



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes – Argentina

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN
MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA**

**EFICACIA GARRAPATICIDA *IN-VITRO* E *IN-VIVO* DE
MOLECULAS SINTETICAS MODIFICADAS (L8 Y S5) EN
FORMULACIONES PARENTERALES**

OPCIÓN: CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES.

TUTOR EXTERNO: MV. DEL RÍO ALVAREZ, Florencia

TUTOR INTERNO: Dra. LOZINA, Laura Analía

RESIDENTE: Mamani, Carolina Micaela

e-mail: karitomicaelamamani@gmail.com

-AÑO 2021-

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Clasificación Taxonómica	4
Distribución Geográfica	4
Ciclo de vida de <i>R.microplus</i>	5
Importancia Sanitaria	7
Estrategias de Control	8
Resistencia al Control Químico (acaricidas)	9
Objetivos	13
Materiales y métodos	14
Resultados y discusión	20
Conclusión	31
Anexo	32
Bibliografía	34

RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fármacos Garrapaticidas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE. El objetivo fue evaluar la eficacia de formulaciones garrapaticidas en terneros conteniendo moléculas modificadas sintéticamente L8+S5 en bioensayos *in vivo* e *in vitro*. Las tareas realizadas fueron: recepción e ingreso de los animales para su adaptación, pesaje, toma de muestras de sangre para evaluación del estado hemodinámico, administración del fármaco antiparasitario y parasitaciones artificiales con larvas de *Rhipicephalus microplus*. Los individuos fueron divididos en tres grupos de dos animales cada uno, el Grupo 1 y 2 recibió como tratamiento la formulación conteniendo: S5+L8, el Grupo 3 auspicio como control. Las formulaciones se administraron por vía subcutánea a una dosis de 1ml/50KgPV (0,7 mg/kg) en el grupo 1, el grupo 2, recibió una dosis de 1,5ml/50KgPV (1,05 mg/kg) de la S5, estando a una concentración del 3,5% en la formulación. Para el caso de la L8 se administró 1 ml/50 Kg de una formulación al 2,5% (0,5 mg/kg) esto para los grupos 1 y 2. Desde el día 0 al día +24, se realizaron recolecciones diarias de garrapatas desprendidas de cada animal, se contaron y seleccionaron una alícuota de 20 teleoginas que fue pesada e incubada a $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ y 70% de humedad, posteriormente fue determinado el peso de huevos y observada la eclosión de las larvas. La prueba *in vitro*, consistió en la técnica de inmersión de adultas Drummond modificada. El ensayo *in vivo* demostró que el producto administrado resultó ser seguro e inocuo a las dosis utilizadas, sin presentación de reacciones adversas y el porcentaje de eficacia en el grupo 1 fue de 45,33%, en el grupo 2 de 65,96%. Respecto al ensayo *in vitro*, utilizando las concentraciones máximas alcanzadas en el presente trabajo de 300 ppm de S5 y 3000 ppm en L8, no se logró obtener eficacia de las moléculas *in vitro*, tal vez sería necesario realizar la mezcla de las dos moléculas *in vitro* para poder lograr un sinergismo entre ambas moléculas.

INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) denominada «garrapata común del ganado», es el ectoparásito más importante en áreas de explotación pecuaria de regiones tropicales y subtropicales ⁽¹⁴⁾. Ocasiona grandes pérdidas económicas a la ganadería por las enfermedades que transmite y por los daños directos al bovino que parasita.

En Argentina la garrapata se distribuye en un área al norte de los paralelos 30-31 Sur y desde el este al oeste hasta los 66°L. En el área hay aproximadamente una población de 12 millones de cabezas, que están concentradas (65-70 por ciento), entre Corrientes, Misiones, Este de Chaco, Este de Formosa, Norte de Santa Fe. A veces, por infestaciones accidentales se encuentra presencia de garrapatas al sur de esos paralelos, hasta el sur de las provincias de Entre Ríos, de Santa Fe y en provincia de Buenos Aires ⁽⁴⁾.

En las zonas más propicias para el desarrollo de la garrapata, con déficit hídrico escaso y la mayoría de los meses del año con temperaturas superiores a 15 °C, como ocurre en el noreste argentino, ⁽⁸⁾ es imposible el desarrollo de una ganadería rentable sin el control de esta parasitosis, el cual se basa, preponderantemente, en el uso de acaricidas. El método de control más utilizado en la Argentina es el empleo de garrapaticidas químicos, lo que ha derivado en muchos casos en la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes al grupo químico utilizado. La resistencia de *R. (B.) microplus* a los acaricidas empleados para su control es uno de los mayores desafíos a enfrentar en los próximos años. En este sentido, en Sudamérica ya se han detectado casos de resistencia a todos los compuestos químicos garrapaticidas disponibles comercialmente ⁽¹¹⁾.

En Argentina, el control de *R. (B.) microplus* está reglamentado por el SENASA y este es el organismo rector que a través de la Ley N°12566 de “Lucha Contra la Garrapata” indica los procedimientos que productores y veterinarios deben seguir en las distintas áreas del país. En la actualidad la resolución 382-E/2017 del SENASA establece la normativa del “Plan Nacional de Control y/o Erradicación de la Garrapata del bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en la República Argentina”, reemplazando al “Plan Nacional de Lucha contra la Garrapata en la República Argentina” correspondiente a la resolución del 22 de enero de 1999 de la ex Secretaría

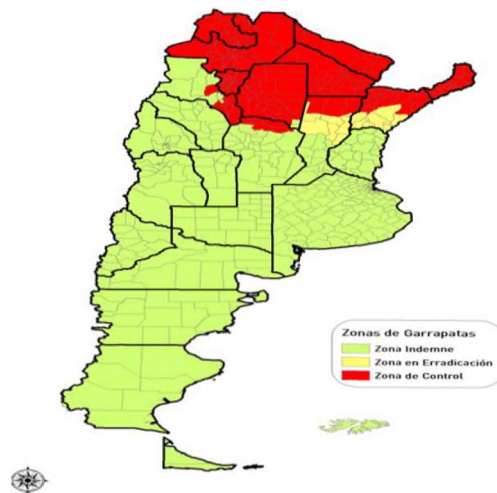
de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, y que estuvo en vigencia hasta el año 2016. El artículo 10 de la resolución 382-E/2017 del SENASA establece el marco legal para la zonificación del territorio nacional en:

a) ZONA DE CONTROL (con garrapatas): es el territorio del país ecológicamente apto para la evolución del ciclo biológico del *Rhipicephalus (B.) microplus*, donde sin existir la obligatoriedad de la erradicación, se adopten medidas sanitarias y tratamientos estratégicos en las épocas del año más propicias para el desarrollo del parásito, tendientes a garantizar un nivel mínimo aceptable de saneamiento.

b) ZONA DE ERRADICACIÓN (bajo plan): es el territorio del país ecológicamente apto para la evolución del ciclo biológico del *Rhipicephalus (B.) microplus*; donde los establecimientos adopten obligatoriamente una estrategia de limpieza y eliminación progresiva del parásito, basados en la aplicación de tratamientos garrapaticidas, hasta alcanzar su erradicación total del ambiente. Bajo controles sanitarios y fiscalizados por el SENASA. La determinación de una zona o región para la ejecución de un plan de erradicación depende de la aprobación de un plan provincial o regional y su convalidación por parte de este Servicio Nacional.

c) ZONA INDEMNE (libre de garrapatas): es el territorio del país ecológicamente libre de la presencia del parásito o aquel apto para la evolución del ciclo biológico del *Rhipicephalus (B.) microplus*, donde se haya ejecutado y comprobado su erradicación en todos los establecimientos y/o exista un porcentaje menor al UNO POR CIENTO (1 %) de establecimientos infestados, en proceso de limpieza y fiscalizados por el SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

(19)



Fuente: SENASA

Clasificación Taxonómica

Las garrapatas se encuentran divididas en dos familias: la Ixodidae, también conocidas como garrapatas duras por poseer una lámina dorsal dura; la familia Argasidae, conocidas como garrapatas blandas por carecer de la lámina dorsal. De las garrapatas implicadas en la transmisión de hemoparásitos bovinos agentes causales de la babesiosis y la anaplasmosis a la familia Ixodidae, existen aproximadamente 650 especies divididas en 13 géneros. Estas garrapatas también son importantes como vectores de otras enfermedades causadas por virus, bacterias y protozoarios que atacan a animales y humanos, como la enfermedad de Lyme, la fiebre de las montañas rocosas, la ehrlichiosis y la brucelosis, entre otras ⁽²⁰⁾.

Categoría	Taxón		
Phylum	Artrópoda		
Clase	Arachnida		
Orden	Acarina		
Suborden	Ixodoidea		
Familia	Ixodidae	Argasidae	Nuttalliellidae
Género	<i>Ixodes</i>		
	<i>Amblyomma</i>		
	<i>Anomalohimalaya</i>		
	<i>Bothriocroton</i>		
	<i>Cosmiomma</i>	<i>Argas</i>	
	<i>Dermacentor</i>	<i>Carios</i>	
	<i>Haemaphysalis</i>	<i>Ornithodoros</i>	<i>Nuttalliella</i>
	<i>Hyalomma</i>	<i>Otobius</i>	
	<i>Margaropus</i>		
	<i>Nosomma</i>		
	<i>Rhipicephalus</i>		
	<i>Rhipicephalus</i>		

Fuente: Horak et al. 2002; Estrada-Peña et al. 2010; Hoogstraal 1985; Vial 2009; Sonenshine y Roe 1993; Oliver 1989

Distribución Geográfica

En Argentina, la garrapata común del bovino se distribuye principalmente en zonas tropicales y subtropicales del noreste (NEA) y noroeste (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. De acuerdo a la zona geográfica, el número de generaciones anuales de *R. (B.) microplus* en Argentina puede variar de cinco en zonas tropicales a tres en áreas más meridionales como el norte de Santa Fe. Pero independientemente del número de generaciones anuales, el pico de abundancia poblacional usualmente se corresponde con la generación que se desarrolla en el otoño⁽⁹⁾. La dinámica estacional del nivel de infestación en bovinos está caracterizada por un incremento en la abundancia de garrapatas desde mediados de la primavera al otoño, donde alcanza el pico máximo, para luego decrecer hacia el invierno e inicio de la primavera⁽¹⁰⁾.

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. (B). microplus* se puede clasificar en función de estas dos variables:

- 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 ⁽¹³⁾.

Ciclo de Vida de *Rhipicephalus microplus*.

Las garrapatas duras, son arácnidos que presentan un ciclo de vida hemimetábolo, de metamorfosis incompleta, puesto que sus estados iniciales de desarrollo, presentan las mismas características morfológicas, de comportamiento y de alimentación que los estados intermedios y de adulto⁽⁶⁾. Esta garrapata tiene un ciclo biológico de un hospedador, donde los tres estadios parasitarios, larvas, ninfas y adultos (machos y hembras), se alimentan, mudan y copulan sobre el mismo individuo.

El ciclo de *R. (B) 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. 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. Como período de pre-oviposición se define al 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. Asimismo, el período que abarca desde que las teleoginas comienzan la oviposición hasta que ponen su último huevo se conoce como período de oviposición. Las teleoginas habitualmente ponen en el suelo entre 2.000 y 3.000 huevos, en sitios protegidos de las radiaciones solares directas. El período que transcurre desde la oviposición hasta el nacimiento de las larvas se denomina período de incubación, cuya duración puede variar entre 20 y 45 días, dependiendo mayormente de la temperatura ambiente. Cuando las larvas que se

encuentran en la vegetación acceden a un bovino, comienza la fase parasitaria del ciclo biológico, que a diferencia de la fase no parasitaria, es escasamente influida por las condiciones ambientales. Esta se desarrolla íntegramente sobre el hospedador, y tiene una duración normal de 23 días (día modal). Las larvas son pequeñas, de color marrón, provistas de 3 pares de patas con un pequeño escudo en la parte dorsal del cuerpo. Una vez sobre el bovino, las larvas comienzan a alimentarse para mudar al estado siguiente de ninfa. Estas tienen 4 pares de patas, son marrones claras, y hacia el día 12 aproximadamente, se ingurgitan con sangre completamente (metaninfa). Las ninfas mudan sobre el hospedador a adultos (machos y hembras), estos copulan, las hembras se ingurgitan con sangre (teleoginas) y finalmente caen al suelo para desovar. La duración relativamente constante de la fase parasitaria de *R. (B). 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 cuál es influenciada por factores abióticos como la temperatura y la humedad del ambiente ⁽¹³⁾. El ciclo biológico se asegura con inviernos benignos y temperaturas medias superior a los 15°C, en tanto que su abundancia o cantidad de garrapatas está asociada a climas húmedos y alta carga de bovinos. Así, el ciclo se acelera en primavera verano, alcanzando el pico en otoño y se desacelera o se detiene en invierno ⁽⁴⁾.

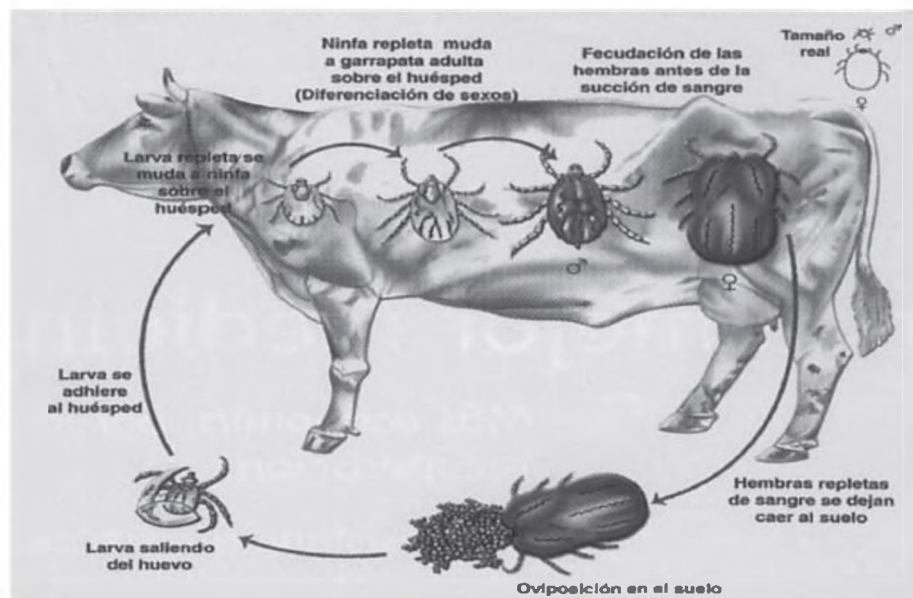


Imagen: Se muestra específicamente el ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, incluyendo los estadios dentro del hospedero y fuera del mismo.

Fuente: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/download/196/392?inline=1>

Importancia Sanitaria

Cada garrapata que completa su ciclo parásito en los bovinos ingiere entre 1-3 ml de sangre e inyecta unos 0,5 ml de saliva. Esta secreción es la herramienta más importante del parásito para evadir la respuesta inmune del huésped, establecerse y hacer de vehículo de transmisión de babesias. La pérdida estimada en producción de carne por cada garrapata hembra que completó su ciclo se estimó en 0,3 gr para un bovino adulto y de 1 gr para un bovino en crecimiento. En una situación estable en ganado de carne, la infestación por garrapatas produce pérdidas de 9,7 U\$S Bovino/año, incluyendo los gastos de productos y operativos para el control. Además de ser vector de *B. bovis* y *bigémina* y *A. marginale* “Tristeza Bovina” disminuye la producción de leche y prolonga el tiempo requerido para alcanzar el peso al 1er servicio. Por otro lado, debilita el sistema inmunológico creando condiciones para otras enfermedades, en las heridas causadas por las picaduras en piel se pueden producir miasis y por último, la industria del cuero se ve afectada en forma importante ya que el cuero pierde calidad debido a las cicatrices ⁽⁴⁾.

Específicamente, *R. microplus* ocasiona daños que pueden ser directos e indirectos. Entre los directos están: 1. la pérdida de sangre asociada con altas cargas parasitarias, lo que causa estrés permanente y anemia; 2. la inflamación de la piel; 3. respuestas tóxicas y alérgicas causadas por antígenos y coagulantes en la saliva de los ectoparásitos; 4. estrés general y pérdida de bienestar; 5. pérdida de energía asociada con el constante movimiento que se produce como respuesta a la infestación ⁽⁷⁾.

Estrategias de Control

En la actualidad la principal herramienta para el control de la garrapata común del bovino se encuentran disponibles los acaricidas químicos. La técnica de aplicación basada en los baños de inmersión constituye, en ausencia de resistencia a los productos utilizados, un método eficaz y de bajo costo. El manejo incorrecto de los baños (instalaciones deficientes, errores en la preparación y en la reposición y refuerzo del producto, 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. Otros métodos utilizados son la aplicación de garrapaticidas por vía tópica (pour-on) o inyectables y eventualmente, por baños de aspersión.

También se cuenta como herramienta el uso de rotación y descanso de pasturas este método se sustenta en el conocimiento de la ecología de *R. (B.) microplus*, específicamente en la duración de la fase de vida libre de su ciclo biológico. Tiene como objetivo disminuir los niveles de infestación con garrapatas en las pasturas mediante el uso diferido de las mismas. Las larvas de *R. (B.) microplus* necesitan encontrar a un bovino hospedador en un período de tiempo dado, que varía de acuerdo a la época del año, de lo contrario morirán por inanición y/o deshidratación.

El uso del fuego 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.

La existencia de vacunas contra la garrapata común del bovino, una producida en Australia (TickGARD®) que no está disponible comercialmente desde el año 2010, y la otra en Cuba (Gavac™). Ninguna de ellas se comercializa en Argentina. Ambas vacunas se formularon con el antígeno Bm86 de células intestinales de *R. (B.) microplus*. A diferencia de la inmunidad natural, que para las garrapatas se da básicamente en forma de hipersensibilidad cuando las larvas se fijan al bovino, la inmunidad artificial provocada por estas vacunas actúa sobre la capacidad reproductiva de las garrapatas hembras.

Entre los métodos alternativos para el control de la garrapata del bovino uno de los más reconocidos es el empleo de determinados biotipos bovinos. Existen varios estudios argentinos acerca de la capacidad de los animales *Bos indicus* y en menor medida de algunas razas de *Bos taurus* como la Criolla, para controlar las infestaciones de *R. (B.) microplus*. Una mayor proporción de genes *Bos indicus* en los biotipos vacunos favorece un control biológico de *R. (B.) microplus* que puede ser utilizado para disminuir el número de tratamientos garrapaticidas.

Como se mencionó una de las herramientas usadas para el control de *Rhipicephalus microplus* son el uso de los acaricidas químicos, los cuales se pueden clasificar por grupo químico en fosforados; piretroides; formamidina (amitraz); avermectinas; fipronil; análogos hormonales (fluazurón). Un mal manejo de estos productos químicos, ya sea por una sub o sobredosificación, la rigurosidad en el mecanismo de aplicación de los productos, la frecuencia de aplicación, la selección y rotación de moléculas

acaricidas y la falta de una base epidemiológica para el control de los ectoparásitos, estas han sido las causas principales para la aparición de resistencia a la mayoría de moléculas utilizadas para el control de garrapatas en el ganado ⁽¹²⁾.

Resistencia al Control Químico (acaricidas)

El mayor inconveniente asociado al uso de garrapaticidas es el inevitable desarrollo de poblaciones de garrapatas resistentes al principio tóxico, así ocurrió en Argentina con los Arsenicales en 1940, con los clorados en el 1951, con los fosforados en el 1968, con los piretroides en la década del 90 y en el 2010-11 se diagnosticaron al menos dos poblaciones resistentes a formamidinas (amitraz) ⁽⁴⁾.

Resistencia se define como la habilidad de una población de parásitos para tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de individuos en una población normal (susceptible) de la misma especie, siendo un mecanismo defensivo del parásito a nivel molecular. Es una modificación genética que confiere a las poblaciones de artrópodos la capacidad de adaptarse a ambientes tóxicos, siendo una condición preadaptativa promovida naturalmente por la selección de genes asociados a hidrólisis de componentes alelopáticos o artificialmente por la aplicación de productos químicos ⁽⁵⁾.

Esta situación se origina en el uso frecuente de acaricidas con un mismo mecanismo de acción, lo cual lleva a que los individuos que no presentan el alelo resistente hacia ese fármaco sean eliminados mientras los que sí lo presentan sobreviven, permitiéndoles transmitir este genotipo a su descendencia, con lo cual, a través de generaciones posteriores, aumentan su frecuencia en la población.

En la práctica, se sospecha la presencia de resistencia, cuando un producto que antes era útil para el control, ya no demuestra el mismo efecto, siempre y cuando se asegure que se trabaja con óptimas condiciones de aplicación ⁽⁵⁾.

El desarrollo de resistencia en artrópodos depende, entre muchos otros factores, del ciclo de vida de estos organismos, del número de descendientes por generación, de las poblaciones refugio existentes en campo (individuos que no han sido puestos en contacto con plaguicidas), así como del volumen, frecuencia y condiciones de aplicación de los compuestos. La garrapata de un hospedador *R. microplus* tiene un ciclo corto de vida y produce muchos descendientes, pudiendo manifestar rápidamente

resistencia, lo cual es particularmente común en este artrópodo. Esta situación, unida al uso intensivo de acaricidas y a las condiciones inadecuadas de preparación y aplicación, da lugar a que sus poblaciones desarrollen mecanismos que permiten la supervivencia de algunos individuos expuestos al tratamiento, mientras los susceptibles son eliminados ⁽⁵⁾.

Medidas a tener en cuenta para retardar la resistencia del *R. microplus*:

- ❖ Consultar, asesorarse por un profesional veterinario o por el SENASA.
- ❖ No tratar a los bovinos si la carga de garrapatas no supera el umbral de daño económico (30 garrapatas por animal). Si se decide un tratamiento, tratar a todos.
- ❖ Usar productos aprobados por el SENASA y leer estrictamente las instrucciones de uso de los garrapaticidas.
- ❖ Realizar análisis periódicos de la concentración y del pH del baño.
- ❖ Enviar muestras de garrapatas para análisis de resistencia a los distintos grupos de garrapaticidas.
- ❖ Rotar el uso de garrapaticidas por diferente grupo químico o mecanismo de acción.
- ❖ Aplicar tratamientos estratégicos en base a los conocimientos sobre la bioecología del *R. (B). microplus*, para reducir al mínimo el número anual de tratamientos y retardar el desarrollo de la resistencia ⁽⁴⁾.

Este estudio pretende presentar la eficacia de nuevas moléculas sintéticas modificadas L8 y S5 en su combinación administradas vía subcutánea a terneros y determinar la concentración de acción de cada nueva molécula llevándose a cabo mediante una prueba *in vitro* de inmersión de hembras adultas de *R. microplus*.

La molécula sintética modificada L8 es un compuesto que interfiere con la síntesis de quitina en etapas inmaduras de garrapatas (larvas y ninfas). Se usa comúnmente en el control de plagas de cultivos. Comparte funciones similares a los insecticidas sistémicos del grupo de las Benzoilfenilureas (BPU), análogos de hormonas juveniles que bloquean los receptores de las hormonas en las larvas evitando su muda y drogas que afectan la síntesis del exoesqueleto inhibiendo la síntesis y depósito de la quitina en la cutícula de insectos y otros artrópodos, han sido muy utilizadas para el control de ectoparásitos en medicina veterinaria, como por ejemplo el Lufenurón que se

utiliza para el control y tratamiento en infestaciones por pulgas y el Fluzurón que es específico de garrapatas y otros ácaros. El modo exacto de acción de las BPU no está comprendido aún, pero se ha visto que interfieren en el ensamblaje de las cadenas de quitina ⁽¹⁸⁾. La quitina es un polisacárido muy difundido como material estructural entre los invertebrados, en especial formando parte de los exoesqueletos. Químicamente es un polímero de N-acetil glucosamina; estas monosacáridos se polimerizan y luego se ensamblan junto a proteínas en cadenas y éstas en microfibras. Se ha visto que, si se altera la síntesis y el depósito de quitina en los exoesqueletos, se genera una fragilidad estructural en el insecto, que lo lleva a la pérdida de fluidos y a su muerte ⁽¹⁸⁾. Se sabe que los insecticidas reguladores del crecimiento (IGR's) causan desequilibrios hormonales y bioquímicos durante el desarrollo del insecto objetivo, lo que da como resultado diversas anomalías morfológicas y un desarrollo reducido de etapas inmaduras, lo que conduce a una reducción en la emergencia de adultos ⁽²⁾.

La fórmula sintética modificada S5 presenta su acción como modulador de los receptores de acetilcolina, bloqueando los receptores nicotínicos generando la despolarización neuronal y posterior excitación. Por su modificación presenta similitud en su modo de acción con el bioinsecticida Spinosad que es creado durante la fermentación de *Saccharopolyspora spinosa*; es una neurotoxina compuesta por una mezcla de las spinosinas A y D, que son compuestos tetracíclicos de macrólidos que actúan sobre un grupo de receptores nicotínicos pos-sinápticos de la acetilcolina y los receptores GABA de una manera única ⁽¹⁷⁾. Tiene actividad larvica y adultica de contacto, oral y sistémico. La exposición provoca la interrupción de la alimentación seguida más tarde de temblores, parálisis y muerte. Esta sustancia activa antiparasitaria se usa en la medicina veterinaria en perros y gatos contra algunos parásitos externos. Los productos a base de Spinosad se han registrado para el control de plagas lepidópteros, dípteros, coleópteros, hormigas y trips, siendo relativamente inactivo sobre insectos chupadores y es clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como un producto de riesgo toxicológicamente reducido ⁽²¹⁾.

Objetivos Generales

- ❖ Evaluar la eficacia de formulaciones conteniendo moléculas modificadas sintéticamente L8+ S5 en bioensayos *in vitro e in vivo*.

Objetivos Particulares

- ❖ Determinar las concentraciones *in vitro* en la cual ejercen su acción las moléculas sintéticas modificadas.
- ❖ Evaluar la eficacia mediante bioensayos *in vivo* administrando la droga por vía subcutánea para el control del *Rhipicephalus microplus*.
- ❖ Evaluar el efecto de las fórmulas sobre los diferentes estadios de desarrollo de la garrapata común del bovino (huevos, larvas, adultos).
- ❖ Evaluar efectos adversos en los animales luego de la administración de las formulaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el transcurso de la residencia externa en el laboratorio de Fármacos Garrapaticidas de la Facultad de Ciencias Veterinaria UNNE, ubicado en calle Sargento Cabral N° 2139, en la ciudad capital de la provincia de Corrientes.

La presente investigación tuvo una duración de dos meses, comenzando el mismo el 18 de junio de 2021 y culminando el 27 agosto del mismo año.

Animales en estudio:

Se utilizaron un n=6 bovinos (*Bos taurus*), mestizos de raza Braford y Brangus con un peso promedio de $209,75 \pm 11,6$ kg al inicio del experimento y de 12 meses de edad.

Inicialmente se procedió a realizar las tareas de amanse y adaptación de los mismos a las instalaciones, alimentación y bozal durante 15 días.

Se realizaron 2 (dos) tomas de muestras sanguíneas de oreja a cada animal, al inicio y al finalizar la prueba, para evaluar porcentaje de hematocrito.

Formación de grupos experimentales:

El día 0 se procedió al pesaje individual de los animales y la conformación al azar de los lotes, tratados y control. Los animales fueron ubicados en jaulas individuales, luego de la administración de las formulaciones a evaluar.

El grupo 1 y 2 fue tratado con el producto garrapaticida conteniendo S5 en una concentración del 3,5 % y 2,5 % de L8, y el grupo 3 fue utilizado como grupo control. Las formulaciones se administraron por vía subcutánea a una dosis de 1ml/50KgPV (equivalente a 0,7 mg/kg) en el grupo 1, el grupo 2, recibió una dosis de 1,5ml/50KgPV (equivalente a 1,05 mg/kg) de la S5, estando a una concentración del 3,5% en la formulación. Para el caso de la L8 se administró 1 ml/50 Kg de una formulación al 2,5% (dando una dosis de 0,5 mg/kg) esto para los grupos 1 y 2. Previamente se realizaron 11 (once) parasitaciones artificiales, con cepas de referencia sensible mantenidas en condiciones de laboratorio, en el laboratorio de Fármacos Garrapaticidas anexo a la Catedra de Farmacología y Toxicología de la FCV-UNNE. Las parasitaciones se llevaron a cabo mediante la siembra individual de 20.000 larvas semanales durante 24 días intercalados. Las mismas se realizaron con pincel de cerda,

por derrame dorsal (desde la cruz a la cola), dando también unas pinceladas en cara y orejas.

Eficacia de Tratamientos:

Evaluación de carga de garrapatas:

Para evaluar la carga de *R. microplus*, a partir del día 0, cada 24hs, y hasta el día +24, se colectó y registró la cantidad individual de teleoginas desprendidas de los animales de cada grupo. Se seleccionó una alícuota de 20 teleoginas de cada animal, se pesaron y colocaron en placas de Petri de polipropileno que fueron preparadas para tal fin. Estas placas fueron identificadas con el número de caravana de cada animal, el día de recolección y el peso de la alícuota incubada, posteriormente se incubaron a $28 \pm 1^\circ \text{C}$ y 70% de humedad. Luego de 18 días de incubación se trasladan los huevos a una cámara de eclosión para determinar el porcentaje de eclosión de larvas.

Seguimiento de los animales y evaluación de la eficacia:

La determinación de la eficacia se realizó según la Res. SENASA 1079/97 para la aprobación de fármacos garrapaticidas.

Se determinaron los siguientes parámetros:

- **Coefficiente de Reducción del N° de teleoginas (CRT)**

$$\text{CRT (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{N° de Teleoginas del Grupo Tratado}}{\text{N° de Teleoginas del Grupo Control}} \right) =$$

- **Coefficiente de Reducción de la oviposición (CRO)**

$$\text{CRO (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Peso Promedio del aove por teleogina del Grupo Tratado}}{\text{Peso Promedio del aove por teleogina en el Grupo Control}} \right) =$$

- **Coefficiente de Reducción de la fertilidad (CRF)**

$$\text{CRF(\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{Peso promedio de Larvas eclosionadas por gr de huevos incubados en el Grupo Tratado}}{\text{Peso Promedio de Larvas eclosionadas por gramo de huevos incubados en el Grupo Control}} \right) =$$

Cabe aclarar que para el registro de todos estos datos se confeccionaron planillas tanto de campo como de laboratorio que una vez completadas fueron llevadas al formato digital para su posterior procesamiento y análisis.

Para determinar el porcentaje de eficacia se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje Eficacia (\%)} = 100 \times [1 - (\text{CRT} \times \text{CRO} \times \text{CRF})]$$

Evolución de peso

Los animales se pesaron individualmente al inicio y al finalizar la experiencia.

Bioensayo *in vitro*

En la prueba *in vitro* de las moléculas sintéticas L8 y S5 se realizó mediante la técnica de Drummond, adaptada para Inmersión de adultas, para cada molécula L8 y S5 trabajando con distintas diluciones para obtener el efecto de las concentraciones del ingrediente activo y poder medir los siguientes parámetros:

- **Porcentaje de Mortalidad y Oviposición:** Las teleoginas fueron observadas diariamente a través de un estereoscopio, viendo la presencia de signos vitales como: movimientos de patas y de asas intestinales, a fin de determinar su vitalidad y oviposición postratamiento hasta el día 24 de su colecta. Además, se pesó el total de huevos de cada grupo experimental.
- **Porcentaje de Eclosión:** Los huevos fueron colectados y acondicionados en tubos y mantenidos en incubación (T° 27 °C y 85% HR) por 25 días. Se estimó la eclosión larval mediante observación directa de los huevos no eclosionados y de las larvas presentes.
- **Determinación de la Eficiencia Reproductiva (ER) y Eficacia de los Tratamientos (E):** La eficiencia reproductiva (ER) expresa la habilidad de una teleogina para transformar parte de su peso inicial en larvas viables. Se calcula dividiendo el peso de la masa total de huevos entre el peso inicial de la teleogina y el valor obtenido se multiplica por el porcentaje de eclosión. La eficacia de los tratamientos (E) expresa la diferencia porcentual entre las eficiencias reproductivas del grupo tratado y control

$$(ER) = \frac{\text{peso de huevo} * \% \text{ eclosión}}{\text{peso de hembras}}$$

$$(\%C) = \frac{RE_{\text{control}} - RE_{\text{tratados}} * 100}{RE_{\text{control}}}$$

Materiales para Prueba *in vitro*:

- ✓ Material Biológico: se utilizó garrapatas *Rhipicephalus microplus* (teleoginas) recolectadas de los animales parasitados artificialmente. Se lavaron con agua, se secaron con papel absorbente y seleccionaron 310 hembras repletas para luego pesarlas y formar grupos homogéneos de 10 teleoginas donde se las colocaron en placas de petri con sus correspondientes pesos.
- ✓ Formulas L8 y S5
- ✓ Acetona
- ✓ Tritón X100
- ✓ Agua destilada
- ✓ Materiales de mesada: probeta de vidrio, vaso de precipitado, erlemeyer, matras aforados, pipeta graduada, micropipeta, tips, tubos de ensayo, guantes.
- ✓ Balanza analítica (gr)
- ✓ Estereoscopio
- ✓ Placas de petri con papel donde en la parte central se coloca un adhesivo para pegar las garrapatas correspondientes a cada grupo.

Para el bioensayo se preparó primeramente los ingredientes activos a trabajar. Con la formula L8 se pesó 0,1gr del principio activo y se diluyo en 10ml de acetona con la adición de 200 µl de tritón el cual favorece la solubilidad del principio activo y la penetración del ingrediente atravesando la cutícula de la garrapata. Para la molécula S5 se pesó 0,25gr del principio activo y se diluyo en 10ml de acetona. Esto se realizó las veces necesarias en cada repetición de las pruebas llevadas a cabo.

Luego de cada principio L8 y S5 preparados, se los diluyo en agua destilada para formar las siguientes diluciones con las que se trabajó. Se analizaron por triplicado las concentraciones de cada formula sintética modificada.

FORMULA L8	FORMULA S5
0,5 ppm	0,75 ppm
5 ppm	12,5 ppm
50 ppm	25 ppm
500 ppm	50 ppm
1000 ppm	100 ppm
2000 ppm	200 ppm
3000 ppm	300 ppm

Las concentraciones preparadas se probaron en garrapatas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*. Donde se utilizaron treinta y un (31) grupos de 10 teleoginas c/u con pesos similares para cada formula probada, sumergiendo cada grupo en las respectivas diluciones preparadas esperando un tiempo de 1 minuto para L8 y de 30 minutos para S5. Luego de retiradas de las diluciones se secaron las garrapatas para ser inmovilizadas en placas petri con tiras de cinta adhesivas adheridas por la parte caudal del cuerpo. Las placas con teleoginas fueron identificadas (fecha, tratamiento y peso de las teleoginas) y acondicionadas en incubadora en un ambiente climatizado a 27 °C y 85% de humedad relativa. También se trabajó con un grupo control para cada formula, el cual se conformó con 10 teleoginas con igual peso de las tratadas y se sumergió en 100ml de agua destila respetando el tiempo que se usó para cada formula.



Figura 1. Placa de petri con hembras adultas de *R. microplus* adheridas a la cinta adhesiva, luego de ser sumergidas a las formulaciones.

Al cabo de 14 días de incubación a 27°C y 85% de humedad relativa, se procedió a pesar la masa de huevos de cada grupo de garrapatas y los huevos puestos se introdujeron en tubos de ensayo tapados con algodón para su posterior cálculo del porcentaje de eclosión. Los tubos se introdujeron nuevamente en la incubadora y se mantuvieron por otros 25 días hasta la eclosión de las larvas.

Análisis Estadístico:

Los parámetros teleoginas totales recolectadas, alícuota incubada, peso de oviposición, entre otros se presentaron en tablas y figuras, y los resultados obtenidos en los grupos control y tratado fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y la comparación de las medias utilizando el test de Tuckey. Se utilizó el programa estadístico Infostat 2006.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. OBSERVACIONES GENERALES Y EXÁMEN CLÍNICO

Las observaciones generales del estado de salud y exámenes físicos realizados indicaron que los animales mostraron comportamiento, salud y aptitud coincidente con la especie, categoría y condiciones de manejo establecidas para este estudio. Luego del examen clínico se determinó que todos los animales se encontraban normales en lo que respecta al sistema nervioso, incluido comportamiento, sistema cardiovascular, linfático, respiratorio, gastrointestinal, reproductor, urinario, tegumentario y locomotor.

El análisis del hematocrito realizado el día 0 de la prueba reveló valores dentro de los parámetros normales para la especie y edad de los animales, en la mayoría de los mismos. Presentando un único ternero perteneciente al grupo tratado, un porcentaje de Hematocrito (%Hto) de 23,4%, inferior a los valores de referencia (38- 43% al destete), según lo descripto por Coppo (2008). Este animal, fue sometido al tratamiento clínico consistente en la administración de un reconstituyente hemático. En la **tabla I** se presenta la estadística descriptiva correspondiente a los valores obtenidos del %Hto de los animales al inicio y al finalizar el ensayo.

Tabla I. Estadística descriptiva del %Hto al Día 0 y Día 24 de la prueba.

Grupos	Días	n	Media±DE	C.V (%)	Min.	Max.
Control	D0	2	33.69,1±0,059	17.5	26%	43%
	D24	2	36.7±0.045	12.6	30%	42%
Tratados	D0	4	30.67±0.044	14.2	23.4%	36%
	D24	4	36.29±0.058	15.8	26.6%	42%

Los productos en estudio fueron adecuadamente administrados a los terneros incluidos en los grupos tratados según el protocolo establecido, sin presentar efectos adversos a la administración.

Al inicio del ensayo los animales presentaron un peso medio de 208,2 kg en el grupo control y de 210,6kg en los grupos tratados. Al finalizar la prueba los animales fueron pesados nuevamente obteniendo un peso promedio para el grupo control de 226,7 kg, y

en el grupo tratado de 221,6kg. Los resultados se encuentran detallados en las **tablas II** y **III**.

CARAVANA	PESO INICIAL (KG)	PESO FINAL (KG)
11	201,0	229,0
14	215,5	224,5
PROMEDIO PESOS	208,2±10,25	226,7±3,18
PROMEDIO KG GANADOS		18,50
GMD (KG)		0,38

Tabla II. Peso vivo de los animales pertenecientes al grupo control.

CARAVANA	PESO INICIAL (KG)	PESO FINAL (KG)
2	211.5	224.0
3	190.0	202.5
6	225.5	239.5
15	215.5	220.5
PROMEDIO PESOS	210,6±15,50	221,6±5,73
PROMEDIO KG GANADOS		11
GMD (KG)		0,23

Tabla III. Peso vivo de los animales pertenecientes al grupo tratado.

2.EFICACIA DE FORMULAS DEL BIOENSAYO *IN-VIVO*

La recolección diaria de teleoginas desde Día 0 al Día +24 y los datos correspondientes a los parámetros obtenidos de la etapa extraparasitaria del ciclo biológico de *R. microplus*, se muestran en el Anexo I en la **Tabla IV**.

Se recolectaron 12.344 y 6.058 teleoginas totales en los grupos tratados 1 y 2 respectivamente, mientras que en el grupo control el conteo fue de 20.241 teleoginas.

En la **Tabla V**, se observa un resumen del número de hembras ingurgitadas recolectadas y del comportamiento reproductivo de las mismas tomados de 0 a +7, 8 a +16 y 17 a +24 días, no encontrándose diferencias entre el grupo tratado y control.

Tabla V. Resumen dividido en tres periodos.

Días	Grupos	Teleoginas recolectadas	Alicuota incubada	Peso total alicuota (gr)	Teleoginas sobrevivientes	Peso total ovoposición (gr)	Huevos incubados (gr)	Peso total larvas (gr)
0 al +7	GC	5.836	320	150,54	319	60,26	16,00	7,36
	G1	3.714	320	144,8	319	66,03	16,00	6,67
	G2	1.657	320	123,15	318	63,45	16,00	6,64
8 al +16	GC	8.595	360	174,94	360	82,91	18,00	6,70
	G1	6.516	345	126,25	245	53,66	14,51	4,19
	G2	2.724	360	142,11	360	73,18	18,00	10,58
17 al +24	GC	5.810	280	137,09	280	57,11	14,00	3,52
	G1	2.114	177	62,91	149	30,77	8,64	1,86
	G2	1.677	280	109,33	280	56,74	14,00	3,47

GC: grupo control

G1: grupo tratado 1

G2: grupo tratado 2

En la **Tabla VI** se observan los resultados obtenidos de los coeficientes, Coeficiente de Reducción del N° de Teleoginas (CRT), Coeficiente de Reducción de la Oviposición (CRO) y el Coeficiente de Reducción de la Fertilidad (CRF), necesarios para la obtención del Porcentaje de Eficacia del producto en estudio, representado en la **tabla VII**.

Tabla VI. Resultados de los coeficientes.

Coeficientes	Días			
GRUPOS	0 +7	8 +16	17+24	0 +24
GRUPO 1				
CRT	0,63	0,75	0,36	0,60
CDO	1,09	0,95	1,01	1,01
CRF	0,90	0,77	0,85	0,88
GRUPO 2				
CRT	0,28	0,31	0,28	0,29
CDO	1,05	0,88	0,99	0,96

CRF	0,90	1,57	0,98	1,17
-----	------	------	------	------

Teniendo en cuenta el análisis de los coeficientes hallados anteriormente y utilizados en el cálculo del porcentaje de eficacia en las combinaciones utilizadas en el grupo 1 fue de 45,33% y en el grupo 2, de 65,96%.

Tabla VII. Porcentajes de Eficacia.

% Eficacia	Días			
GRUPOS	0 +7	8 +16	17 +24	0 +24
GRUPO 1	36,80	44,07	68,46	45,33
GRUPO 2	72,94	55,83	71,73	65,96

3.EFICACIA DE FORMULAS DEL BIOENSAYO *IN-VITRO*

La eficacia *in vitro* de las fórmulas sintéticas modificadas L8 y S5 empleadas a diferentes concentraciones, por inmersión de teleoginas de *R. microplus* se describen a continuación. Los resultados de la primer inmersión de teleoginas a la molécula sintética modificada L8 se muestra en la **Tabla VIII y Fig.2**, en todas las concentraciones probadas no se evidencio diferencias en los parámetros estudiados respecto al grupo control (100% Eclosión). En este caso se esperaba, inhibición de la eclosión de larvas al día +39, por tratarse del grupo de las benzoilfenilureas o insecticidas reguladores del crecimiento (IGR's) (Brar et al., 2015). Se repitió dos veces más la prueba, buscando las concentraciones que inhiban la eclosión de larvas en las garrapatas, no lográndose a concentraciones de 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm y 3000 ppm, como se muestran en las **Tablas IX y X y Fig. 3 y 4**.

En concordancia con nuestros resultados, los autores Shawky Aboelhadida et al., (2018) demostraron en su estudio la actividad de altas dosis de tres IGR's, el lufenurón, piriproxifeno y hidropreno. Donde se probaron diferentes concentraciones de los IGR's, en huevos, larvas y garrapatas adultas de *Rhipicephalus annulatus* mediante inmersión, paquete de larvas y bioensayos de inmersión para adultos, respectivamente. Los autores pudieron observar en cuanto a la actividad adulticida de los IGR's probados, que el lufenurón incluso en las dosis más altas (10X -500 ppm-, 50X-2500-, 100X-5000 ppm) no presenta efectos sobre garrapatas adultas y de manera similar, el piriproxifeno y el hidropreno no causaron la muerte de las hembras adultas en el estudio, pero sí causó una

reducción significativa en los índices reproductivos de garrapatas tratadas en concentraciones altas. En cuanto a la actividad ovicida el lufenurón como el piriproxifeno mostraron una considerable actividad ovicida retrasando la incubabilidad de los huevos tratados. También los IGR's probados mostraron que a bajas concentraciones no tienen actividad larvicida, pero sin embargo a altas concentraciones de lufenurón, hidropreno y piriproxifeno indujeron una actividad larvicida altamente significativa causando una mortalidad del 100% después de 72 h de exposición al tratamiento

En el presente trabajo respecto a la formula sintética modifica S5 se trabajó de igual manera, con una primera inmersión de las hembras adultas y realizando la lectura de los resultados como se muestra en la **Tabla XI y Fig.5**. Se esperaba una disminución en la oviposición y la actividad adulticida del producto, no observándose en las concentraciones a partir de 0,75, 12,5, 25, 50 y hasta 100 ppm.

Se realizó la repetición de las concentraciones más altas a las probadas llegando hasta el punto de saturación del principio activo y evidenciando una ausencia de actividad sobre el ciclo reproductivo de la garrapata en 100 ppm, 200 ppm y 300 ppm como se muestran en las **Tabas XII y XIII y Fig. 6 y 7**.

Como se mencionará previamente, S5, presenta similitud con el bioinsecticida Spinosad. Robert Miller et al, (2011) estudiaron a varias cepas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a los acaricidas, expuestas al Spinosad utilizando la prueba de paquetes larvarios y de inmersión en adultos. Los autores encontraron que las larvas de todas las cepas probadas eran susceptibles al Spinosad. Por el contrario, en la prueba de inmersión de adultos el Spinosad en altas concentraciones no presentó diferencia observable respecto al control. También realizaron ensayos *in vitro* contra larvas, ninfas y adultos de *Amblyomma americanum* y *Dermacentor variabilis* sensibles a acaricidas, mostraron diferencias en la actividad que dependían de las especies de garrapatas y la etapa de vida parasitaria. En estos ensayos observaron que el Spinosad es muy eficaz contra las etapas inmaduras de ambas garrapatas, la actividad fue mucho menor contra *D. variabilis* adulta. Los autores concluyeron que el Spinosad es eficaz contra las larvas de muchas cepas de *R. microplus* resistentes simples y multirresistentes recolectadas y que ciclo reproductivo de garrapatas hembras adultas de *R. microplus* no se ve afectado por el tratamiento.

En el presente trabajo se usó como máxima concentración 100 ppm de S5, realizando el triplicado de la misma y aumentando la dosis hasta 200 ppm y 300 ppm llegando al

punto de saturación de la solubilidad de la droga, pudiendo así comprobar que al igual que lo presentado por los autores, que la formula sintética S5 no presentó actividad frente a las teleoginas de *R. microplus*.

Tabla VIII. Parámetros reproductivos de *R. microplus* expuestas a diferentes concentraciones de la Formula L8.

FORMULA L8	VIVAS	MUERTAS	PESO DE HEMBRAS	PESO DE HUEVOS	% DE ECLOSIÓN	RE	% C
Control	10	—	3,60	1,62	100	45	
0,5ppm	10	—	3,60	1,72	100	48	-
5ppm	10	—	3,60	1,61	100	45	-
50ppm	10	—	3,59	1,61	100	45	-
500ppm	10	—	3,59	1,60	100	45	-
1000ppm	10	—	3,58	1,67	100	47	-

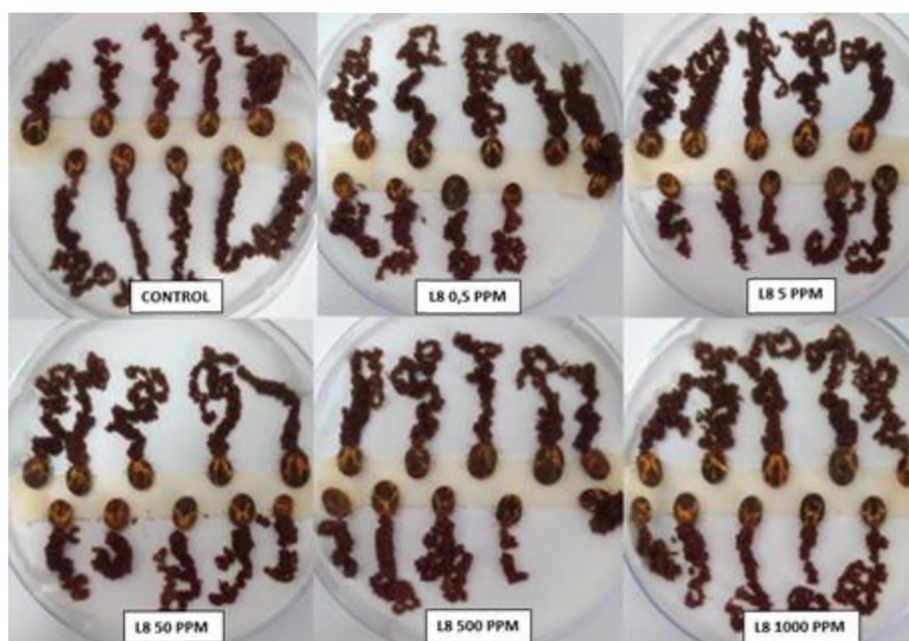


Figura 2. Placa de petri con *R. microplus* sumergidas en la molécula sintética modifica de L8, en concentraciones de 0,5ppm, 5 ppm, 50ppm, 500ppm y 1000ppm después de 14 días de Incubación.

Tabla IX. Parámetros reproductivos de *R. microplus* expuestas a diferentes concentraciones de la Formula L8.

FORMULA L8	VIVAS	MUERTAS	PESO DE HEMBRAS	PESO DE HUEVOS	% DE ECLOSIÓN	RE	% C
Control	10	—	3,98	2,00	100	50	
500ppm	10	—	3,98	2,10	100	53	-
1000ppm	10	—	3,98	2,07	100	52	-
2000ppm	10	—	3,98	1,85	100	46	8
3000ppm	10	—	3,97	1,85	100	47	6

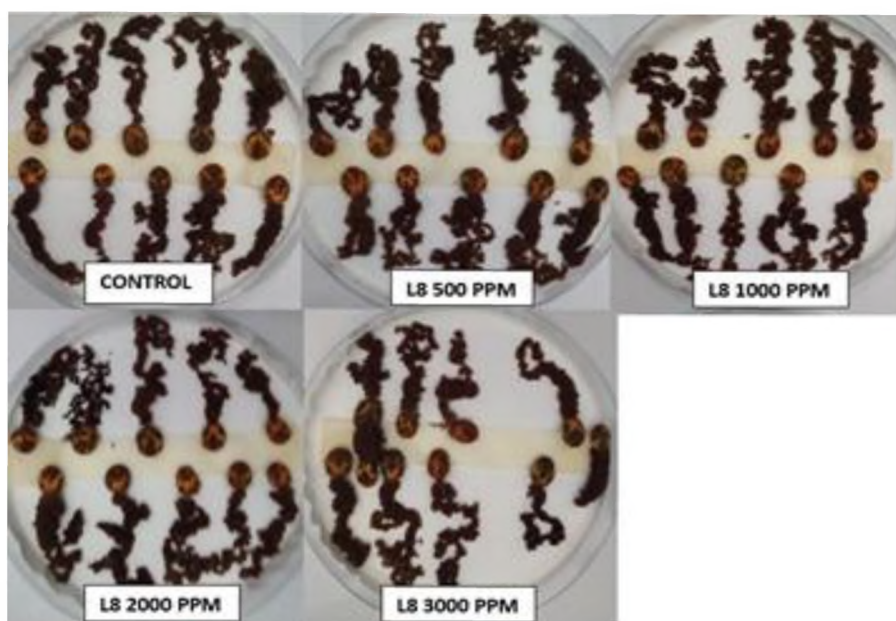


Figura 3. Placa de petri con *R.microplus* sumergidas en la molécula sintética modifica de L8, en las concentraciones más altas trabajadas de 500ppm, 1000ppm, 2000ppm y 3000ppm después de 14 días de Incubación.

Tabla X. Parámetros reproductivos de *R. microplus* expuestas a diferentes concentraciones de la Formula L8.

FORMULA L8	VIVAS	MUERTAS	PESO DE HEMBRAS	PESO DE HUEVOS	% DE ECLOSIÓN	RE	% C
Control	10	—	4,24	1,64	100	39	
500ppm	8	2	4,09	1,25	100	31	21
1000ppm	9	1	4,10	1,63	100	40	-
2000ppm	9	1	4,10	1,67	100	41	-
3000ppm	9	1	4,10	1,17	100	29	26

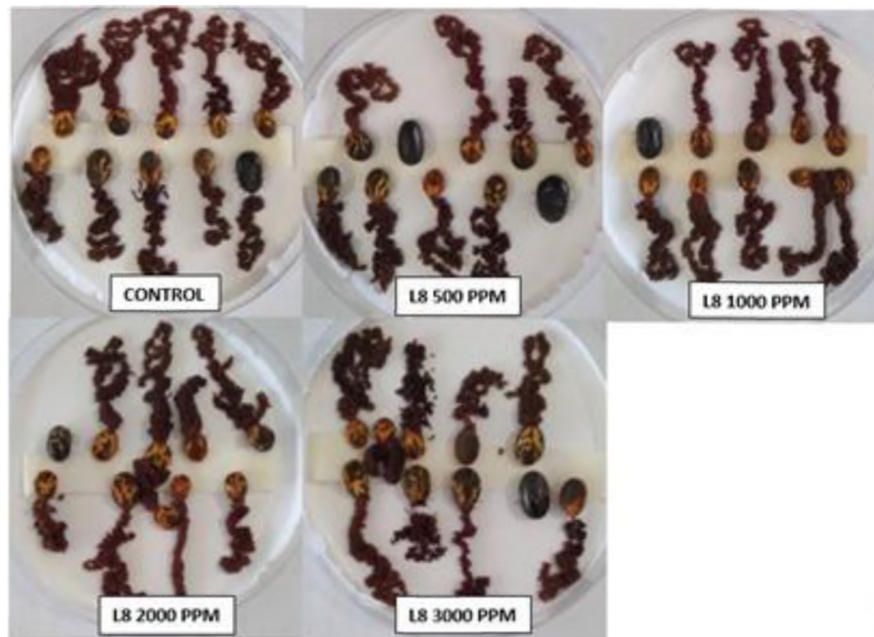


Figura 4. Placa de petri con *R.microplus* sumergidas en la molécula sintética modifica de L8, en las concentraciones más altas trabajadas de 500ppm,1000ppm, 2000ppm y 3000ppm después de 14 días de Incubación.

Tabla XI. Parámetros reproductivos de *R. microplus* expuestas a diferentes concentraciones de la Formula S5.

FORMULA S5	VIVAS	MUERTAS	PESO DE HEMBRAS	PESO DE HUEVOS	% DE ECLOSIÓN	RE	% C
Control	10	—	3,61	1,79	100	50	
0,75ppm	10	—	3,60	1,67	100	46	8
12,5ppm	10	—	3,60	1,70	100	47	6
25ppm	10	—	3,60	1,49	100	41	18
50ppm	10	—	3,59	1,34	100	37	26
100ppm	2	8	3,58	0,26	100	7,2	86

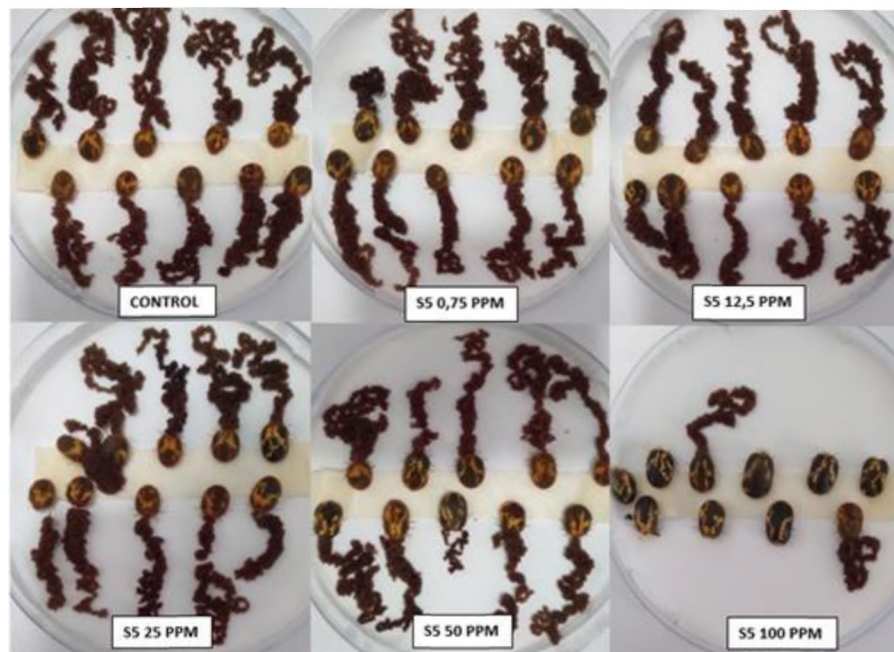


Figura 5. Placa de petri con *R.microplus* sumergidas en concentraciones de 0,75ppm, 12,5ppm, 25ppm, 50ppm y 100ppm de la formula sintética modifica de S5, después de 14 días de Incubación.

Tabla XII. Parámetros reproductivos de *R. microplus* expuestas a diferentes concentraciones de la Formula S5.

FORMULA S5	VIVAS	MUERTAS	PESO DE HEMBRAS	PESO DE HUEVOS	% DE ECLOSIÓN	RE	% C
Control	10	—	3,98	1,98	100	50	
50ppm	10	—	3,98	2,00	100	50	-
100ppm	10	—	3,98	1,23	100	31	38
200ppm	10	—	3,98	1,47	100	37	26
300ppm	10	—	3,98	1,23	100	31	38

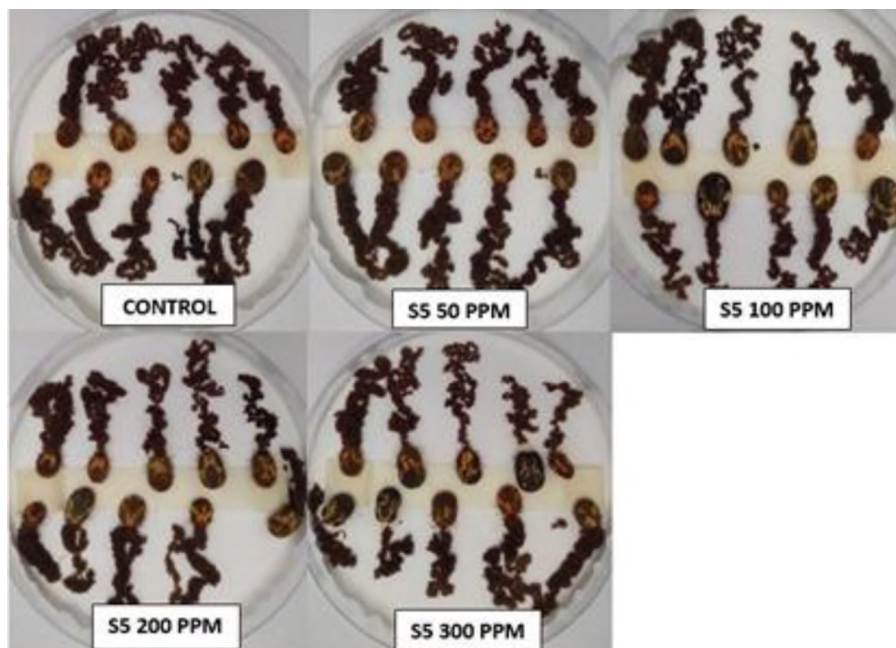


Figura 6. Placa de petri con *R.microplus* sumergidas en concentraciones de 50ppm, 100ppm, 200ppm y 300ppm de la formula sintética modifica de S5, después de 14 días de Incubación.

Tabla XIII. Parámetros reproductivos de *R. microplus* expuestas a diferentes concentraciones de la Formula S5.

FORMULA S5	VIVAS	MUERTAS	PESO DE HEMBRAS	PESO DE HUEVOS	% DE ECLOSIÓN	RE	% C
Control	10	—	4,24	1,64	100	39	
100ppm	10	—	4,09	1,57	100	38	3
200ppm	8	2	4,09	1,25	100	31	21
300ppm	8	2	4,09	1,06	100	26	33

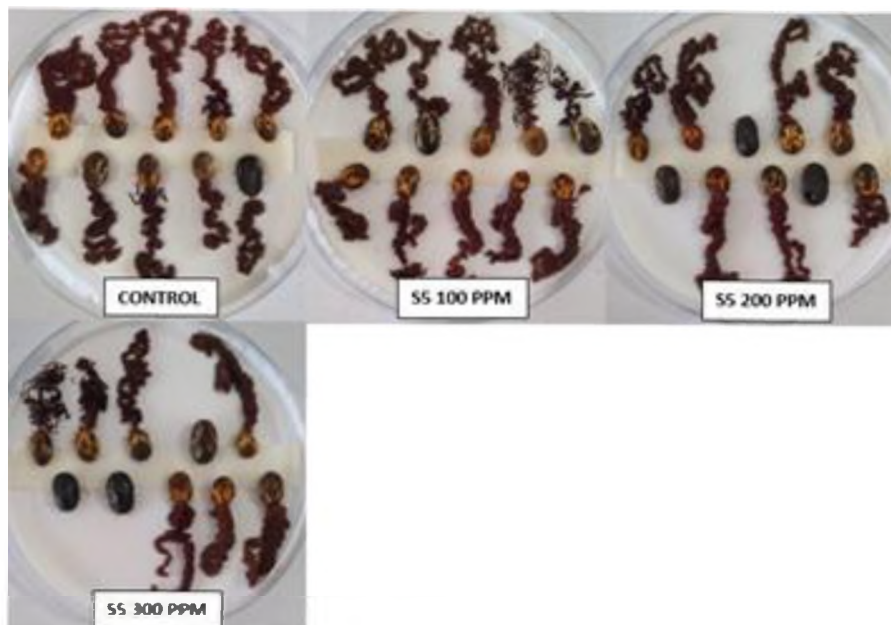


Figura 7. Placa de petri con *R.microplus* sumergidas en concentraciones de 100ppm, 200ppm y 300ppm de la formula sintética modifica S5, después de 14 días de Incubación.

Utilizando las concentraciones máximas en nuestro trabajo de 300 ppm de S5 y 3000 ppm en L8, no se logró obtener eficacia de las moléculas en los ensayos *in vitro*, tal vez sería necesario realizar la mezcla de las dos moléculas *in vitro* para poder lograr un sinergismo entre ambas moléculas sintetizadas. Esto para extrapolar en el resultado *in vivo*, donde se observó un porcentaje de eficacia de 45,33 % en el grupo 1 y de 65,96 % en el grupo 2.

Cabe destacar que no se utilizaron mayores concentraciones de S5, debido a que se logró el punto de saturación de la solución, no logrando la disolución de la molécula.

CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que en la Prueba *in vitro* de inmersión de hembras adultas de *Rhipicephalus microplus* tanto para la molécula sintética modifica L8 como S5 no se encontró la concentración *in vitro* para lograr la inhibición de la oviposición e inhibición de emergencia de larvas.

Respecto al ensayo *in vivo* se determinó que realizando la combinación de ambas moléculas en dosis de 0,7 y 1,05 mg/kg de S5 y manteniendo la misma dosis de 0.5 dmg/kg L8, en ambos grupos de bovinos, el porcentaje de eficacia fue de 45 % y 67%, respectivamente, este último fue prometedor sin embargo no fue suficiente para lograr la eficacia garrapaticida requerida por el ente regulador SENASA.

Cabe destacar que las exigencias del ente regulador en Argentina, SENASA, requiere un porcentaje de eficacia igual o superior al 95% para la aprobación de productos garrapaticidas de aplicación parenteral, según Res. 757/98. Asimismo, estos resultados preliminares son solo orientativo requiriendo un n° mayor al utilizado.

Finalizado el mismo se pudo determinar que el producto administrado resulto ser seguro e inocuo a las dosis utilizadas sin presentación de reacciones adversas.

ANEXO

Tabla IV. Resultados obtenidos desde día 0 al día +24.

GRUPO CONTROL

Día de prueba	Teleoginas recolectad.	Alicuota incubada	Peso total Alicuota	Teleoginas Sobrevivien	Peso total oviposición	Gramos h. incubados	Peso total larvas
0	607	40	19,87	40	6,32	2	0,95
+1	790	40	19,03	39	6,15	2	0,82
+2	566	40	19,12	40	6,25	2	0,97
+3	1049	40	18,68	40	7,32	2	0,69
+4	712	40	18,19	40	7,88	2	0,55
+5	561	40	18,36	40	7,9	2	0,89
+6	754	40	17,99	40	8,6	2	1,54
+7	797	40	19,3	40	9,84	2	0,95
0 a +7	5836	320	150,54	319	60,26	16	7,36
+8	1089	40	19,41	40	10,17	2	0,87
+9	1232	40	19,69	40	9,49	2	0,73
+10	1290	40	19,87	40	9,67	2	0,88
+11	914	40	20,2	40	8,81	2	0,82
+12	1051	40	20,09	40	9,28	2	0,91
+13	989	40	19,37	40	9	2	0,88
+14	635	40	18,37	40	8,4	2	0,84
+15	739	40	19,13	40	9,01	2	0,39
+16	656	40	18,81	40	9,08	2	0,38
8 a +16	8595	360	174,94	360	82,91	18	6,7
+17	967	40	20,62	40	9,75	2	0,67
+18	716	40	18,87	40	5,09	2	0,59
+19	678	40	18,71	40	4,91	2	0,48
+20	527	40	18,68	40	9,21	2	0,38
+21	737	40	19,67	40	9,65	2	0,39
+22	1027	40	20,32	40	9,38	2	0,59
+23	1158	40	20,22	40	9,12	2	0,42
+17 a +24	5810	280	137,09	280	57,11	14	3,52
TOTAL	20241	960	462,57	959	200,28	48	17,58

GRUPO 1

Día de Prueba	Teleoginas recolectad.	Alicuota incubada	Peso total Alicuota	Teleoginas sobrevivien	Peso total oviposición	Gramos h. incubados	Peso total larvas
0	113	40	18,27	40	7,9	2	0,74
+1	241	40	18,85	40	7,89	2	0,65
+2	372	40	18,47	40	8,47	2	0,94
+3	430	40	18,17	39	7,37	2	0,66
+4	527	40	18,26	40	8,49	2	0,83
+5	684	40	17,3	40	7,76	2	1,17
+6	668	40	17,98	40	9,08	2	0,64
+7	679	40	17,5	40	9,07	2	1,04
0 a +7	3714	320	144,8	319	66,03	16	6,67
+8	927	40	17,95	40	9,17	2	0,74
+9	1090	40	18,77	40	10,15	2	0,9
+10	1095	40	19,23	40	9,35	2	0,81
+11	1703	40	18,42	20	4,56	1	0,43
+12	527	40	14,85	20	4,57	1	0,17
+13	374	40	10,19	22	4,14	1,24	0,43
+14	269	40	9,87	23	3,96	1,27	0,36
+15	284	32	8,17	20	3,73	2	0,31
+16	247	33	8,8	20	4,03	2	0,04
8 a +16	6516	345	126,25	245	53,66	14,51	4,19

+17	334	32	9,25	21	4,31	1,09	0,15
+18	232	30	8,84	20	4,28	2	0,15
+19	246	23	9,04	23	4,48	1,28	0,36
+20	255	24	9,19	23	4,46	1,21	0,27
+21	322	21	9,11	20	4,63	1	0,22
+22	376	22	9,02	22	4,59	1,06	0,30
+23	349	25	8,46	20	4,02	1	0,41
+17 a +24	2114	177	62,91	149	30,77	8,64	1,86
TOTAL	12344	842	333,96	713	150,46	39,15	12,72

GRUPO 2

Día de Prueba	Teleoginas recolectad.	Alicuota incubada	Peso total Alicuota	Teleoginas Sobrevivien	Peso total oviposición	Gramos h. incubados	Peso total larvas
0	130	40	15,38	39	7,78	2	0,95
+1	154	40	15,76	40	8,21	2	0,81
+2	187	40	15,92	40	8,06	2	0,87
+3	235	40	15,71	40	8,08	2	0,75
+4	230	40	15,82	40	8,35	2	0,41
+5	206	40	14,49	40	7,3	2	1,16
+6	245	40	15,17	40	7,81	2	0,85
+7	270	40	14,9	39	7,86	2	0,84
0 a +7	1657	320	123,15	318	63,45	16	6,64
+8	280	40	15,41	40	8,3	2	0,72
+9	413	40	15,9	40	8,5	2	0,56
+10	390	40	16,61	40	8,98	2	0,93
+11	288	40	16,16	40	8,33	2	0,7
+12	263	40	15,79	40	8,49	2	0,78
+13	294	40	16,44	40	8,61	2	0,77
+14	265	40	15,52	40	8,04	2	0,39
+15	276	40	15,4	40	6,93	2	2,01
+16	255	40	14,88	40	7	2	3,72
8 a +16	2724	360	142,11	360	73,18	18	10,58
+17	256	40	15,33	40	7,51	2	0,36
+18	177	40	14,66	40	7,52	2	0,19
+19	237	40	15,19	40	7,94	2	0,60
+20	218	40	15,46	40	8,17	2	0,45
+21	281	40	15,6	40	7,88	2	0,53
+22	291	40	17,04	40	9,35	2	0,60
+23	217	40	16,05	40	8,37	2	0,74
+17 a +24	1677	280	109,33	280	56,74	14	3,47
TOTAL	6058	960	374,59	958	193,37	48	20,69

BIBLIOGRAFIA

- 1) ABOELHADID SM, ARAFA WM, WAHBA AA, MAHROUS LN, IBRAHIUM SM, HOLMAN PJ. 2018. Effect of high concentrations of lufenuron, pyriproxfen and hydroprene on *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Veterinary Parasitology*; 256:35-42. PMID: 29887028.
- 2) BRAR G.R, MEYER W, STELINKI LL. 2015. Effects of methoprene, a juvenile hormone analog, on survival of various developmental stages, adult emergence, reproduction and behavior of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama <https://doi.org/10.1002/ps.3975>.
- 3) COPPO, J.A. 2008. Fisiología comparada del medio interno. Segunda edición. Editorial Salta.
- 4) DAFFNER A. La garrapata de los vacunos. Características y control. *Revista veterinaria argentina* 2012; (consultado 7 de agosto del 2021) p1-5. Disponible en: <https://www.veterinariargentina.com/revista/2012/10/la-garrapata-de-los-vacunos-caracteristicas-y-control/>
- 5) DÍAZ RIVERA, E. 2012. Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, Vol. 5, No. 1.
- 6) ENCINAS A. 2000. Artrópodos. En: Cordero M, Rojo FA. *Parasitología Veterinaria*. Madrid: Mc Graw-Hill, Interamericana. p. 134-151.
- 7) ESTRADA-PEÑA A, VENZAL JM. 2007. Climate niches of tick species in the mediterranean región: modeling of occurrence data distributional constraints and impact of climate change. *J Med Entomol* [consultado 2011 may.] 44 (6):1130-1138.
- 8) GUGLIELMONE AA. 1992. The level of infestation with the vector of cattle babesiosis in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 87, Suppl. III, 133-137
- 9) GUGLIELMONE AA, NAVA S. 2013. Epidemiología y control de las garrapatas de los bovinos en la Argentina. *Enfermedades Parasitarias con Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes: Fundamentos Epidemiológicos para su Diagnóstico y Control* (ed. A. Nari y C. Fiel), pp. 441–456. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- 10) GUGLIELMONE AA, HADANI A, MANGOLD AJ, De Haan L, BERMUDEZ A. 1981. Garrapatas (Ixodoidea: Ixodidae) del Ganado bovino en la

- provincia de Salta: especies y carga en 5 zonas ecológicas. Rev.Med. Vet. 62, 194-205
- 11) GUGLIELMONE AA, CASTELLI ME, MANGOLD AJ, AGUIRRE DH, ALCARAZ E, Cafrune MM, CETRA B, LUCIANI CA, SUAREZ VH. 2007. El uso de acaricidas para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) en la Argentina. Rev. Inv. Agropec. 36, 155-167.
 - 12) NAVA, S.; MANGOLD, A.J.; MOREL, N.; ROSSNER, M.V.; GUGLIELMONE, A.A. Epidemiología y control de la garrapata común del bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Argentina. 2017 Publicación Miscelánea Año V - N°2 ISSN en línea-2314-3126. INTA. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela.
 - 13) MANGOLD, A.; NAVA, S.; MASTROPAOLO, M. 2011. Garrapata común del bovino [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*] (bioecología, importancia sanitaria, control, resistencia a los antiparasitarios). Ficha Nro 5. Laboratorio de Parasitología e Inmunología, INTA. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela.
 - 14) MANUAL MERK DE VETERINARIA. 5ª ed. Barcelona: Océano.2000 p.758
 - 15) MILLER RJ, WHITE WH, DAVEY RB, GEORGE JE, PEREZ DE LEON A.2011.Efficacy of Spinosad Against Acaricide-Resistant and -Susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and Acaricide-Susceptible *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* J. Med. Entomol. 48(2): 358-365; DOI:10.1603/ME08222
 - 16) POLANCO ECHEVERRY, D. N. y RÍOS OSORIO, L.A. 2016. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria, Mosquera (Colombia); 17(1):81-95. ISSN 0122-8706, ISSNE 2500-5308.
 - 17) SALGADO VL. 1998. Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates. Pesticide Biochemistry & Physiology 60:91-102.
 - 18) SCHENKER R .1999. Effects of lufenuron on the development of the cat flea. Scientific Communication Novartis.
 - 19) SENASA. Plan nacional de control y erradicación de la garrapata del bovino; (consultado 6 de agosto del 2021) Disponible en:

<http://www.senasa.gob.ar/tags/plan-nacional-de-control-yo-erradicacion-de-la-garrapata-del-bovino>.

- 20) SONENSHINE DE, LANE RS, NICHOLSON WL. 2002. Chapter 24: Ticks (Ixodida). Medical and veterinary entomology. En: Mullen G, Durden L. Medical and Veterinary Entomology. Amsterdam: Elsevier Science. p. 517-558.
- 21) THOMPSON GD, DUTTON R, SPARK TC. 2000. Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. Pest Management Science 56:696-702.