficacia} = 100 - \text{Porcentaje de Supervivencia}$$

$$(9) \text{Porcentaje de Control (\%C)} = \frac{\Sigma \text{I.R. del Control} - \Sigma \text{I.R. del Tratado}}{\Sigma \text{I.R. del Control}} \times 100$$

### 3.2.3- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

**Sugiero que se agregue en este campo el paquete estadístico utilizado para los modelos lineales generalizados y las funciones empleadas (Manzoli)**

**En este punto sugiero que las tablas de los resultados que corresponden a los modelos lineales generalizados sean los que arrojan el software estadístico utilizado, dado que de allí se puede extraer más información del modelo (Manzoli)**

#### 3.2.3.1- Análisis estadístico de la prueba *in vitro*

Para comprobar el efecto del tratamiento sobre la reproducción de las teleoginas tratadas en comparación con las no tratadas se analizaron los siguientes parámetros: a) número de teleoginas que ovipusieron, b) peso de los huevos, c) porcentaje de eclosión y d) Reproducción Estimada utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Para comparar el efecto de las diferentes concentraciones sobre el e) Porcentajes de Control se utilizó el test de Mann-Whitney.

Estos test son “no paramétricos” y fueron utilizados debido a que ninguna de las variables de respuesta fueron normales (confirmado mediante la realización de la prueba de Kolmogorov-Smirnov) y, adicionalmente, el número de teleoginas es un recuento y no una variable continua, lo que invalida la utilización de pruebas paramétricas.

#### 3.2.3.2- Análisis estadístico de la prueba *in vivo*

Para analizar el número de teleoginas caídas los días previos al tratamiento y posteriores al mismo y dado que la variable de respuesta es el recuento del “número de teleoginas” se empleó un Modo Lineal Generalizado de medidas repetidas en los días -3, -2, -1 y 0 por la mañana antes del tratamiento con la función de enlace Poisson.

Para el resto de las variables (Peso de las teleoginas; Cantidad de teleoginas incubadas que ovipusieron; Peso de los huevos; % E, RE e IR, que fueron continuas, pero con una distribución muy sesgada a la derecha, se utilizó para evaluar el efecto que ejercía el tratamiento un Modelo Lineal Generalizado de medidas repetidas con función de enlace Gamma o de Poisson según fuese necesario.

## CAPITULO IV. RESULTADOS

### 4.1- DE LA PRUEBA *in vitro*

#### Ver corrección de Baravalle

En la tabla N° 7 se muestran todos los datos de la prueba.

Placa N°	Producto	Cantidad de teleoginas	Peso de teleoginas (g)	Cantidad de teleoginas que ovipusieron	Peso de huevos (g)	% E	RE	% C
1	Aguaribay 2,5 %	10	3,177	4	0,500	60	9,4	78,8
2	Aguaribay 2,5 %	10	3,059	5	0,532	60	10	76,6
3	Aguaribay 2,5 %	10	3,111	9	1,051	70	24	46,9
4	Aguaribay 2,5 %	10	3,018	8	0,871	80	23	48,1
5	Aguaribay 2,5 %	10	3,077	9	1,100	75	27	39,8
6	Aguaribay 5 %	10	2,973	1	0,066	20	0,4	99
7	Aguaribay 5 %	10	2,982	0			0	100
8	Aguaribay 5 %	10	2,972	2	0,079	0	0	100
9	Aguaribay 5 %	10	3,030	0			0	0
10	Aguaribay 5 %	10	2,959	0			0	0
11	Aguaribay 10 %	10	2,934	0			0	0
12	Aguaribay 10 %	10	2,936	0			0	0
13	Aguaribay 10 %	10	2,99	0			0	0
14	Aguaribay 10 %	10	3,075	0			0	0
15	Aguaribay 10 %	10	3,096	0			0	0
16	Testigo	10	2,389	10	1,251	85	45	
17	Testigo	10	2,792	10	1,214	100	44	
18	Testigo	10	2,892	10	1,353	95	45	
19	Testigo	10	2,217	10	1,119	90	45	
20	Testigo	10	2,251	10	1,038	95	44	

**Tabla N° 7:** Resultados de la Prueba de Inmersión de Adultos.

#### 4.1.1- Peso inicial de las teleoginas

En la tabla N° 2 se puede observar que las teleoginas del grupo Control tuvieron menor peso que las correspondientes a los grupos tratados con diferentes concentraciones de Aguaribay ( $p=0,003$ ). Por otra parte, el peso de las teleoginas entre los diferentes niveles del tratamiento no resultaron estadísticamente diferentes ( $p>0,05$ ).

Grupo	Número de placas	Media <sup>1</sup>
Control	5	2,508 <sup>b</sup>
Aguaribay 2,5 %	5	3,088 <sup>a</sup>
Aguaribay 5 %	5	2,983 <sup>a</sup>
Aguaribay 10 %	5	3,006 <sup>a</sup>

Tabla N° 2: Peso inicial de las teleoginas (g)

Referencia: <sup>1</sup> Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p<0,05$ .

#### 4.1.2- Cantidad de teleoginas que ovipusieron.

Como se muestra en el tabla N° 3, la totalidad de las teleoginas del grupo control ovipusieron, mientras que las correspondientes a los grupos tratados lo hicieron en una proporción inferior que fue disminuyendo conforme aumentó la concentración de Aguaribay ( $p<0,001$ ). No obstante, no fue posible encontrar diferencias significativas entre el número de teleoginas que ovipusieron entre el grupo control y el tratado con Aguaribay al 2,5% ( $p=0,104$ ) y entre los dos niveles de concentración superior de Aguaribay ( $p= 0,083$ ).

Grupo	Media <sup>1</sup>
-------	--------------------

<b>Control</b>	10,0 <sup>b</sup>
<b>Aguaribay 2,5 %</b>	7,0 <sup>b</sup>
<b>Aguaribay 5 %</b>	0,6 <sup>a</sup>
<b>Aguaribay 10 %</b>	0,0 <sup>a</sup>

**Tabla N° 3:** Cantidad de teleoginas que ovipusieron

Referencia: <sup>1</sup> Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3- Porcentaje de eclosión (% E).

En el Tabla N° 4 se puede observar que existió un efecto dosis dependiente, es decir que a medida que aumentó la concentración de aguaribay disminuyó el porcentaje de eclosión, aunque no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de aguaribay al 5 % y 10 %. **Baravalle pregunta si la media del 5% debería ser 4 y**

**40: preguntar a Chelo**

<b>Tratamientos</b>	<b>Cantidad de placas</b>	<b>Media<sup>1</sup></b>
<b>Aguaribay 2.5%</b>	5	69,000 <sup>b</sup>
<b>Aguaribay 5%</b>	5	40,000 <sup>a</sup>
<b>Aguaribay 10%</b>	5	0,000 <sup>a</sup>
<b>Control</b>	5	93,000 <sup>c</sup>

**Tabla N° 4:** Porcentaje de eclosión prueba *in vitro*

Referencia: <sup>1</sup> Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

#### 4.1.4- Reproducción Estimada (RE)

En el Tabla N° 5 se muestra que la RE siguió el mismo comportamiento que el observado en el Porcentaje de Eclosión.

Tratamientos	Cantidad de placas	Media <sup>1</sup>
Aguaribay 2.5%	5	18,660 <sup>b</sup>
Aguaribay 5%	5	0,080 <sup>a</sup>
Aguaribay 10%	5	0,000 <sup>a</sup>
Control	5	44,320 <sup>b</sup>

Tabla N° 5: Reproducción Estimada (RE)

Referencia: <sup>1</sup> Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

#### 4.1.5- Porcentaje de Control (%C)

La Tabla N° 6 muestra que el % C del AEC de aguaribay sobre la reproducción de las teleoginas aumentó conforme se incrementó su concentración, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de aguaribay al 5 % y 10 %.

Tratamientos	Cantidad de placas	Media <sup>1</sup>
Aguaribay 2.5%	5	58,0 <sup>a</sup>
Aguaribay 5%	5	99,8 <sup>b</sup>
Aguaribay 10%	5	100 <sup>b</sup>

Tabla N° 6: Porcentaje de Control prueba *in vitro*.

Referencia: <sup>1</sup> Medias con letras diferentes indican diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

## 4.2- DE LA PRUEBA *in vivo*

En el anexo se presentan los resultados de recolección e incubación de todo el ensayo.

### 4.2.1- Cantidad de larvas por gramo

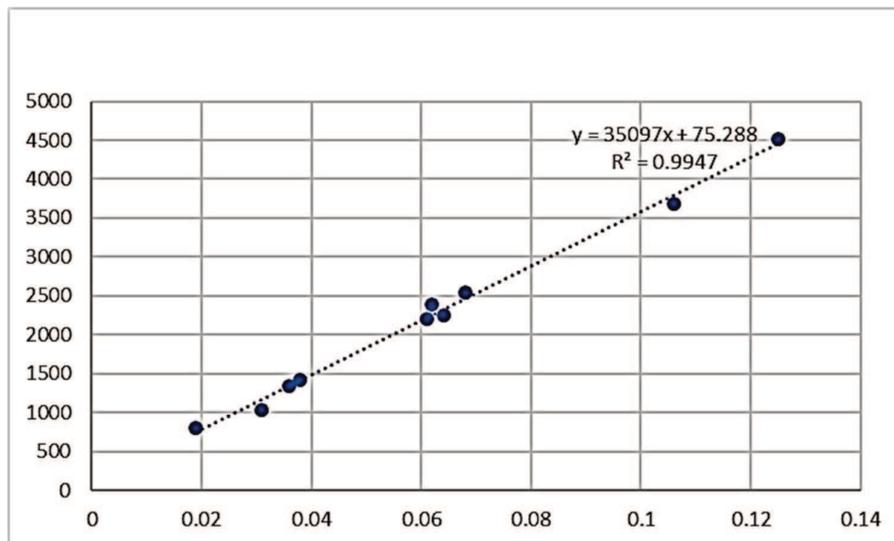
En la Tabla N° 8 se observa que por cada gramo de larvas utilizado había 36.780 larvas. La Tabla N° 9 muestra que en un ensayo posterior hubo 22.703 larvas por gramo. En las figuras N° 10 y 11 se presentan los cálculos de Regresión lineal de ambos recuentos.

Placa N°	g de larvas	Cantidad de larvas	Larvas/g
1	0,019	796	41.890
2	0,062	2.384	38.450
3	0,106	3.684	34.750
4	0,064	2.243	35.050
5	0,068	2.539	37.340
6	0,038	1.420	37.370
7	0,036	1.347	37.420
8	0,125	4.515	36.120
9	0,061	2.202	36.100
10	0,031	1.032	33.290
<b>Media</b>	0,061	2.216	36.780

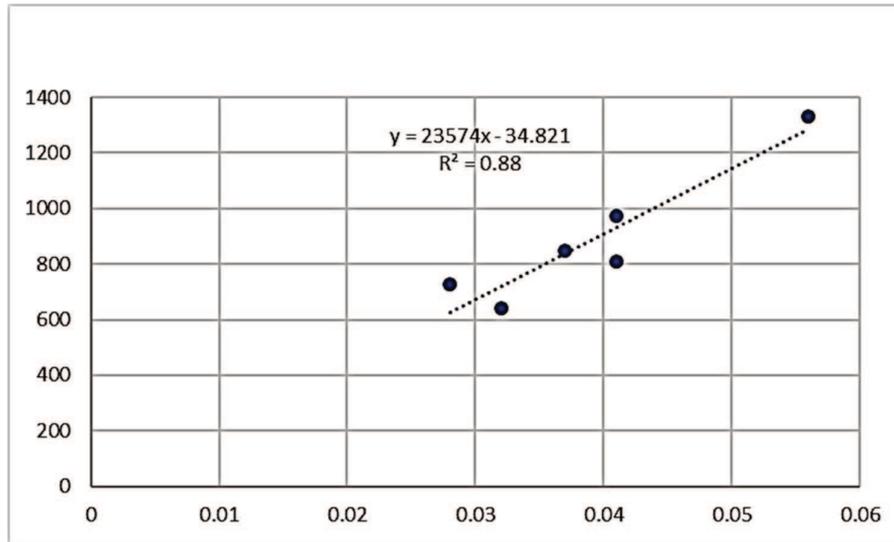
**Tabla N° 8:** Cantidad de larvas por gramo para Prueba de Establo

Placa N°	g de larvas	Cantidad de larvas	Larvas/g
1	0,028	728	26.000
2	0,032	643	20.090
3	0,041	808	19.710
4	0,056	1331	23.770
5	0,037	847	22.890
6	0,041	974	23.760
<b>Media</b>	0,039	889	22.703

**Tabla N° 9:** Cantidad de larvas por gramo ensayo posterior



**Fig. ¿?:** Regresión lineal de la cantidad de larvas por g Prueba de Establo.



**Fig. 6?** : Regresión lineal de la cantidad de larvas por g ensayo posterior.

#### 4.2.2- Porcentaje de teleoginas recuperadas

El porcentaje de teleoginas recuperadas sobre la cantidad de larvas utilizadas en el grupo Control fue del 0,24 %. Tabla N° 12.

Animal	Larvas colocadas	Teleoginas recuperadas	Porcentaje
1	42.628	38	0,09 %
2	44.357	176	0,40 %
3	42.996	96	0,22 %
<b>Total</b>	129.981	310	0,24 %

**Tabla N° 12:** Porcentaje de teleoginas recuperadas en el grupo Control

#### 4.2.3- De la infestación previa al tratamiento

En el Tabla N° 13 se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los grupos ( $p= 0,142$ ); por lo tanto el número de teleoginas caídas en ambos grupos antes de la aplicación del tratamiento fue estadísticamente similar. **VER COMENTARIO DE NAVAS LUEGO DE VER LAS DEMÁS EVALUACIONES Y CORREGIR.**

Grupo	Cantidad de teleoginas caídas	Media	Significancia
Control	76	6,33	0,142
Tratado	165	13,75	

**Tabla N° 13:** Comparación de las medias de teleoginas caídas en ambos grupos previo al tratamiento.

#### 4.2.4- Efectos del tratamiento

##### 4.2.4.1- Caída de teleoginas .

En el Tabla N° 14 se muestra que existió un efecto sobre la caída observándose que cayeron más teleoginas de los animales del grupo Control que de los Tratados a lo largo de todo el ensayo luego de realizar el tratamiento.

Grupo	Cantidad de teleoginas caídas	Media	Significancia
Control	234	2,76	<0,001
Tratado	38	0,43	

**Tabla N° 14:** Comparación de las medias de teleoginas caídas en ambos grupos luego del tratamiento.

#### 4.2.4.2- Peso de las teleoginas

En la tabla N° 15 se puede observar que existió un efecto significativo sobre el peso de las teleoginas caídas del grupo Tratamiento, siendo estas más livianas que las del grupo control.

Grupo	Media (g)	Peso total (g)	Significancia
Control	0,8073	32,698	<0,001
Tratado	0,0824	3,540	

**Tabla N° 15:** Efecto del tratamiento sobre el peso de las teleoginas.

#### 4.2.4.3- Cantidad de teleoginas incubadas que ovipusieron

En el Tabla N° 16 se muestra que las teleoginas que sobrevivieron al tratamiento tuvieron una menor capacidad para poner huevos comparadas con las que no recibieron tratamiento (P= 0,007).

Grupo	Media	Cantidad de teleoginas	Significancia
Control	4.33	160	0,007
Tratado	1.76	26	

**Tabla N° 16:** Efecto del tratamiento sobre el número total de teleoginas que ovipusieron.

#### 4.2.4.4- Peso de los huevos

Las masas de huevos de las teleoginas caídas del grupo Tratado fueron más livianas que las del grupo Control lo que indicaría que las sobrevivientes del grupo Tratado pusieron menor cantidad de huevos que las del grupo Control (Tabla N° 17).

<b>Grupo</b>	<b>Media (g)</b>	<b>Peso total de los huevos (g)</b>	<b>Significancia</b>
<b>Control</b>	0,400	13,231	<0,001
<b>Tratado</b>	0,093	1,320	

**Tabla N° 17:** Efecto del tratamiento sobre el peso de los huevos.

#### 4.2.4.5- Porcentaje de Eclosión (% E)

Este parámetro reproductivo no fue afectado por el tratamiento recibido ya que no se observaron diferencias estadísticas entre ambos lotes (Tabla N° 18).

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Número de placas evaluadas</b>	<b>Significancia</b>
<b>Control</b>	82,023	42	0,568
<b>Tratado</b>	77,352	17	

**Tabla N° 18:** Análisis del % E de los huevos post tratamiento.

#### 4.2.4.6- Reproducción Estimada (RE)

La tabla N° 19 muestra que existió diferencia significativa en la RE entre el grupo Control y Tratado luego de aplicar el tratamiento.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Número de RE evaluadas</b>	<b>Significancia</b>
<b>Control</b>	22,5506	42	0,021
<b>Tratado</b>	8,8401	17	

**Tabla N° 19:** Análisis de la RE después del tratamiento.

#### 4.2.4.7- Índice de Reproducción (IR)

El IR de las teleoginas del grupo Tratamiento fue menor, lo que indica que la reproducción de las mismas fue menos eficiente que las del grupo Control. (Tabla N° 20).

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Sumatoria de IR</b>	<b>Significancia</b>
<b>Control</b>	40,97	1.720,20	0,001
<b>Tratado</b>	8,655	155,700	

**Tabla N° 20:** Análisis del IR de ambos grupos.

#### 4.2.4.10- Porcentaje de Eficacia

El Porcentaje de Eficacia del AEC de *S. molle* L. fue de 91,8 %. (Tabla N°22)

<b>Porcentaje de sobrevivencia de hembras ingurgitadas</b>	
<b>A=</b> Número de garrapatas en animales del grupo Control antes del tratamiento	25
<b>B=</b> Número de garrapatas en animales del grupo Control	78

después del tratamiento	
<b>C=</b> Número de garrapatas en animales del grupo Tratado antes del tratamiento	55
<b>D=</b> Número de garrapatas en animales del grupo Tratado después del tratamiento	14
<b>P.S. = (A x D) / (B x C) x 100</b>	<b>8,2</b>
<b>Eficacia (%) = 100 - % de Supervivencia</b>	<b>91,8</b>

**Tabla N° 22:** Porcentaje de sobrevivencia de hembras ingurgitadas.

#### 4.2.4.11- Porcentaje de Control (% C)

El % C del AEC de *S. molle* L. aplicado en emulsión al 5 % fue del 91 %. (Tabla N° 23)

<b>Prueba de Establo</b>	
% C días: 1 - 7 (Acción sobre estadios adultos)	90,8
∑ IR CONTROL	1.126,0
∑ IR TRATADOS	103,1
% C días: 8 - 14 (Acción sobre ninfas y estadios de muda)	93,5
∑ IR CONTROL	303,6
∑ IR TRATADOS	19,7
% C días: 15 - 25 (Estadios de muda)	88,7
∑ IR CONTROL	290,6
∑ IR TRATADOS	32,9
%C días: 1 - 25 (Acción global sobre el ciclo parasitario)	91,0
∑ IR CONTROL	1.720,2
∑ IR TRATADOS	155,7

**Tabla N° 23:** Porcentaje de Control en los diferentes estadios del ciclo.

Referencias:

- IR: Índice de Reproducción.
- % C: Porcentaje de Control

## CAPITULO V. DISCUSIÓN

### 5.1- Discusión sobre la Prueba *in vitro*: Test de Inmersión de Adultos

Como ya se expresó anteriormente, la Técnica de Inmersión de Adultos es una prueba desarrollada y publicada por Drummond *et al.*, (1973).

Si bien se ha difundido a lo largo y ancho del mundo como prueba de referencia, cabe aclarar que no está estandarizada. Esta situación hace que puedan existir diferencias en los resultados al comparar diferentes laboratorios. Por citar algunos ejemplos, hay ensayos donde el tiempo de inmersión de las teleoginas se realiza durante 30 segundos, 1 minutos, 5 minutos o más (Martins, 2006. Sousa *et al.*, 2008. Vivan, 2005. Broglio-Micheletti *et al.*, 2009). Siendo 30 segundos o 1 minuto el tiempo más habitualmente utilizado ya que Drummond originalmente así lo indicó.

Otra de las variantes que se realizan es que en algunos laboratorios las teleoginas son secadas luego de ser sumergidas. El fundamento de realizarlo es que de esta manera se estandariza el tiempo de contacto del medicamento con el parásito. Pero no es lo que sucede cuando se realiza el tratamiento a campo. Cuando los animales son sumergidos en los baños o pulverizados con dichos medicamentos, las teleoginas siguen mojadas durante un período en el cual la droga tiene más tiempo para realizar su efecto. Además se aumenta la probabilidad de error ya que pueden existir diferencias en la forma de realizar el secado de las diferentes teleoginas.

La importancia del secado puede demostrarse con los resultados obtenidos en ensayos preliminares realizados por nuestro equipo donde con el mismo protocolo, pero secando las teleoginas luego de ser sumergidas en emulsiones de aceite esencial los

Porcentajes de Control de la Reproducción promedio en las concentraciones 5 %, 10 % y 15 % arrojaron los siguientes resultados: 29,6 %, 65,1 % y 76,7 % respectivamente y existió gran variabilidad dentro de cada placa (Lapissonde *et al*, datos no publicados)

Otro punto importante a tener en cuenta es la estimación del Porcentaje de Eclosión. Es una medición subjetiva que puede arrojar errores significativos que alterarían el resultado final. El entrenamiento para disminuir el porcentaje de error en esta evaluación consistió en realizar estimaciones visuales de la eclosión de las masas de huevos y luego aplicando alcohol 96° se disgregaron los huevos en placas de Petri para finalmente ser observados con lupa estereoscópica contabilizando en forma individual los huevos no eclosionados. Teniendo en cuenta que en 1 g existen aproximadamente 20.000 huevos (Cuore *et al.*, 2007) se realizó una regla de tres simple obteniéndose el Porcentaje de Eclosión final. De todas maneras sigue siendo una estimación subjetiva con grandes posibilidades de error.

También debe mencionarse que esta prueba al ser realizada en condiciones de laboratorio maximiza el efecto de las drogas testeadas ya que a campo existen muchos factores que no pueden ser controlados, tales como el efecto del sol, la humedad ambiente, la cobertura de pelo de los animales que no permite el óptimo contacto de la droga con el parásito.

Como se mencionó anteriormente las teleoginas del grupo Control tuvieron menor peso que las correspondientes a los grupos tratados. Esta situación, si bien no es la ideal, no altera en gran medida el cálculo del % C ya que podría estar provocando un resultado menor de control lo que no perjudica el desarrollo del resto del ensayo.

Como puede observarse en el capítulo Resultados el control de la reproducción se dio por tres motivos; la mortandad provocada a las teleoginas, la menor cantidad de huevos ovipuestos y el menor porcentaje de eclosión de estos últimos.

Según trabajos realizados con anterioridad sobre *R. microplus* y *Varroa destructor* (Lapissonde *et al*, 2010. Lapissonde *et al.*, 2011) se postula la hipótesis que el efecto acaricida de los AEC está dado por la alteración de la quitina del tegumento de estos ácaros.

Según Barducco (2009) los AEC tienen un comportamiento de ácidos débiles por lo tanto se puede inferir que la acción sobre la quitina se va a producir sobre la parte más débil de la molécula que es la unión de la amida con el grupo carbohidrato. Por lo tanto al ser tratadas se alteraría la composición del tegumento y su correcto funcionamiento provocando la muerte de los ácaros o su normal desempeño reproductivo. La magnitud del efecto estaría dada por la concentración del aceite y el tiempo de contacto. De ser correcta esta hipótesis se podría suponer que la posibilidad de crear resistencia a estos productos por parte de los parásitos sería muy difícil ya que el efecto ácido de los aceites está dado por la interacción de las más de 100 moléculas que componen los aceites esenciales crudos.

También puede adjudicarse el control de la reproducción al efecto del aceite sobre los huevos ya que posiblemente queda afectado el órgano de Gene y los huevos son puestos al medio sin las capas de cera necesarias para su supervivencia lo cual podría explicar el menor porcentaje de eclosión de los huevos puestos por los parásitos tratados. En la prueba *in vivo* no existió diferencias significativas en el porcentaje de eclosión entre los grupos Control y Tratados, posiblemente pudo deberse a que el aceite

no pudo llegar a este órgano. Recordar que partes de dicha glándula se encuentra en comunicación con el exterior lo que permitiría que el aceite tome contacto con la misma (Lees y Beament, 1948).

## **5.2- Discusión sobre la Prueba *in vivo*: Prueba de Establo**

La Prueba de Establo tiene como finalidad comprobar la eficacia de un producto acaricida sobre todas las etapas del ciclo evolutivo del *R. microplus* mediante un tratamiento en el momento que sobre el animal están presentes todas las etapas evolutivas mencionadas midiendo la reproducción de las teleoginas que resulten de las infestaciones artificiales que se realizan.

Si bien el ensayo estaba planificado para 22 días, debió prolongarse hasta el día 25 porque siguieron cayendo teleoginas.

Las infestaciones realizadas durante el ensayo no fueron lo efectivas que se planificó ya que se recolectó (medido solo en el grupo CONTROL) el 0,24 % de teleoginas sobre el total de larvas colocadas sobre los animales. En un ensayo publicado por Cuore *et al.*, (2007) reportaron 33.9 % de recolección.

Las causas que pudieron provocar este bajo porcentaje de infestación pueden haber sido la raza de los animales (cruzas índicas) (Piper *et al.*, 2009) y la poca vitalidad de las larvas.

Se considera que el motivo principal fue la baja vitalidad de las larvas ya que durante la incubación de las mismas y luego de la finalización de la eclosión de los huevos, se

registraron variaciones marcadas en la temperatura de la estufa debido a inconvenientes en el suministro eléctrico en el laboratorio.

En ensayo posterior donde no se registraron los inconvenientes mencionados el porcentaje de recolección fueron superiores al 20 %.

La bibliografía indica que por cada g hay 20.000 larvas (Cuore *et al.*, 2007). Sin embargo las larvas utilizadas en el ensayo sumaron 36.780 en promedio. En base a esto se puede hipotetizar que muchas estaban muertas o deshidratadas. Para dar mayor sustento a esta hipótesis se puede comparar con el otro ensayo cuyos resultados fueron expuestos anteriormente donde el recuento de larvas por gramo fue más acotados a lo citado por la bibliografía: 22.703 larvas/g.

Al evaluar la efectividad del producto ensayado se debe tener en cuenta que se utilizó una emulsión de agua destilada y aceite sin ningún excipiente que favorezca la adhesión a los parásitos o pelo y por lo tanto el período de contacto con los mismos sería menor.

Si tomamos en cuenta el ensayo preliminar descrito en Métodos donde las teleoginas fueron secada y lo comparamos con el presente; donde no lo fueron; podemos decir que a mayor tiempo de contacto mayor eficiencia de control. Si a futuro se pudiese agregar algún tipo de coadyuvante para favorecer la adherencia del aceite al pelo de los animales o que el método de aplicación sea más eficiente en la penetración del producto en el pelaje de los bovinos, se podría aumentar la efectividad del mismo.

El menor porcentaje de control se dio en las etapas de muda. Esto reafirmaría la hipótesis que el producto actúa por contacto ya que en estas etapas evolutivas la

emulsión tiene mayor dificultad para hacer su efecto ya que los parásitos están envueltos por una doble cutícula: la que están perdiendo y la nueva.

El control de la reproducción se dio porque el aceite provocó una menor cantidad de teleoginas caídas de los animales del grupo tratado, fueron más livianas y pusieron menos cantidad de huevos. A diferencia de la prueba de laboratorio, en el porcentaje de eclosión no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

## CAPITULO VI. CONCLUSIONES

La concentración más adecuada para aplicar en la prueba *in vivo* y determinada mediante la prueba de laboratorio fue la emulsión al 5 %.

El producto ensayado, preparado en forma de emulsión en agua destilada tiene mayor efecto *in vitro* que *in vivo*.

El Porcentaje de Control *in vivo* fue del 91 %.

El AEC de *Schinus molle* L. obtenido mediante cohobación sumergida es capaz de controlar la reproducción del *Rhipicephalus microplus* tanto en forma *In Vitro* como *In Vivo*.

## CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

ANDERSON, J. F. y MAGNARELLI, L. A. (2008). Biology of ticks. Infect Dis. Clin Norh Am 2008; 22:195 – 215

ANZIANI, O.S. y GUGLIELMONE, A.A. (2005). Resistencia a los antiparasitarios utilizados para el control de nematodos gastrointestinales y garrapatas: situación en el área Centro - Norte de la Argentina. Revista CREA, Bs. As., 36 (298). 36,298.

[http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/parasitarias\\_bovinos/77-resistencia\\_a\\_los\\_antiparasitarios.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/77-resistencia_a_los_antiparasitarios.pdf)

APEL, M. A.; RIBEIRO, V. L. S.; BORDIGNON; S. A. L.; HENRIQUES, A. T.; VON POSER, G. (2009). Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila species* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasitol. Res. 105:863-868.

ARIAS, A. R.; HIRSCHMANN, C. S. (1988). The effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans* bugs. Fitoterapia, v. 59, n. 2, p. 148-149, 1988.

BANDONI, A.; (2002) Los recursos vegetales aromáticos en América Latina – Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores – Ediciones de la Universidad de La Plata, Argentina, 480 pp

BARANDIKA IZA, J. F. (2012). Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micro-mamíferos. Universidad del País Vasco.

<https://buleria.unileon.es/handle/10612/922?show=full>

BARDUCCO, L. (2009). Acción degradativa de los aceites esenciales sobre la quitina de los ácaros. Pasantía Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Litoral (FIQ-UNL).

BLANDON, M. A. (2006). Target validation of a myokinin receptor the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). Master's thesis, Texas A&M University. Texas A&M University. <http://hdl.handle.net/1969.1/5747>.

BORDIN, E. L. (1998) Carrapatos – Uma abordagem diferenciada. A Hora Veterinária – Ano 18, N° 103, maio/junho p.23-28.

BORGES, L.M.; SOUSA, L.A.; BARBOSA, C.S. (2011). Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 20(2). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722481>

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; NEVES-VALENTE, E. C.; DE SOUZA, L. A.; DA SILVA-DIAS, N.; GIRÓN- PÉREZ, K. y PRÉDES-TRINDADE, R. C. (2009). Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) con extractos vegetales. Rev. Colomb. Entomol. vol.35 N° 2 Bogotá Jul/Dec. 2009.

BRUNETON, J. (1991). Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia - Traducción: del Fresno, A.; Accame, E.; Zaragoza, España; Editorial Acribia SA; 594p

CABRAL, M. M. O. (1996). Anti-moulting activity in Brazilian *Melia azedarach*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 91, n. 1, p. 117-118, 1996. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761996000100021>

CABRERA, A. (1976). Regiones Fito geográficas argentinas. En: Dimitri, M. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería 2 (1): 1-85. Ed. ACME, Buenos Aires.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J. R.; MENDES, M.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G. M.; SCUMAKER, T. T. S.; (2010a). Diagnoses of fipronil resistant in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. Vet. Parasitol. 173, 300-306

CASTRO-JANER, E.; RIFRAN, L.; GONZÁLEZ, P.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; SCHUMAKER, T.T.S.; (2010b). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:

Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. *Vet. Parasitol.* 169, 172-177.

CASTRO-JANER, E.; GONZÁLEZ, P.; NIELL, C.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; SCHUMAKER, T. T. S. (2011). Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by larval immersion test (LIT) in Uruguay. *Vet. Parasitol.* 178, 148-155

CETRÁ, B. (2001). Garrapata común del bovino. *Noticias y Comentarios.* 352: 1-6. E.E.A. INTA Mercedes, Corrientes.

CHAGAS, A.C.; DOMINGUES, L.F.; FANTATTO, R.R.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVERIRA, D. H. MAONO, R. A.; JACOB, R. G. (2014) In vitro and in vivo acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon* spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol.* 2014 Sep 15;205(1-2):277-84. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085774>

CLARK, L. G.; SANCHEZ, S. J. (1983). Association of pesticide eradication with some health factors during the tick eradication program in Puerto Rico. In: *International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, 3., 1983, Arlington. *Proceedings...* Kansas (USA) Veterinary Medicine Publishing Co, 1983. p. 620-3. [http://www.sciquest.org.nz/elibrary/download/61222/Association\\_of\\_pesticide\\_toxicosis\\_with\\_some\\_health.pdf](http://www.sciquest.org.nz/elibrary/download/61222/Association_of_pesticide_toxicosis_with_some_health.pdf).

CUORE, U.; TRELLES, A.; SANCHIS, J.; GAYO, V.; SOLARI, M. (2007). Primer diagnóstico de resistencia al fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. *Veterinaria Montevideo* Vol. 42. p 35 – 41.

CUORE, U.; ALTUNA, M.; CICERO, L.; FERNANDEZ, F.; LUENGO, L.; MENDOZA, R.; NARI, A. (2012). “Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay”. *Veterinaria (Montevideo)* 48 (187) 5-13

CUTULLÉ, C; LOVIS, L; D'AGOSTINO, B.I.; BALBIANI, G.G.; MORICI, G; CITRONI, D.; REGGI, J.; CARACOSTANTOGOLO, J.L.; (2013). In vitro diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina. *Vet. Parasitol.* 192, 296-300. Citar ese trabajo

DIETRICH, R.A. y Adams, L. G. (2000) Potential animal health concerns relative to cattle fever ticks, classical swine fever, and bovine brucellosis with special emphasis on Texas. Research Report to Veterinary Services, APHIS, US Department of Agriculture. Taes, Tamu, College Station, TX. 82 pp.

DIMITRI, M. (1988). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I. Volumen II, 257-1137, 3° Ed, ACME, Buenos Aires.

DOMÍNGUEZ, X. A. (1988). Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa, Mexico DF, Mexico, Cuarta edición. 280p

DOMÍNGUEZ-GARCÍA, D. I. (2010). *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Redalyc, Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 12 (2010):181 – 192. [www.redalyc.org/articulo.oa?id=93913070001](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93913070001)

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E., TREVINO, J. L., GLADNEY, W. J. y GRAHAM, O. H. (1973). *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 66(1), 130–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4690254>

DUCORNEZ, S.; BARRE, N.; MILLER, R.; GARINE, M. (2005). Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Vet Parasitol.* 130, 285-92.

ESTRADA PEÑA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WLKER, A. R.; (2006). The

known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. Springer.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s10493-006-0003-5>

EVANS, W. C. (1996). The plant and animal kingdoms as sources of drugs. In: Trease and Evans pharmacognosy. London: W. B. Saunders, p.15-17.

[www.sciencedirect.com/science/book/9780702029332](http://www.sciencedirect.com/science/book/9780702029332)

FRAGOSO, H.; SOBERANES, N.; ORTIZ, M.; SANTAMARÍA M.; ORTIZ, A. (1995). Epidemiología de la resistencia a ixodicidas piretroides en garrapatas *Boophilus microplus* en la República Mexicana. En: Rodríguez, S., Fragoso, H. editores. Seminario Internacional de Parasitología Animal – Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria. Acapulco, Guerrero, México. 1995:45-57.

FAO. (1984). Ticks : Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention., 25–77. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf>

FAO. (2004). Guideline resistance management and integrated parasite control in ruminants. Agriculture Department. Animal Production and Health Division, FAO, Roma. Italia. <ftp://ftp.fao.org/DOCREP/fao/010/ag014e/ag014e00.pdf>

FARIAS, M.P.; SOUSA, D.P.; ARRUDA, A.C.; ARRUDA, M.S.; WANDERLEY, A.G.; ALVES, L.C. (2007). Eficácia in vitro do óleo da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.9, n.4, p.68-71

[www.sbpmed.org.br/download/issn\\_07\\_4/artigo11\\_v9\\_n4.pdf](http://www.sbpmed.org.br/download/issn_07_4/artigo11_v9_n4.pdf)

GASHAW, B.A. y MERSHA, C.K. (2013). Pathology of Tick Bite Lesions in Naturally Infested Skin and Hides of Ruminants: A Review. Acta Parasitológica Globalis 4 (2): 59-63, 2013 ISSN 2079-2018 © IDOSI Publications, 2013.

[https://www.idosi.org/apg/4\(2\)13/5.pdf](https://www.idosi.org/apg/4(2)13/5.pdf)

GIL, J. F.; RODILLA, J. M.; SILVA M.L.; QUIÑONES, W.; ECHEVERRI, F. (2013), Efectos garrapaticidas in vitro de la esencia de Palo Santo y algunos de sus componentes. Productos naturales contra parásitos externos del ganado bovino y ovino, tales como mosca de los cuernos y garrapatas. Eds. Echeverri, F. y Rossini, C., Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile, P. 88-98

GUALA, M. S.; PÉREZ, G.; LÓPEZ, S.; LAPISSONDE, M. O.; SIBILIN, R.; FONSECA, S.; ELDER, H.; BARDUCCO, L. (2011). Mejoramiento sanitario em colmenas de abejas (*Apis mellifera*) usando extractos vegetales de la flora nativa. XI Congreso Iberoamericano e extención universitária. Santa Fe (Argentina) 22 – 25 nov. 2011.

GUENTHER, E. (1972). The production of essential oils: methods of distillation, enfleurage, maceration, and extraction with volatile solvents. The EssentialOils History. Origin in Plants – Production – Analysis, Vol. 1. (ed. by E. Guenther), pp. 85–226. Krieger Publishing, Malabar, FL. Hebeish,

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R.; (2012). Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 21, 1-6.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. (2002). Garrapata Común de los Bovinos. Revista IDIA XXI, INTA 2: 132-136. INTA, Argentina. ISSN edición impresa 0325-8718 ISSN edición en línea 1669-2314.

GUGLIELMONE, A.A.; NAVA, S. (2005). Argasidae y los géneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* y *Rhipicephalus* (Ixodidae) de la Argentina: distribución y hospedadores. RIA, 34 (2): 123-141 Agosto 2005. INTA, Argentina. ISSN edición impresa 0325-8718 ISSN edición en línea 1669-2314

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; CASTELLI, M.; SUÁREZ, V. H.; AGUIRRE, D. H.; ALCARZ, E.; CAFRUNE, M. M.; CETRÁ, B.; FADER, O. W.; LUCIANI, C. A.; MEDUS, P.D.; NAVA, S. (2006). Toxicidad in vitro de la cipermetrina para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Can.) y del diazinón para *Haematobia irritans* (L.) en la Argentina. Rev. Inv. Agropec. 35, 31-41.

GUGLIELMONE, A.A.; CASTELLI, M.E.; MANGOLD, A.J.; AGUIRRE, D.H.; ALCARAZ, E.; CARUNE, M.M.; CETRÁ, B.; LUCIANI, C.A. y SUAREZ, V.H. (2007). El uso de acaricidas para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) en la Argentina. RIA, 36(1), p 155-167.

GUTIÉRREZ OSORIO, J. D. (2006). Identificación de órganos blanco en garrapatas de la especie *Boophilus microplus* para anticuerpos-antigarrapata de bovinos inducidos por el Inmunógeno Tick-Vac MK® del laboratorio Limor de Colombia S.A mediante métodos de inmunoperoxidasas. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Microbiología Industrial - Bogotá, D.C.

HEIMERDINGER, A. (2006) Extrato alcohólico de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) no controle do *Boophilus microplus* em bovinos. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 15, n. 1, p. 37-39.

HORAK, I. G.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; SHAO, R.; BARKER, S. C. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. <http://hdl.handle.net/2263/17278>

HÜE, T.; CAUQUIL, L.; FOKOU, J. B.; DONGMO, P. M.; BAKARNGA-VIA, I.; MENUT, C. (2015) Acaricidal activity of five essential oil of *Ocimum* species on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. Parasitol Rs. 2015 Jan,114 (1):91-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25300420>

INSTITUTE FOR INTERNATIONAL COOPERATION IN ANIMAL BIOLOGIC. (2007). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Garrapata del Ganado del sur, garrapata del Ganado bovino. . 20/2/2007 - BOOM\_0207\_0707. © 2007 CFSPH. Página 1 de 3. [www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus\\_microplus-es.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus_microplus-es.pdf)

IVANCOVICH, J.C.; LUCIANI, C.A. (1992). Las garrapatas de Argentina. Monogr. Asoc. Arg. Parasitol. Vet., 95 p. 1992

JONSSON, N; DAVIS, R; DE WITT, M. (2001) An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms, Australian Veterinary Journal Vol. 79, Issue 12, p. 826–831, dic. 2001 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11837904>

KOLLER, W.; GOMES, A.; MEDEIROS, A.- (2009) – “Diagnóstico da Resistencia do Carrapato-do-boi a Carrapaticidas em Mato Grosso do Sul”. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (25), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Corte, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento <https://www.embrapa.br/gado-de-corte/busca-de-publicacoes/-/publicacao/327201/diagnostico-da-resistencia-do-carrapato-do-boi-a-carrapaticidas-em-mato-grosso-do-sul>.

KOPP GÓMEZ, J.A. (2011). Impacto económico de las enfermedades parasitarias en la producción de leche de Centroamérica. <https://es.scribd.com/document/48747452/Enfermedades-parasitarias-en-la-produccion-de-leche-de-Centroamerica>.

LAPA, A. J. (1999). Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 181-196.

LAPISSONDE, M. O; DEORENZZI, M.B; RODRÍGUEZ ARMESTO, R.; ELDER, H.; GUALA, M.S. (2009). Ensayo de toxicidad aguda y crónica con aceite esencial crudo de aguaribay (*Schinus molle* L.) en ratas. V Simposio Brasileiro de Oleos Essenciais Lugar: Río de Janeiro (Brasil) Fecha: 3 al 6 de noviembre de 2009

LAPISSONDE, M. O.; GUALA, M. S.; ELDER, H.; SANCHEZ, M. (2010). Acción del aceite esencial crudo de Aguaribay (*Schinus molle* L.) sobre la quitina de los ácaros. XXIX Congreso Latinoamericano de Química. XVI Congreso Colombiano de Química. VI Congreso Colombiano de Cromatografía. Cartagena de Indias (Colombia) Sep. 27 – Oct. 01 de 2010.

LAPISSONDE, M. O.; SANCHEZ, M.; ELDER, H.; GUALA, M. S. (2011). *Rhipicephalus microplus*: Efecto del aceite esencial crudo de Aguaribay (*Schinus molle* L.), Lipia (*Lipia alba* (Mill.) N. E. Brown) y Carqueja (*Braccharis articulata*). 23° Congreso Internacional de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina)

LAPISSONDE, M. O.; ELDER, H.; GUALA, M. S. (2012). Essential crude oil of Aguaribay (*Schinus molle* L.) acute toxicity determination in rats to be used as ectoparasiticide in bovine. XXVII World Buiatrics Congress. Lisboa (Portugal) 3 – 8 junio 2012.

LEE, D.; PARK, Y.; BROWN, T. M. y ADAMS, M. E. (1999). Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Molecular Pharmacology*, 55(3), 584–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10051544>

LEES, A. D. y BEAMENT, J. W. L. (1948). An Egg-waxing Organ in Ticks, Agricultural Research Council Unit of Insect Physiology, Zoological Department, Cambridge. Vol. 89. Pag. 291 – 392. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18888183>

LIDSTER, R.T.; HAMILTON, J.F.; LEWIS, A.C.; LEE, J.D.; HOPKINS, J.R. (2012) Using Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography (GCxGC) for the Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCs) <http://adsabs.harvard.edu/abs/2012EGUGA..14.6944L>

LÓPEZ VALENCIA, G; OTONIEL VIZCAÍNO, G. (1992). Transmisión transovarica de *Anaplasma marginale* por la garrapata *Boophilus microplus*. *Revista ICA* (Instituto Colombiano Agropecuario) Vol. 27:437-443.

MAGADUM, S.; MONDAL, D. B.; GHOSH, S. (2009) Comparative efficacy of *Annona squamosa* and *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus* Izatnagar isolate. *Parasitology Research*, v. 105, n. 4, p. 1085-1091. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19557436>

MANZANO ROMÁN, R.; DÍAZ MARTÍN, V.; PÉREZ-SANCHEZ, R. (2013). Daños producidos por las garrapatas y métodos de control del parásito. *Parasitología Animal*. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC). Cordel de Merinas, 40-52, 37008 Salamanca, España.

<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/10931/articulos-rumiantes-archivo/danos-producidos-por-las-garrapatas-y-metodos-de-control-del-parasito.html>

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; CASTILLO-HERRERA, G. A.; ROSARIO-CRUZ, R.; FLORES-FERNANDEZ, J. M.; LOPEZ-RAMIREZ, J. y HERNANDEZ-GUTIERREZ, R. (2011). Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res*, 108: 481-487. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20865426>

MARTINS, J. R. (2004). Manejo da resistência aos carrapaticidas, 0–1. doi: Rev. Bras. Parasitol.Vet., v.13, suplemento 1, 2004  
[http://www.rbpv.ufrrj.br/documentos/13supl.12004/pe13s1114\\_115.pdf](http://www.rbpv.ufrrj.br/documentos/13supl.12004/pe13s1114_115.pdf).

MARTINS, R. M. (2006). Estudio in vitro de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, (8), 71–78.  
[http://www.sbpmed.org.br/download/issn\\_06/artigo12\\_v8\\_n2.pdf](http://www.sbpmed.org.br/download/issn_06/artigo12_v8_n2.pdf)

METCALF, R. L. (1989). Insect resistance to insecticides. *Pesticide Sci* 26, 333-358.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.2780260403/abstract>

MORGAN, E. D.; THORNTON, M. D. (1973). Azairachtin in the ruit of *Melia azedarch*. *Phytochemistry*. v. 12, n 2, p. 391-392, 1973. [http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80025-1](http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(73)80025-1)

MULLA, M. S.; SU, T. (1999) Activit and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of American Mosquito Control Association*, 15, p.133-152.

[http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA\\_V15\\_N2\\_P133-152.pdf](http://www.biodiversitylibrary.org/content/part/JAMCA/JAMCA_V15_N2_P133-152.pdf)

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J. (2011). Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de carne del área central de la Argentina. Revista de Investigación Agropecuaria RIA, 1-9. [http://inta.gob.ar/documentos/guia-para-el-control-de-los-parasitos-externos-en-bovinos-de-carne-del-area-central-de-la-argentina/ta en Argentina.pdf](http://inta.gob.ar/documentos/guia-para-el-control-de-los-parasitos-externos-en-bovinos-de-carne-del-area-central-de-la-argentina/ta%20en%20Argentina.pdf)

NEWMAN DORLAND, W.A. (1986). Diccionario de Medicina Enciclopédico Ilustrado. Nueva Editorial Interamericana S.A. Talleres de Prensa Técnica, S.A. de C.V. Calzada de Chabacano núm. 65-A Col. Asturias Delegación Cuauhtémoc 06850 México, D.F. – 3000 ejemplares.

OLIVO, C. J.; CARVALHO, N. M.; SILVA, J. H. S.; VOGEL, F. F.; MASSARIOL, P.; MEINERZ, G.; AGNOLIN, C.; MOREL, A. F.; VIAU, L. V. (2008). Citronella oil on the control of cattle ticks. Ciênc Rural. 2008; 38: 406-410. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000200018](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000200018)

PAROLA, P.; RAOULT, D. (2001) Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis. 32: 897-928.

PARRA, M.; SEGURA, F.; ARCOS, J.; LONDOÑO, J.; DÍAZ, E.; VENEGAS, M. (1999). Manejo integrado de garrapatas en bovinos. Corpoica Regional número 6. Tolima, Colombia. Págs. 10-18, 28-39.

PAZINATO, R.; KLAUCK, V.; VOLPATO, A.; TONIN, A. A.; SANTOS, R. C.; DE SOUZA, M. A.; VAUCHER, R. A.; RAFFIN, R.; GOMES, P.; FELIPPI, C. C.; STEFANI, L. M.; DA SILVA, A. S. (2014). Influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. ExpAppl Acarol. 2014 May; 63(1)77-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24368704>

PEIXOTO, M. G.; COSTA-JUNIOR, L. M.; BLANK, A. F.; LIMA ADA, S.; MENEZES, T. S.; SANTOS DDE, A.; ALVES, P. B.; CAVALCANTI, S. C.; BACCI,

L.; ARRIGONI-BLANK, M de F. (2015). Acaridical activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol.* 2015 May30; 210(1-2):118-22.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25837783>

PIPER, E. K.; JONSSON, N. N.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. E.; MOOLHUIJZEN, P.; VANCE, M. E. (2009). Immunological Profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the Cattle Tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 16, No. 7. p. 1074–1086.  
<http://cvi.asm.org/content/16/7/1074.full>

PIRALI-KHEIRABADI, K. y SILVA, J. T. (2010). *Lavandula angustifolia* essential oil as a novel and promising natural candidate for tick (*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*) control. *Exp. Parasitol*, 126: 184-186.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433836>

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S., MARTINS, J. R.; (2014) First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet. Parasitol.* 201, 128-136

RIBEIRO, V. L.; DOS SANTOS, J. C.; BORDIGNON, S. A.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; VON POSER, G. L. (2010). Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Bioresour Technol*; 101(7):2506-9.  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19954969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19954969)

ROSARIO, C.R.; HERNÁNDEZ, O.R. (2001). Evolución química de la resistencia a acaricidas. Memorias del Curso-Taller, diagnóstico de resistencia a ixodidas en garrapatas *Boophilus microplus*. Jiutepec, Morelos, México. Pp. 23-30. Rosario.

ROULSTON, W. J.; STONE, B. F.; WILSON, J. T.; WHITE, L. I. (1968). Chemical control of an organophosphorous and carbamate resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) from Queensland. Bull. Ent. Res. 58, 379-392.

STONE, B F. (1972). The genetics of resistance by ticks to acaricides. Aust. Vet. J. 48, 345-350.

SONENSHINE, D. E. (1991). Biology of Ticks I. New York (USA): Oxford University Press, Inc; 1991.

SONENSHINE, D.E. (1993) Biology of ticks. New York: Oxford University. 465 p.

SOUSA, L.; SOARES, S.; HÉLIO, B.; PIRES, H.; FERRI, P. H.; FERREIRA-BORGES, L. (2008). Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de Cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 17, 36–40. <http://www.scielo.br/pdf/rbpv/v17n1/v17n1a08.pdf>.

SPÄTH, E. J. A.; GUGLIELONE, A. A.; SIGNORINI, A. R.; MANGOLD, A. J. (1994). Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata *Boophilus microplus* y la enfermedades asocias en la Argentina. Therios – Vol. 23 – N° 116 – Agosto 1994.

TORRES, F. C. (2010). Avaliação da atividade carrapaticida das fracoes dos óleos essenciais de Citronela (*Cymbopogon winterianus*), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Aroeira (*Schinus molle*). Tesis de maestria. Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. <http://meriva.pucrs.br/dspace/handle/10923/3236>.

VAN LEEUWEN, T.; VONTAS, J.; TSAGKARAKOU, A.; WANNES, D. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review - Insect Biochemistry and Molecular Biology, 40, 563 – 572. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20685616>

VIEGAS JUNIOR, C. (2003) Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova* v.26 n. 3. São Paulo. *Veterinária – Ano 18*, Nº 103, maio/junho p.23-28, 1998.

[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422003000300017&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422003000300017&script=sci_abstract&tlng=pt).

VILLAR CLEVES, C.E. (1997). Aspectos básicos para el manejo integral del parasitismo en bovinos. Corpoica (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria). Programa nacional de transferencia de tecnología agropecuaria. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Pag. 1 – 8.

[20061127162541\\_Manejo integral de parasitismo bovino.pdf](#)

VITURRO, C.; BANDONI, A.; DELLACASSA, E.; SERAFINI, L.; ELDER, H. (2010). Normalización de Productos Naturales obtenidos de especies de la Flora Aromática Latinoamericana. pp 205- 280. Dellacassa, E. (Ed), Ed edi. PUCRS –Editora Universitaria da Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do SUL, Porto Alegre, Brasil, ISBN 978-85-397-0054-7.

VIVAN, M. P. (2005). Uso do cinamomo (*Melia azedarach*) como alternativa aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). 72 f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WALL, R. y SHEARER, D. (2001). *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control*. 2da. Edición. Londres (Inglaterra). Editorial: Blackwell Science Ltd. 262.

YAKKUNDI, S. R.; THEJAVATHI, R.; RAVINDRANATH, B. (1995). Variation of Azadirachtin content during growth and storage of neem (*Azadirachta indica*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, n. 9, p. 2517-2519, 1995.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf00057a036>

## CAPITULO VIII. ANEXO

Resultados de la Prueba de Establo. Los datos del día 0 pertenecen a la recolección de la mañana; el tratamiento se realizó por la tarde.

Día	LOTE	CORRAL	Recolección							Incubación							Resultados		
			Teleog. Caídas	Grandes	Medianas	Chicas	Muertas	Lesionadas	Decolorada	Deformes	Teleg. Incubadas	Grandes	Medianas	Chicas	grs. de Teleog.	Teleog. Ovip.	grs. Huevos	% Eclosión	RE
-3	C	1	0																
-3	T	2	0																
-3	T	3	0																
-3	T	4	0																
-3	C	5	0																
-3	C	6	0																
-2	C	1	0																
-2	T	2	0																
-2	T	3	7	3	3	1				7	3	3	1	1,358	7	0,768	95		73,0
-2	T	4	0																
-2	C	5	0																
-2	C	6	0																
-1	C	1	0																
-1	T	2	0																
-1	T	3	18	15	3					18	15	3		4,149	18	2,452	100		245,2
-1	T	4	25	3	17	5				20	2	14	4	3,014	19	1,584	100		198,0
-1	C	5	11	4	3	4				11	?	?	?	1,783	11	1,001	100		100,1
-1	C	6	15	5	4	6				15	?	?	?	3,170	14	1,619	100		161,9
0	C	1	6		2	4				6		2	4	0,499	5	0,160	100		16,0
0	T	2	4		1	3				4		1	3	0,283	4	0,133	90		12,0
0	T	3	44	31	8	2		3		20	15	4	1	4,432	20	2,273	100		500,1
0	T	4	67	1	50	10	3	3		20	1	16	3	2,566	20	1,340	100		448,9
0	C	5	33	4	20	9				20	3	12	5	2,651	18	1,249	100		206,1
0	C	6	11	5	3	1	1	1		9	5	3	1	1,760	7	0,729	95		84,6
1	C	1	1			1				1			1	0,028	1	0,008	100	29	0,8
1	T	2	1		1					1		1		0,126	1	0,066	100	52	6,6
1	T	3	0																
1	T	4	4			3	1			3			3	0,248	3	0,115	100	46	15,3
1	C	5	0																
1	C	6	2	1	1					2	1	1		0,421	2	0,196	60	28	11,8
2	C	1	4		4					4		4		0,498	4	0,258	100	52	25,8
2	T	2	1			1				1			1	0,037	1	0,004	100	11	0,4
2	T	3																	
2	T	4																	
2	C	5																	
2	C	6																	

Día	LOTE	CORRAL	Recolección							Incubación							Resultados			
			Teleog. Caídas	Grandes	Medianas	Chicas	Muertas	Lesionadas	Decolorada	Deformes	Teleg. Incubadas	Grandes	Medianas	Chicas	grs. de Teleog.	Teleog. Ovip.	grs. Huevos	% Eclósión	RE	IR
3	C	1	6		1		5				1		1		0,107	1	0,042	80	31	20,2
3	T	2	1		1						1		1		0,106	0	0,000	0		0,0
3	T	3	1				1				0									
3	T	4	4				4				0									
3	C	5	1				1				0				1,517					
3	C	6	18	4	12		2				16	4	12		3,033	16	1,502	90	45	152,1
4	C	1	1			1					1		1		0,068	1	0,010	0		0,0
4	T	2	1			1					1		1		0,074	1	0,033	100	45	3,3
4	T	3	2		2						2		2		0,341	2	0,170	95	47	16,2
4	T	4	7		3	3	1				6		3	3	0,579	6	0,258	70	31	21,1
4	C	5	12	1	9	2					12	1	9	2	1,364	12	0,758	95	53	72,0
4	C	6	19	12	3	3	1				18	12	3	3	3,251	16	1,758	100	54	185,6
5	C	1																		
5	T	2																		
5	T	3																		
5	T	4	7		1	2	4				3		1	2	0,320	3	0,151	100	47	35,2
5	C	5	34	1	29	4					20	1	17	2	3,033	20	1,690	100	56	287,3
5	C	6	11	5	6						11	5	6		2,118	11	1,251	95	56	118,8
6	C	1																		
6	T	2	1		1						1		1		0,110	1	0,053	95	46	5,0
6	T	3																		
6	T	4	1			1					1		1		0,065	0	0,000	0		0,0
6	C	5	20	2	16		2				18	2	16		2,765	7	1,409	100	51	156,6
6	C	6	1	1							1	1			0,243	1	0,106	95	41	10,1
7	C	1	3		1	2					3		1	2	0,210	3	0,095	100	45	9,5
7	T	2																		
7	T	3																		
7	T	4																		
7	C	5	11		8	2	1				10		8	2	1,294	8	0,640	80	40	56,3
7	C	6	2		1		1				1		1		0,176	1	0,096	100	55	19,2
8	C	1																		
8	T	2	1		1						1		1		0,112	1	0,062	100	55	6,2
8	T	3																		
8	T	4																		
8	C	5	14	1	10	3					14	1	10	3	1,853	11	0,806	70	30	56,4
8	C	6	1		1						1		1		0,187	1	0,107	100	57	10,7
9	C	1																		
9	T	2																		
9	T	3																		
9	T	4																		
9	C	5																		
9	C	6	1	1							1	1			0,206	1	0,123	95	57	11,7

Día	LOTE	CORRAL	Recolección							Incubación						Resultados			
			Teleog. Caídas	Grandes	Medianas	Chicas	Muertas	Lesionadas	Decolorada	Deformes	Teleg. Incubadas	Grandes	Medianas	Chicas	grs. de Teleog.	Teleog. Ovip.	grs. Huevos	% Eclosión	RE
10	C	1																	
10	T	2																	
10	T	3																	
10	T	4	1		1					1		1	0,123	1	0,049	100	40	4,9	
10	C	5	4		4					4		4	0,755	4	0,410	100	54	41,0	
10	C	6	2	1	1					2	1	1	0,385	2	0,217	100	56	21,7	
11	C	1																	
11	T	2																	
11	T	3																	
11	T	4																	
11	C	5																	
11	C	6																	
12	C	1	1		1					1		1	0,111	1	0,030	5	1	0,2	
12	T	2	2		1	1				2		1	0,201	2	0,090	95	43	8,6	
12	T	3																	
12	T	4																	
12	C	5	6		6					6		6	0,854	5	0,372	95	41	35,3	
12	C	6	3	3						3	3		0,704	3	0,380	75	40	28,5	
13	C	1	3		2	1				3		2	0,290	2	0,106	95	35	10,1	
13	T	2																0,0	
13	T	3																	
13	T	4																	
13	C	5	2		1	1				2		1	0,212	1	0,026	100	12	2,6	
13	C	6	2	2						2	2		0,466	2	0,257	95	52	24,4	
14	C	1	1			1				1			0,018	1	0,010	10	6	0,1	
14	T	2																	
14	T	3																	
14	T	4																	
14	C	5	2		2					2		2	0,310	2	0,149	100	48	14,9	
14	C	6	4	4						4	4		0,929	4	0,460	100	50	46,0	
15	C	1																	
15	T	2																	
15	T	3																	
15	T																		
15	C	5																	
15	C	6																	
16	C	1	1			1				1			0,032	0	0,000	0		0,0	
16	T	2	2		1	1				2		1	0,260	2	0,128	40	20	5,1	
16	T	3																	
16	T	4																	
16	C	5	2		2					2		2	0,348	2	0,169	80	39	13,5	
16	C	6	3	3						3	3		0,715	3	0,365	80	41	29,2	

Día	LOTE	CORRAL	Recolección							Incubación							Resultados		
			Teleog. Caídas	Grandes	Medianas	Chicas	Muertas	Lesionadas	Decolorada	Deformes	Teleg. Incubadas	Grandes	Medianas	Chicas	grs. de Teleog.	Teleog. Ovip.	grs. Huevos	% Eclosión	RE
17	C	1																	
17	T	2	2		2					2		2	0,280	2	0,126	40	18	5,0	
17	T	3																	
17	T	4																	
17	C	5	3	1	2					3	1	2	0,558	3	0,280	95	48	26,6	
17	C	6																	
18	C	1																	
18	T	2																	
18	T	3																	
18	T	4																	
18	C	5																	
18	C	6																	
19	C	1																	
19	T	2																	
19	T	3																	
19	T	4																	
19	C	5																	
19	C	6																	
20	C	1	1		1					1		1	0,176	1	0,070	40	16	2,8	
20	T	2	3		3					3		3	0,434	3	0,209	80	39	16,7	
20	T	3																	
20	T	4																	
20	C	5	6	3	3					6	3	3	1,313	6	0,659	90	45	59,3	
20	C	6	1	1						1	1		0,276	1	0,161	100	58	16,1	
21	C	1	4		2	2				4		2	0,399	2	0,036	70	6	2,5	
21	T	2																	
21	T	3																	
21	T	4																	
21	C	5	11	7	4					11	7	4	2,406	11	1,318	70	38	92,3	
21	C	6																	
22	C	1																	
22	T	2																	
22	T	3																	
22	T	4																	
22	C	5																	
22	C	6																	
23	C	1	4			3	1			3			0,181	2	0,039	100	22	5,2	
23	T	2																	
23	T	3																	
23	T	4																	
23	C	5	3		3					3		3	0,369	3	0,185	95	48	17,6	
23	C	6																	

Día	LOTE	CORRAL	Recolección							Incubación							Resultados		
			Teleog. Caídas	Grandes	Medianas	Chicas	Muertas	Lesionadas	Decolorada	Deformes	Teleg. Incubadas	Grandes	Medianas	Chicas	grs. de Teleog.	Teleog. Ovip.	grs. Huevos	% Eclosión	RE
24	C	1																	
24	T	2																	
24	T	3																	
24	T	4																	
24	C	5																	
24	C	6																	
25	C	1	2			2				2		2	0,083	2	0,027	90	29	2,4	
25	T	2	1		1					1		1	0,124	1	0,060	100	48	6,0	
25	T	3																	
25	T	4																	
25	C	5	2	1	1					2	1	1	0,454	2	0,231	100	51	23,1	
25	C	6																	