

Desarrollo de métodos de bioensayo con garrapatas aplicados a la detección de potenciales bioplaguicidas botánicos

AZUCENA GONZÁLEZ-COLOMA^{1*}, SONIA OLMEDA², JESUS BURILLO³,
JESUS SANZ⁴, PAULA SAINZ¹, MARÍA LAURA UMPIÉRREZ⁵, CARMEN ROSSINI^{5*}

¹ ICA-CSIC, Madrid, ESPAÑA

² Departamento de Sanidad Animal, UCM, Madrid, ESPAÑA

³ CITA-Gobierno de Aragón, Zaragoza, ESPAÑA

⁴ IQOG-CSIC, Madrid, ESPAÑA

⁵ Laboratorio de Ecología Química, Departamento de Química Orgánica, Facultad de
Química, Universidad de la República- Montevideo, URUGUAY

* Autoras para correspondencia: azu@ica.csic.es, crossini@fq.edu.uy

Palabras clave. Acaricidas, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, productos naturales, ensayos *in vitro*.

RESUMEN

Este capítulo trata de comparar la metodología usada de forma rutinaria para evaluar la actividad de agentes garrapaticidas, no adaptada a la evaluación de extractos y productos naturales, con metodologías desarrolladas en el contexto del proyecto CYTED P307AC0512 específicas para la aplicación de extractos y productos de origen botánico. En primer lugar se describen los métodos utilizados y descritos en la bibliografía y después se describe la metodología desarrollada y algunos resultados obtenidos como ejemplos.

INTRODUCCIÓN

La problemática causada por las garrapatas, en particular por la garrapata común del ganado, *R. (B.) microplus*, ya ha sido expuesta en otros capítulos de este libro (Capítulo 1). Estos problemas ocasionan pérdidas comerciales enormes, y por ello es que el uso de acaricidas químicos suele ser en la mayoría de los sistemas de producción la medida de control más habitual (profiláctica y terapéutica) de estos ectoparásitos (Nari, 1990). Como se ha mencionado previamente, el uso de los mismos tiene sus inconvenientes, incluyendo la aparición de residuos tanto en carne como en leche, así como la producción de efectos medioambientales adversos.

Para empeorar la situación, la aparición de resistencia a numerosos productos convencionales parece haberse convertido en un patrón. De esta manera se ha seleccionado cepas resistentes a diferentes principios activos debido a su sobre-uso. Esta resistencia no se ha generado únicamente en garrapatas de un tipo, sino también se ha descrito resistencia cruzada entre ácaros de distintas especies, de ácaros con insectos –p.e. *H. irritans*–, e incluso ácaros con helmintos. (Díaz- Alonso y col., 2006; FAO, 2004)

Este escenario requiere por lo tanto del desarrollo de nuevos productos. Para la obtención de los mismos se hace necesario tener métodos rápidos de selección en laboratorio, que permitan fácilmente detectar actividad y proseguir con los estudios pertinentes. Tradicionalmente el entorno académico ha utilizado los métodos recomendados por la FAO para el control de aparición de resistencia como forma de detectar actividades. Tales métodos incluyen el llamado ensayo de paquete larvario (oficial), utilizado ninfas como detectores, y el protocolo derivado de los trabajos de Drummond y col. (1973), utilizado como detectores a teleoginas ingurgitadas, así como algunas modificaciones que posteriormente se han incorporado.

EXPERIMENTAL

Breve descripción de los bioensayos disponibles. El muestreo de actividad de diferentes productos contra garrapatas se ha realizado aplicando ensayos de inmersión, utilizando el protocolo Drummond, y el test del paquete larvario con variaciones diversas adaptadas a diferentes principios activos y muestras con potencial actividad (Miller y col., 2002; Miller y col., 2007; Nolan, 1994). Los métodos más utilizados, Paquete Larvario y el Protocolo Drummond se describen a continuación.

- **Paquete Larvario (Mortalidad sobre larvas).** Se realiza en una adaptación de la prueba de diagnóstico de resistencia de la FAO (1995), cuyo diseño se basa en el trabajo de Stone & Haydock (1962). Se exponen larvas de edad conocida (14-21 días) a los productos impregnados sobre papel de filtro, y se controla la mortalidad a las 24 y 48h, mediante observación con lupa binocular. Los bioensayos se realizan en condiciones de temperatura y humedad controlada, 27–28°C, 70–80% HR; en general se realiza por cada dosis un mínimo de 4 réplicas, con 30 larvas por réplica (De Freitas y col., 2005), analizándose los resultados por ANOVA. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Ensayos sobre paquete larvario (Stone y Haydock, 1962)

- 1) Preparación de los extractos/productos a analizar: Preparar al menos 25 mL de la solución a ensayar. Se recomienda utilizar soluciones acuosas, a una concentración inicial de 10000 ppm (esto es: 250 mg). En general se recomienda como solvente el uso de una mezcla 2:1 de tricloroetileno y aceite de oliva. Realizar diluciones seriadas a partir de la solución madre.
- 2) Preparación de garrapatas (larvas): Utilizar garrapatas desprendidas del ganado en las 24 horas anteriores, con el mismo pre-tratamiento indicado en el test de Drummond (Cuadro 2). Incubar las garrapatas por 14 días, y obtener los huevos que se colocan en tubos de eclosión e incuban. Utilizar las larvas emergidas luego de los 14 a 21 días de incubación.
- 3) Preparación de papeles impregnados: Utilizar papel Whatman 1 (8.5 x 7.5 cm) tratado en forma homogénea con 670 µl de la solución a ensayar; se espera que el solvente se evapore y se realizan al menos 4 réplicas por tratamiento.
- 4) Cargar cada papel (plegado y sellado mecánicamente con clips) con 100 larvas.
- 5) Incubar a 27-29°C y HR>80 % por 24 horas.
- 6) Contar las larvas vivas (con movimiento) y muertas (quietas o incapaces de desplazarse). Realizar los cálculos mostrados abajo, comparando contra los resultados del control negativo. No considerar ensayos en los que el control negativo de mortalidad mayor al 10%. Entre 5 y 10% de mortalidad en el control negativo se corrige por Abbot (Abbott, 1925). Eventualmente se puede calcular dosis letales, si se ha hecho la curva dosis-respuesta.

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de garrapatas muertas}}{\text{N}^\circ \text{ de garrapatas totales}} * 100$$

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = \frac{(\% \text{ mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad control})}{100 \% \text{ mortalidad control}} * 100$$

El ensayo puede utilizarse como forma de determinar la curva dosis/respuesta; los resultados se expresan como dosis letales necesarias para matar la mitad de la población (LD50), realizándose el tratamiento estadístico por análisis de probit (o logit de acuerdo a ajuste del modelo). En caso de ser necesario se puede aplicar la corrección de Abbot (Abbott, 1925), pero en principio se debería aplicar el criterio recomendado por la FAO, en cuanto a no considerar réplicas en donde a mortalidad del control negativo exceda el 10%.

Modificaciones de este método han sido descritas en diversos trabajos, incluyendo el test de inmersión descrito por Shaw (1966), el test con uso de pipetas (Barnard y col., 1981; Maupin y Piesman, 1994), el llamado test de "bolsa de té" (Fiedler, 1968) y varias

otras modificaciones (Benavides y Romero, 2000; Mekonnen y col., 2003; Roberts y col., 1980; Sabatini y col., 2001; Schnitzerling y col., 1983). Asimismo, también se ha descrito recientemente microensayos de inmersión para larvas, como alternativa para muestrear rápidamente numerosos productos (Ferraz y col., 2010; Hunter White y col., 2004; Lovis y col., 2011; White y col., 2004).

Por último, se ha descrito otro método que consiste en recubrir un vial (4-Dram) con diferentes concentraciones del extracto/producto a ensayar (1.28-0.08 µg/cm²). Para ello, se toman diez ninfas sin alimentar/vial (50/ensayo), se mantienen 24h, transcurridas las cuales se determina la mortalidad (Flor-Weiler y col., 2011).

• **Protocolo Drummond (Toxicidad sobre teleoginas por inmersión).** Se realiza en base a la prueba diseñada por Drummond y col., (1967) (Drummond y col., 1967 (citado en Diaz-Alonso y col. 2006); Drummond y col., 1973), según modificaciones propuestas (Alvarez y col., 2008; Sarda Ribeiro y col., 2008; Sarda Ribeiro y col., 2007) (Cuadro 2). Grupos de 10 a 12 hembras (3 réplicas/tratamiento) de R. (B.) microplus previamente pesadas se sumergen por 5 minutos en un beaker que contiene 10 mL de las soluciones. Las soluciones pueden ser acuosas y/o con surfactante (p.e. Triton), o con solvente no tóxico, dependiendo de la solubilidad. De cualquier manera el vehículo de la solución debe usarse como control negativo.

Las teleoginas se mantienen en placas de Petri (5.5 x 1.5 cm) e incuban en condiciones controladas por el período del bioensayo (27–28°C, 70–80% HR). Se registra la mortalidad diaria.

A los 14 días se registra el número de hembras en oviposición, pesándose los huevos, y trasvasándolos a tubos de vidrio, para controlar emergencia, 14 días más. Se determinan por lo tanto parámetros relacionados con la proliferación, a saber: el porcentaje de mortalidad, la inhibición de oviposición, e inhibición de emergencia.

CUADRO 2. Protocolo Drummond (Drummond y col., 1973)

- 1) Preparación de los productos a ensayar: Preparar al menos 25 mL de las soluciones. Usar soluciones acuosas a una concentración inicial de 10000 ppm (aprox. 250 mg).
- 2) Preparación de grupos de teleóginas: Utilizar garrapatas desprendidas del ganado en las 24 horas previas (nunca usar garrapatas desprendidas en un período anterior a los 3 días). Las teleóginas se lavan con agua (para sacar restos de materia orgánica); se secan suavemente con papel absorbente, y se colocan bajo una fuente calórica para detectar las garrapatas más vitales. Descartar garrapatas lesionadas, las que no están debidamente ingurgitadas, las que tienen alteración de color o consistencia, o las que han comenzado a oviponer. Formar grupos de 10 teleóginas pesadas y colocarlos en cajas de Petri (9 cm de diámetro) pre-pe-sadas.
- 3) Día 0: Colocar 25 mL de la solución a ensayar homogeneizada en un vaso de 100. Sumergir cada grupo de garrapatas y agitar suavemente durante 1 minuto. Verter el contenido en colador eliminando el garrapaticida y colocar las garrapatas en papel absorbente; secarlas suavemente y depositarlas en la caja de Petri correspondiente. Incubar a 27°C y más de 80% de humedad relativa por 14 días. Preparar los grupos testigos correspondientes (Control negativo: solvente con o sin adyuvantes. Control positivo: un garrapaticida de uso convencional)
- 4) Día 14: Retirar las teleóginas de las cajas de Petri y pesar los huevos. Dejar los huevos en iguales condiciones que antes, por 25 días más. Para ello, colocar las cajas de Petri en un recipiente profundo con agua jabonosa en el fondo (evitar el contacto de las cajas con el agua) para impedir la fuga de las larvas eclosionadas antes del final del ensayo.
- 5) Día 39: Determinar visualmente la tasa de eclosión (%) de las distintas cajas comparando la masa total de huevos eclosionados con la masa de los no eclosionados. Realizar los cálculos mostrados abajo, comparando contra los resultados del control negativo (100% de eclosión) y del control positivo (0% de eclosión).

i) Reproducción estimada (RE)

$$RE = \frac{\text{Peso de huevos (mg)}}{\text{Peso de hembras (mg)}} * \text{eclosión (\%)}$$

ii) Porcentaje de control (%C)

$$\% C = \frac{RE \text{ control} - RE \text{ tratado}}{RE \text{ tratado}} * 100$$

Varios otros métodos se han ensayado, en trabajos puntuales; comparación de alguno de ellos fue realizada en trabajos anteriores (Castro-Janer y col., 2009; Miller y col., 2007).

Dianas seleccionadas en este trabajo. Para la realización de este trabajo se eligieron dos modelos de garrapatas de importancia económica y sanitaria, una especie del continente americano (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) y una del continente Europeo (*Hyalomma lusitanicum*).

R. (B.) microplus, actualmente de incidencia mundial, ocasiona grandes daños económicos en la actividad ganadera debido a que por su presencia se da disminución de la producción de leche y de la carne. Las consecuencias de su ectoparasitosis han sido descritas previamente en el Capítulo 1 de este libro. Asimismo, presenta resistencia a nivel mundial, habiéndose descrito a organofosforados, piretroides, amitraz (aunque con menor distribución), lactonas macrocíclicas (FAO, 2004) y fipronil (Castro-Janer y col., 2010; Castro-Janer y col., 2010; Kumar y col., 2011). También se ha detectado la aparición de cepas con resistencia múltiple (Díaz- Alonso y col., 2006).

Hyalomma lusitanicum es la garrapata exófila de importancia médica y veterinaria más abundante en el centro de España. Se considera vector de *Theileria annulata* y *Coxiella burnetii*, y portadora de *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis* y *Borrelia burgdorferi* (Toledo y col., 2009). El control de esta especie de garrapatas es difícil debido a la complejidad de su ciclo, y se ha basado en el uso de insecticidas de origen sintético aplicados directamente sobre los animales. El uso de estos productos está siendo revaluado debido a la aparición de resistencias, los residuos en productos de consumo y la contaminación ambiental (Klafke y col., 2010). La tendencia actual pasa por el control integrado que incluye la utilización de agentes naturales con actividad ixodida.

Los estadios elegidos fueron teleoginas para el ensayo Drummond y sus modificaciones, así como larvas para el ensayo con celulosa; estas fueron elegidas porque son la fase de la garrapata que coloniza el huésped, lo que permitiría eventuales tratamientos tópicos en el huésped y tratamientos del suelo.

Modificaciones ensayadas a los protocolos existentes y propuesta de nuevo protocolo. Las cantidades de sustancias necesarias para realizar un ensayo siguiendo el protocolo Drummond son altas, a la hora de realizar un muestreo de productos, si estos no están disponibles en grandes cantidades (Cuadro 1). Sin embargo, en el caso de ensayos con productos puros, estas cantidades se convierten en cuasi prohibitivas. Así mismo, el tiempo insumido por este protocolo (39 días) lo limita en cuanto a ser aplicado en un muestreo rápido. Por estas razones se decidió ensayar modificaciones a los protocolos existentes, como una manera de generar herramientas que consuman poca cantidad de muestra y tiempo, con resultados confiables. Se ensayaron las siguientes modificaciones sobre el protocolo Drummond (Cuadro 3):

a. Modificaciones para ensayar productos sobre teleoginas. Como forma de disminuir la cantidad de muestra necesaria para las pruebas, se ensayó la aplicación tópica sobre teleoginas en forma individual, en lugar de la inmersión propuesta por el protocolo inicial. La aplicación para el caso de líquidos, se realizó entonces con microjeringa sobre la parte dorsal de cada teleogina. Así mismo se realizó un ensayo con celulosa microcristalina como vehículo, también aplicada en la parte dorsal.

b. Se desarrolló un protocolo de ensayo para estudiar toxicidad sobre larvas, en el cual se controla la mortalidad, de acuerdo a lo expuesto en el Cuadro 3. Este protocolo fue empleado también con varias muestras ensayadas según el protocolo Drummond (Tabla 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modificaciones ensayadas sobre el protocolo Drummond. Los resultados obtenidos mediante la aplicación tópica con solventes y con celulosa se muestran en la Tabla 1. Comparando los resultados de los controles positivos (amitraz) aplicados con y sin celulosa, se realizó una observación inesperada: La celulosa parece de alguna manera proteger a las teleoginas de la acción del amitraz, ya que continuaron ovipositando en forma similar al control negativo. Sin embargo, los huevos puestos por teleoginas tratados con amitraz sobre celulosa no eclosionaron, como era de esperarse, indicando que éste si entra en contacto con estos huevos.

Por otra parte, los solventes ensayados produjeron toxicidad sobre las teleoginas, en cuanto no sólo disminuyeron la tendencia a la oviposición, sino también la eclosión de los huevos. Es interesante observar que si bien el etanol y el Tween 20 por sí mismos produjeron cierto grado de toxicidad, no lo hizo así su mezcla 75:25. Concluimos entonces que las modificaciones ensayadas no son adecuadas, en cuanto a que los vehículos presentan por sí mismo actividad, a pesar de que se ha afirmado que la aplicación tópica directa de solventes tales como acetona y etanol no afecta a las garrapatas (White y col., 2004).

Cuadro 3. Protocolo con celulosa

Material biológico:

Larvas de la misma puesta de garrapatas, de por lo menos 21 días de edad para *R. microplus* y 7 días para *H. lusitanicum*.

Material de laboratorio:

Tubos de ensayo taponados con algodón hidrófilo.

Tubos eppendorfs, con 25 mg de celulosa cristalizada Merck adicionados con 50 µl de solvente, (acetona o metanol, control negativo), un garrapaticida (control positivo) o con el producto a probar.

Procedimiento:

Adicionar los extractos a una concentración de 20 µg/µl (total 1000 µg de extracto) y hacer diluciones seriadas si es necesario.

Hacer un control negativo absoluto (celulosa), uno negativo con celulosa y solvente, y otro control positivo con un acaricida comercial.

Ensayo de mortalidad:

Día -1. Garrapatas: Hacer 3 a 5 lotes de 20 garrapatas por experimento en tubos de ensayo tapados con algodón. Las garrapatas se mantendrán a 24°C y HR superior al 70%

Día 0. El contenido de los viales con los extractos en matriz de celulosa se vierte en los viales de las garrapatas. Cada vial se tapa con algodón hidrófilo y se agita para asegurar el contacto del producto y las garrapatas. Los viales con garrapatas tratadas se mantienen a 24°C y HR superior al 70%.

Día 1. 24 h post-tratamiento. Se abre cada vial y se retiran y contabilizan los ejemplares muertos. Se evalúan los datos para determinar la significación estadística de las diferencias de mortalidad observadas.

En estos estudios se encontró que si bien las teleoginas ovipositaban en forma normal, los huevos no eclosionan (Tabla 1). El efecto de solventes sobre otras especies ha sido estudiado en *Anocenter nitens* (Beadles y col., 1973), y *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Ravindran y col.).

Tabla 1. Efecto de diferentes solventes por aplicación tópica sobre teleoginas en la emergencia de los huevos.

Producto	Teleoginas ovipositando	Masa Huevos (g)	Emergencia (%)	RE
Control absoluto	9	1.1	64	22.6
Acetona	9	0.9	0	0
Celulosa, 50 mg	10	1.0	2	0.5
Etanol	8	0.6	0	0
Etanol-Tween20*	10	1.1	0	0
Tween 20	9	0.7	0	0
Celulosa/ Amitraz	10	0.8	0	0
Amitraz	0	0	--	--

* Tween 20 al 1%, en mezcla con etanol (75:25).

Análisis de extractos de plantas. En las Tablas 2 y 3 se presentan los resultados de la actividad de extractos de plantas provenientes de diferentes familias, sobre dos tipos de garrapatas, aplicando el protocolo convencional Drummond para teleoginas, y el protocolo con celulosa como vehículo para larvas.

Tabla 2. Actividad de varios extractos etanólicos (EE) de plantas, contra teleoginas (Drummond) y larvas (Protocolo con celulosa, 10 µg/µL) de *R. (B.) microplus*.

Familia Especie (tipo de extracto)	Drummond*			Celulosa
	Masa huevos(g)	Emergencia huevos (%)	Índice de Fecundidad	Mortalidad larvas (%)
Bignoniaceae <i>Jacaranda mimosifolia</i> (EE, hojas)	1,2 ± 0,4 ^a	100 ^a	42 ^a	11 ± 11
<i>Clytostoma callistegioides</i> (EE, hojas)	1,0 ± 0,4 ^a	95 ^a	38 ^a	16 ± 9
<i>C. callistegioides</i> (EE, lianas)	1,4 ± 0,5 ^a	80 ^a	37 ^a	2 ± 2
<i>Dolichandra cynanchoides</i> (EE, hojas)	0,9 ± 0,5 ^a	33 ^b	11 ^a	86 ± 4
<i>Macfadyena unguis-cati</i> (EE, hojas)	1,1 ± 0,4 ^a	75 ^a	27 ^a	60 ± 2
<i>M. unguis-cati</i> (EE, lianas)	1,3 ± 0,5 ^a	95 ^a	45 ^a	50 ± 26
Meliaceae <i>Melia azedarach</i> (EE, frutos)	0,4 ± 0,1 ^b	54 ^b	9 ^c	76 ± 21
Phytolaccaceae <i>Phytolacca dioica</i> (EE, frutos)	0,9 ± 0,3 ^a	90 ^a	33 ^a	47 ± 7
Sapindaceae <i>Allophylus edulis</i> (EE, hojas)	1,1 ± 0,4 ^a	78 ^a	32 ^a	76 ± 11
<i>A. edulis</i> (EE, ramas)	0,5 ± 0,2 ^b	80 ^a	16 ^b	76 ± 2
<i>Dodonaea viscosa</i> (EE, hojas)	1,0 ± 0,5 ^a	70 ^a	24 ^b	60 ± 12
<i>Serjania meridionalis</i> (EE, hojas)	1,1 ± 0,5 ^a	70 ^a	27 ^b	6 ± 2
<i>S. meridionalis</i> (EE, frutos)	0,7 ± 0,1 ^b	100 ^a	28 ^b	67 ± 10
<i>S. meridionalis</i> (EE, ramas)	1,0 ± 0,3 ^a	100 ^a	34 ^a	67 ± 22
Control negativo	1,3 ± 0,4 ^a	90 ^a	45 ^a	0 ± 1
Control positivo	0	--	--	100 ± 0

* Diferentes letras indican diferencias significativas (P < 0.05) mediante comparaciones post-ANOVA (comparaciones por Tukey).

Tabla 3. Actividad de varios extractos etanólicos (EE) y aceites esenciales (AE) de plantas, contra larvas (Protocolo con celulosa) de *H. lusitanicum*.

Familia Especie (tipo de extracto)	Mortalidad larvas (%)	
	20 µg/µL	10 µg/µL*
Bignoniaceae <i>Jacaranda mimosifolia</i> (EE, hojas)	0 ± 0	-
<i>Clytostoma callistegioides</i> (EE, hojas)	0 ± 0	-
<i>C. callistegioides</i> (EE, lianas)	0 ± 0	-
<i>Dolichandra cynanchoides</i> (EE, hojas)	0 ± 0	-
<i>Macfadyena unguis-cati</i> (EE, hojas)	1,6 ± 0,5	-
<i>M. unguis-cati</i> (EE, lianas)	0 ± 0	-
Meliaceae <i>Melia azedarach</i> (EE, frutos)	1,5 ± 0,4	-
Phytolaccaceae <i>Phytolacca dioica</i> (EE, frutos)	0 ± 0	-
Sapindaceae <i>Allophylus edulis</i> (EE, hojas)	2 ± 2	-
<i>A. edulis</i> (EE, ramas)	2 ± 2	-
<i>Dodonaea viscosa</i> (EE, hojas)	0 ± 0	-
<i>Serjania meridionalis</i> (EE, hojas)	0 ± 0	-
<i>S. meridionalis</i> (EE, frutos)	0 ± 0	-
<i>S. meridionalis</i> (EE, ramas)	0 ± 0	-
Labiatae <i>Artemisia herba-alba</i> 3 (AE, parte aérea)	100	22±16
<i>A. herba-alba</i> 11 (AE, parte aérea)	100	11± 3
<i>Rosmarinus officinalis</i> 1 (AE, parte aérea)	100	20 ± 1
<i>R. officinalis</i> 6 (AE, parte aérea)	100	58 ± 16
<i>R. officinalis</i> 7 (AE, parte aérea)	95 ± 3	5 ± 3
<i>R. officinalis</i> 9 (AE, parte aérea)	97 ± 2	23 ± 4
<i>R. officinalis</i> 12 (AE, parte aérea)	96 ± 4	18 ± 16
<i>Lippia alba</i> (AE, parte aérea)	15 ± 19	-
<i>Hyssopus officinalis</i> (AE, parte aérea)	0	-
Control negativo	0 ± 0	0 ± 0
Control positivo	96 ± 4	97 ± 3

* Los extractos con buena actividad fueron re-ensayados a concentraciones menores.

En general, para *R. (B.) microplus* se observa una mayor sensibilidad de larvas con celulosa frente al ensayo Drummond (Tabla 2). A su vez, de la comparación de la actividad de los mismos extractos contra ambos organismos utilizados, puede concluirse (Tabla 2 y 3) que un patrón general

está dado por la mayor susceptibilidad de las larvas de *R. (B.) microplus* (Tabla 2) que las de *H. lusitanicum* (Tabla 3). De hecho, en el caso de las larvas de *H. lusitanicum*, ninguno de los extractos etanólicos ensayados fueron activos, destacándose para este organismo como patrón una mayor actividad de los aceites esenciales comparada a la de los extractos etanólicos (Tabla 3).

Por último cabe destacar que el protocolo desarrollado con celulosa amplía el rango de productos a ensayar, sin consideración de las propiedades fisicoquímicas de los mismos, ya que el ensayo elimina los problemas derivados de la poca solubilidad en agua. En este protocolo pueden aplicarse productos solubilizados en una variedad de disolventes orgánicos, lo cual no es posible en el caso del protocolo Drummond, en el cual los residuos de disolventes son tóxicos per se sobre las teleoginas (Tabla 1).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las modificaciones ensayadas con el objetivo de utilizar menos cantidad de muestra sobre el protocolo Drummond no resultaron efectivas debido a la toxicidad de los vehículos (Tabla 1); por otra parte, el protocolo desarrollado con larvas de ambas especies, utilizando celulosa como vehículo de aplicación de los productos a ensayar ha sido efectivo, robusto y rápido, pues en 24 h se obtienen los resultados.

En el caso de *R. (B.) microplus* se puede apreciar que la susceptibilidad de larvas es mayor que la de adultos, comparando los resultados de actividad contra adultos y larvas (Tabla 2). Así por ejemplo, el extracto de *Melia azedarach* fue muy efectivo contra larvas pero no así contra adultos. Es así que el protocolo de celulosa sobre larvas (el cual es más rápido y menos laborioso) puede ser usado como la primera aproximación para cribados rápidos, seleccionando así productos activos que pueden luego ser ensayados sobre adultos siguiendo el protocolo Drummond, que no solo es más laborioso y largo sino que también consume grandes cantidades de muestra (Cuadro 2).

Comparando los resultados de actividad anti-larvaria obtenidos para ambas especies de garrapatas (Tablas 2 y 3), se puede observar una mayor susceptibilidad en las larvas de *R. (B.) microplus*, que en las de *H. lusitanicum*. Es de esperar entonces que los extractos de *Artemisia herba-alba* y *Rosmarinus officinale*, que han dado excelente actividad larvicida frente a *H. lusitanicum*, sean muy activos contra la garrapata común del ganado, constituyéndose así en productos de interés potencial en desarrollo de nuevos garrapaticidas.

AGRADECIMIENTOS. Los autores agradecen el apoyo técnico de Rubén M. Molina, a CYTED la subvención del proyecto CYTED P307AC0512 y la cofinanciación de los proyectos CTQ2009-14629-C02-01.

REFERENCIAS

- Abbott W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18: 265-267.
- Alvarez V., Loaiza, J., Bonilla, R., Barrios, M. 2008. Control in vitro de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari : Ixodidae) mediante extractos vegetales. *Rev Biol Trop* 56: 291-302.
- Barnard, DR., Jones, BG., Rogers, GD. 1981. Acaricide susceptibility in the lone star tick (Acari, Ixodidae). Assay techniques and baseline data. *J Econ Entomol* 74: 466-469
- Beadles, ML., Drummond, RO., Whetston, Tm 1973. Tropical Horse Tick: Effects of Solvents on Oviposition. *J Econ Entomol* 66: 125-127.
- Benavides, E., Romero, A. 2000. Preliminary results of a larval resistance test to ivermectins using *Boophilus microplus* reference strains. New York.
- Castro-Janer, E., Martins, J. R., Mendes, MC., Namindome, A., Klafke, GM., Schumaker TTS. 2010. Diagnoses of fipronil resistance 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. 2010. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. *Vet Parasitol* 169: 172-177.
- Castro-Janer, E., Rifran, L., Piaggio, J., Gil, A., Miller, R. J., Schumaker, T. T. S. 2009. In vitro tests to establish LC(50) and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Vet Parasitol* 162: 120-128.
- De Freitas, F., De Paula, E., Da Costa, A., Da Silva, I. 2005. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Pesq Agropec Bras* 40: 1243-1245.
- Diaz-Alonso, M., Rodriguez-Vivas, R., Frago-Sanchez, H. 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch Med Vet* 38: 105-113.
- Drummond, R., Graham, O., Ernest, SE. Evaluation of insecticides for the control of *B. annulatus* (Say) and *B. microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae) on cattle., en II International Congress on Acarology, pp 493-498 (1967 (citado en Diaz-Aloonso et al. 2006)).
- Drummond, RO., Ernst, SE., Trevino, J L., Gladney, W. J., Graham, OH. 1973. *Boophilus anulatus* and *B. microplus*: Laboratory Tests of Insecticides. *J Econ Entomol* 66: 130-133.
- FAO 1995. Acaricide resistance test kit. Instructions for use. World Acaricide Resistance Reference Centre, Berlin.
- FAO 2004. Module 1: Ticks: acaricide resistance: diagnosis, management and prevention, en: Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants, ed por Division F. A. P. a. H., FAO Animal Production and Health Division, Roma.
- Ferraz, ADF., Balbino, JM., Zini, CA., Ribeiro, VL. S., Bordignon, SAL., von Poser, G. 2010. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three Piper species. *Parasitol Res* 107: 243-248.

Fiedler OGH. 1968. A new biological method for evaluating the efficacy of acaricides against ticks. J South African Vet Med Assoc 39: 84-87.

Flor-Weiler, LB., Behle, RW., Stafford, KC. 2011. Susceptibility of Four Tick Species, *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, *Ixodes scapularis*, and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), to Nootkatone From Essential Oil of Grapefruit. J Med Entomol 48: 322-326.

Hunter, W W., Plummer, PR., Kemper, CJ., Miller, RJ., Davey, RB., Kemp, DH., Hughes, S., Smith, C. K., Gutierrez, JA. 2004. An in vitro larval immersion microassay for identifying and characterizing candidate acaricides. J Med Entomol 41: 1034-1042.

Klafke, GM., Albuquerque, TA., Miller, RJ., Schumaker, TTS. 2010. Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari:Ixodidae) in Brazil. Vet Parasitol 168: 97-104.

Kumar, S., Paul, S., Sharma, AK., Kumar, R., Tewari, SS., Chaudhuri, P., Ray, DD., Rawat, AKS., Ghosh, S. 2011. Diazinon resistant status in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from different agro-climatic regions of India. Vet Parasitol 181: 274-281.

Lovis L., Perret, J. L., Bouvier, J., Fellay, J. M., Kaminsky, R., Betschart, B., Sager, H. 2011. A new in vitro test to evaluate the resistance level against acaricides of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet Parasitol 182: 269-280.

Maupin, G. O., Piesman, J. 1994. Acaricide susceptibility of immature *Ixodes scapularis* (Acari, Ixodidae) as determined by the disposable pipette method. J Med Entomol 31: 319-321.

Mekonnen, S., Bryson, NR., Fourie, NR. Peter, RJ, Spickett, AM, Taylor, RJ, Strydom, T, Kemp, DH, Horak, IG. 2003. Comparison of 3 tests to detect acaricide resistance in *Boophilus decoloratus* on dairy farms in the Eastern Cape Province, South Africa. J South African Vet Med Assoc 74: 41-44.

Miller, RJ., Davey, RB., George, JE. 2002. Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz-susceptibility against ixodidae. J Med Entomol 39: 645-651.

Miller, R. J., Davey, R. B., Hunter, White, W., George, J. E. 2007. A comparison of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae). J Med Entomol 44: 283-294.

Nari, A. 1990. Methods currently used for the control of one host ticks: their validity and proposals for future control strategies. Parasitologia 32: 133-143.

Nolan, J. 1994. Acaricide resistance in the cattle tick, *Boophilus microplus*. FAO, Porto Alegre.

Ravindran, R., Juliet, S., Kumar, KG. A., Sunil, AR., Nair, SN., Amithamol K. K., Rawat A. K. S., Ghosh S. 2011. Toxic effects of various solvents against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. Ticks and Tick-borne Diseases 2: 160-162.

Roberts, RH., Zimmerman, JH., Mount, GA. 1980. Evaluation of potential acaricides as residues for the area control of the lone star tick (Acari, Ixodidae). J Econ Entomol 73: 506-509.

sabatini, GA., Kemp, DH., Hughes, S. 2001 Test to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. Vet Parasitol 95: 53-62.

Sarda Ribeiro, VL., Goncalves, K., Toigo, E., von Poser, G. 2008. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae)

on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. Vet Parasitol 151: 351-354.

Sarda Ribeiro, VL., Toigo, E., Bordignon, SAL., Goncalves, K., von Poser, G. 2007. Properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet Parasitol 147: 199-203.

Schnitzerling, H.J., Nolan, J., Hughes, S. 1983. Toxicology and metabolism of some synthetic pyrethroids in larvae of susceptible and resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can). Pest Sci 14: 64-72.

Shaw, RD. 1966. Culture of an Organophosphorus-Resistant Strain of *Boophilus microplus* (Can) and an Assessment of Its Resistance Spectrum. Bul Entomol Res 56: 389-405.

Stone, BF., Haydock, KP. 1962. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). Bul Entomol Res 53: 563-578.

Toledo, A., Olmeda, AIH., Anda P. 2009. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. Am J Tropical Med and Hyg 81: 67-74.

White, WH., Plummer, PR., Kemper, CJ., Miller, RJ., Davey, RB., Kemp, DH., Hughes, S., Smith, CK., Gutierrez, JA. 2004. In vitro larval immersion microassay for identifying and characterizing candidate acaricides. J Med Entomol 41: 1034-1042.