



Un efecto novedoso del extracto acuoso de semillas de *Pimpinella anisum* sobre garrapatas de perros domésticos (*Canis lupus familiaris*)



William Fernando Vázquez-Tec ^{a,c}

Sara Luz Nahuat-Dzib ^b

Julia Cano-Sosa ^c

Lorena Reyes-Vaquero ^d

Edgar E. Lara-Ramirez ^e

Benjamín Abraham Ayil-Gutiérrez ^f

Angel Virgilio Domínguez-May ^{a*}

^a TecNM. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán (ITSSY). Carretera Muna-Felipe Carrillo Puerto, tramo Oxkutzcab-Akil Km 41+400, Oxkutzcab, 97880, Yucatán, México.

^b TecNM, Campus Mérida. Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica. Yucatán, México.

^c Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Subsede Sureste. Yucatán, México.

^d CONAHCYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Subsede Sureste. Yucatán, México.

^e Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica, Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica. Tamaulipas, México.

^f CONAHCYT, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Biotecnología Vegetal. Tamaulipas, México.

*Autor de correspondencia: adominguez@suryucatan.tecnm.mx

Resumen:

Los pesticidas sintéticos utilizados para combatir las garrapatas pierden su eficacia contra determinadas especies y pueden afectar la salud humana. En el presente estudio se evaluó *in vitro* e *in vivo* el efecto del extracto acuoso de semillas de *Pimpinella anisum* (*P. anisum*) contra *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes affinis*, garrapatas del perro doméstico. En las evaluaciones *in vitro* se aplicaron directamente a las garrapatas concentraciones de 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 % del extracto acuoso de *P. anisum*. Las concentraciones que provocaron mayor efectividad en la inmovilización fueron 50%, 75% y 100%, pero esta última provocó una inmovilización por mayor tiempo (55.89 ± 0.16 min). En la evaluación *in vivo*, el extracto acuoso concentrado se aplicó sobre garrapatas adheridas a la piel de perros domésticos. Se utilizó Amitraz, un garrapaticida comercial, como testigo positivo. Tanto el extracto acuoso concentrado como el Amitraz provocaron el 100 % del desprendimiento de garrapatas. Sin embargo, el extracto acuoso concentrado de semillas de *P. anisum* fue más efectivo para reducir el tiempo promedio de desprendimiento de las garrapatas (60.81 ± 3.17 min) en comparación con el garrapaticida comercial Amitraz (145.12 ± 15.97 min). Esta investigación sugiere que el p-anisaldehído identificado en el extracto acuoso podría estar relacionado con la inmovilización y desprendimiento de *R. sanguineus* e *I. affinis* de los perros domésticos, lo que sugiere que este extracto podría usarse como biopesticida para controlar las garrapatas en perros domésticos.

Palabras clave: Biopesticida, garrapatas, inmovilización, perros domésticos, *in vitro*, *in vivo*

Recibido: 31/10/2022

Aceptado: 26/12/2023

Introducción

Las garrapatas de la familia Ixodidae son artrópodos hematófagos de distribución mundial, que parasitan diversas especies de mamíferos, aves y reptiles. Cuando estos ectoparásitos se alimentan de su hospedero (diversos animales domésticos y silvestres, incluido el humano), pueden transmitir microorganismos patógenos como bacterias, virus, protozoarios y helmintos^(1,2).

Las garrapatas son plagas que se consideran económicamente perjudiciales en el ganado y en otras especies de animales, ya que pueden ocasionar cuadros de anemia grave y pérdida de peso⁽³⁾. Los perros que habitan en zonas rurales y urbanas son hospederos de la especie *R. sanguineus*. Estas garrapatas pueden encontrarse en regiones tropicales y subtropicales,

adaptándose a condiciones intradomiciliarias⁽⁴⁾. *Ixodes affinis* es una especie que también es común en perros y gatos en todo el mundo⁽⁵⁾.

El uso de pesticidas sintéticos ocasiona daño al medio ambiente y es un peligro para la salud^(6,7); sin embargo, en los últimos años se han estado buscando alternativas para controlar las plagas sin contaminar el medio ambiente; una de ellas es el uso de plantas con capacidades para el control de insectos o ácaros.

El uso de plantas medicinales es una práctica que se ha utilizado desde la antigüedad y ha contribuido al origen de la medicina moderna⁽⁸⁾. Numerosas plantas medicinales contienen metabolitos secundarios y pigmentos, entre otros componentes que son tóxicos contra varios microorganismos. Se ha reportado que los fitoquímicos aislados de plantas medicinales son clave para la generación de biopesticidas; además de ser considerados menos tóxicos y de fácil degradación^(9,10). En los últimos años la aplicación de extractos y aceites esenciales de especies vegetales se han convertido en nuevas alternativas como pesticidas amigables con el medio ambiente, con el propósito de limitar el uso de pesticidas sintéticos en el sector agrícola^(7,11).

Entre las especies de plantas que se usan para el combate de plagas se encuentra *Pimpinella anisum*⁽¹²⁾, comúnmente conocida como anís, anís verde o badiana⁽¹³⁾, pertenece a la familia Umbelliferae actualmente denominada Apiaceae y ha sido utilizada en la medicina tradicional como carminativo, aromático, desinfectante y galactogogo. Las semillas de *P. anisum*, presentan actividad antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anticonvulsiva, relajante muscular, analgésico, efecto hipoglucémico⁽¹⁴⁾, también se ha reportado que tiene actividad insecticida⁽¹⁵⁾. El aceite esencial de las semillas de esta especie vegetal, ha demostrado tener un efecto letal contra *Tribulium castaneum*⁽¹²⁾, actividad repelente contra adultos de *Culex pipiens*⁽¹⁶⁾ y es tóxico contra *Daphnia magna*⁽¹⁷⁾. Estudios recientes demostraron que el aceite de las semillas de *P. anisum* presenta actividad acaricida contra *Tetranychus urticae*⁽¹⁸⁾; en cuanto el extracto acuoso y metanólico presentan actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*⁽¹⁹⁾ y *Escherichia coli*⁽²⁰⁾, respectivamente. En las semillas de *P. anisum* se han identificado compuestos como el *trans*-anetole, metil chavicol, anisaldehído, estragol, y γ -hymachalen⁽¹⁴⁾, y en el aceite esencial se ha identificado *p*-anisaldehído⁽¹⁴⁾, este es un compuesto que ocasiona efectos de inmovilización, repelencia y mortalidad en insectos como *Haematobia irritans irritans* (L.) y *Musca domestica* L. y la respuesta de su aplicación depende del estado de desarrollo en estos insectos^(21,22,23). De acuerdo con los antecedentes y efectos causados por la especie *P. anisum* en contra de otros insectos, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del extracto acuoso de semillas de *P. anisum* contra garrapatas que atacan comúnmente a los perros domésticos, con el fin de disminuir el uso de insecticidas sintéticos no amigables con el medio ambiente.

Material y métodos

Material biológico

Las semillas de *P. anisum* se obtuvieron de la casa comercial Granos y semillas Yael, ubicada en la calle 52 No. 540 y 67, Centro, Mérida, Yucatán, las cuales se encontraban deshidratadas.

Preparación del extracto acuoso de semillas de *P. anisum*

El extracto acuoso de semillas de *P. anisum* concentrado, se obtuvo a partir de 50 g de semillas, las cuales se trituraron en un molino manual (marca Del Rey) para obtener partículas de 1.5 mm de diámetro en promedio. Se realizó la decocción de las semillas utilizando 12.5 g en 1 L de H₂O purificada (marca Bonafont®) a 90 °C. El tiempo de cocción fue de 20 min. Finalmente, el extracto acuoso obtenido se mantuvo en frascos de color ámbar y se conservó bajo condiciones de refrigeración a 4 °C hasta su uso. Posteriormente el extracto acuoso concentrado se diluyó con H₂O purificada (Bonafont®) preparándose concentraciones de 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 % y el extracto acuoso concentrado 100 %. Se utilizó como testigo negativo el H₂O purificada y para el testigo positivo se empleó el compuesto comercial Combatick® (12.5% de Amitraz), solución insecticida y acaricida, el cual se preparó y aplicó de acuerdo con las indicaciones de la etiqueta del producto (2 ml de la solución por 1 L de H₂O).

Bioensayo de toxicidad

Para determinar la toxicidad del extracto acuoso de semillas *P. anisum*, se realizó el ensayo de toxicidad en *Artemia salina* (White Mountain, Great Salt Lake, Utah, USA), los quistes se incubaron en agua de mar filtrada por 24 h, a una temperatura de 29 ± 4 °C, con aireación constante⁽²⁴⁾.

Los bioensayos se realizaron en placas de 24 pozos. Por dilución serial se prepararon cuatro concentraciones (0.0005, 0.05, 5, 500 µg/ml) del extracto acuoso de semillas de *P. anisum*. En cada pozo se colocaron 10 nauplios de *A. salina*. Como control negativo se usó H₂O de mar filtrada sin extracto. Todos los tratamientos se analizaron por quintuplicado. Las placas se incubaron a 29 ± 4 °C por 24 h; después de este tiempo se observaron bajo microscopio estereoscópico (SMZ800, Nikon) y se contó el número de nauplios vivos. Se consideró la mortalidad cuando después de 10 seg no se observó ningún movimiento. Se calculó el porcentaje de mortalidad y la dosis letal media (LC₅₀). Para considerar si el extracto vegetal es tóxico se siguieron los criterios de toxicidad propuesto por Clarkson *et al*⁽²⁵⁾: no tóxico cuando LC₅₀ >1,000 µg/ml, toxicidad baja 500 < LC₅₀ <1,000 µg/ml, toxicidad moderada 100 < LC₅₀ <500 µg/ml, y altamente tóxico 0 < LC₅₀ <100 µg/ml.

Recolección de garrapatas en perros domésticos

Fueron recolectadas 270 garrapatas adultas en 10 perros domésticos de distintas razas, edades y sexo, infestados naturalmente y provenientes de los municipios de Ticul (20°23'43"N, 89°32'02"O) y Oxkutzcab (20°18'10"N 89°25'06"O), Yucatán, México; estos animales no recibieron tratamiento previo. Las garrapatas se colocaron en frascos de vidrio con tapa perforada y conservadas en el laboratorio a 29 ± 4 °C por 24 h.

Evaluación *in vitro* en garrapatas

Para la evaluación de toxicidad *in vitro* se utilizó el extracto acuoso concentrado de semillas de *P. anisum* y siete diluciones de este mismo extracto (1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75%) y H₂O purificada como testigo negativo. Para cada uno de los tratamientos se utilizaron 30 garrapatas y una cantidad de 0.5 ml de la solución aplicándola por atomización sobre las garrapatas. Después de 30 min, el porcentaje de garrapatas inmovilizadas (% I) se calculó usando la fórmula:

$$\% I = (N_i/N_T) \times 100$$

Donde: % I= porcentaje de garrapatas inmovilizadas; N_i= número de garrapatas inmovilizadas; N_T= total de garrapatas tratadas.

Evaluación *in vivo* en perros domésticos

Para la evaluación del efecto del extracto acuoso de semillas de *P. anisum* sobre garrapatas en perros domésticos, se utilizó el extracto concentrado. Para este ensayo, el testigo positivo fue el Amitraz, el cual es un acaricida e insecticida comercial y como testigo negativo se empleó agua purificada de la marca Bonafont®. Para la evaluación se incluyeron 12 perros domésticos de diferentes razas, sexo y edades que presentaban problemas de presencia de garrapatas en su cuerpo y se dividieron en tres grupos de cuatro ejemplares caninos cada uno, para la aplicación del producto a evaluar, y el conteo del número de garrapatas presente en cada individuo (Cuadros 1, 2 y 3). Para cada perro se utilizó un volumen de 0.5 ml de extracto concentrado de *P. anisum* y fue aplicado en la oreja izquierda, cola, axilas y en el lomo del animal donde estaban las garrapatas. El Amitraz se aplicó de acuerdo con las indicaciones del productor comercial. Para determinar el tiempo que tardó cada tratamiento en desprender las garrapatas, se esperó hasta que la última garrapata se desprendió por zona de aplicación.

Cuadro 1: Razas de perros infestados de garrapatas en diferentes zonas, tratados con el testigo negativo (H₂O purificada)

Raza	Número de garrapatas por zona				Total de garrapatas
	Oreja izquierda	Cola	Axilas	Lomo	
Chihuahua	6	12	5	12	35
Bichón maltés	5	15	11	11	42
Pastor alemán	5	15	11	11	42
Mestizo (raza mixta)	13	7	12	3	35

Cuadro 2: Razas de perros infestados de garrapatas en diferentes zonas, tratados con extracto acuoso concentrado de *P. anisum*

Raza	Número de garrapatas por zona				Total de garrapatas
	Oreja izquierda	Cola	Axilas	Lomo	
Chihuahua	7	6	11	7	31
Bichón maltés	15	15	12	7	49
Pastor alemán	7	7	8	9	31
Mestizo (raza mixta)	5	16	15	5	41

Cuadro 3: Razas de perros infestados de garrapatas en diferentes zonas, tratados con el testigo positivo (Amitraz)

Raza	Número de garrapatas por zona				Total de garrapatas
	Oreja izquierda	Cola	Axilas	Lomo	
Chihuahua	10	6	7	8	31
Bichón maltés	13	5	14	11	43
Pastor alemán	7	7	8	9	31
Mestizo (raza mixta)	5	16	15	5	41

Identificación de la especie de garrapatas en perros domésticos

La identificación de las 100 garrapatas seleccionadas al azar, tratadas en el laboratorio, así como las que se desprendieron de los perros domésticos después de la aplicación del extracto acuoso y del Amitraz, fue mediante características morfológicas, la forma del hipostoma, capítulo y pedipalpo de cada uno de los ectoparásitos. Las garrapatas se colocaron en una solución de etanol al 70 % durante 8 min, tiempo en el cual las garrapatas permanecieron sin movimiento. Posteriormente se observaron con un microscopio estereoscópico (Stemi 305, Zeiss). La identificación de la especie se realizó tomando como referencia las imágenes de garrapatas publicadas por Lord CC⁽²⁶⁾ y Solís Hernández⁽²⁷⁾.

Identificación de p-anisaldehído en el extracto acuoso de *P. anisum*

Para determinar la presencia de p-anisaldehído, se utilizaron 5 ml del extracto concentrado, el cual se filtró a través de membranas de nylon de 0.22 μM (Thermo Scientific Cat. No. 726-2520). Posteriormente la solución se congeló en un ultracongelador por 3 h (Thermo Fisher Scientific Inc., Model-TSX400D, No 144DT0B01A) y liofilizada (LABCONCO-No cat 77540-00) por 24 h. El producto liofilizado fue resuspendido en 5 ml MeOH (TEDIA-MS1922-001), agitado (Vortex-genie -Serial No G-560) y centrifugado nuevamente por 5 min (Galaxy mini centrifuge – Serial No 1204), obteniendo el sobrenadante. Para el análisis de la muestra se inyectaron 2 μl del sobrenadante en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (Agilent 7890A, Wilmington, Delaware USA), equipado con un detector de ionización de llama de hidrógeno para la identificación de compuestos. La separación de compuestos se realizó con una columna HP5MS (Agilent Technologies, 30 m \times 0.250 mm, 0.25 μm , Cat. No. 190915-435, USA). La temperatura del inyector se ajustó a 250 °C y la temperatura inicial del horno fue de 70 °C durante 3 min, aumentando a 5 °C/min a 250 °C.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los tratamientos *in vitro* e *in vivo* se analizaron con ANOVA de una vía con la prueba de Holm-Sidak mediante el programa de Sigma Plot versión 12.

Resultados

Bioensayo de toxicidad

Los resultados de toxicidad del extracto acuoso de semillas de *P. anisum* mostraron que a una concentración de 500 mg/ml se obtuvo el mayor porcentaje de mortalidad (14.3 %), mientras que con las otras concentraciones no se observó mortalidad (Cuadro 4). La dosis

letal media (LC₅₀) fue de 4645 µg/ml. Con los resultados de toxicidad y LC₅₀ obtenidos y de acuerdo con los criterios de toxicidad propuesto por Clarkson *et al*⁽²⁵⁾, se considera que el extracto acuoso de semillas de *P. anisum* es no tóxico para su uso en caninos.

Cuadro 4: Porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* en presencia del extracto acuoso de semillas de *P. anisum*

Concentración (mg/ml)	Mortalidad (%)
Testigo	0.0
0.0005	2.0
0.05	0.0
5	0.0
500	14.3

Efecto inmovilizador del extracto acuoso de semillas de *P. anisum in vitro*

En el tratamiento *in vitro* se realizó la aplicación por aspersión del extracto acuoso de semillas de *P. anisum* sobre las garrapatas observándose después de 30 min que la concentración de 1.25 % del extracto acuoso no ocasionó efecto sobre la movilidad de las garrapatas. En la concentración de 2.5 % se observó un porcentaje de inmovilización de 16.7 ± 5.8 . En las concentraciones mayores el porcentaje de inmovilización aumentó significativamente, con el 25 % se inmovilizaron más del 96 % del total de garrapatas evaluadas y con las concentraciones de 50, 75 y 100 % de extracto se logró inmovilizar el 100 % de las garrapatas tratadas, sin observarse diferencia significativa en los últimos cuatro tratamientos (Cuadro 5).

El tiempo promedio de inmovilización de las garrapatas fue diferente de acuerdo a cada concentración del extracto acuoso de las semillas de *P. anisum*. Observándose que el extracto acuoso al 2.5 % ocasionó que las garrapatas permanecieran sin moverse 3.00 ± 0.04 min, con 10 % del extracto acuoso el tiempo fue de 14.9 ± 0.21 min; con 50 % el tiempo de inmovilización fue de 45.14 ± 0.07 min. El extracto concentrado 100 %, ocasionó que las garrapatas permanecieran sin moverse por más de 50 min (55.89 ± 0.16 min). El tiempo de inmovilización fue estadísticamente diferente entre cada tratamiento (Cuadro 5).

Cuadro 5: Porcentaje de garrapatas inmovilizadas y tiempo de inmovilización ocasionado por efecto del extracto acuoso de semillas de *P. anisum* bajo condiciones *in vitro*

Concentración del extracto acuoso (%)	Garrapatas inmovilizadas (%)	Tiempo de inmovilización (min)
0	0 ^a	0 ^a
1.25	0 ^a	0 ^a
2.5	16.7±5.8 ^b	3±0.04 ^b
5	43.3±5.8 ^c	10.07±0.13 ^c
10	60±00 ^d	14.9±0.21 ^d
25	96.7±5.8 ^e	28.07±0.07 ^e
50	100±00 ^e	45.14±0.07 ^f
75	100±00 ^e	50.14±0.07 ^g
100	100±00 ^e	55.89±0.16 ^h

^{abcd} Letras diferentes, colocadas como superíndice, indican diferencias significativas. ANOVA de una vía ($P<0.005$).

Efecto *in vivo* del extracto acuoso de semillas de *P. anisum* sobre garrapatas adheridas a perros domésticos

Con la finalidad de demostrar el efecto de las semillas de *P. anisum* sobre garrapatas adheridas a perros domésticos, se evaluó el extracto acuoso concentrado, el cual bajo condiciones *in vitro* ocasionó que las garrapatas quedaran inmovilizadas por más tiempo a diferencia de las diluciones (1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 75 %).

En la comparación de los efectos del control negativo H₂O purificada (Bonafont[®]), el extracto acuoso de semillas de *P. anisum* y el Amitraz como control positivo, se demostró que el agua purificada no desprendió las garrapatas de la piel de los perros domésticos; mientras que el extracto acuoso de semillas de *P. anisum* ocasionó que todas las garrapatas se desprendieran en un tiempo promedio de 60.81 ± 3.17 min, mientras que el Amitraz requirió de 145.12 ± 15.97 min, observándose que el tiempo promedio de inmovilización de las garrapatas de estos tratamientos fue estadísticamente diferente (Cuadro 6). Después del desprendimiento de las garrapatas de los perros domésticos; el extracto acuoso concentrado mantuvo el efecto de inmovilización de éstas en el suelo durante 14.625 ± 1.36 min. Mientras que el Amitraz lo hizo por 44.93 ± 2.38 min (Cuadro 7); observándose diferencia significativa en el tiempo de inmovilización de las garrapatas en el suelo.

Cuadro 6: Efecto del extracto acuoso de semillas de *P. anisum* sobre el tiempo de desprendimiento de garrapatas adheridas a perros domésticos

Tratamientos	Garrapatas desprendidas (%)	Tiempo de desprendimiento del total de garrapatas (min)
Agua purificada	0	0
Extracto acuoso (100%)	100+00	60.813 ± 3.17 ^a
Amitraz	100±00	145.125 ± 15.97 ^b

^{ab} Letras diferentes, colocadas como superíndice, indican diferencias significativas. ANOVA de una vía ($P < 0.005$).

Cuadro 7: Tiempo de inmovilización de las garrapatas después del desprendimiento en los perros domésticos, por efecto del extracto acuoso de semillas de *P. anisum*

Tratamientos	Tiempo promedio de inmovilización del total de garrapatas (min)
Agua purificada	0
Extracto acuoso (100%)	14.625 ± 1.36 ^a
Amitraz	44.938 ± 2.38 ^b

^{ab} Letras diferentes, colocadas como superíndice, indican diferencias significativas. ANOVA de una vía ($P < 0.005$).

Morfología de garrapatas evaluadas

Los análisis morfológicos sugieren que las garrapatas que se inmovilizaron *in vitro*, así como las que se desprendieron de los perros domésticos al aplicarles el extracto acuoso de *P. anisum* y el Amitraz, varían en forma y tamaño del hipostoma, pedipalpo, la forma del capítulo y color. En todas las garrapatas que se evaluaron se contabilizaron cuatro pares de patas, observándose el 80 % de *R. sanguineus* y el 20 % *I. affinis*.

Identificación de compuestos del extracto acuoso de semillas de *P. anisum*

Se identificaron nueve compuestos en el extracto acuoso de semillas de *P. anisum*, p-anisaldehído (4-metoxi benzaldehído), ácido butanoico, benzil alcohol y falcarinol (compuestos con actividad antimicrobiana), fenol (propiedad antioxidante), 2-miristinoil panteteine (compuesto aromatizante), paromomicin (propiedad antileishmaniasis), ácido 10-heptadecen-8-noico, metil ester, (E)- y *d*-mannosa (actividad antiinflamatoria) (Cuadro 8).

Cuadro 8: Compuestos identificados en el extracto acuoso de semillas de *P. anisum* mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

N	Nombre del compuesto	Fórmula	Área (%)	Actividad biológica reportada
1	4-metoxi benzaldehido	C ₈ H ₈ O ₂	0.55	Efecto inmovilizador y repelente ^(21,22,23) Actividad antifúngica ⁽²⁸⁾
2	Ácido butanoico	C ₄ H ₈ O ₂	6.31	Actividad antibacterial ⁽²⁹⁾
3	fenol	C ₆ H ₆ O	0.96	Propiedad antioxidante ⁽³⁰⁾
4	Paromomicin	C ₂₃ H ₄₅ N ₅ O ₁₄	0.04	Tratamiento de <i>Leishmania amazonensis</i> ⁽³¹⁾
5	2-miristinoil panteteine	C ₂₅ H ₄₄ N ₂ O ₅ S	0.02	Propiedad sensorial ⁽³²⁾
6	Benzil alcohol	C ₈ H ₁₀ O ₂	2.62	Inhibe la reproducción de β-hemolítica <i>Streptococcus</i> y <i>Proteus</i> spp ⁽³³⁾
7	Falcarinol	C ₁₇ H ₂₄ O	0.49	Actividad antimicrobacterial ⁽³⁴⁾
8	Ácido 10-heptadecen-8-noico, metil ester, (E)-	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	0.03	Antiinflamatorio ⁽³⁵⁾
9	d-Mannosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.02	Antiinflamatorio ⁽³⁶⁾

Discusión

En la evaluación del extracto acuoso de semillas de *P. anisum* bajo condiciones *in vitro*, se observó como principal efecto la inmovilización de las garrapatas en los perros domésticos. El porcentaje de garrapatas que se inmoviliza y la duración del efecto, dependió del incremento en las concentraciones del extracto acuoso de semillas de *P. anisum*. El efecto de desprendimiento y de inmovilización de las garrapatas al aplicarse el extracto concentrado de *P. anisum* podría deberse al compuesto identificado como p-anisaldehido (4-metoxi benzaldehido).

Así mismo, se demostró que la correlación que existe entre el extracto acuoso y su efecto en este estudio concuerda con resultados publicados, Showler y Harlien⁽²¹⁾, donde evaluaron la actividad del p-anisaldehido en polvo al 98 % de pureza marca sigma, observando que al incrementar la concentración de 0.125 a 2.5 % de este producto, aumentaba el número de adultos inmovilizados de *Haematobia irritans irritans* (L). Showler y Harlien^(22,23) reportaron que el p-anisaldehido presenta efectos letales y repelentes sobre *Musca doméstica*. También se ha demostrado que el incremento de la concentración del p-anisaldehido en polvo, causa mayor mortalidad de larvas de *Amblyomma americanum*; sin embargo, el efecto que generó fue de acuerdo con la técnica de aplicación⁽³⁷⁾. Considerando estos antecedentes, en el

presente estudio se sugiere que el efecto de inmovilización de las garrapatas pudiera ser por la presencia de p-anisaldehído en el extracto acuoso de semillas de *P. anisum*, el cual mientras menos concentrado esté, disminuye la duración de su efecto de inmovilización.

Cuando el extracto acuoso se aplicó sobre garrapatas adheridas a perros domésticos, ocasionó que éstas se desprendieran, lo cual sugiere que el extracto acuoso de semillas de *P. anisum*, genera inmovilización; este efecto ocasiona que las garrapatas se desprendan de la piel de los perros domésticos, al igual que el Amitraz (testigo positivo en este estudio). El Amitraz es un producto ampliamente utilizado para el tratamiento de garrapatas en animales domésticos, desafortunadamente el uso extensivo de este producto ha ocasionado que ciertas especies de garrapatas como la *Rhipicephalus microplus* se vuelva resistente⁽³⁸⁾, además es un producto que puede causar envenenamiento por inhalación y por contacto dérmico⁽³⁹⁾.

En esta investigación se encontró bajo las condiciones aplicadas, que el extracto acuoso de semillas de *P. anisum* desprende las garrapatas adultas de la piel de los perros domésticos al 100 %, teniendo efectos similares al producto comercial Amitraz. Esto significa que el efecto que genere este extracto pudiera relacionarse con la concentración que se utilice, o la técnica de aplicación.

Igualmente, se encontró que el extracto acuoso de semillas de *P. anisum* formulado con 50 g de semillas por litro de agua purificada, no es tóxico para el que lo aplica de acuerdo con los estudios realizados con *A. salina* y con el criterio de Clarkson *et al*⁽²⁵⁾; además, el extracto acuoso de semillas no ocasionó irritación o enrojecimiento de la piel de los perros domésticos.

De acuerdo con los análisis morfológicos, las garrapatas con cuerpo alargado, de color café, con el hipostoma y pedipalpo cortos, así como la forma hexagonal de su capítulo pertenecen a la especie de *R. sanguineus*, las cuales son características que coinciden con datos publicados por Lord CC⁽²⁶⁾. Mientras que las garrapatas con cuerpo redondo, con hipostoma y pedipalpo largos, así como la forma triangular de su capítulo y escudo dorsal, indican que pertenecen al género *Ixodes* o a la especie de *I. affinis*, datos característicos que coincide con ejemplares de *I. affinis* publicados por Solís-Hernández *et al*⁽²⁷⁾.

Aun cuando el extracto oleoso se ha utilizado en algunas publicaciones, esto no limita el evaluar el uso del extracto acuoso de semillas de *P. anisum* como una alternativa sustentable y económica. El propósito de esta investigación fue demostrar que el extracto acuoso de semillas de *P. anisum* también puede funcionar para el tratamiento contra garrapatas, además de que se prepara de forma sencilla y a menor costo, que extraer el aceite esencial de las semillas.

En este trabajo se observó que el extracto acuoso de semillas de *P. anisum* tiene potencial como uso comercial para el control de garrapatas, además es asequible para consumidores de

tipo doméstico. Este estudio es de los primeros que se publican en donde se evalúa el extracto acuoso de semillas de *Pimpinella anisum*.

Conclusiones e implicaciones

El extracto acuoso de semillas de *P. anisum* puede ser una alternativa sustentable para el tratamiento de garrapatas de perros domésticos; este extracto ha demostrado un tiempo de desprendimiento más eficaz que el Amitraz, además de tener un efecto de desprendimiento del 100 % de los ectoparásitos de la piel de los perros domésticos y los mantiene inmovilizados por un determinado tiempo, aunque más corto que el Amitraz. Se demostró que la cantidad de semillas utilizada por litro de agua para la producción del extracto acuoso hace que éste no sea tóxico. Además, este extracto no ocasionó irritación en la zona de aplicación. Se espera que los resultados de esta investigación aporten las bases para realizar futuras investigaciones sobre el extracto acuoso elaborado a partir de las semillas de *Pimpinella anisum* y sea aplicado a otras plagas que aquejan a los seres vivos.

Agradecimientos

Al Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán por el permitir el uso de materiales e instalaciones para la realización de esta investigación, así como también al apoyo brindado por los padres de familia que permitieron evaluar a sus caninos.

Literatura citada:

1. Oteo Revuelta JA. Espectro de las enfermedades transmitidas por garrapatas. Rev Pediatr Aten Primaria 2016;18:47-51.
2. Rodríguez-Vivas RI, Apanaskevich DA, Ojeda-Chi MM, Trinidad-Martínez I, Reyes-Novelo E, Esteve-Gassent MD, *et al.* Ticks collected from humans, domestic animals, and wildlife in Yucatan, Mexico. Vet Parasitol 2016;215:06-113.
3. Jongejan F, Uilenberg G. Ticks and control methods. Rev Sci Tech (International Office of Epizootics) 1994;13:1201-1226.
4. Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Parasit Vectors 2010;3:1-11.
5. Ghosh P, Saleh MN, Sundstrom KD, Lentile M, Little SE. *Ixodes* spp. from dogs and cats in the United States: Diversity, seasonality, and prevalence of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum*. Vector Borne Zoonotic Dis 2021;21:11-19.
6. Muñoz-Quezada MT, Lucero BA. Bioética y justicia ambiental: el caso de presencia de plaguicidas en escolares de comunidades rurales. Acta Bioeth 2019;25(2):161-170.

7. Saroj A, Oriyomi OV, Nayak AK, Haider SZ. Phytochemicals of plant-derived essential oils: A novel green approach against pests. In: Egbuna C, Sawicka B, editors. Natural remedies for pest, disease and weed control. USA: Academic Press; 2020:65-79.
8. Salmerón-Manzano E, Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F. Worldwide research trends on medicinal plants. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:3376.
9. Gupta S, Didwania N. Role of medicinal plants as green pesticides against *Alternaria* blight. *Bulg J Agric Sci* 2021;27:562-568.
10. Kim SI, Park C, Ohh MH, Cho HC, Ahn YJ. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). *J Stored Prod Res* 2003;39:11-19.
11. Raja N, Albert S, Ignacimuthu SE, Dorn S. Effect of plant volatile oils in protecting stored cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. *J Stored Prod Res* 2001;37(2):127-132.
12. Hashem AS, Awadalla SS, Zayed GM, Maggi F, Benelli G. *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*—insecticidal activity and mode of action. *Environ Sci Pollut Res* 2018;25:18802-18812.
13. CONAFOR. Comisión Nacional Forestal. Plantas medicinales de la farmacia viviente del CEFOFOR: usos terapéuticos tradicionales y dosificación. México. 2010.
14. Shojaii A, Abdollahi Fard M. Review of pharmacological properties and chemical constituents of *Pimpinella anisum*. *Int Sch Res Notices* 2012;1-8.
15. Sun W, Shahrajabian MH, Cheng Q. Anise (*Pimpinella anisum* L.), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes. *Cogent Biol* 2019;5(1)1673688.
16. Erler F, Ulug I, Yalcinkaya B. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. *Fitoterapia* 2006;77:491-494.
17. Pavela R. Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *J Asia Pac Entomol* 2014;17:287-293.
18. El-Sayed SM, Ahmed N, Selim S, Al-Khalaf AA, Nahhas NE, Abdel-Hafez SH, *et al.* Acaricidal and antioxidant activities of anise oil (*Pimpinella anisum*) and the oil's effect on protease and acetylcholinesterase in the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Agriculture* 2022;12(224):1-13.

19. Gülçin İ, Oktay M, Kıreççi E, Küfrevioğlu Öİ. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem* 2003;83:371-382.
20. Mohamed HSAA, Abdelgadir WS, Almagboul AZ. *In vitro* antimicrobial activity of anise seed (*Pimpinella anisum* L.). *Int J Adv Res* 2015;3(1):359-367.
21. Showler AT, Harlien JL. Effects of the botanical compound p-Anisaldehyde on horn fly (Diptera: Muscidae) repellency, mortality, and reproduction. *J Med Entomol* 2018; 55(1):183–192.
22. Showler AT, Harlien JL. Lethal and repellent effects of the botanical p-anisaldehyde on *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* 2019;112(1):485-493.
23. Showler AT, Harlien JL. Repellency of p-anisaldehyde against *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the Laboratory. *J Med Entomol* 2021;58(6):2314–2320.
24. Lima RL, Andrade FK, Alves RD, de Moraes SM, Vieira SR. Anti-cetylcholinesterase and toxicity against *Artemia salina* of chitosan microparticles loaded with essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Pelargonium* x spp and *Copaifera officinalis*. *Int J Biol Macromol* 2021;167:1361–1370.
25. Clarkson C, Maharaj VJ, Crouch NR, Grace OM, Pillay P, Matsabisa MG, *et al.* *In vitro* antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa. *J Ethnopharm* 2004;92:177-191.
26. Lord CC. Brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Arachnida: Acari: Ixodidae). University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, EDIS 2001. EENY-221.
27. Solís-Hernández A, Rodríguez-Vivas R, Pérez-Barrera MA, Esteve-Gassent MD, Apanaskevich DA. *Ixodes affinis* (Acari: Ixodidae) en perros de comunidades rurales de Yucatán, México: prevalencia, abundancia y factores asociados. *Vet Méx OA* 2015;2:01-09.
28. Che J, Chen X, Ouyang Q, Tao N. p-anisaldehyde exerts Its antifungal activity against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by disrupting the cell wall integrity and membrane permeability. *J Microbiol Biotechnol* 2020;30(6):878–884.
29. Kennedy GM, Min MY, Fitzgerald JF, Nguyen MT, Schultz SL, Crum MT, *et al.* Inactivation of the bacterial pathogens *Staphylococcus pseudintermedius* and *Acinetobacter baumannii* by butanoic acid. *J Appl Microbiol* 2019;126(3):752-763.
30. Husain N, Gupta S. A critical study on chemistry and distribution of phenolic compounds in plants, and their role in human health. *IOSR Environ Sci Toxicol Food Technol* 2015;1(3):57-60.

31. Coser EM, Ferreira BA, Branco N, Yamashiro-Kanashiro EH, Lindoso JAL, Coelho AC. Activity of paromomycin against *Leishmania amazonensis*: Direct correlation between susceptibility *in vitro* and the treatment outcome *in vivo*. *Int J Parasitol Drug* 2020;14(1):91–98.
32. Zhao Y, Smyth HE, Tao K, Henry RJ, Gilbert RG. Starch molecular structural features and volatile compounds affecting the sensory properties of polished Australian wild rice. *Foods* 2022;11(4):511.
33. Cole LK, Luu DH, Rajala-Schultz PJ, Meadows C, Torres AH. *In vitro* activity of an ear rinse containing tromethamine, EDTA, and benzyl alcohol on bacterial pathogens from dogs with otitis. *AJVR* 2006;67(6):1040-1044.
34. Li H, O'Neill T, Webster D, Johnson JA, Gray CA. Anti-mycobacterial diynes from the Canadian medicinal plant *Aralia nudicaulis*. *J Ethnopharmacol* 2012;140(1):141–144.
35. Ibraheam IA, Hussein HM, Hameed IH. *Cyclamen persicum*: methanolic extract using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique. *Int J Pharm Qual Assur* 2017;8(4):200-213.
36. Torretta S, Scagliola A, Ricci L, Mainini F, Di Marco S, Cuccovillo I, *et al.* D-mannose suppresses macrophage IL-1 β production. *Nat Commun* 2020;11(1):6343-6354.
37. Showler AT, Harlien JL. Botanical compound p-anisaldehyde repels larval Lone Star Tick (*Acari: Ixodidae*), and halts reproduction by gravid adults. *J Med Medical Entomol* 2018;55(1):200–209.
- 38 De La Canal LH, Dall'Agnol B, Webster A, Reck J, Martins JR, Klafke GM. Mechanisms of amitraz resistance in a *Rhipicephalus microplus* strain from southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2021;12:1-6.
39. Bhartiya M, Hans B, Sundaray S, Sagar A. Amitraz poisoning: The not so (un)common poisoning. *Cureus* 2019;11(8):e5438.