



## Invited Review [Revisión invitada]

AVANCES SOBRE EL USO DE OCHO PLANTAS TROPICALES PARA EL CONTROL DE GARRAPATAS Y NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN BOVINOS, EQUINOS Y CANINOS †

[ADVANCES IN THE USE OF EIGHT TROPICAL PLANTS FOR THE CONTROL OF TICKS AND GASTROINTESTINAL NEMATODES IN BOVINES, EQUINES, AND CANINES]

G.J. Flota-Burgos<sup>1</sup>, J.A. Rosado-Aguilar<sup>1\*</sup>, R.I. Rodríguez-Vivas<sup>1</sup>, R. Borges-Argaez<sup>2</sup> and M. Gamboa-Angulo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Carretera Mérida-Xmatkuil Km. 15.5. C.P:97315. Mérida, Yucatán, México. Email.

[alberto.rosadoaguilar@gmail.com](mailto:alberto.rosadoaguilar@gmail.com), [ja.rosado@correo.uady.mx](mailto:ja.rosado@correo.uady.mx)

<sup>2</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 Colonia Chuburná de Hidalgo C.P: 97200 Mérida, Yucatán, México.

\*Corresponding author

## SUMMARY

**Background.** Ticks and gastrointestinal nematodes negatively affect the health, welfare and production of domestic animals. Additionally, some parasites represent a zoonotic potential and have developed acaricidal and anthelmintic resistance to the main drugs used for their control. Due to this, the current interest for the prevention and control of these parasites is focused on the search for control alternatives, emphasizing the use of plant extracts and their secondary metabolites with acaricidal and anthelmintic activity. **Objective.** To present the main advances that have been made on the use of eight tropical plants from the Yucatán peninsula for the control of ticks and nematodes in bovines, equines and canines. **Methodology.** Scientific articles and unpublished works of the studies carried out by the working group of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the Autonomous University of Yucatán and the Scientific Research Center of Yucatán were compiled. The review focused on the use of extracts from eight plants and the active compounds of *Petiveria alliacea* against *Rhipicephalus microplus* larvae and adults, and the compounds of *Diospyros anisandra* against eggs of nematodes of *Ancylostoma caninum*, *Haemonchus placei* and cyathostomins. **Main findings.** Studies on extracts of *Bursera simaruba*, *Caesalpinia gaumeri*, *Casearia corymbosa*, *D. anisandra*, *Havardia albicans*, *P. alliacea*, *Solanum tridynamum* and *S. erianthum*, and demonstrated their acaricidal potential against acaricide-resistant *R. microplus* larvae. *P. alliacea* also showed high percentages of mortality in adult *R. microplus* ticks, as well as oviposition inhibition and hatching inhibition. The acaricidal activity was attributed to the presence of the compounds dibenzyl trisulfide and dibenzyl disulfide, which cause histological damage to the reproductive system of adult females, affecting the oogenesis process. *P. alliacea* also demonstrated broad-spectrum anthelmintic activity against *A. caninum*, *H. placei*, and cyathostomin eggs. In *D. anisandra*, high anthelmintic activity was reported. Its main compound, plumbagin, was attributed the responsibility of this high biological activity, even at very low concentrations. On the other hand, a difference was observed in the acaricidal and anthelmintic activity depending on the part of the plant and the time of collection for both plants. **Implications.** Further studies are required to identify active anthelmintic compounds from *P. alliacea*, to elucidate the mechanisms of action of these compounds, and to explore the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the acaricidal and anthelmintic compounds from both plants for safe and effective *in vivo* studies. **Conclusions.** The extracts of the eight evaluated plants showed high acaricidal activity against *R. microplus* resistant to acaricides. The extracts of *P. alliacea*, *D. anisandra* and their active compounds also present high broad-spectrum anthelmintic activity against nematodes of the order strongylida, for which they represent a potential alternative for control against ticks and nematodes of domestic animals.

**Key words:** acaricide; animals; anthelmintic; control alternative; plants

## RESUMEN

† Submitted April 28, 2023 – Accepted October 6, 2023. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4921>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = J.A. Rosado-Aguilar: <http://orcid.org/0000-0002-4941-9123>

**Antecedentes.** Las garrapatas y los nematodos gastrointestinales (NGI) afectan negativamente en la salud, bienestar y producción de los animales domésticos. Adicionalmente, algunos parásitos representan un potencial zoonótico y han desarrollado resistencia acaricida y antihelmíntica a los principales fármacos empleados para su control. Debido a esto, se han explorado alternativas de control, destacando el uso de extractos de plantas y sus metabolitos secundarios con actividad acaricida y antihelmíntica. **Objetivo.** Presentar los principales avances sobre el uso de ocho plantas tropicales de la península de Yucatán para el control de garrapatas y nematodos de bovinos, equinos y caninos. **Metodología.** Se recopilaron artículos científicos y trabajos inéditos realizados por el grupo de trabajo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán y el Centro de Investigación Científica de Yucatán. La revisión se centró en el uso de extractos de ocho plantas y los compuestos activos de *Petiveria alliacea* contra *Rhipicephalus microplus* y los compuestos de *Diospyros anisandra* contra NGI como *Ancylostoma caninum*, *Haemonchus placei* y ciatostomíneos. **Resultados.** Los estudios sobre los extractos de *Bursera simaruba*, *Caesalpinia gaueri*, *Casearia corymbosa*, *D. anisandra*, *Havardia albicans*, *P. alliacea*, *Solanum tridynamum* y *S. erianthum* demostraron su potencial acaricida contra larvas de *R. microplus* resistentes a acaricidas. *P. alliacea* además demostró altos porcentajes de mortalidad en garrapatas adultas, así como disminución en sus indicadores reproductivos. La actividad acaricida se le atribuyó a los compuestos trisulfuro de dibencilo y disulfuro de dibencilo, los cuales provocan daños histológicos al sistema reproductor de las hembras adultas, afectando el proceso de ovogénesis. *P. alliacea* también demostró actividad antihelmíntica (AH) de amplio espectro contra huevos de *A. caninum*, *H. placei* y ciatostómidos. En *D. anisandra* se demostró también alta AH (ovicida) contra los nematodos previamente mencionados. A la plumbagina se le atribuyó la responsabilidad de la AH, aún a muy bajas concentraciones. Por otra parte, se observó diferencia en la actividad acaricida y AH dependiendo de la parte de la planta y época de colecta para ambas plantas. **Implicaciones.** Se requieren más estudios para la identificación de compuestos activos antihelmínticos de *P. alliacea*, elucidar los mecanismos de acción, y explorar la farmacodinamia y farmacocinética de los compuestos activos de ambas plantas para realizar estudios *in vivo* seguros y eficaces. **Conclusiones.** Los extractos de las ocho plantas evaluadas presentan alta actividad acaricida contra *R. microplus* resistentes a acaricidas. *P. alliacea*, *D. anisandra* y sus compuestos activos presentan además alta AH de amplio espectro contra NGI del orden strongylida, por lo cual representan una potencial alternativa de control contra garrapatas y nematodos de animales domésticos. **Palabras clave:** acaricida; animales; antihelmíntica; alternativa de control; plantas.

## INTRODUCCIÓN

### Importancia de las garrapatas y nematodos gastrointestinales en México

En las regiones tropicales, la eficiencia productiva de los animales domésticos se ve limitada por los daños directos e indirectos ocasionados por garrapatas y nematodos gastrointestinales (Alegría-López *et al.*, 2015; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017a). Dichos agentes patógenos afectan negativamente la salud y bienestar de animales domésticos, como bovinos y equinos, al provocar diversos signos clínicos que incluso pueden derivar en la muerte de los animales (Bowman *et al.*, 2009). La garrapata con mayor importancia en la ganadería bovina es *Rhipicephalus microplus*, en tanto que los nematodos gastrointestinales (NGI) más prevalentes en bovinos y equinos son *Haemonchus* spp. y ciatostomíneos, respectivamente (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017a; Craig *et al.*, 2018; Saeed *et al.*, 2019).

Aunado a lo anterior, las parasitosis por garrapatas y NGI repercuten en la economía de las unidades de producción. En la ganadería bovina de México se han estimado pérdidas económicas anuales de \$US 573,608,076 y \$US 445,096,562.6 que producen la garrapata *R. microplus* y los NGI, respectivamente (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017a). Por otro lado, garrapatas y NGI también afectan a los animales

domésticos catalogados como animales de compañía, como son los perros. Además de ocasionar problemas de salud, tienen impacto en salud pública por su potencial zoonótico. *Rhipicephalus sanguineus* es la principal garrapata que parasita a perros, mientras que *Ancylostoma* spp. es el NGI más prevalente y patógeno. *Ancylostoma* spp. tiene potencial zoonótico al producir síndrome de la *larva migrans* cutánea en humanos (Dantas-Torres *et al.*, 2010; Hawdow y Wise, 2021).

### Situación de la resistencia antiparasitaria en bovinos, equinos y caninos y alternativas de control

Los programas de prevención y control de garrapatas y NGI implican el uso periódico de antiparasitarios de amplio espectro, sin previo diagnóstico y generalizando el tratamiento a toda la población (Fissaha y Kinde, 2021; Dzemo *et al.*, 2023). Este manejo ha derivado en el desarrollo de resistencia acaricida y antihelmíntica hacia las principales familias de antiparasitarios (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018; Kaushlendra *et al.*, 2023). En México, se ha reportado resistencia de *R. microplus* a organofosforados, amidinas, fenilpirazolonas, lactonas macrocíclicas y piretroides sintéticos (Perez-Cogollo *et al.*, 2010; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012). Se han encontrado poblaciones de *R. sanguineus* que presentan resistencia a amitraz, cipermetrina e

ivermectina (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017b; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017c). En el caso de NGI, se ha observado resistencia de *Haemonchus* spp. a la ivermectina en bovinos de Yucatán (Alegría-López *et al.*, 2015), mientras que a nivel mundial existen reportes de resistencia a bencimidazoles, imidazotiazoles, salicilanilidas y lactonas macrocíclicas (Ramos *et al.*, 2019; Kaplan, 2020; Melo *et al.*, 2021). En México la resistencia antihelmíntica de ciatostominos a la ivermectina fue reportada recientemente (Flota-Burgos *et al.*, 2023), sumándose a los reportes internacionales de resistencia a los bencimidazoles, pirimidinas y lactonas macrocíclicas como ivermectina y moxidectina (Nielsen, 2022). Se han encontrado poblaciones de *Ancylostoma caninum* resistente a bencimidazoles y lactonas macrocíclicas (Kitchen *et al.*, 2019; Jimenez-Castro *et al.*, 2021; Jimenez-Castro *et al.*, 2022).

La situación de resistencia antiparasitaria se agrava al existir poblaciones de estos agentes con multi-resistencia a dos o más antiparasitarios (Alegría-López *et al.*, 2015; Kitchen *et al.*, 2019).

Debido a la baja eficacia de los fármacos antiparasitarios actuales, se ha impulsado la búsqueda de alternativas de control, destacando el uso de extractos de plantas y sus compuestos activos con actividad antiparasitaria. Desde tiempos prehispánicos, México ha destacado por el uso de plantas con actividad biológica para el tratamiento de padecimientos en humanos y animales. Derivado de lo anterior, en la actualidad, las plantas y sus productos naturales son utilizados como tratamientos adicionales o alternativos a los productos químicos convencionales, y han servido como una valiosa fuente natural para el desarrollo de nuevas moléculas antiparasitarias (Liu *et al.*, 2020).

El presente artículo recopila una revisión de los principales avances sobre el uso de ocho plantas tropicales y sus compuestos activos como alternativa de control contra garrapatas y NGI de bovinos, equinos y caninos; así también se incluyen las principales problemáticas encontradas y perspectivas a futuro en esta línea de investigación desarrollada en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán en conjunto con el Centro de Investigación Científica de Yucatán.

## PARÁSITOS ESTUDIADOS Y EXTRACTOS VEGETALES EVALUADOS

### a) Garrapatas

Las especies de garrapatas que se han trabajado en esta línea de investigación son *R. microplus* y *R. sanguineus*, provenientes de bovinos y caninos, respectivamente. *Rhipicephalus microplus* es la

principal especie de garrapata que afecta a los bovinos, distribuyéndose en el 53% del territorio mexicano. Las pérdidas económicas que *R. microplus* ocasiona en la ganadería se asocian a la reducción en la producción de carne y leche, daño a las pieles, costos por concepto de prevención, control y mortalidad en los animales afectados, así como daños indirectos debido a la transmisión de agentes infecciosos como *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *B. bovis* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017a; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2018).

*Rhipicephalus sanguineus*, conocida como garrapata café del perro, es la garrapata con mayor distribución a nivel mundial, parasita a los perros y ocasionalmente a otros hospederos incluyendo el humano. Además de la afectación a la salud de los perros parasitados por esta garrapata, es relevante su papel como vector de diversos agentes patógenos, algunos de ellos con potencial zoonótico como *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia conorii* y *Rickettsia rickettsii* (Dantas-Torres, 2010).

### b) Nematodos gastrointestinales

Diferentes géneros de NGI del orden Strongylida han sido utilizados para evaluar la actividad antihelmíntica de extractos de plantas y sus compuestos activos. *Haemonchus* spp. es un NGI que parasita rumiantes. Las prevalencias reportadas en países de América latina llegan hasta 70% (Lobayan *et al.*, 2017). La anemia es el signo característico de esta parasitosis debido a la alimentación hematófaga de los adultos en el abomaso de sus hospederos, también se presenta anorexia, diarrea, síndrome de mala absorción, baja ganancia de peso, retraso en el crecimiento, emaciación que puede llegar a la atrofia de la musculatura esquelética en infecciones crónicas y la muerte del animal en casos graves (Bowman, 2009).

Los ciatostominos, conocidos también como pequeños estróngilos, son un grupo formado por 40 especies clasificadas dentro de 14 géneros. Su prevalencia es de 80 a 100% en caballos de América latina (Pereira y Viana, 2006). Se considera que entre el 75 y 100% de los huevos de NGI expulsados en las heces de equinos pertenecen a los ciatostominos. Los signos clínicos de esta parasitosis son anorexia, síndrome de mala absorción, diarrea, disminución de la ganancia de peso y síndrome abdominal agudo (Bowman, 2009).

*Ancylostoma* spp. es el NGI más prevalente y patógeno en perros (Bowman, 2009). Las prevalencias reportadas en países de América latina van de 38% hasta 65% ((Delgado-Fernández, 2017; Saldanha-Elias *et al.*, 2019; Lyons *et al.*, 2022). Los animales infectados cursan con anemia, anorexia, pobre condición corporal, alteraciones intestinales y, en casos graves, la muerte. Destaca su potencial zoonótico debido a que puede ocasionar el síndrome de

*larva migrans* cutánea en humanos, una erupción cutánea eritematosa e intensamente pruriginosa causada por la migración de la larva L<sub>3</sub> (Gutiérrez *et al.*, 2006; Bowman, 2009).

Las garrapatas y NGI descritos anteriormente son altamente frecuentes en la región donde se desarrolla la presente línea de investigación (sureste de México) y representan un problema serio en la producción y tenencia de animales domésticos.

### c) Plantas, extractos vegetales y compuestos activos

La mayoría de las plantas evaluadas en la línea de investigación de NGI y garrapatas son nativas de la península de Yucatán, con reportes de amplia actividad biológica. En primera instancia, se seleccionaron plantas con propiedades acaricidas e insecticidas mediante búsqueda de literatura en revistas, libros, bases de datos informáticas y entrevistas etnobotánicas. Para la realización de los extractos vegetales se tomaron en consideración variables como estadio de desarrollo del parásito, la época de colecta y diferentes estructuras vegetales de la planta. Los extractos de las plantas fueron obtenidos utilizando metanol (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010a; Rosado-Aguilar *et al.*, 2010b).

En el avance de la línea de investigación, las plantas que mostraron alta actividad acaricida se fueron seleccionando para su evaluación contra NGI, considerando de igual forma la época de colecta y estructuras vegetales. De los extractos vegetales con mayor eficacia se identificaron y evaluaron sus compuestos secundarios con el objetivo de determinar cuáles eran los compuestos responsables de su actividad biológica.

Los extractos vegetales que han sido evaluados contra garrapatas y NGI se presentan en la tabla 1. En la tabla 2 se pueden observar los avances en el estudio de compuestos activos y su actividad contra garrapatas y NGI.

## INVESTIGACIÓN *IN VITRO*: TÉCNICAS EMPLEADAS Y CONSIDERACIONES

A continuación, se mencionan las principales pruebas *in vitro* que se han empleado en el estudio de plantas como alternativa de control contra garrapatas y NGI.

### a) Garrapatas

Los extractos de plantas y sus compuestos activos pueden ser evaluados en las fases larvianas o adultas de las garrapatas. La actividad acaricida en las larvas de

garrapatas se ha evaluado a través de la prueba de paquete de larvas (*larval packet test*) y/o la prueba de inmersión larval (*larval immersion test*), con modificaciones para mejorar su uso y permitir una mayor repetibilidad (Rosado-Aguilar *et al.*, 2017c). Para el caso de garrapatas adultas se utiliza la prueba de inmersión de adultas. Esta técnica ha permitido evaluar la tasa de mortalidad, la tasa de oviposición y la inhibición de la eclosión larval (Rosado-Aguilar *et al.*, 2017c).

En las pruebas antes descritas, se han considerado las condiciones ambientales *in vitro* brindadas a las garrapatas colectadas y su progenie (temperatura y humedad) a fin de evitar que las condiciones macroambientales adversas interfieran con la actividad biológica normal de las garrapatas y muestren un falso efecto del extracto sobre las mismas. Además, debe considerarse la elección de un disolvente que garantice la inocuidad para los organismos a evaluar y la completa disolución del material vegetal. Rosado-Aguilar *et al.* (2008) evaluaron Tween 20 (2%), metanol (95%) y dimetilsulfóxido (2.5%) como disolventes del extracto crudo de *Diospyros anisandra*, reportando que Tween 20 (2%) fue el mejor disolvente que cumplió con lo mencionado previamente, reflejándose en una mayor mortalidad de las larvas (79%).

Los extractos crudos de las plantas han sido evaluados a diferentes concentraciones (p. ej. 20%, 10%, 5% y 2.5%) con la finalidad de obtener las dosis-respuestas y las concentraciones letales al 50% y 99% (CL<sub>50</sub> y CL<sub>99</sub>, respectivamente) por medio de la metodología Probit. En *P. alliacea* se han identificado y evaluado diferentes compuestos de manera individual al 1%, y en combinación a las siguientes concentraciones: 0.325% de disulfuro de dibencilo, 0.631% de trisulfuro de dibencilo, 0.0003% de *cis* estilbena, 0.028% de éster metílico de ácido hexadecanoico, 0.004% de éster metílico de ácido octadecanoico y 0.007% de éster metílico de ácido octadecadienoico (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010b; Arceo-Medina *et al.*, 2016).

### b) Nematodos gastrointestinales

Los extractos de plantas y sus compuestos activos pueden ser evaluados en contra de NGI en las fases de adultos, larvas y huevos. Los estudios de actividad antihelmíntica presentados en esta revisión han sido sobre huevos de *Ancylostoma* spp., *Haemonchus placei* y ciatostominos, empleando la prueba de inhibición de la eclosión (*Egg Hatch Inhibition*). Esta técnica ha permitido clasificar el efecto observado en actividad ovicida y larvas L<sub>1</sub> que fallan en la eclosión (Flota-Burgos *et al.*, 2017; Flota-Burgos *et al.*, 2020a).

**Tabla 1. Plantas evaluadas como alternativa de control contra garrapatas y nematodos gastrointestinales de animales domésticos.**

Parásito	Planta	Referencias
<i>R. microplus</i> (larvas)	<i>Petiveria alliacea</i> L. (Phytolaccaceae)	Rosado-Aguilar <i>et al.</i> , 2008
	<i>Havardia albicans</i> Kunth (Fabaceae)	Rosado-Aguilar <i>et al.</i> , 2010a
	<i>Caesalpinia gaumeri</i> Greenm (Fabaceae)	Rosado-Aguilar <i>et al.</i> , 2013
	<i>Diospyros anisandra</i> S.F. Blake ( Ebenaceae)	Arceo-Medina <i>et al.</i> , 2017
	<i>Capraria biflora</i> L. (Scrophulariaceae)	Rosado-Aguilar <i>et al.</i> , 2017a
	<i>Solanum tridynamum</i> Dunal (Solanaceae)	
	<i>Bursera simaruba</i> L. ( Burseraceae)	
	<i>Solanum erianthum</i> D. Don (Solanaceae)	
	<i>Spondias purpurea</i> L. (Anacardiaceae)	
	<i>Ocimum micranthum</i> Wild (Lamiaceae)	
	<i>Parthenium hysterophorus</i> L. (Asteraceae)	
	<i>Casearia corymbosa</i> Kunth (Salicaceae)	
	<i>Clusia flava</i> Jacq (Clusiaceae)	
	<i>Sapindus saponaria</i> L. (Sapindaceae)	
	<i>Tabebuia guayacan</i> Jacq. (Bignoniaceae)	
	<i>Annona reticulata</i> L. (Annonaceae)	
	<i>Solanum melongena</i> L. (Solanaceae)	
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae)		
<i>R. microplus</i> (adultas)	<i>Petiveria alliacea</i>	Rosado-Aguilar <i>et al.</i> , 2010b
	<i>Diospyros anisandra</i>	Rosado-Aguilar <i>et al.</i> , 2017a
	<i>Havardia albicans</i>	
<i>R. sanguineus</i> (larvas)	<i>Caesalpinia gaumeri</i>	
	<i>Diospyros anisandra</i>	Arjona-Cambranes <i>et al.</i> , 2016a
	<i>Casearia corymbosa</i>	Rosado-Aguilar <i>et al.</i> , 2017b
<i>Ancylostoma</i> spp. (huevos)	<i>Bursera simaruba</i>	
	<i>Petiveria alliacea</i>	Arjona-Cambranes <i>et al.</i> , 2016b
	<i>Diospyros anisandra</i>	Flota-Burgos <i>et al.</i> , 2020a
<i>Haemonchus placei</i> (huevos)	<i>Casearia corymbosa</i>	Flota-Burgos <i>et al.</i> , 2020b
	<i>Bursera simaruba</i>	
	<i>Petiveria alliacea</i>	Flota-Burgos <i>et al.</i> , 2020a
Ciatostominos (huevos)	<i>Diospyros anisandra</i>	Flota-Burgos <i>et al.</i> , 2020b
	<i>Casearia corymbosa</i>	
	<i>Bursera simaruba</i>	
Ciatostominos (huevos)	<i>Petiveria alliacea</i>	Flota-Burgos <i>et al.</i> , 2017
	<i>Diospyros anisandra</i>	Flota-Burgos <i>et al.</i> , 2020a
	<i>Casearia corymbosa</i>	Flota-Burgos <i>et al.</i> , 2020b
	<i>Bursera simaruba</i>	

**Tabla 2. Compuestos activos de plantas evaluados contra de garrapatas y nematodos gastrointestinales de animales domésticos.**

Parásito	Compuesto activo	Referencias
<i>R. microplus</i> (larvas y adultas)	Disulfuro de dibencilo <sup>a</sup>	Rosado-Aguilar <i>et al.</i> , 2010b
	Trisulfuro de dibencilo <sup>a</sup>	Arceo-Medina <i>et al.</i> , 2016
	<i>Cis</i> -estilbeno <sup>a</sup>	Arceo-Medina <i>et al.</i> , 2017
	Éster metílico de ácido hexadecanoico <sup>a</sup>	Arceo-Medina <i>et al.</i> , 2020
	Éster metílico de ácido octadecanoico <sup>a</sup>	
	Éster metílico de ácido octadecadienoico <sup>a</sup>	
<i>Ancylostoma</i> spp. <i>Haemonchus placei</i> Ciatostominos (huevos)	Combinaciones de los compuestos activos <sup>a</sup>	
	Plumbagina <sup>b</sup>	Flota-Burgos <i>et al.</i> , 2020b
	Betulina <sup>b</sup>	
	Lupeol <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> Compuestos activos provenientes de *Petiveria alliacea*; <sup>b</sup> Compuestos activos provenientes de *Diospyros anisandra*

Similar a la evaluación *in vitro* sobre garrapatas, destaca la importancia del disolvente. Un disolvente inadecuado puede ocasionar toxicidad, generando falsos positivos o enmascarando el verdadero efecto (D'Angelo *et al.*, 2014; Chagas, 2015). Flota-Burgos *et al.* (2020a; 2020b) mencionan que la adición del 5% de etanol absoluto y el uso de un baño ultrasónico aseguró la dilución total del extracto de *Petiveria alliacea* y potencializó su efecto sobre huevos de NGI en comparación con estudios previos del mismo extracto (Arjona-Cambranes *et al.*, 2016b).

### INVESTIGACIÓN *IN VIVO*: TÉCNICAS EMPLEADAS Y CONSIDERACIONES

El objetivo de identificar extractos de plantas y sus compuestos activos con actividad acaricida y antihelmíntica es lograr la aplicación práctica de estos productos. Los estudios *in vivo* constituyen un paso indispensable y, muchas veces, la etapa de la investigación más compleja de realizar.

#### a) Garrapatas

Los extractos de plantas y sus compuestos activos no han sido evaluados de forma *in vivo* en las investigaciones realizadas en el sureste de México. Rosado-Aguilar *et al.* (2017c) mencionan que los resultados obtenidos en condiciones *in vitro* demuestran la actividad acaricida de los extractos y sus compuestos activos. Sin embargo, estos resultados no necesariamente pueden ser extrapolados a condiciones de campo. A la fecha, no existe un diseño experimental específico para la evaluación *in vivo* de compuestos acaricidas de plantas.

Dentro de las limitantes que presentan los estudios *in vivo* se encuentra la dosificación y el vehículo para administrar los extractos y compuestos, la posible alteración por factores ambientales, la actividad de los animales tratados y la biología misma de las garrapatas, como en el caso de *R. sanguineus*, especie de garrapata cuyo ciclo biológico se considera de tres hospederos e implica que las diferentes fases de la garrapata no se encuentran siempre sobre el hospedero.

#### b) Nematodos gastrointestinales

La actividad *in vivo* del extracto metanólico de *D. anisandra* fue evaluada contra *Ancylostoma* spp. en perros de dos a tres meses de edad, naturalmente infectados (procedimiento aprobado por el Comité de Bioética FMVZ-UADY, CB-CCBA-M-2018-002). El grupo de control positivo recibió pamoato de pirantel (10 mg/kg), el grupo tratado recibió 13.6 mg/kg del extracto en cápsulas de gelatina dura (día 0 y 7) y el grupo de control negativo no recibió tratamiento. La eliminación de huevos se midió diariamente del día 0 al 14 de la evaluación. Adicionalmente, se evaluó la

actividad del extracto sobre el desarrollo larval de los huevos eliminados. Los porcentajes de reducción en el grupo tratado con el extracto oscilaron entre 9% y 67% en comparación con el grupo de control negativo. Sin embargo, la reducción a la dosis evaluada no fue estadísticamente significativa. En cuanto al desarrollo larval y eclosión, el extracto de *D. anisandra* no mostró efecto antihelmíntico. Es importante mencionar que, durante el periodo del estudio, no se observaron efectos secundarios en los cachorros tratados (Perez-Chi *et al.*, datos no publicados).

Al igual que sucede con los fármacos, es de suponerse que los extractos administrados por vía oral están sujetos a variables como la farmacodinamia y farmacocinética dentro del organismo animal. La concentración del extracto en el sitio de ubicación de *Ancylostoma* spp. pudo verse afectada por su absorción, distribución tisular, metabolismo y excreción y, por tanto, su efecto sobre el parásito (Sumano y Ocampo, 2006).

Son escasos los estudios que brindan información sobre la eficacia *in vivo* de los extractos de plantas y compuestos activos con potencial antihelmíntico. Se debe considerar que la realización de estudios *in vivo* implica la utilización de modelos animales con características homogéneas (edad, sexo, raza, nivel de infección), además de que se debe contar con las instalaciones y el personal técnico adecuado. Los factores tales como el vehículo de administración, vía de administración, dosificación y toxicidad del extracto y compuestos a evaluar deben ser considerados para el desarrollo de estudios *in vivo* y la aplicación segura, eficaz y asequible a un nivel práctico (Liu *et al.*, 2020).

### RESULTADOS DESTACADOS DE ACTIVIDAD ACARICIDA Y ANTIHELMÍNTICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS NATIVAS DE YUCATÁN

#### a) Actividad acaricida *in vitro*

En un primer estudio para determinar la actividad acaricida, los extractos metanólicos crudos de 15 plantas nativas de la península de Yucatán fueron evaluados (100 mg/ml) contra larvas de *R. microplus* resistentes a acaricidas provenientes de la FMVZ-UADY (Yucatán). Los extractos provinieron de diferentes estructuras de la planta: hoja, tallo, corteza y raíz. Los extractos con mayor actividad fueron las hojas de *P. alliacea* (95.7%), tallo de *P. alliacea* (99.2%), hojas de *Havardia albicans* (93.0%), hojas de *Caesalpinia gaumeri* (90.1%), corteza de *D. anisandra* (98.8%), tallo de *Solanum tridynamum* (98.0%), tallo de *Solanum erianthum* (97.8%), corteza de *Bursera simaruba* (99.56%) y corteza de *Casearia corymbosa* (99.5%) (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010a).

Por su alta actividad acaricida, los extractos de hoja y tallo de *P. alliacea* fueron seleccionados para continuar la investigación a diferentes concentraciones contra larvas y adultas de *R. microplus* resistentes a acaricidas, así como para determinar los compuestos responsables que le conferían la actividad previamente reportada. Rosado-Aguilar *et al.* (2010b) reportaron porcentajes de mortalidad en las larvas expuestas de más de 94% con el 10% de concentración del extracto del tallo y hoja de *P. alliacea* y 100% de mortalidad cuando la concentración de dichos extractos fue del 20%. Además, se determinaron las concentraciones letales al 50% (CL<sub>50</sub>) de 3.88 mg/ml y CL<sub>99</sub> de 16.52 mg/ml con el extracto metanólico del tallo y las CL<sub>50</sub> de 4.30 mg/ml y CL<sub>99</sub> de 12.29 mg/ml con el extracto metanólico de la hoja. Con las garrapatas adultas, el extracto proveniente del tallo (20%, 200 mg/ml) mostró 86.6% de mortalidad y 91% de inhibición de la oviposición. A través del fraccionamiento biodirigido, se determinó que la fracción de *n*-hexano produjo alta mortalidad de 93.6% sobre las larvas de *R. microplus* en comparación con la fracción metanólica (6.4%) y de acetato de etilo (5.2%), poniendo en evidencia que los compuestos no polares eran los responsables de la actividad acaricida de *P. alliacea*. A través de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se identificaron seis compuestos activos en el extracto del tallo: *cis*-estilbeno (0.3% de abundancia), éster metílico de ácido octadecadienoico (0.4%), éster metílico de ácido octadecanoico (0.7%), éster metílico de ácido hexadecanoico (2.8%), disulfuro de dibencilo (32.5%) y trisulfuro de dibencilo (63.1%).

Existen factores que pueden afectar la producción y concentración de compuestos activos en las plantas y, por tanto, pueden resultar en variaciones de la actividad acaricida de los extractos estudiados. Dentro de los factores intrínsecos se mencionan la especie de planta, parte vegetal empleada en la elaboración del extracto y edad fenológica de la planta, mientras que los factores ambientales representados por, las características del suelo y la época de colecta constituyen los principales factores extrínsecos (Kubec y Musah, 2001; Castelo *et al.*, 2012). Arceo-Medina *et al.* (2017) evaluaron el efecto de la época y lugar de colecta sobre la actividad acaricida del tallo y hoja de *P. alliacea* sobre larvas de *R. microplus* resistente a acaricidas. La época de colecta se clasificó como época de secas y de lluvias, mientras que los sitios de colecta fueron: a) sitio 1 (Yaxcabá, Yucatán) Los suelos característicos de esta región son los cambisoles, calcisoles y, en menor medida, los luvisoles; b) sitio 2 (Hunucmá, Yucatán) con suelos de textura pedregosa, fértiles pero con poca retención de agua, se consideran una combinación de leptosoles y cambisoles; c) sitio 3 (Colonia Yucatán, Yucatán) los suelos predominantes son leptosoles y cambisoles, con alto porcentaje de pedregosidad. De manera general, se observó mayor actividad acaricida cuando los

extractos fueron colectados durante la época de secas (CS) en comparación con las colectas de la época de lluvias (CLL). En cuanto a la estructura vegetal empleada para la elaboración del extracto, se observó que el tallo (CS) obtuvo porcentajes de mortalidad mayores ( $\geq 92\%$  a partir del 10% de concentración) en comparación con las hojas CS (6.8% a 96% al 20% de concentración) ( $p < 0.05$ ). Las menores CL<sub>50</sub> se obtuvieron con el extracto del tallo CS, siendo de 1.7 y 2.2 mg/ml para el lugar de colecta 1 y 2. De los tres lugares de colecta, la mayor actividad contra larvas se encontró con los extractos CS en el sitio 1 en comparación con el 2 y 3. Los autores atribuyen la variación en la actividad al tipo de suelo predominante en el lugar de colecta 1, calcisol, que no está presente en el sitio 2 y 3. El suelo de tipo calcisol está caracterizado por la acumulación de carbonatos secundarios y cementados, lo que representaría mayor disponibilidad de carbono y mayor capacidad en la producción de metabolitos secundarios en las condiciones de estrés para la época de secas (Bryant *et al.*, 1995). Aunado a lo anterior, la época de secas presenta factores característicos como la baja disponibilidad de agua, la temperatura y la radiación solar, los cuales parecen jugar un papel importante en la concentración de metabolitos secundarios de las plantas (Castelo *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2012). Los extractos del tallo CS en los sitios 1 y 2 mostraron concentraciones más altas de disulfuro de dibencilo (0.641% y 0.666%) y trisulfuro de dibencilo (0.860% y 0.0%) en comparación con los extractos del tallo CLL (0.493% y 0.492%; 0.490% y 0.0%), lo que confirmaría lo reportado por Rosado-Aguilar *et al.* (2010b) al atribuir la actividad acaricida de *P. alliacea* a los compuestos sulfurados encontrados.

A pesar de conocer los compuestos activos de mayor abundancia en *P. alliacea* y a los cuales se les atribuía su actividad contra garrapatas, en la naturaleza los compuestos minoritarios de las plantas pueden actuar como metabolitos sinérgicos, produciendo una mayor eficacia en mezclas con los compuestos individuales mayoritarios (Hummelbrunner e Isman, 2001). Arceo-Medina *et al.* (2016) evaluaron los compuestos activos reportados en *P. alliacea* de manera individual y en combinaciones para identificar cualquier sinergismo entre ellos sobre larvas y adultas de *R. microplus* resistentes a acaricidas. Los compuestos evaluados se muestran en la tabla 2 y fueron reportados por Rosado-Aguilar *et al.* (2010). Los compuestos fueron evaluados de manera individual y en combinaciones de dos a seis compuestos por mezcla. De manera individual, ninguno de los seis compuestos evaluados mostró efecto sobre las larvas de *R. microplus*, con porcentajes de mortalidad menores al 3%. Se observó una mortalidad de 92.6% con la mezcla de disulfuro de dibencilo (DSD) + trisulfuro de dibencilo (TDB). De las 57 mezclas evaluadas, once que contenían la combinación de DSD + TDB mostraron porcentajes de

mortalidad superiores al 80%. Cuando los compuestos sulfurados se mezclaron con los ácidos grasos y *cis* estilbeno, las tasas de mortalidad fueron de más del 92.6% (9 de las 57 mezclas). Por otro lado, se observó que ninguna de las nueve mezclas que mostraron alta mortalidad sobre las larvas causaban efecto significativo (>14.5%) en las garrapatas adultas; sin embargo, presentaban cierta eficacia en inhibición de la oviposición (>33.0%). La mezcla de DSD + TDB ocasionó 97.7% de inhibición de la eclosión de los huevos, mientras que la mezcla de DSD + TDB + éster metílico del ácido octadecenoico (MEAD) logró inhibir el 92.2% de la eclosión. Los huevos provenientes de garrapatas tratadas con la mezcla DSD + TDB se observaron oscuros, secos y opacos en comparación con el grupo control. Este efecto se atribuyó al efecto de los compuestos sulfurados sobre la embriogénesis de *R. microplus* (Arceo-Medina *et al.*, 2016).

Con base en los resultados anteriores y con el objetivo de determinar el efecto de los compuestos sulfurados sobre la mortalidad y proceso de ovogénesis de *R. microplus*, Arceo-Medina *et al.* (2020) evaluaron las mezclas de DSD + TDB y DSD + TDB + MEAD sobre garrapatas adultas, preparándose en las proporciones reportadas por Rosado-Aguilar *et al.* (2010b). Las mortalidades sobre las garrapatas adultas fueron de 26% y 23%, respectivamente. En cuanto a la inhibición de la oviposición, las mezclas demostraron alta eficacia (86% y 80%, respectivamente). La primera mezcla no mostró efecto significativo en el porcentaje de inhibición de la eclosión (7%), mientras que la segunda mezcla inhibió moderadamente la eclosión (57%). El efecto del ácido graso (MEAD) pudiera ser a nivel del órgano Gene más que en el ovario, ya que éste órgano secreta una cera protectora sobre el huevo que evita su desecación y permite su adherencia a otros huevos para protección de las condiciones externas (Booth *et al.*, 1986). Al observar los huevos tratados de ambas mezclas, estos presentaron un aspecto oscuro, deshidratado y con menos adherencia en comparación con los huevos del grupo control. La histopatología de las garrapatas tratadas reveló cambios en la estructura normal de los ovocitos identificados como alteraciones morfológicas que aparecen como masas celulares deformes y heterogéneas. Los ovocitos I y II presentaban una vesícula germinal con dos nucléolos. En los ovocitos de estadio IV y V se observaron pliegues y deformaciones en toda su longitud, presencia de vacuolas en su citoplasma localizadas en o alrededor de la vesícula germinal, así como ruptura y formación incompleta de los ovocitos. En todos los ovocitos se observaron la presencia de vacuolas, lo que puede explicarse como un intento por parte de la célula para aislar compuestos tóxicos y continuar su proceso metabólico (Arnosti *et al.*, 2011). Otra lesión identificada fue el engrosamiento y la desorganización del corión de los ovocitos, esto parece ser una

respuesta protectora contra sustancias dañinas por parte de los ovocitos. Esta respuesta perjudicaría la supervivencia del embrión al interferir con el intercambio gaseoso normal que se da en los microporos del corion (Barbosa *et al.*, 2016; König *et al.*, 2019). Las lesiones observadas fueron similares para ambas mezclas.

Los estudios anteriormente mencionados brindan evidencia relacionada sobre el potencial acaricida de los extractos y compuestos activos de *P. alliacea* contra *R. microplus*. Cabe destacar que su alta actividad se ha observado en diferentes estadios de la garrapata (larvas y adultas), además de que posee alta eficacia contra *R. microplus* resistentes a acaricidas comerciales. Estudios similares deben conducirse sobre *R. sanguineus* y otros géneros de garrapatas de importancia veterinaria, para conocer su espectro de acción. Aunado a lo anterior, los estudios a futuro en la línea de investigación deberán incluir la realización de estudios *in vivo*.

## b) Actividad antihelmíntica

Dentro de la línea de investigación y con los resultados obtenidos con *P. alliacea* contra *R. microplus*, surgió la interrogante de si los mismos extractos tendrían actividad antihelmíntica. Arjona-Cambranes *et al.* (2016b) evaluaron los extractos metanólicos de tallo y hoja de *P. alliacea*, corteza y hoja de *D. anisandra*, hoja de *H. albicans* y corteza de *B. simaruba* y *C. corymbosa*, colectados en épocas de secas y lluvias, sobre la eclosión de huevos de *Ancylostoma* spp. Los extractos del tallo de *P. alliacea* CLL mostraron porcentajes de inhibición de la eclosión (PIE) superiores al 90% a partir de 300 µg/ml, mientras que la colecta de secas obtuvo PIE de 99.0% a partir de 1200 µg/ml. El mismo patrón se observó con los extractos provenientes de la hoja. Los extractos de *D. anisandra* CLL mostraron PIE de 94.1% a 1200 µg/ml (corteza) y 99.9% a 2400 µg/ml (hoja). Los extractos de la misma planta CS mostraron PIE ≥90.0% a 2400 µg/ml. Los extractos de *H. albicans*, *C. corymbosa* y *B. simaruba* mostraron bajos PIE, independientemente de la época de colecta y estructura vegetal. Los autores atribuyeron el bajo efecto a que los extractos mencionados no lograron disolverse completamente. El efecto ocasionado por *P. alliacea* en los huevos de *Ancylostoma* spp. fue la inhibición de la eclosión de las larvas L<sub>1</sub>, reportándose que más del 84% de los huevos expuestos lograron embrionar a larvas L<sub>1</sub> en todas las concentraciones evaluadas; sin embargo, no lograron eclosionar. En tanto que con la corteza de *D. anisandra* CLL se inhibió el 61.2, 87.3 y 97.6%, la embrionación de huevos de *Ancylostoma* spp. En las concentraciones de 1200, 2400 y 3600 µg/ml, presentando efecto ovicida.

En un estudio piloto, se evaluó la actividad antihelmíntica de *P. alliacea* sobre nematodos del orden strongylida de bovinos, obteniéndose 100% de inhibición de la eclosión (3600 µg/ml) sobre huevos de *Haemonchus placei* y *Trichostrongylus* spp. (Rosado-Aguilar et al., 2016). Posteriormente, los extractos de *P. alliacea* (tallo y hojas) y *D. anisandra* (corteza y hojas), colectados en secas y lluvias, fueron evaluados sobre huevos de ciatostominos (Flota-Burgos et al., 2017). Los mayores PIE se obtuvieron con los extractos del tallo de *P. alliacea* (97.5% a 75 µg/ml) y de la corteza de *D. anisandra* (97.9% a 37.5 µg/ml), ambos colectados en época de lluvias. De igual forma, las menores CL<sub>50</sub> se obtuvieron con los extractos antes mencionados. La CL<sub>50</sub> del tallo de *P. alliacea* CLL fue de 28.2 µg/ml y no se encontró diferencia significativa entre esta y las obtenidas con los extractos de hojas CLL y CS (38.2 y 31.3 µg/ml, respectivamente). Con la corteza de *D. anisandra* CLL se obtuvo un CL<sub>50</sub> de 10.2 µg/ml, siendo diferente estadísticamente de las CL<sub>50</sub> obtenidas con las hojas CLL, corteza y hojas CS. Similar a lo reportado contra garrapatas por Arceo-Medina et al. (2017), la estructura de *P. alliacea* que mostró mayor actividad antihelmíntica fue el tallo. En el caso de *D. anisandra* la estructura vegetal que mostró mayor actividad fue la corteza, parte de la planta a la que se le había atribuido gran cantidad de compuestos activos con amplia actividad biológica (Uc-Cachón et al., 2014). Sin embargo, con respecto a la época de colecta, se observó que con los NGI la actividad más alta se obtuvo con las colectas de lluvias, a diferencia de los estudios con garrapatas en donde se vio que los extractos colectados en secas exhibieron mayor actividad acaricida. Como se ha mencionado, variantes como época de colecta y los factores ambientales influyen en la actividad biológica de los extractos de plantas, además de que los compuestos activos responsables de la actividad acaricida y antihelmíntica podrían ser diferentes (Modak, 2010; Liang, 2012).

Como parte importante de los estudios sobre la actividad antihelmíntica se ha diferenciado el efecto que ocasionan los extractos sobre los huevos de NGI. De acuerdo con Vargas-Magaña et al. (2014) se reconocen dos efectos: actividad ovicida y larvas L<sub>1</sub> que fallan la eclosión. Flota-Burgos et al. (2017) mencionan que el efecto de los extractos de *P. alliacea* sobre los huevos de ciatostominos fue el fallo de las larvas L<sub>1</sub> en la eclosión, este efecto se ha asociado a la interferencia que ocasionan los compuestos activos en el proceso de eclosión, evitando cambios en la permeabilidad de la membrana que son necesarios para la eclosión, inhibiendo enzimas involucradas en el proceso o por competencia con receptores de factores de eclosión presentes en la membrana del huevo (Vargas-Magaña et al., 2014). Los extractos de *D. anisandra* mostraron actividad ovicida sobre los huevos de ciatostominos, explicado por el tamaño

pequeño de los compuestos activos que permitiría su ingreso a los huevos tratados y afectar el desarrollo de la mórula (Vargas-Magaña et al., 2014). Cabe destacar que los extractos evaluados tuvieron eficacias similares al producto comercial tiabendazol (0.1 µg/ml) a partir de 75 µg/ml con el tallo de *P. alliacea* CLL y a partir de 37.5 µg/ml con la corteza de *D. anisandra* CLL.

La evidencia del potencial antihelmíntico de *P. alliacea* y *D. anisandra* sobre huevos de diferentes NGI llevó a indagar sobre el espectro de acción de sus extractos, debido a que los estudios previos se realizaron contra un solo género de NGI y considerando que una de las ventajas de los antihelmínticos comerciales era su amplio espectro de acción. Flota-Burgos et al. (2020a; 2020b) evaluaron los extractos de tallo y hojas *P. alliacea*, corteza y hojas de *D. anisandra*, corteza de *C. corymbosa* y corteza de *B. simaruba* sobre huevos de *Ancylostoma* spp., *Haemonchus placei* y ciatostominos. Al igual que en estudios previos, los extractos se colectaron en dos épocas del año. De manera general, los mejores PIE y las menores CL<sub>50</sub> y CL<sub>99</sub> se obtuvieron con los extractos CLL, independientemente de los géneros de NGI evaluados. Con *P. alliacea*, los PIE más altos se obtuvieron con el extracto proveniente del tallo CLL sobre *Ancylostoma* spp. (≥97.1% a partir de 75 µg/ml), *Haemonchus placei* (≥90.3% a partir de 150 µg/ml) y ciatostominos (≥90.1% a partir de 150 µg/ml). A partir de las concentraciones mencionadas, los PIE obtenidos fueron estadísticamente similares al tiabendazol. Con el extracto de tallo CS se requirió el doble de la concentración para alcanzar PIE similares a la colecta de lluvias. Al evaluar los extractos provenientes de las hojas de *P. alliacea* CLL, se observó que PIE ≥98.9 a 150 µg/ml sobre *A. caninum* y ≥94.0% a 300 µg/ml para *H. placei* y ciatostominos. De manera similar a lo observado con el extracto proveniente del tallo, la colecta de secas requirió una concentración mayor para alcanzar PIE similares a la colecta de lluvias. El extracto del tallo de *P. alliacea* CLL mostró las menores CL<sub>50</sub> y CL<sub>99</sub> sobre *A. caninum* (33.3 y 79.5 µg/ml, respectivamente), *H. placei* (78.9 y 178.0 µg/ml, respectivamente) y ciatostominos (68.6 y 277.4 µg/ml, respectivamente). Los extractos de *C. corymbosa* y *B. simaruba* mostraron moderada y baja actividad antihelmíntica. Los PIE del extracto de *C. corymbosa* CLL se mantuvieron entre 55% y 74% a 3600 µg/ml, mientras que con el extracto CS fueron de 45% a 65% a la misma concentración. El extracto de *B. simaruba* CLL y CS mostró altos PIE solamente contra huevos de *Ancylostoma* spp. (95.4% y 79.8% a 3600 µg/ml, respectivamente), mientras que su actividad contra *Haemonchus placei* fue baja (25.4% y 2.3%, respectivamente) y moderada contra ciatostominos (56.3% y 48.1%, respectivamente). Este estudio corroboró que la época de colecta y la estructura vegetal influyen en la actividad

antihelmíntica. Existe una mayor concentración de compuestos activos con actividad biológica como aceites esenciales, flavonoides y terpenos en los meses correspondientes a la época de lluvias (Castelo *et al.*, 2012; Mediouni *et al.*, 2012; Sariego-Frómata *et al.*, 2013; Anese *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente, los compuestos activos responsables de la actividad antihelmíntica pueden ser diferentes de los que le confieren actividad acaricida, lo que explicaría el comportamiento de las plantas contra garrapatas en época de secas y contra NGI en época de lluvias.

Se observó que *P. allieacea* tuvo actividad ovicida sobre los huevos de los tres NGI evaluados, contrario a lo reportado por Arjona-Cambranes *et al.* (2016b) y Flota-Burgos *et al.* (2017). A diferencia con los estudios anteriores, se modificó la técnica para la dilución de los extractos adicionando 5% de etanol al disolvente y utilizando un baño ultrasónico para la dilución completa y homogénea de los extractos metanólicos. Como se mencionó previamente, elegir un disolvente adecuado que no sea tóxico con los organismos evaluados y que permita la solubilidad de los compuestos activos garantiza su efectividad biológica. Se pueden perder fuentes potenciales para el desarrollo de nuevas alternativas por factores ajenos al extracto como una mala dilución, técnicas inadecuadas o el uso de disolventes inadecuados (D'Angelo *et al.*, 2014; Chagas, 2015). Los extractos de *C. corymbosa* y *B. simaruba* ocasionaron que las larvas L<sub>1</sub> fallen el proceso de eclosión, similar a lo observado por Arjona-Cambranes *et al.*, 2016. Con el extracto de *C. corymbosa* CLL, a partir de 1200 µg/ml, se observó daño en las estructuras internas de las larvas L<sub>1</sub> que lograron eclosionar, lo que da lugar a la probabilidad de que este extracto pueda tener alta actividad contra larvas L<sub>1</sub> y no en la fase de huevos de los NGI.

Otra de las plantas con alto potencial antihelmíntico es *D. anisandra*. Flota-Burgos *et al.* (2020b) evaluaron la actividad antihelmíntica de la corteza y hojas de *D. anisandra* colectada en época de lluvias y secas sobre huevos de *Ancylostoma* spp., *Haemonchus placei* y ciatostominos. Los mejores PIE se obtuvieron con los extractos CLL en comparación con la colecta de secas y con los extractos provenientes de la corteza en comparación con las hojas. El extracto de corteza CLL obtuvo PIE  $\geq 95\%$  a partir de 75 µg/ml contra *Ancylostoma* spp. y *Haemonchus placei*, mientras que contra ciatostominos mostró PIE  $\geq 97\%$  a partir de 37.5 µg/ml. Con el extracto de corteza CS se requirió al menos el triple de concentración para obtener PIE similares a la colecta de lluvias. Resalta que los extractos provenientes de hojas, colectados en ambas épocas, mostraron únicamente alta actividad contra ciatostominos ( $\geq 96\%$  a 300 µg/ml), mientras que la actividad contra *Haemonchus placei* fue moderada y se consideró baja contra *Ancylostoma* spp. Las CL<sub>50</sub> para

la corteza CLL fueron de 11.3 a 60.0 µg/ml y las CL<sub>99</sub> estuvieron en un rango de 38.1 a 128.7 µg/ml.

Debido a los altos PIE, bajas CL<sub>50</sub> y amplio espectro, se seleccionó el extracto metanólico de la corteza de *D. anisandra* para la identificación de los compuestos activos presentes. A través del fraccionamiento biodirigido del extracto antes mencionado se obtuvieron las fracciones de *n*-hexano, acetato de etilo y metanólica (residual). La fracción *n*-hexano demostró tener mayor eficacia (PIE:  $\geq 95\%$  a partir de 75 µg/ml) contra los tres NGI evaluados, es decir que los compuestos no polares se detectaron como los responsables de la actividad antihelmíntica, similar a lo reportado con *P. allieacea* y su actividad contra garrapatas (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010b). Entre las 11 sub-fracciones obtenidas, la sub-fracción 5 mostró mayor actividad antihelmíntica con PIE de 95.6% sobre *Ancylostoma* spp., 89.8% sobre *Haemonchus placei* y 96.7% sobre ciatostominos, al ser evaluada a la concentración de 18 µg/ml. Las sub-fracciones restantes mostraron rangos de PIE de 5.9 a 11.8%, 5.7 a 14% y 3.3 a 18.2% contra *Ancylostoma* spp., *Haemonchus placei* y ciatostominos, respectivamente. El compuesto más abundante de la sub-fracción 5 fue identificado como plumbagina (72.69%). La plumbagina se evaluó contra huevos de los tres NGI estudiados, obteniendo un PIE  $\geq 91\%$  a 2.3 µg/ml. No se pudo determinar la CL<sub>50</sub> y CL<sub>99</sub> de la sub-fracción 5 y sus compuestos activos debido al alto PIE ( $\geq 90\%$ ) alcanzado en todas las concentraciones evaluadas (150 a 2.3 µg/ml). Adicionalmente, se evaluaron los constituyentes betulina y lupeol encontrados en la corteza de *D. anisandra*. Estos tuvieron baja actividad contra los huevos de *A. caninum* (PIE de 3.6 y 3.2%, respectivamente), *H. placei* (PIE de 1.4 y 1.9%, respectivamente) y ciatostominos (PIE 5.0 y 5.3%, respectivamente) a 2.3 µg/ml. Incluso a la concentración más alta evaluada (150 µg/ml) se observaron PIE bajos frente a los huevos de *Ancylostoma caninum* (5.0 y 3.1%, respectivamente), *Haemonchus placei* (4.3 y 1.5%, respectivamente) y ciatostominos (8.8 y 5.5%, respectivamente). El extracto metanólico, la fracción *n*-hexano, la sub-fracción 5 y la plumbagina tuvieron actividad ovicida sobre los huevos de los tres NGI estudiados. La actividad antihelmíntica de la plumbagina ha sido reportada previamente contra *H. contortus*, *Ascaris suum* y *Caenorhabditis elegans* (Fetterer y Fleming, 1991; Chaweeborisuit *et al.*, 2016).

Los resultados presentados anteriormente demuestran el potencial antihelmíntico de amplio espectro que poseen los extractos de *P. allieacea* y *D. anisandra*. En el caso de *D. anisandra* se ha determinado el compuesto activo que le confiere actividad antihelmíntica y valdría la pena evaluar si existe sinergismo de este con los compuestos minoritarios de la planta. Por otro lado, deben determinarse los

compuestos activos que le confieren actividad antihelmíntica a *P. alliacea*.

### **PERSPECTIVAS EN LA INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACARICIDA Y ANTIHELMÍNTICA DE PLANTAS Y SUS COMPUESTOS ACTIVOS**

La finalidad de los estudios realizados en esta línea de investigación es que el potencial acaricida y antihelmíntico de las plantas estudiadas y sus compuestos activos puedan aprovecharse y ser una alternativa viable y aplicable para el control de estos parásitos de animales domésticos y de importancia agropecuaria. A continuación, se describen las principales perspectivas a futuro y que deberán guiar los siguientes objetivos de esta línea de investigación.

#### **a) Selección de extractos y compuestos activos con amplio espectro de acción**

Una de las principales ventajas que ofrecen los antiparasitarios disponibles comercialmente es su amplio espectro de acción (Nixon *et al.*, 2020). La mayor experiencia de la acción acaricida de plantas como *P. alliacea* y sus compuestos activos ha sido contra larvas y adultas de *R. microplus*. Además, pueden evaluarse con otras especies de garrapatas de importancia en la ganadería bovina como *Amblyomma* spp. y, en el caso de los animales de compañía, se encuentra *R. sanguineus*, la cual tiene importancia en salud pública debido a su papel como vector en la transmisión de enfermedades (Ojeda-Chi *et al.*, 2019; Pérez de León *et al.*, 2020). Los extractos y compuestos de plantas como *P. alliacea* y *D. anisandra* han demostrado amplio espectro de acción contra huevos de NGI del orden Strongylida. Sin embargo, los extractos no han sido evaluados contra NGI de otro orden, por ejemplo, los ascáridos que afectan a los animales domésticos y que presentan una morfología diferente, lo que pudiera representar diferencias en la actividad de los extractos evaluados (Bowman, 2009).

#### **b) Evaluación de otras plantas nativas con amplia actividad biológica**

Existe evidencia de más plantas nativas con actividad acaricida que deben continuarse estudiando para detectar y aislar sus compuestos activos, como es el caso de *C. gaumeri*, *H. albicans* y *C. corymbosa* (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010a). En el caso de NGI, *C. corymbosa* mostró causar daño en las estructuras internas de las larvas L<sub>1</sub> que lograron eclosionar, lo que se suma a su efecto de inhibición de la eclosión (Flota-Burgos *et al.*, 2020a). La evaluación de extractos y compuestos activos provenientes de otras plantas podría ampliar las opciones disponibles y descubrir nuevas formas de acción sobre etapas del desarrollo

diferentes de las conocidas hasta el momento. Adicionalmente se podrían realizar mezclas o combinaciones de extractos de estas plantas para obtener efectos sinérgicos o aditivos, potencializando su actividad acaricida y antihelmíntica y reduciendo el posible riesgo de generación de resistencia metabólica o genética de los agentes parasitarios.

#### **c) Identificación de los compuestos activos responsables de la actividad biológica**

La identificación de los compuestos activos de los extractos de plantas en investigaciones realizadas con *R. microplus* ha permitido conocer su actividad acaricida y los efectos que ocasiona sobre larvas y garrapatas adultas, así como su efecto a nivel tisular y en la progenie de garrapatas tratadas. Por otra parte, se conoce la actividad antihelmíntica de *P. alliacea*, pero no se ha llegado a identificar si los compuestos responsables son los mismos que los reportados por Rosado-Aguilar *et al.* (2010b) y Arceo-Medina *et al.* (2017) contra garrapatas. Se puede observar que la época de colecta que presenta mayor actividad acaricida es la época de secas, mientras que la actividad antihelmíntica se expresa con mayor eficacia cuando los extractos se colectaron en época de lluvias; para comprobar la similitud o diferencia de compuestos activos responsables, es necesario identificar los compuestos activos y la variación en sus concentraciones con respecto a la época de colecta y estructura de la planta. La identificación de los compuestos responsables de la actividad biológica de las plantas permitirá avanzar en el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios (Jain *et al.*, 2019).

#### **d) Disponibilidad de material vegetal**

Muchas de las plantas estudiadas generalmente son solo arbustos o hierbas que crecen de manera natural en los montes de la península de Yucatán y el trópico. Se observó que el tallo, corteza y hoja (la parte aérea) de las plantas evaluadas presentaron alta eficacia contra los parásitos estudiados, por lo cual para una reserva y mayor disponibilidad de material vegetal podrían ser colectadas las semillas de las plantas con alta eficacia, cultivarlas y micropropagarlas en condiciones controladas para la obtención y aislamiento de un banco de metabolitos secundarios, con posibilidades de crear un fitofármaco con propiedades acaricidas y antihelmínticas contra garrapatas y nematodos resistentes a antiparasitarios.

#### **e) Mecanismos de acción específicos**

El efecto de los extractos y sus compuestos activos sobre *R. microplus*, *Ancylostoma* spp., *H. placei* y ciatostominos se ha descrito previamente. Los mecanismos de acción que ocasionan los efectos observados deben ser explorados. Arceo-Medina *et al.*

(2020) describen los cambios ocasionados en el proceso de ovogénesis y órganos reproductivos de garrapatas *R. microplus* adultas, pero no se conoce el mecanismo de acción sobre las larvas de dicha garrapata. Con los NGI se ha observado que los extractos y sus compuestos activos pueden tener actividad ovicida o provocar que las larvas L<sub>1</sub> no completen el proceso de eclosión; sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción específico. El uso de técnicas como la microscopía electrónica podría proveer más información sobre el daño ocasionado en la ultraestructura de garrapatas y huevos de NGI tratados, complementando el efecto observado por microscopía óptica y/o estereoscopia, contribuyendo a elucidar el mecanismo de acción de los extractos y compuestos evaluados.

#### f) Estudios *in vivo*

El objetivo de la investigación sobre la actividad acaricida y antihelmíntica es su aplicación a nivel campo. Para lo anterior, es necesaria la realización de estudios *in vivo* que permitan caracterizar la farmacocinética y farmacodinámica de los extractos y sus compuestos activos en los animales, para determinar la vía de administración, formulación y dosis más adecuadas que aseguren el funcionamiento de los extractos y sus compuestos activos a nivel de campo (Newman y Cragg, 2016; Liu *et al.*, 2020).

### CONCLUSIONES

La investigación realizada sobre la actividad acaricida y antihelmíntica de plantas nativas de Yucatán ha permitido descubrir alternativas con potencial para el control que podrían ayudar a reducir la dependencia de antiparasitarios comerciales sintéticos o semisintéticos que han creado resistencia en los parásitos blanco, en animales de producción y de compañía. *Petiveria alliacea* (hoja y tallo) ha demostrado poseer alta actividad contra larvas y adultas de *R. microplus* resistentes a acaricidas comerciales, mientras que los extractos de *P. alliacea* (tallo) y *D. anisandra* (corteza) exhibieron alta actividad de amplio espectro sobre huevos de *Ancylostoma* spp., *Haemonchus placei* y ciatostominos. Los principales compuestos activos encontrados en *P. alliacea* son disulfuro de dibencilo y trisulfuro de dibencilo, mientras que en *D. anisandra* el principal compuesto fue plumbagina. Existe una variación en la actividad acaricida y antihelmíntica relacionada con la época de colecta y la estructura de la planta empleada para realizar el extracto. Los resultados obtenidos son prometedores, y se requieren estudios que complementen la información existente (microscopía electrónica, mecanismos de acción, farmacodinamia, farmacocinética, evaluación *in vivo*, entre otros) que permitan llegar a la aplicación de estos productos a nivel de campo de una forma segura y eficaz.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACYT el apoyo financiero para la realización del presente trabajo (clave CB-2012-01-178216).

**Funding.** Project “Evaluación de la actividad acaricida de plantas contra *Rhipicephalus microplus* resistentes a ixodicidas” from CONACYT ciencia básica, code CB-2012-01-178216.

**Conflict of interest statement.** The authors declare that there is not conflict of interest.

**Compliance with ethical standards.** Do not apply.

**Data availability.** Data is available upon reasonable request with the corresponding author ([ja.rosado@correo.uady.mx](mailto:ja.rosado@correo.uady.mx)).

**Author contribution statement (CRediT).** **G.J. Flota-Burgos** – Investigation and writing-original draft. **J.A. Rosado-Aguilar** – Conceptualization, Project administration, Supervision and Writing - review & editing. **R.I. Rodríguez-Vivas** – Conceptualization, Supervision and writing -review & editing. **R. Borges-Argaez** – Resources, Methodology, Supervision and writing -review & editing. **M. Gamboa-Angulo** – Supervision, Validation and Writing-review & editing.

### REFERENCIAS

- Alegría-López, M.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Torres-Acosta, J.F.J., Ojeda-Chi, M.M. and Rosado-Aguilar, J.A., 2015. Use of ivermectin as endoparasiticide in tropical cattle herds generate resistance in gastrointestinal nematodes and the tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 52(2), pp. 214-221. <https://doi.org/10.1093/jme/tju025>
- Arceo-Medina, G.N., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I. and Borges-Argaez, R., 2016. Synergistic action of fatty acids, sulphides and stilbene against acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* ticks. *Veterinary Parasitology*, 228, pp. 121-125. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.023>
- Arceo-Medina, G.N., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Méndez-González, M., Borges-Argaez, R., Cáceres-Farfán, M. and Tamayo-Díaz, M., 2017. Effect of season and sampling location on acaricidal activity of *Petiveria alliacea* on larvae of *Rhipicephalus microplus* resistant to acaricides. *Journal of Veterinary Medicine and Allied Science*, 1, pp. 1-22. :

- <http://www.alliedacademies.org/veterinary-medicine-and-allied-science/>
- Arceo-Medina, G.N., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R. and Barrero-Pool, F., 2020. Evaluation of the effect of the combination of dibenzyl disulfide, dibenzyl trisulfide and octadecenoic acid methyl ester on the process of ovogenesis in acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(1), pp.1-11. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.2958>
- Arnosti, A., Brienza, P.D., Furquim, K.C.S., Chierice, G.O., Bechara, G.H., Calligaris, I.B. and Camargo-Mathias, M.I., 2011. Effects of ricinoleic acid esters from castor oil of *Ricinus communis* on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Experimental Parasitology*, 127, pp. 575-580. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.006>
- Arjona-Cambranes, K.A., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Ortega-Pacheco, A., Arceo-Medina, G. and Flota-Burgos, G.J., 2016a. Extractos vegetales como alternativa de control contra larvas de *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* en perros. *Ciencia y Agricultura*, 13(2), pp. 76.
- Arjona-Cambranes, K.A., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Ortega-Pacheco, A. and Flota-Burgos, G.J., 2016b. Actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos vegetales contra huevos de *Ancylostoma* spp. de perros. *Ciencia y Agricultura*, 13(2), pp. 76.
- Anese, S., Umeda Grisi, P., Jatobá, L.J., Imatomi, M., de Cassia Pereira, V. and Juliano Gualtieri, S.N., 2014. Seasonal variation in phytotoxicity of *Drimys brasiliensis* Miers. *Idesia*, 32(3), pp. 109-116. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292014000300014>
- Barbosa, C.D.A.S., Borges, L.M., Braz L.C.C., Lopes R.T., Miguita, C.H., De Sabóia-Morais T., Garcez, W.S. and Garcez, F.R., 2016. *In vitro* activity of 3 $\beta$ -O-tigloylmelianol from *Guarea kunthiana* A. Juss (Meliaceae) on oogenesis and ecdysis of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*. 164, pp. 5 -11. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.015>
- Bowman, D.D., 2009. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 9th Edition. Philadelphia: Ed. Saunders-Elsevier.
- Bryant, J.P. and Julkunen, T.R., 1995. Ontogenic development of chemical defense by seedling resin birch: energy cost of defense production. *Journal of Chemical Ecology*, 21(7), pp. 883-896. <https://doi.org/10.1007/bf02033796>
- Castelo, A.V.M., Del Menezzi, C.H.S. and Resck, I.S., 2012. Seasonal variation in the yield and the chemical composition of essential oils from two Brazilian native arbustive species. *Journal of Applied Sciences*, 12(8), pp.753-760. <https://doi.org/10.3923/jas.2012.753.760>
- Chagas, A.C., 2015. Medicinal plant extracts and nematode control. *CAB Reviews*, 10(8), pp. 1-8. <http://doi.org/10.1079/PAVSNR201510008>
- Craig, T.M., 2018. Gastrointestinal nematodes, diagnosis and control. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 34, pp. 185-99. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.008>
- D'Angelo, F., Pone, J.W., Yondo, J., Komtangi, M.C., Vittori, S. and Mbida, M., 2014. Evaluation of ovicidal and larvicidal activities of methylene chloride extract of *Annona senegalensis* (Annonaceae) stem bark on *Heligmosomoides bakeri* (Nematoda, Heligmosomatidae). *Global Journal of Science Frontier Research*, 14, pp. 21-39. <https://globaljournals.org/item/3067-evaluation-of-ovicidal-and-larvicidal-activities-of-methylene-chloride-methanol-extract-of-annona-senegalensis-annonaceae-stem-bark-on-heligmosomoides-bakeri-nematoda-heligmosomatidae>
- Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasite & Vectors*, 3(26), pp. 1-11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
- Delgado-Fernández, R., 2017. Prevalencia de parásitos con potencial zoonótico en perros callejeros de la ciudad de Ciego de Ávila. *MEDICIEGO*, 23(2), pp. 3-12. <https://revmediciego.sld.cu/index.php/mediciego/article/view/630/1121>

- Engström, M. T., Karonen, M., Ahern, J. R., Baert, N., Payré, B., Hoste, H. and Salminen, J. P., 2016. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(4), pp. 840-851. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05691>
- Flota-Burgos, G.J., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I. and Arjona-Cambranes, K.A., 2017. Anthelmintic activity of methanol extracts of *Diospyros anisandra* and *Petiveria alliacea* on cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) larval development and egg hatching. *Veterinary Parasitology*, 248, pp. 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.016>
- Flota-Burgos, G.J., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., Gamboa-Angulo, M.M. and Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., 2020a. Anthelmintic activity of *Petiveria alliacea*, *Bursera simaruba* and *Casearia corymbosa* collected in two seasons on *Ancylostoma caninum*, *Haemonchus placei* and cyathostomins. *Acta Scientific Veterinary Sciences*, 2(12), pp. 12-24. <https://actascientific.com/ASVS/pdf/ASVS-02-0113.pdf>
- Flota-Burgos, G. J., Rosado-Aguilar, J. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Borges-Argáez, R., Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., & Gamboa-Angulo, M. 2020b. Anthelmintic activity of extracts and active compounds from *Diospyros anisandra* on *Ancylostoma caninum*, *Haemonchus placei* and cyathostomins. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 565103. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.565103>
- Flota-Burgos, G.J., Rosado-Aguilar, J.A., Rojas-Becerril, R., Rodríguez-Vivas, J.A., and Trinidad-Martínez, I., 2023. Evidence of resistance to ivermectin in the gastrointestinal nematodes of horses from Mexican southeast, *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 44, pp. 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2023.100907>
- Gutiérrez, J.F., Ortuño, A., Castellá, J. and Almería, S. 2006., *Parasitología clínica*. Barcelona, España: Editorial Multiméica Ediciones Veterinarias.
- Hawdow, J.M., Wise and K.A., 2021. *Ancylostoma caninum* and other Hookworms. In: Strube, C., Mehlhorn, H. (eds) *Dog Parasites Endangering Human Health*. Springer Cham, pp. 147-193. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-53230-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-53230-7_9)
- Hummelbrunner, L.A. and Isman, M.B., 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm *Spodoptera litura* (Lep. Noctuidae). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, pp. 715-720. <https://doi.org/10.1021/jf000749t>
- Jain, C., Khatana, S. and Vijayvergia, R., 2019. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(2), pp. 494-504. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(2\).494-04](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(2).494-04)
- Jimenez-Castro, P.D., Venkatesan, Abhinaya., Redman, E., Chen, R., Malatesta, A., Huff, H., Zuluaga-Salazar, D.A., Avramenko, R., Gilleard, J.S. and Kaplan, R.M., 2021. Multiple drug resistance in hookworms infecting greyhound dogs in the USA. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 17, pp. 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.08.005>
- Jimenez-Castro, P.D., Durrence, K. and Durrence, S., 2022. Multiple anthelmintic drug resistance in hookworms (*Ancylostoma caninum*) in a Labrador breeding and training kennel in Georgia, USA. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 261(3), pp. 342-347. <https://doi.org/10.2460/javma.22.08.0377>
- Kaplan, R.M., 2020. Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock, *Food Animal Practice*, 36(1), pp. 17-30. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.001>
- Kitchen, S., Ratnappan, R., Han, S., Leasure, C., Grill, E., Iqbal, Z., Granger, O., O'Halloran, D.M., and Hawdon, J.M., 2019. Isolation and characterization of a naturally occurring multidrug-resistance strain of the canine hookworm, *Ancylostoma caninum*. *International Journal for Parasitology*, 49, pp. 397-406. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.12.004>
- Konig I.F.M., Gonçalves R.R.P., Oliveira M.V.S., Silva C.M., Thomasi S.S., Peconick A.P. and Remedio R.N., 2019. Sublethal concentrations of acetyl carvacrol strongly impact oocyte development of engorged

- female cattle ticks *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10, pp. 766–774. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.010>
- Kubec, R. and Musah, R.A., 2001. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*, 58(6), pp. 981-985. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(01\)00304-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(01)00304-1)
- Liang, Q., Wei, G., Chen, J., Wang, Y. and Huang H., 2012. Variation of medicinal components in a unique geographical accession of horny goat weed *Epimedium sagittatum* Maxim. (Berberidaceae). *Molecules*, 17(3), pp. 13345-13356. <https://doi.org/10.3390/molecules171113345>
- Liu, M., Panda, S.K. and Luyten, W., 2020. Plant-based natural products for the Discovery and development of novel anthelmintics against nematodes. *Biomolecules*, 10, p. 426. <https://doi.org/10.3390/biom10030426>
- Lobayan, S.I., Schapiro, J.H., Fiel, C.A., Zabalo, M.M. and Roselli, J.G., 2017. Resistencia a los antihelmínticos en bovinos del nordeste de Corrientes (Argentina). *Revista Veterinaria*, 28(2), pp. 138-140. <http://www.scielo.org.ar/pdf/revet/v28n2/v28n2a09.pdf>
- Lyons, M.A., Malhotra, R. and Thompson, C.W., 2022. Investigating the free-roaming dog population and gastrointestinal parasite diversity in Tulum, México. *PLoS ONE*, 17(10), p. e0276880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276880>
- Mediouni Ben Jemâa, J., Haouel, S., Bouaziz, M. and Khouja, M.L., 2012. Seasonal variations in chemical composition and fumigant activity of five *Eucalyptus* essential oils against three moth pests of stored dates in Tunisia. *Journal of Stored Products Research*, 48: 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.10.001>
- Melo, LRB., Sousa, L.C., de Menezes Oliveira, C.S., Alvares, F.B.V., Ferreira, L.C., Bezerra, L.A., Athayde, A.C.R., Feitosa, T.F., and Vilela, V.L.R., 2021. Resistance of bovine gastrointestinal nematodes to four classes of anthelmintics in the semiarid region of Paraíba state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 30(3): e010921. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021077>
- Modak, B., Torres, R. and Urzúa, A., 2011. Seasonal variation of the flavonoids pinocembrin and 3-o-methylgalangin, in the surface component mixture (resinous exudates and waxy coating) *Ofheliotropium Stenophyllum*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 56, pp. 532-534. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072011000100002>
- Nielsen, M.K., 2022. Anthelmintic resistance in equine nematodes: Current status and emerging trends, *International Journal for Parasitology*, 20, pp. 76-88. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2022.10.005>
- Newman, D. and Cragg, G.M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), pp. 629-661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Nixon, S.A., Welz, C., Wood, D.J., Costa-Junior, L., Zamanian, M. and Martin, R.J., 2020. Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, pp. 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.07.001>
- Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Esteve-Gasent, M.D., Pérez de León, A.A., Modarelli, J.J. and Villegas-Pérez, S.L., 2019. Ticks infesting dogs in rural communities of Yucatan, Mexico and molecular diagnosis of rickettsial infection. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66, pp. 102-110. <https://doi.org/10.1111/tbed.12990>
- Pereira, J.R. and Vianna, S.S., 2006. Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140, pp. 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.036>
- Pérez-Chi, A., 2019. Actividad antihelmíntica *in vivo* del extracto metanólico de *Diospyros anisandra* sobre *Ancylostoma* spp. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Perez-Cogollo, L.C., Rodriguez-Vivas, R.I., Ramirez-Cruz, G.T. and Miller, R.J., 2010. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 168, pp. 165-169. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.021>

- Pérez de León, A.A., Mitchell, R.D. and Watson, D.W., 2020. Ectoparasites of cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice.*, 36, pp. 173-185. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.004>
- Ramos, F., Marques, C.B., Reginato, C.Z., Bräunig, P., Osmari, V., Fernandes, F., Sangioni, F.A., and Vogel, F.S.F., 2019. Field and Molecular Evaluation of Anthelmintic Resistance of Nematode Populations from Cattle and Sheep Naturally Infected Pastured on Mixed Grazing areas at Rio Grande do Sul, Brazil. *Acta Parasitologica.* 65, pp. 118-127. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00137-6>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Hodgkinson, J.E. and Trees, A.J., 2012. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3(1), 9-24. URL: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v3s1/v13s1a4.pdf>
- Rodríguez-Vivas R.I., Grisi, L., Pérez de León, A.A., Silva Villela, H., Torres-Acosta, J.F.J., Fragoso Sánchez H., Romero Salas, D., Rosario Cruz, R., Saldierna, F., and García Carrasco, D., 2017a. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), pp. 61-74. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martínez, I. and Bolio-González, M.E., 2017b. First report of amitraz and cypermethrin resistance in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* infesting dogs in Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 31, pp. 72-77. <https://doi.org/10.1111/mve.12207>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martínez, I. and Pérez de León, A.A., 2017c. First documentation of ivermectin resistance in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 233, pp. 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.11.015>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Ojeda-Robertos, N.F. and Martínez-Ortíz de Montellanos, C., 2018. Estrategias para el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus* en un mundo de resistencia a los acaricidas convencionales y lactonas macrocíclicas. En: *Avances de la Investigación sobre Producción Animal y Seguridad Alimentaria en México*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, pp. 189-198.
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., García-Vázquez, Z., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M. and Dorantes-Euán, A., 2008. Actividad ixodida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8(3), pp. 297-301. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911235009>
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., García-Vázquez, Z. and Méndez-González, M., 2010a. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) by larval immersion test. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12, pp. 417-422. <https://www.revista.coba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/358>
- Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., García-Vázquez, Z. and Méndez-González, M., 2010b. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 168, pp. 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.022>
- Rosado-Aguilar, J.A., Arieta-Román, R., Rodríguez-Vivas, R.I., Carrillo-Pereza, R. and Peniche-Cardena, A. 2013., Acaricidal activity of extracts from *Annona reticulata* (Annonaceae), *Solanum melongena* (Solanaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus* resistant to acaricides. 24<sup>th</sup> International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 25-29 August. Perth, Australia.
- Rosado-Aguilar, J.A., Arjona-Cambranes, K., Flota-Burgos, G.J. and Rodríguez-Vivas, R.I., 2016. Actividad antihelmíntica de extractos metanólicos contra huevos del orden Strongylida de bovinos. IV Seminario Internacional y V Nacional de Investigadores en Salud y Producción animal SENISPA. 11, 12 y 13 octubre. Tunja, Colombia.

- Rosado-Aguilar, J. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Borges-Argaez, R. and Arjona-Cambranes, K. A., 2017a. Acaricidal activity of *Havardia albicans* and *Caesalpinia gaumeri* methanolic leaf extracts on *Rhipicephalus microplus* and its toxicity to laboratory animals. *Experimental and Applied Acarology*, 71(4), pp. 345-354. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0130-1>
- Rosado-Aguilar, J.A., Arjona-Cambranes, K.A., Carrillo-Pereza, J.R., Rodríguez-Vivas, R.I. and Bolio-González., 2017b. Acaricidal activity against *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma* spp. of extracts from *Diospyros anisandra* (Ebenaceae) collected in different seasons. 26<sup>th</sup> International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. September 4 – 8. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Rosado-Aguilar, J.A., Arjona-Cambranes, K., Torres-Acosta, J.F.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Bolio-González, M.E., Ortega-Pacheco, A., Alzina-López, A., Gutiérrez-Ruiz, E.J., Gutiérrez-Blanco, E. and Aguilar-Caballero, A.J., 2017c. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity against ticks. *Veterinary Parasitology*, 238, pp. 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.023>
- Saeed, M., Beveridge, I., Abbas, G., Beasley, A., Bauquier, J., Wilkes, E., Jacobson, C., Hughes, K.J., El-Hage, C., O'Handley, R., Hurley, J., Cudmore, L., Carrigan, P., Walter, L., Tennent-Brown, B., Nielsen, M.K. and Jabbar, A., 2019. Systematic review of gastrointestinal nematodes of horses from Australia. *Parasites & Vectors*. 12(1), pp. 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3445-4>
- Saldanha-Elias, A.M., Silva, M.A., Silva, V.O., Amorim, S.L.A., Coutinho, A.R., Santos, H.A., Giunchetti, R.C., Vitor, R.W.A., and Geiger, S.M., 2019. Prevalence of Endoparasites in Urban Stray Dogs from Brazil Diagnosed with Leishmania, with Potential for Human Zoonoses. *Acta Parasitologica*. 64, pp. 352-359. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00043-x>
- Sariego-Frómata, S., Marín-Morán, J.E., Ochoa-Pacheco, A. and Viera-Tamayo, Y., 2013. *Petiveria alliacea* L.: distintas condiciones experimentales en la elaboración de extractos con actividad antimicrobiana. *Química Viva*, 3, pp. 274-287. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86329278008.pdf>
- Sumano, H. and Ocampo, L., 2006. Farmacología veterinaria. 3ª edición. México: MacGraw-Hill Interamericana.
- Uc-Cachón, A.H., Borges-Argáez, R., Said-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., González-Salazar, F., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M. and Molina-Salinas, G.M., 2014. Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 21(1), pp. 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2013.08.001>
- Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H. and Chan-Pérez, J.I., 2014. Anthelmintic activity of acetone:water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology*, 206, pp. 322-327. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.008>