

VOL. 34

Enero – Junio

1.984

REVISTA ECUATORIANA
de
HIGIENE y MEDICINA TROPICAL



MEDICION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE BOOPHILUS MICROPLUS (Can.) A DIFERENTES GARRAPATICIDAS¹

Por: Francisco Ratti²

Jaime Buestán³

Kléber Loor⁴

INTRODUCCION

Uno de los problemas más importantes de la producción pecuaria en muchos países es la resistencia de las garrapatas a los acaricidas. En general, aunque hay pocas especies de garrapatas que se han hecho resistentes, por ser ellas de importancia veterinaria su existencia es una amenaza para la producción ganadera, ya sea porque transmiten enfermedades y/o producen productividad (Wharton, 1.967).

La resistencia presenta su mayor incidencia en las garrapatas de un huésped del género Boophilus, probablemente debido a que la mayor porción de la población total de tales especies está bajo presión química a un mismo tiempo, la que obviamente es menor en las garrapatas de dos y tres huéspedes. Estas tienen ciclos de vida más largos y también tienden a ser menos huéspedes específicas para los animales domésticos. La resistencia a pesar de esto, también ha sido desarrollada por las garrapatas de dos y tres huéspedes, y puede esperarse que se desarrolle en otros cuyo control depende de productos químicos (Wharton and Roulston, 1.970).

El espectro más amplio de resistencia a los acaricidas ha sido demostrado por Boophilus

microplus. Se ha demostrado resistencia en Australia, Nueva Guinea, Asia, Sudamérica y otras áreas, pero no en Nueva Zelandia. Sin embargo la mayor diversidad de resistencia es hallada en Australia, y es allí también donde se ha desarrollado la mayor cantidad de investigación en este aspecto.

Por lo menos 8 diferentes cepas de B. microplus en Australia ahora muestran resistencia simple, cruzada o doble a una variedad de acaricidas organofosforados y carbamatos.

Con el uso de acaricidas organofosforados y carbamatos, más cepas resistentes de B. microplus serán descubiertas. Estas cepas deben ser cuidadosamente catalogadas y su espectro de resistencia asimismo debe ser cuidadosamente definido (Drummond, 1.977).

En Sudamérica, cepas de B. microplus resistentes a los compuestos organofosforados, han sido encontradas en Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela. En el Ecuador, a pesar de que esta garrapata está distribuída por todas las regiones del país (Loor, 1.966) y que se depende exclusivamente de productos químicos para su control, nada se conoce sobre el status de resistencia del ácaro hacia ellos. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue conocer cual es la situa-

1. Reproducción parcial del trabajo de Tesis presentado por el primer autor como requisito para optar el título de Dr. en Ciencias Biológicas en la Universidad de Guayaquil.
2. Microbiólogo 1, Laboratorios Veterinarios del Instituto Nacional de Higiene.
3. Microbiólogo 3, Sección de Entomología.
4. Microbiólogo Jefe 2, División de Investigación.

ción del Ecuador en relación al problema y

compararla con la de otros países.

MATERIALES Y METODOS

Básicamente el trabajo se realizó probando cuatro garrapaticidas:

<u>Nombre Comercial</u>	<u>Grupo químico</u>	<u>Fórmula química</u>
Asuntol (Coumaphos)	Fosforado	$O-(3\text{-cloro-4-metil-2-cxo-2H-benzopiran-7-il})O,O\text{-diethyl ester.}$
Dursban (Chorpyrifos)	Fosforado	$O,O\text{-diethyl }O-(3,5,6\text{-triclono-2-piridinil})\text{ ester.}$
Bromophos-ethyl	Fosforado	$O-(4\text{-bromo-2,5-diclorofenil})O,O\text{-diethyl ester.}$
Lindano (Isómero Y de BHC) Clorinado		1,2,3,4,5,6-hexacloro-, Y-isómero.

Para el efecto se utilizó el método de Stone y Haydock (1.962) adoptado como patrón internacional por la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación (FAO, 1.971). Este método es universalmente conocido como "Método de larvas en sobres" (Larval packet test).

COLECCION DE ESPECIMENES Y CRIA

La manera más satisfactoria de medir la susceptibilidad de las garrapatas a los acaricidas es utilizando larvas sin alimentarse. Las garrapatas de la especie *B. microplus* fueron colectadas parcial o totalmente ingurgitadas sobre ganado bovino en 17 localidades representativas de 11 provincias ecuatorianas (Fig. 1). Se las transportó al laboratorio en recipientes de cartón con la mayor cantidad de datos tales como: localidad, fecha de colecta, presión atmosférica, temperatura del lugar, tipos de garrapaticidas usados y frecuencia de baños.

MANTENIMIENTO DE COLONIAS EN EL LABORATORIO

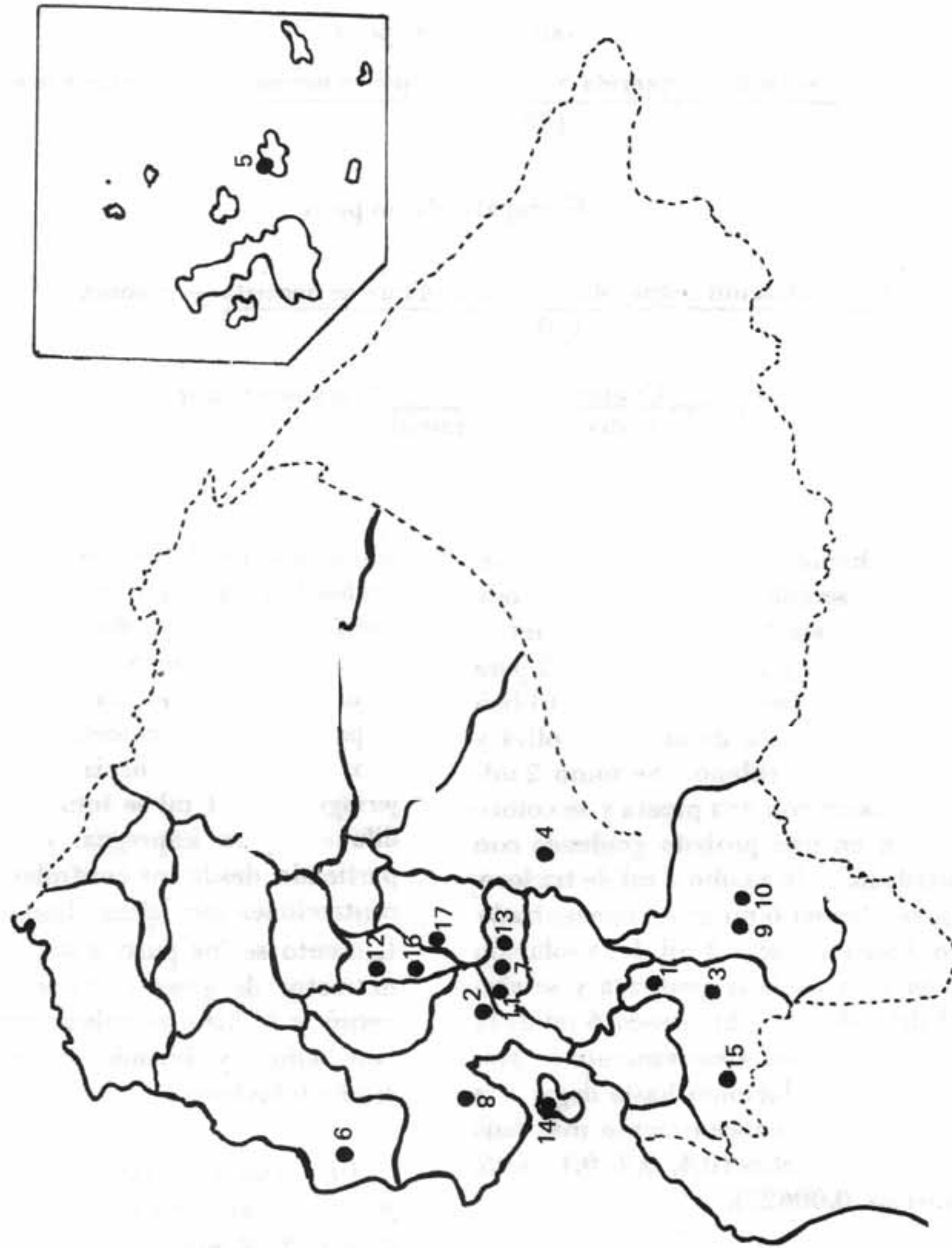
Se colocaron grupos de 50 garrapatas ingurgitadas en cajas de petri de 14 cm. de diámetro, por 3 ctms de altura, dejando una abertura para permitir una mejor aireación.

Este material así acondicionado se incubó en una cámara ambiental a 27-28°C y aproximadamente 80% de humedad relativa por un tiempo de 10 días, que es el periodo de oviposición de las garrapatas. Se peso un gramo de huevos (un gramo de huevos produce 20.000 garrapatas) y se lo colocó en un tubo de ensayo sellando la abertura con tela organdi, dejándolos incubar por 18 días, transcurridos los cuales las larvas eclosionaron. Las que se utilizarían en las pruebas fueron aquellas comprendidas entre 7 y 14 días de edad.

SOLUCIONES DE ACARICIDAS PARA LAS PRUEBAS

Preparación de soluciones.— Como solvente se utilizó una mezcla de tres partes de tricloroetileno con una de aceite de oliva (grado analítico) este último esterilizado por 24 horas a 100°C. El acaricida debía ser soluble en ambos componentes, el tricloroetileno es muy volátil y es un vehículo que ayuda a la difusión del aceite sobre el papel filtro, que sólo es un tercio del volumen del solvente, es la razón por la que se consideró solamente el volumen del aceite cuando se calculó la cantidad de insecticida que se necesitaba para obtener la concentración inicial, que en este caso fue de 0.4 para Asuntol,

Fig. 1. Sitios de colección de 17 cepas de Boophilus microplus



1. Saraguro
2. M. Auxiliadora
3. Loja
4. Sucúa
5. Galápagos
6. Sucre
7. Cochancay
8. San Juan
- 9.- Oriente
10. Zamora
11. Troncal
12. Echeandía
13. Javín
14. Puná
15. Celica
16. Caluma
17. Pallatanga

Dursban y Lindano y de 2.0 para Bromophos-ethyl.

Hay que anotar además que para preparar

Garrapaticida puro

$$\frac{\text{Concentración requerida} \times \text{cantidad que se necesita}}{100} = \text{gramos a usar}$$

Garrapaticida no puro.

$$\frac{\text{Concentración requerida} \times \text{cantidad que se necesita}}{100} = \text{gramos.}$$

$$\frac{\text{Gramos} \times 100}{\% \text{ de concentración inicial}} = \text{gramos a usar}$$

Con la solución "stock" se realizaron siete diluciones seriadas al 50^o%, comprendidas desde 0,4 hasta 0,00625 para Asuntol, Dursban, Lindano, y 2,0 hasta 0,00312 para Bromophos-ethyl; como control se utilizó la mezcla de una parte de aceite de oliva y dos partes de tricloroetileno. Se tomó 2 ml de solución madre con una pipeta y se colocó esta cantidad en una probeta graduada con tapa esmerilada, se le añadió 4 ml de tricloroetileno para obtener 6 ml de un concentrado al 0,4^o%, luego se vació 3 ml de la solución anterior en otra probeta graduada y se añadió 3 ml del solvente, obteniendo 6 ml de la dilución al 0,2^o%; así sucesivamente se procedió a hacer las diluciones hasta llegar a la séptima que fue la concentración más baja utilizada en las pruebas (0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125, 0,00625).

SOBRES DE PAPEL CON LARVAS

Después de numerosas experiencias en las que se probaron y eliminaron sucesivamente distintas clases de papel filtro, fue utilizado el Watman No. 541 (11 cm de diámetro), el cual tiene bajo contenido de ceniza, superficie lisa resistente a los químicos, se dobla e impregna con facilidad, con 25 µm de porosidad que permite un intercambio gaseoso normal con el ambiente. Se marcó las hojas con un sello de caucho que imprime una figura

la solución madre en aceite de oliva fue necesario utilizar garrapaticida puro, o por lo menos con 95^o% de pureza, y la cantidad se calculó en base de la fórmula siguiente:

geométrica de 8,5 cm de largo por 7 cm de ancho, la misma que internamente está compuesta por 52 pequeños cuadros de 1 cm de largo por 0,5 de ancho. Cada papel filtro fue rotulado al reverso con la concentración a impregnar. Se los colocó en una base de caucho con alfileres hacia arriba y con una jeringuilla de 1 ml se tomó 0,68 ml de cada dilución para impregnar cada papel filtro, partiendo desde los controles hasta las concentraciones más altas; después de este tratamiento se los puso a secar en un aparato extractor de gases (Sorbona), luego se los retiró y se hizo un sobre cerrando los lados con 'clips' y dejando uno abierto para introducir las larvas.

Un tubo con larvas de garrapatas fue puesto en un vaso de precipitación en posición vertical sostenido por una base de caucho, esto con la finalidad de que las larvas que poseen geotropismo negativo subiesen al borde abierto del tubo de ensayo. Después, grupos de aproximadamente 100 a 120 larvas, fueron colocados en el interior de los sobres, utilizando para ello un pincel de pelo de camello y desprendiendo las larvas mediante la suave rotación de una varilla de vidrio, cerrando inmediatamente el borde abierto del sobre con un clip. Los sobres, dos por cada concentración y controles,

fueron colocados en una bandeja de hierro y puestos en una cámara con temperatura y humedad relativa controlada. Pasado este período de tiempo se abrieron los sobres, comenzando siempre por los controles, las garrapatas que caminaban con normalidad se las sacó con un pincel y se las colocó en algodón húmedo con detergente para ser contadas con facilidad, después se contaron las que quedaron en los sobres que estaban muertas o casi inactivas.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Los resultados se anotaron en un formulario previamente preparado y con estos datos se calculó el porcentaje de mortalidad arrojado por cada concentración; las pruebas cuyos controles dieron más del 5^o/o de mortalidad fueron eliminadas, la mortalidad en controles hasta el 5^o/o se corrigió utilizando la fórmula de Abbott, que es como sigue:

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{\text{Mortalidad media} - \text{Mortalidad control}}{100 - \text{Mortalidad control}} \times 100$$

Esta fórmula es una adaptación de la expresión matemática del efecto de una combinación de probabilidades independientes. La fórmula de Abbott es usada por la FAO para corregir la mortalidad en este tipo de pruebas.

Con los porcentajes de mortalidad se buscan los valores de la CL50, es decir la cantidad de insecticida necesario para matar el 50^o/o de la población, lo que se hizo basándose en dos métodos, uno gráfico y otro gráfico-matemático conocido como "Probit análisis" (Finney, 1.977).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron 1.444 pruebas de susceptibilidad con 33 cepas de *Boophilus microplus* de diferentes lugares del país, a las que se les puso el nombre de las localidades donde fueron colectadas. 17 de las 33 cepas fueron utilizadas para este trabajo por ser las más representativas por zona y cuyos cálculos fueron comprobados por analistas en computación de la Universidad de Auburn, Alabama, Estados Unidos (Mullen, 1.981).

El cuadro No. 1 corresponde a los resultados obtenidos con el garrapaticida organofosforado Dursban, que se introdujo en el país el año 1.970, siendo muy popular entre los ganaderos por su eficacia para controlar las garrapatas, especialmente *B. microplus*. Después de realizar numerosas pruebas de susceptibilidad con la cepa Saraguro y algunos pa-

ses en ganado bovino, se la seleccionó como cepa susceptible debido a su baja CL50 = 0,018 ± 0,008 y tener una pendiente de 4,400 con una p < 0,05, lo que demuestra que no hay discrepancia significativa en la recta trazada. La alta sensibilidad de la cepa Saraguro puede ser atribuída a la heterogeneidad genética en la población, que se mantiene por la insuficiente selección de garrapaticidas y al casi continuo flujo de genes susceptibles de una población de garrapatas que raramente son expuestas a los acaricidas (Rawlins and Mansigh, 1978a). La cepa Saraguro posee una CL50 igual a la de la cepa susceptible de Australia, la Yeerongpilly con CL50 = 0,018, considerada internacionalmente como tal. En un trabajo similar a este realizado en Jamaica, también se tomó como cepa referencial la Yeerongpilly, a pesar de que encontraron una cepa susceptible autóctona, la Omeara, con CL50 = 0,017 ± 0,020 y una pendiente de 4,880.

Las cepas que presentaron CL50 más elevadas son: Sucúa con CL50 = 0,065 ± 0,014 con pendiente de 12,00, San Juan con CL50 = 0,035 ± 0,019 y una pendiente de 4,409, Galápagos con CL50 = 0,031 ± 0,014 con una pendiente de 4,719, Echeandía con CL50 = 0,034 ± 0,013 y una pendiente de 4,800, Caluma con CL50 = 0,033 ± 0,020 y una pendiente de 3,541. Estas cepas arrojaron factores de resistencia de 3,6x, 1,9x, 1,7x, 1,9x y 1,8x, respectivamente, valores similares, el primero a los de la cepa Silkwood

Cuadro 1. Factores de resistencia de 14 cepas ecuatorianas de *Boophilus microplus* al DURSBAN, calculados mediante línea de regresión log-dosis/probit.

Cepas	\bar{x}	\bar{y}	b	X ²	V	m ₁	m ₂	CL50	FR
Saraguro (Suscept.)	1,277	5,079	4,400	0,181	0,039	0,034	0,002	0,018 ± 0,008	1,8x
M. Auxiliadora	0,482	4,858	4,488	0,000	0,042	0,062	0,003	0,033 ± 0,015	1,4x
Loja	1,371	4,808	4,768	0,090	0,038	0,027	0,025	0,026 ± 0,001	3,6x
Sucúa	0,753	4,279	12,000	0,636	0,019	0,034	0,123	0,065 ± 0,020	1,7x
Galápagos	0,489	4,964	4,719	0,078	0,036	0,058	0,004	0,031 ± 0,014	1,9x
Sucre	0,564	5,131	4,387	0,040	0,049	0,067	0,001	0,034 ± 0,017	1,9x
Cochancay	—	—	—	—	—	—	—	—	—
San Juan	0,591	5,217	4,409	0,050	0,058	0,103	0,012	0,035 ± 0,019	1,9x
Oriente	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Zamora	0,525	4,937	6,077	0,116	0,020	0,053	0,015	0,034 ± 0,010	1,9x
Troncal	1,414	4,801	4,088	0,091	0,035	0,053	0,005	0,029 ± 0,010	1,6x
Echeandía	0,513	4,901	4,800	0,087	0,029	0,059	0,009	0,034 ± 0,013	1,9x
Javín	0,443	5,145	5,528	0,177	0,020	0,042	0,010	0,026 ± 0,008	1,4x
Puná	1,189	4,843	4,086	0,087	0,048	0,051	0,007	0,017 ± 0,008	0,9x
Celica	1,390	4,832	4,169	0,143	0,052	0,075	0,010	0,027 ± 0,001	1,5x
Caluma	1,371	4,466	3,541	0,144	0,070	0,110	0,010	0,033 ± 0,020	1,8x
Pallatanga	0,485	5,263	5,568	0,041	0,029	0,047	0,025	0,027 ± 0,010	1,5x

— — CL50 fuera de los límites fiduciales.

considerada similar a la Mackay, que no son resistentes al Dursban, y los restantes al de la cepa Ridgeland, también de Australia, con un factor de resistencia de 2,0x, que tampoco es resistente al Dursban (Schnitzerling Et Al, 1.974); y a la cepa Goya, provincia de Corrientes, Argentina, con un factor de resistencias de 2,6x (Grillo Torrado y Gutiérrez, 1.970). En Jamaica cepas como Waller Field con $CL_{50} = 0,041 \pm 0,090$ y una pendiente de 3,420, St. Thomas con $CL_{50} = 0,055 \pm 0,080$ y una pendiente de 3,020, St. Kitts con $CL_{50} = 0,029 \pm 0,100$ y una pendiente de 2,820, poseen factores de resistencia de 2,3x, 3,1x, 1,6x, en su orden y tampoco son consideradas como resistentes. En Sudamérica, solamente se ha reportado resistencia al Dursban en el sur de Brasil (Wharton and Roulston, 1.976).

De toda suerte, y considerando que el factor de resistencia más alto obtenido para el Dursban es de 3,6x (en la cepa Sucúa), seguido de 1,9x (en las cepas San Juan y Echeandía), que se acercan al factor de resistencia de 2,0x de la cepa Ridgeland para este garrapaticida, podría afirmarse que lo que existe es una cierta tolerancia de poca o ninguna significación práctica. Según la experiencia australiana, cepas con factores de resistencia de 2,0x son controladas en un 99% cuando se pulveriza el garrapaticida sobre el ganado en el campo, indicativo de que ejerce un control eficiente. Para que un factor de resistencia al Dursban preocupe deberá ser de 6,0x que es la de la cepa Biarra de Australia, pero aún así al aplicar el garrapaticida sobre el ganado daría una mortalidad de 96%. Lo que si haría considerar la supresión del uso de este garrapaticida, sería el encontrar factores de resistencia del tipo de la australiana Mt. Alford, que es de 110,0x que correspondería a una mortalidad de sólo 46% al aplicar el producto sobre el ganado en el campo, según la antes citada experiencia.

En el cuadro No. 2 se presentan los resultados obtenidos con el Asuntol (Coumaphos), otro de los fosforados de gran demanda en el Ecuador, habiéndoselo utilizado por un

período mayor a los 15 años, razón más que suficiente para que se lo incluyese en esta investigación. La cepa susceptible Saraguro posee una $CL_{50} = 0,022 \pm 0,019$ y una pendiente de 3,218 y una no significativa $p < 0,05$, lo que está encuadrado dentro de la concebible variación de una población homogénea al nivel de 0,05%. Para este garrapaticida existen otras cepas susceptibles, como es el caso de la Sucre, provincia de Manabí, con $CL_{50} = 0,011 \pm 0,004$ y una pendiente de 5,697, la Puná, provincia del Guayas con $CL_{50} = 0,020 \pm 0,009$ y una pendiente de 6,577, CL_{50} inferiores a la de la susceptible Yeerongpilly de Australia con $CL_{50} = 0,048$ y a la Omeara de Jamaica con $CL_{50} = 0,061$, lo que demuestra la mayor sensibilidad de la cepa Saraguro al Asuntol al compararla con cepas susceptibles de otros países.

Analizando los resultados se observa que dos cepas, la María Auxiliadora de El Triunfo con $CL_{50} = 0,079 \pm 0,043$ y una pendiente de 4,022 y la Sucúa de Morona Santiago con $CL_{50} = 0,087 \pm 0,030$ y una pendiente de 8,300, muestran factores de resistencia de 3,6x y de 4,0x, lo que se considera como una alta tolerancia al Asuntol, que puede atribuirse a la existencia de una población con incipiente desarrollo de resistencia, hecho que se fundamenta en que la resistencia a los organofosforados está dada por genes autosomales completamente dominantes (Stone, 1.972); este es un fenómeno preexistente en el que la selección de los acaricidas favorece la supervivencia de los individuos resistentes. Fue por esto que se hizo necesario realizar una selección en el laboratorio para "purificar" una muestra heterogénea de campo y de esta manera acelerar en último término el proceso que se produciría en el campo mismo.

Se ha preferido usar el término tolerancia en lugar de "resistencia baja" porque, comparando estos datos con los de otros países como Australia y Argentina, sería apresurado afirmar de manera categórica que exista una condición que lleve a concluir que el Asuntol no está ejerciendo un eficiente control en las

localidades de donde son originarias las cepas María Auxiliadora y Sucúa. Así por ejemplo: la cepa Biarra de Australia que es resistente al Asuntol y que posee un factor de resistencia de 43x, medido por el mismo método utilizado en este trabajo, sólo es controlada por este producto a la concentración de 0,025^o/o en un 41^o/o bajo condiciones de campo. Para la situación ecuatoriana, si se hacen los cálculos de los factores de resistencia de las cepas María Auxiliadora y Sucúa en base a la Yeerongpilly australiana, se obtienen factores de resistencia de 1,65x y de 1,81x, respectivamente, esto es, más bajos que los obtenidos haciéndolos en relación a la Saraguro. Por otro lado investigaciones hechas en la Argentina, pero utilizando un método de inmersión de larvas, señalan un factor de resistencia de 20,0x para el Asuntol en la cepa Goya, Provincia de Corrientes, que fue controlada en un 84^o/o, pero en ensayos hechos en condiciones de confinamiento y evaluando los resultados en base del peso promedio de aove fértil producido por las teologinas de las garrapatas grávidas que infestaban los animales tratados (Grillo Torrado y Gutiérrez, 1.970). En este mismo país, Nuñez, Pugliese y Shaw (1.972), trabajando con una cepa "Goya", que se presume sea la misma antes citada, consiguió factores de resistencia de 4,85x al Asuntol, pero utilizando el método de Shaw que difiere del anterior en el tiempo en que las larvas están en contacto con el garrapaticida (Shaw, 1.966).

De lo antes expuesto se desprende que la relación entre los factores de resistencia y la mortalidad que se consigue en condiciones de campo, debe ser cuidadosamente evaluada en cada situación, antes de decidir el retiro de un garrapaticida del mercado por considerar que no está ejerciendo un control aceptable. Esta afirmación tiene más validez aún si comparamos las diferencias de criterios que hay entre varias autoridades en la materia, ya que mientras los australianos opinan que "el hallazgo de resistencia no significa que el control práctico haya fracasado y que la vida efectiva de cualquier acaricida debería prolongarse al máximo posible para conservar

acaricidas para el futuro"; Grillo Torrado (1.972), argentino, es la de opinión que: 1) "un factor de resistencia inferior a 4,0x debe alertar acerca del posible fracaso del acaricida para controlar la población de ácaros en estudio; solamente se justificará su ensayo in vivo, si las pruebas de eficacia son satisfactorias y; 2) un factor de resistencia de 4,0x o mayor autoriza el descarte del garrapaticida en ensayo para combatir una población dada de garrapatas y hace innecesario su evaluación in vivo".

Otras cepas dieron valores más bajos de toxicidad al Asuntol: la Oriente colectada en animales traídos al Camal Municipal de Guayaquil, con CL50 = 0,052 ± 0,020 y una pendiente de 5,389, Zamora con CL50 = 0,061 ± 0,019 y una pendiente de 6,471, Troncal con CL50 = 0,054 ± 0,045 y una pendiente de 3,667; Echeandía con CL50 = 0,060 ± 0,024 y una pendiente de 5,958. Ellas poseen factores de resistencia de: 2,4x, 2,8x, 2,5x, y 2,7x, especificidad que puede ser atribuida a la presencia de varios niveles de tolerancia, similares a los observados para el Dursban. Esta opinión es compartida por los investigadores que trabajaron en Jamaica (Pawling and Mansingh, 1978b), quienes consiguieron factores de resistencia semejantes a los anotados, tal es el caso de las cepas St. Kitts con CL50 = 0,065 ± 0,110 y una pendiente de 5,540, St. Thomas con CL50 = 0,143 ± 0,300 y una pendiente de 3,940, con factores de resistencia de 2,0x y 3,0x.

Los datos presentados en el cuadro No. 3 corresponden al garrapaticida organosfosforado Bromophos—cthyl que se comercializa en el país con el nombre de Nexagan—dip desde 1.972. Aquí también se tomó como patrón la cepa susceptible Saraguro, con CL50=0,0851 ± 0,046 y una pendiente de 3,384 y una $p < 0,05$, susceptibilidad mucho más baja que la cepa susceptible Yeerongpilly de Australia con CL50 = 0,280 y la cepa susceptible St. Mitts de Jamaica con CL50 = 0,019. Tomando en consideración lo anotado por Rawling and Masingh (1978a) en el sentido de que, "los factores de resistencia inferiores a 6,0x, pueden ser atribuidos a un vigor de

Cuadro 2. Factores de resistencia de 16 cepas ecuatorianas de *Boophilus microplus* al ASUNTOL, calculados mediante línea de regresión log-dosis/probit.

Cepas	\bar{x}	\bar{y}	b	X ²	V	m ₁	m ₂	CL50	FR
Saraguro (Suscept.)	1,257	4,721	3,218	0,244	0,139	0,119	0,004	0,022 ± 0,019	
M. Auxiliadora	0,835	4,745	4,022	0,005	0,055	0,228	0,027	0,079 ± 0,043	3,6x
Loja	1,451	4,694	2,169	0,010	0,157	0,234	0,007	0,039 ± 0,035	1,8x
Sucúa	0,920	4,850	8,300	0,002	0,056	0,146	0,028	0,087 ± 0,030	4,0x
Galápagos	0,502	4,690	4,699	0,030	0,161	1,010	0,125	0,037 ± 0,030	1,7x
Sucre	1,032	4,957	5,697	-2,697	0,032	0,019	0,003	0,011 ± 0,004	0,5x
Cochancay	0,502	4,611	3,061	-0,028	0,058	0,126	0,014	0,040 ± 0,004	1,8x
San Juan	0,582	4,716	5,000	0,446	0,053	0,085	0,005	0,040 ± 0,023	1,8x
Oriente	0,698	4,917	5,839	0,009	0,030	0,092	0,012	0,052 ± 0,020	2,4x
Zamora	0,742	4,737	6,471	0,055	0,019	0,098	0,024	0,061 ± 0,019	2,8x
Troncal	1,558	4,359	3,667	-0,003	0,133	0,279	0,010	0,054 ± 0,045	2,5x
Echeandía	0,836	5,328	5,958	-0,019	0,030	0,107	0,013	0,060 ± 0,024	2,7x
Javín	0,546	4,924	4,766	0,063	0,035	0,066	0,006	0,036 ± 0,016	1,6x
Puná	1,266	4,727	6,577	0,194	0,036	0,038	0,002	0,020 ± 0,009	0,9x
Celica	1,433	4,794	3,155	0,030	0,075	0,108	0,009	0,031 ± 0,029	1,4x
Caluma	0,527	4,689	3,541	0,002	0,057	0,080	0,002	0,040 ± 0,020	1,8x
Pallatanga	—	—	—	—	—	—	—	—	—

--- CL50 fuera de los límites fiduciales.

Cuadro 3. Factores de resistencia de 16 cepas ecuatorianas de *Boophilus microplus* al BROMOPHOS—ETHYL calculados mediante línea de regresión log-dosis/probit.

Cepas	\bar{x}	\bar{y}	b	X ²	V	m ₁	m ₂	CL50	FR
Saraguro (Suscept.)	0,916	4,960	3,384	0,105	0,055	0,245	0,029	0,085 ± 0,046	
M. Auxiliadora	0,841	4,791	9,727	-0,023	0,022	0,112	0,034	0,073 ± 0,025	0,9x
Loja	1,429	4,857	4,595	0,740	0,026	0,504	0,072	0,288 ± 0,110	3,4x
Sucúa	1,681	4,440	7,251	-0,012	0,041	1,102	0,044	0,573 ± 0,270	6,7x
Galápagos	1,597	5,066	8,000	-0,008	0,020	0,642	0,132	0,387 ± 0,130	4,6x
Sucre	1,582	4,820	7,214	0,035	0,016	0,635	0,165	0,400 ± 0,120	4,7x
Cochancay	—	—	—	—	—	—	—	—	—
San Juan	1,770	5,152	7,692	0,390	0,025	0,970	0,150	0,560 ± 0,210	6,6x
Oriente	1,529	4,599	4,178	0,010	0,052	0,670	0,004	0,337 ± 0,180	4,0x
Zamora	1,509	4,601	4,919	0,832	0,047	0,760	0,019	0,389 ± 0,190	4,6x
Troncal	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Echeandía	1,637	4,756	6,900	0,044	0,033	0,860	0,008	0,470 ± 0,197	5,5x
Javín	1,568	5,147	6,143	0,185	0,027	0,609	0,091	0,350 ± 0,132	4,1x
Puná	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Celica	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Caluma	1,175	4,693	4,482	0,019	0,045	0,342	0,008	0,175 ± 0,085	2,1x
Pallatanga	1,470	4,924	4,966	0,095	0,028	0,541	0,071	0,036 ± 0,117	3,6x

---CL50 fuera de los límites fiduciales

tolerancia y los de 6,0x o más a desarrollo de resistencia, habría resistencia a este garrapaticida en el Ecuador, pues las cepas San Juan (Pueblo Viejo) con $CL_{50} = 0,560 \pm 0,210$ y una pendiente de 7,692, Sucúa con $CL_{50} = 0,573 \pm 0,270$ y una pendiente de 7,251, Echeandía con una $CL_{50} = 0,470 \pm 0,197$ y una pendiente de 6,900, cuyos factores de resistencia son de 6,6x, 6,7x y 5,5x, llegarían o sobrepasarían este límite. Sin embargo, calculando los factores de resistencia en relación con la Yeerongpilly se obtienen cifras de 2,0x para San Juan, 2,0x para Sucúa y 1,7x para Echeandía; cálculos que también hicieron los citados investigadores en Jamaica, pues la susceptibilidad de algunas cepas fue inferior a la de la Yeerongpilly. Lo que sí cabe hacer notar es que, con excepción de la cepa María Auxiliadora que dió un factor de resistencia de 0,9x, los conseguidos para las otras cepas investigadas se mantienen consistentemente altos si se los compara con los dados por las mismas cepas para el Asuntol y Dursban, que no mantienen esta relativa consistencia. El bajo factor de resistencia de la cepa María Auxiliadora (0,9x) es consecuencia de que los cálculos se hicieron en base a la mortalidad dada por dos concentraciones y muy equidistantes, por ausencia de mortalidad en las concentraciones intermedias.

Si se considera de importancia los factores de resistencia de las cepas ecuatorianas al Bromophos-ethyl, calculados en relación con la susceptible Saraguro, se estaría dando una situación diferente no reportada en otros países, donde el desarrollo de la resistencia se ha caracterizado por tener patrones definidos para los distintos garrapaticidas. Así, la cepa Mt. Alfort con un factor de resistencia de 5,0x para Bromophos-ethyl, tiene un factor de resistencia de 110,0x para el Dursban. De la misma manera, la cepa Biarra con un factor de resistencia de 3,9x al Bromophos-ethyl tiene uno de 6,2x para el Dursban; esta correspondencia es mantenida por las cepas Ridgeland, Gracemere, Mackay y Silkwood. En el Ecuador los valores se invierten ya que, mientras en la cepa Sucúa se observa un factor de resistencia de 6,8x para

Bromophos-ethyl, el mismo es de 3,6x para Dursban, relación ésta que se observa también en las demás cepas estudiadas.

Llama la atención que en la localidad donde fue colectada la cepa Sucúa, investigando la historia de los garrapaticidas usados, se encontró que los preferidos eran Asuntol, Dursban, Neguvón y Ruelene, pero no se pudo constatar el uso del Bromophos-ethyl. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que haya sido utilizado.

Hay que tomar en consideración que en el presente trabajo la cepa Sucúa fue la que dió los factores de resistencia más altos para los tres garrapaticidas organofosforados. Esto es importante, especialmente en el caso del Bromophos-ethyl, pues en Australia con factores de resistencia relativamente bajos como el de 3,9x para la cepa Biarra se consiguió sólo 78% de control en el campo usando el producto a la concentración de 0,05% y sólo 60% de control de la Mt. Alfort que tiene un factor de resistencia de 5,0x. A grandes rasgos puede decirse que con factores de resistencia relativamente bajos este garrapaticida tendría un pobre desempeño en condiciones de campo.

Otras cepas de interés, haciendo los cálculos con la Saraguro son: Galápagos con $CL_{50} = 0,387 \pm 0,130$ y una pendiente de 8,000, Zamora con $CL_{50} = 0,389 \pm 0,190$ y una pendiente de 4,919, Javín con $CL_{50} = 0,50 \pm 0,132$ y una pendiente de 6,143; con factores de resistencia de 4,6x, 4,6x, 4,1x, pero como ya se dijo anteriormente se ha preferido interpretar los resultados en base a los cálculos hechos con la Yeerongpilly, y por tanto no se hacen más consideraciones sobre la importancia que revisten factores de resistencia que serían mucho más bajos que los de las cepas jamaicanas Waller Field con $CL_{50} = 0,700 \pm 1,600$ y una pendiente de 3,280 y St. Thomas con $CL_{50} = 0,721 \pm 2,000$ y una pendiente de 2,170, y con factores de resistencia de 5,0x y 5,2x, calculados tomando como base a la Yeerongpilly.

El cuadro No. 4 corresponde al Lindano,

Cuadro 4. Factores de resistencia de 11 cepas ecuatorianas de *Boophilus microplus* al LINDANO, calculados mediante línea de regresión log-dosis/probit.

Cepas	\bar{x}	\bar{y}	b	X^2	V	m ₁	m ₂	CL50	FR
Saraguro (Suscept.)	0,497	5,880	4,056	0,823	0,064	0,003	0,001	0,002 ± 0,001	
M. Auxiliadora	1,202	4,487	7,600	0,171	0,047	0,035	0,001	0,018 ± 0,009	9,0x
Loja	1,395	4,744	2,013	0,160	0,129	0,170	0,006	0,033 ± 0,037	16,5x
Sucúa	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Galápagos	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sucré	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cochacay	1,236	4,864	3,460	0,066	0,065	0,060	0,006	0,018 ± 0,010	9,0x
San Juan	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Oriente	1,287	5,376	4,260	0,057	0,045	0,029	0,001	0,015 ± 0,007	7,5x
Zamora	1,280	4,960	4,745	0,003	0,050	0,037	0,001	0,019 ± 0,009	9,5x
Troncal	1,270	5,160	5,164	0,084	0,808	1,260	0,003	0,017 ± 0,030	8,5x
Echeandía	0,953	4,555	3,923	0,482	0,161	0,030	0,008	0,011 ± 0,010	5,5x
Javín	1,165	5,065	5,057	0,833	0,030	0,025	0,003	0,014 ± 0,006	7,0x
Puná	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Celica	1,409	4,870	2,566	0,071	0,099	0,130	0,007	0,028 ± 0,020	14,0x
Caluma	1,203	4,788	2,982	0,043	0,064	0,058	0,006	0,018 ± 0,010	9,0x
Pallatanga	0,303	5,131	5,375	0,073	0,033	0,033	0,005	0,019 ± 0,007	9,5x

-- CL50 fuera de los límites fiduciales.

un garrapaticida que se ha utilizado en el Ecuador por varias décadas, ya sea en su forma pura, o incluido en el BHC* del que es uno de los isómeros que lo componen. En el Ecuador y en muchos otros países el Lindano ha sido ampliamente sustituido por garrapaticidas organofosforados y carbamatos, a causa de resultar inaceptables los residuos de productos organoclorados en la carne y también en parte como resultado de la competencia que se produjo en el mercado de los acaricidas. En el Ecuador se reportó resistencia a este acaricida en el año 1.966.

La cepa susceptible Saraguro posee una $CL_{50} = 0,002 \pm 0,001$ con una pendiente de 4,056 siendo más sensible que la cepa St. Thomas de Jamaica con $CL_{50} = 0,090$ y una pendiente de 1,770.

Es indudable que existe resistencia al Lindano y que está ampliamente distribuida en el país pues, las cepas: Loja con $CL_{50} = 0,033 \pm 0,037$ y una pendiente de 2,013, Celica con $CL_{50} = 0,028 \pm 0,02$ y una pendiente de 2,566, Pallatanga con $CL_{50} = 0,019 \pm 0,050$ y una pendiente de 5,375, María Auxiliadora con $CL_{50} = 0,018 \pm 0,009$ y una pendiente de 7,600 y finalmente Caluma con $CL_{50} = 0,018 \pm 0,010$ y una pendiente de 2,982 poseen factores de resistencia de 16,5x, 14,0x, 9,5x, 9,0x, respectivamente. Estos factores de resistencia posiblemente deben haber sido más altos y los actuales son consecuencia del abandono del uso del Lindano como garrapaticida; es conocido el fenómeno de reversión de la resistencia para este compuesto cuando se lo deja de usar (Rawling and Mansingh, 1978a). Una reversión similar de la resistencia al Lindano fue reportada por Keiding (1953) en poblaciones de campo de Musca doméstica. Es interesante anotar que la resistencia al Lindano, cuando se presenta, está caracterizada por valores de resistencia altos. Por ejemplo, en Jamaica donde se lo usó regular, pero moderadamente durante dos décadas, se encuentran cepas tales como la Waller Field con factor de resistencia de 226,6x, la

Papine con 147,0x, la Omeara con 49,0x y la St. Kitts con 31,0x.

Aunque las cepas ecuatorianas de B. microplus muestran resistencia al Lindano y cierta tolerancia a los 3 garrapaticidas organofosforados de más uso en el país, debido a las actuales condiciones en que se desenvuelve la ganadería bovina, especialmente en la Costa y el Oriente, probablemente pasarán algunos años antes de que estas cepas alcancen niveles altos de resistencia, tales como los encontrados en Australia; y aún niveles no muy altos como los de Argentina, Brasil e incluso Jamaica.

El tipo predominante de ganado en la Costa es el criollo o las cruza de cebú con criollo, que son más resistentes a las garrapatas que las razas europeas especializadas, y no permiten por lo tanto el incremento de las poblaciones a niveles que hagan imprescindible la intensificación de la presión de acaricidas para efectuar un buen control. El Oriente ha sido poblado con cruza de ganado criollo con cebú, o con Holstein trasladado de la Sierra, observando que el centro Oriente tiene un sistema de pastoreo que consiste en amarrar al ganado durante el día y encerrarlo o situarlo cerca de las viviendas por la noche, tipo de manejo que hace que las garrapatas grávidas que se desprenden en mayor número entre las 5:00 a.m. y 9:00 a.m. sean presas de las aves de corral, limitando de esta manera el aumento de las poblaciones. En la parte Norte y Sur hay ganaderías que en su gran mayoría son pequeñas y los animales, por decirlo así, están casi siempre a la vista del dueño; los tratamientos con garrapaticidas son esporádicos, pues la alta pluviosidad de la zona obra como factor de control, al impedir la eclosión de las larvas debido a la prolongada inmersión de los huevos.

La situación tiende a cambiar radicalmente con la importación a la costa de razas europeas especializadas y con el aumento de ganaderías en el Oriente, la desforestación para implantarlas y la consecuente disminución del régimen de lluvias. Entre las desven-

* Hexacloruro de Benceno.

tajas conque tropiezan estas razas en los trópicos, está la de que son altamente susceptibles a las garrapatas, lo que lógicamente ocasionará un aumento de poblaciones de campo y en consecuencia se necesitarán mayores cantidades de garrapaticidas para controladas, predisponiendo a la aparición de cepas resistentes. Un ejemplo de lo expuesto es el record cronológico del hallazgo de la resistencia a los compuestos organofosforados en Australia, donde se observó la amenazadora rapidez con que B. microplus se adaptó a la presión selectiva de los nuevos acaricidas. Es trágico el hecho de que un alto nivel de resistencia se demostró en el campo 7 años después de la introducción del primer compuesto organofosforado; y que menos de 3 años después de que los garrapaticidas que solucionaron este problema, Dursban y bromophos-cetyl fueron introducidos, B. microplus nuevamente respondió al desafío desarrollando resistencia a ellos. El problema en Australia se complica más aún por la renuencia de los ganaderos a desarrollar razas de ganados mezclas de Bos indicus con Bos taurus, que ayuda a mantener un bajo nivel de poblaciones de garrapatas. Existe mucho perjuicio en contra del ganado cebú por un lado, y por otro, consideran inaceptable que el tipo de ganado a usarse en un ambiente determinado sea dictado por un parásito.

El control de B. microplus es necesario por dos razones principales: 1) evitar pérdidas de carne y leche en el ganado por efecto directo de la garrapata y, 2) prevenir la enfermedad clínica en el ganado por la infección con Babesia bobis (= Argentina), Babesia bigemina y Anaplasma marginale. En el Ecuador este control reside exclusivamente en la aplicación de garrapaticidas sobre el ganado, práctica que como dijo anteriormente, deberá de ejecutarse con mayor frecuencia si el ganado es altamente susceptible a la infestación. Entonces, es incuestionable que si no se desea desperdiciar los esfuerzos y dinero de los ganaderos tendientes a propender el desarrollo de ganaderías lecheras en las zonas cálidas, actividad acorde con las metas a cumplir por el gobierno

en el plan de desarrollo 1.980 - 84, debe implementarse un programa que contemple el control eficaz y racional de B. microplus mediante:

- 1) La continuación de la vigilancia para detectar la aparición de cepas resistentes a los acaricidas.
- 2) La realización de pruebas cuyos resultados conduzcan al conocimiento de la significación que tienen los factores de resistencia en la eficacia de los garrapaticidas en condiciones de campo.
- 3) La supervisión y el asesoramiento permanente que hagan posible el manejo correcto de los baños garrapaticidas y su optimización, evitando así cambios periódicos innecesarios que acortarán su vida efectiva.
- 4) La utilización del gran potencial genético que ofrece el ganado criollo, en la selección de razas con una producción aceptable de carne y leche, que conserven al mismo tiempo los niveles de resistencia a B. microplus y a los hemoparásitos que transmite.

RESUMEN

Con el objeto de conocer la respuesta a 3 garrapaticidas organofosforados y un clorinado, se realizaron 1.444 pruebas de susceptibilidad in vitro con 33 cepas de Boophilus microplus de diferentes lugares del Ecuador, de las que 17 fueron seleccionadas como las más representativas. De todas las cepas estudiadas, la Saraguro fue la más susceptible, por lo que los valores de su CL50 se tomaron como base para calcular los factores de resistencias (FR). Sin embargo, con el fin de comparar la situación del Ecuador con la de Australia, país que presenta los mayores problemas de resistencia, las conclusiones finales se hicieron partiendo de los FR calculados en relación con la CL50 de la Yeerongpilly.

De una manera general, se considera que 5 cepas ecuatorianas de B. microplus poseen resistencia al Lindano con FR de 16,5x, 14,0x, 9,5x, 9,0x y 9,0x, respectivamente.

En lo referente a los compuestos organofosforados, la cepa Sucúa mostró los FR más altos, así: Asuntol 4,0x, Dursban 3,6x, y Bromophos Ethyl 6,7x, calculando con la Saraguro; y Asuntol 1,81x, Dursban 3,6x y Bromophos Ethyl 2,0x, calculando con la Yeerongpilly. Por lo tanto se considera que hay una tolerancia o "resistencia baja" a los compuestos organofosforados. Llama la atención que los FR de las cepas ecuatorianas al Bromophos Ethyl sean más altos que los FR al Dursban, pues en Australia sucede lo contrario con cepas caracterizadas toxicológicamente y bioquímicamente, como Mt. Alfort, Biarra, Riedgeland, Gracemere, Mackay y Silkwood.

Se recomienda tomar urgentes medidas para evitar o demorar el desarrollo de la resistencia, pues con la introducción de ganado europeo altamente susceptible a las garrapatas, aumentarán las poblaciones de campo y también la presión selectiva de los garrapaticidas.

SUMMARY

Three organophosphates and one chlorinated hydrocarbon were tested against 33 strains of *Boophilus microplus* from Ecuador, in order to observe their resistance spectra to these chemicals. 17 strains were selected as the most representatives. The CL50 values showed that the Saraguro strain was the most susceptible, even more than the Yeerongpilly strain of Australia and the resistant factors (RF) were calculated on their basis. But, for the sake of comparison and standardization the general conclusions on their significance, were drawn from the RF calculated with reference to the LC50 values of the Yeerongpilly, taking into account that at least eight distinct strains of *B. microplus* in Australia now show resistance to a variety of organophosphate and carbamate acaricides.

Generally, it is stated that 5 strains of *B. microplus* are resistant to Lindane revealing RF of 16,5x, 14,0x, 9,5x, 9,0x, and 9,0x respectively.

Regarding to the organophosphates, the Sucua strain showed the highest RF, so: Coumaphos 4,0x, chlorpyrifos 3,6x and Bromophos-ethyl 6,7x, this in relation to the Saraguro strain; and Coumaphos 1,81x, Chlorpyrifos 3,6x and Bromophos-ethyl 2,0x, in relation to the Yeerongpilly. Thus, it is considered that this condition may be attributed to "strain-specific" vigor tolerance or, at best to 'low resistance'. Amazingly, the RF of the equatorial strains to Bromophos-ethyl were higher than the RF to Chlorpyrifos, resistant spectra different from the Australian Mt. Alfort, Biarra, Gracemere, Ridgeland, Mackay and Silkwood strains, as they all have RF higher to Dursban than to Bromophos-ethyl.

Various recommendations are given in order to prevent or delay selection for resistance to the organophosphates. With the introduction of European cattle to tick infested areas of Ecuador, the tick population will increase and, correspondingly the selection pressure, because higher amounts of acaricides will be needed to control the tick.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Claudio Cañizares, Presidente del Comité Nacional de UNESCO, por su interés en el desarrollo y culminación de esta investigación.

A los Dres. R. O. Drummond y J.R. Mullen, del Dep. de Agricultura de los Estados Unidos y de la Universidad de Auburn, Alabama, respectivamente, por su invaluable colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

BIBLIOGRAFIA

Drummond, R.O. 1977. Resistance in ticks and insects of veterinary importance. Pesticide management and insecticide resistance, 302 - 319. Academic press, inc., New York.

- FAO. 1971. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Plant Prot. Bull. 19, 15 - 18.
- Finney, D. J. 1964. Probit Analysis. Cambridge University press. third edition. 318pp.
- Grillo-Torrado, J. M., y Gutiérrez, R. O. 1970. Fósforo-resistencia de una cepa Argentina de garrapata Boophilus microplus - su medición. Rev. Med. Vet. (Buenos Aires) 51, 113 - 125.
- Grillo-Torrado, J. M., Gutiérrez, R. O., y Arriete, A. P. 1972. El "factor de resistencia" en larvas de la garrapata Boophilus microplus (Can.) Lah. a los compuestos órgano-fosforados. Su significación en la eficacia de los garrapaticidas. Rev. Invest. Agropecu. Ser. 9, 25 - 35.
- Keiding, J. 1953. Development of resistance in the field and study of resistance. Proc. 9th Int. Congr. Entomol. 2, 360 - 5.
- Loor, K., A. 1966. Identificación específica de Ixodides parásitos de bovinos en el Ecuador. Tesis Doctoral, Universidad Técnica de Manabí.
- Mullen, G.R. 1981. Comunicación personal.
- Nuñez, J. L., Pugliese, M.E., y Shaw, R.D. 1972. Boophilus microplus Can. Pruebas de susceptibilidad in vitro con veinte cepas Argentinas. Rev. Med. Vet. (Buenos Aires) 56, 37 - 43.
- Rawlins, S.C. and Mansingh, A. 1978a. Acaricidal susceptibility of five strains of Boophilus microplus from four Caribbean countries. J. Econ. Ent. 71, 142 - 144.
- Rawlins, S.C. and, Mansingh, A. 1978b. Patterns of resistance to various acaricides in some Jamaican populations Boophilus microplus. J. Econ. Entomol. 71, 956 - 960.
- Schnitzerling, H. J., Schuntner, C.A., Roulston, W. J., and Wilson, W. J., 1974. Characterization of organophosphorus-resistant Mt. Alfort, Gracemere and Silkwood strains of the cattle tick, Boophilus microplus. Aust. Biol. Sci. 27 397 - 408.
- Shaw, R.D., 1966. Culture of an organophosphorus-resistant strain of Boophilus microplus (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. Bull. Entomol. Res. 56, 389 - 405.
- Stone, B.F., and Haydock, K. P. 1962. a method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick Boophilus microplus (Can.). Bull. Entomol. Res. 53, 563 - 578.
- Stone, B. F. 1972. The genetics of resistance by ticks to acaricides. Aust. Vet. J. 48, 345 - 350.
- Wharton, R. H. 1967. Acaricide resistance and cattle ticks control. Aust. Vet. J. 43, 394 - 399.
- Wharton, R.H., and Roulston, W. J. 1970. Resistance of ticks to chemicals. Annu. Rev. Entomol. 15, 381 - 404.
- Wharton, R.H., and Roulston, W. J. 1976. Acaricide resistance in Boophilus microplus in Australia. Proceedings of the hemoparasite Workshop, Cali, Colombia 1975 Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical (Mimeografiado).