



## Evaluación antihelmíntica de cuatro extractos de árboles forrajeros contra el nematodo *Haemonchus contortus* bajo condiciones *in vitro*



Itzel Santiago-Figueroa <sup>a</sup>

Alejandro Lara-Bueno <sup>b</sup>

Roberto González-Garduño <sup>c</sup>

Pedro Mendoza-de Gives <sup>d</sup>

Edgar Jesús Delgado-Núñez <sup>e</sup>

Ema de Jesús Maldonado-Simán <sup>b</sup>

Yagoob Garedaghi <sup>f</sup>

Agustín Olmedo-Juárez <sup>d\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

<sup>b</sup> Universidad Autónoma Chapingo. Posgrado en Producción Animal. Chapingo, Estado de México, México.

<sup>c</sup> Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria Sur Sureste. Teapa, Tabasco, México.

<sup>d</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla 8534, Jiutepec 62574, Morelos, México.

<sup>e</sup> Universidad Autónoma de Guerrero. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Iguala, Guerrero, México.

<sup>f</sup> Islamic Azad University. Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology. Tabriz, Iran.

\*Autor de correspondencia: [olmedo.agustin@inifap.gob.mx](mailto:olmedo.agustin@inifap.gob.mx), [aolmedoj@gmail.com](mailto:aolmedoj@gmail.com)

**Resumen:**

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto nematicida de cuatro extractos hidroalcohólicos (EHA) de *Brosimum alicastrum* (EHA-Ba), *Guazuma ulmifolia* (EHA-Gu), *Erythrina americana* (EHA-Ea) y *Leucaena leucocephala* (EHA-Ll) contra *Haemonchus contortus*. Se usaron las pruebas de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) y mortalidad larval (larvas infectantes). Los tratamientos fueron los EHA´s a concentraciones de 6.25-50 mg/ml para IEH y de 25-100 mg/ml para mortalidad larval, ivermectina (5 mg/ml, control positivo) y agua destilada (control negativo). Los datos se analizaron mediante un ANOVA y los tratamientos con efecto dependiente a la concentración se sometieron a un análisis de regresión para determinar las concentraciones letales (CL50 y CL90). Además, se realizó un análisis fitoquímico a los extractos para identificar la presencia de los principales metabolitos secundarios. La mejor actividad ovicida y larvicida fue observada en EHA-Gu con un 96.78 % de IEH a 6.25 mg/ml y 57.2 % de mortalidad larval a 75 mg/ml. Seguido de EHA-Ba mostrando 90 % IEH a 6.25 mg/ml y un 58.0 % de mortalidad larval a 75 mg/ml. Las CL50 y CL90 del EHA-Gu sobre la IEH fueron 2.7 y 4.4 mg/ml, respectivamente. Mientras que las CL´s de este mismo extracto sobre larvas fue de CL50=64 y CL90=125 mg/ml. El análisis fitoquímico indica que todos los extractos contienen taninos, cumarinas, flavonoides y terpenos. Las especies forrajeras *G. ulmifolia* y *E. americana* podrían ser plantas candidatas para el control de *H. contortus*.

**Palabras clave:** Árboles forrajeros, Metabolitos secundarios, *Haemonchus contortus* Mortalidad de larvas, Inhibición de la eclosión de huevos.

Recibido: 13/10/2022

Aceptado: 12/06/2023

## Introducción

En las regiones tropicales, los nematodos gastrointestinales (NGI) representan un grave problema en pequeños rumiantes; y para disminuir el impacto que estos organismos tienen sobre los animales es necesario realizar algún tipo de tratamiento<sup>(1)</sup>. *Haemonchus contortus* es un nematodo hematófago de mayor prevalencia a nivel mundial en ovinos y caprinos que afecta su salud<sup>(2,3)</sup>. Este parásito causa diferentes alteraciones en su hospedero entre ellas reducción en la tasa de crecimiento, anemias y puede causar la muerte súbita<sup>(3)</sup>. El principal método para el control de NGI en pequeños rumiantes incluyendo *H. contortus*, es mediante el uso de antihelmínticos de amplio espectro tales como bencimidazoles, lactonas macrocíclicas, imidazotiazoles y más recientemente el derivado de amino-acetonitrilo. El uso

inadecuado y excesivo de estos antiparasitarios ha desencadenado un problema de resistencia antihelmíntica múltiple a nivel mundial<sup>(4)</sup>.

En los sistemas de producción de pequeños rumiantes bajo condiciones de pastoreo, el uso de especies arbóreas con potencial forrajero representa una opción viable para su alimentación, debido a que contienen una fuente rica de energía y proteína<sup>(5)</sup>. Se ha determinado que estas arbóreas contienen metabolitos secundarios, por lo cual podrían presentar actividad antihelmíntica<sup>(6)</sup>. Entre las arbóreas más conocidas se encuentran: *Brosimum alicastrum* que contiene de 14 a 17 % de proteína cruda (PC)<sup>(7,8)</sup>; *Guazuma ulmifolia* contiene 17 % de PC<sup>(9,10)</sup>; *Erythrina americana*, que aporta de 14 a 18.9 % de PC<sup>(11,12)</sup>; y *Leucaena leucocephala* que aporta de 23.4 hasta 33.2 % de PC, dependiendo de la edad de rebrote y la época del año<sup>(13,14)</sup>. En estas especies arbóreas se han identificado algunos metabolitos secundarios; por ejemplo en el follaje de *B. alicastrum* se reportan fenoles como ácido gálico<sup>(15)</sup>, *G. ulmifolia* presenta fenoles como ácido cafeico, clorogénico y flavonoides como catequina, quercetina y luteolina<sup>(16)</sup>. *Erythrina americana* contiene alcaloides (erysotrina) en las semillas, flores y follaje<sup>(17)</sup> y fenoles como taninos hidrolizables<sup>(12)</sup>. Por su parte *L. leucocephala* contiene flavonoides como quercetina, kaempferol, luteolina, entre otros<sup>(18)</sup>.

Debido a la presencia de estos metabolitos secundarios en el follaje de estas plantas y a su disponibilidad en las regiones tropicales resulta interesante conocer su efecto sobre los NGI de pequeños rumiantes; sin embargo, existe información limitada de algunas de estas plantas. En ovejas alimentadas 30 días con *G. ulmifolia* se encontró una tendencia decreciente altamente significativa ( $P < 0.001$ ) en el conteo de huevos por gramo de heces<sup>(19)</sup>, mientras que el extracto metanólico de la semilla de *E. americana* ejerce un efecto nematocida e insecticida sobre *Panagrellus redivivus* y *Anopheles sp.* respectivamente<sup>(20-22)</sup>. Por otro lado, extractos acuosos de *L. leucocephala* y *G. ulmifolia* mostraron efecto inhibitorio de la eclosión de huevos del 50 % a 1.25 mg/ml sobre de NGI de ovinos<sup>(23)</sup>. Con la finalidad de conocer el efecto de *B. alicastrum*, *G. ulmifolia*, *E. americana* y *L. leucocephala*, sobre el nematodo *H. contortus* se evaluaron los extractos hidroalcohólicos sobre huevos y larvas infectantes del parásito *H. contortus* bajo condiciones *in vitro*.

## Material y métodos

### Muestras de forraje

La colecta del material vegetal se realizó en la región de la Huasteca Potosina, localizada en el estado de San Luis Potosí. Esta región cuenta con un clima subhúmedo con lluvias en verano<sup>(24)</sup>. Se colectaron hojas y tallos de árboles maduros con edad de 3, 12, 20 y 30 años para *L. leucocephala*, *G. ulmifolia*, *B. alicastrum* y *E. americana* respectivamente. Cabe

señalar que el material colectado fueron hojas y tallos no senescentes. La colecta se realizó durante los meses de junio a octubre de 2017. Posteriormente el material fue secado en estufa de aire forzado y molido hasta un tamaño de partícula de 0.5 cm.

### **Extracto hidroalcohólico**

Cada especie arbórea se maceró con una solución hidroalcohólica, colocando 300 g del material vegetal seco y molido en una solución de 70 % agua y 30 % metanol y se dejó macerar durante 24 h. En seguida cada extracto se filtró para retirar el material vegetal. Después de obtener la parte líquida, los solventes se eliminaron por destilación a presión reducida usando un rotavapor R-300 (BUCHI, Suiza) hasta obtener extractos semisólidos. En seguida cada extracto se congeló a -80 °C durante 24 h y finalmente se llevaron a sequedad total por procesos de liofilización y se almacenaron a -40 °C hasta su posterior uso.

### **Análisis cualitativo de compuestos secundarios de los extractos**

El perfil químico de los extractos hidroalcohólicos se determinó siguiendo diferentes procedimientos fitoquímicos usando compuestos de referencia<sup>(25)</sup>. La identificación de alcaloides se realizó mediante la técnica de Dragendorff, Mayer y Wagner<sup>(25)</sup>. La presencia de cumarinas se determinó con la prueba de Bornträger, mientras que el contenido de flavonoides fue con la prueba de Mg<sup>2+</sup> y HCl<sup>(26,27)</sup>. Se utilizó la prueba de cloruro férrico, solución salina y gelatina para la identificación de taninos<sup>(28,29)</sup>. La identificación de terpenos se determinó usando las pruebas de Liebermann-Burchard y Salkowski y la formación de espuma fue el indicador usado para identificar la presencia de saponinas<sup>(27)</sup>.

### **Material biológico**

Huevos y larvas de *Haemonchus contortus* se obtuvieron de un ovino donador libre de nematodos gastrointestinales de tres meses y medio de edad y 22 kg de peso vivo previamente infectado artificialmente con una cepa mono-específica del parásito en estudio (cepa INIFAP-HcIVMr-SAI). El ovino se alojó en una jaula individual elevada provista de alfalfa, alimento comercial y agua a libre acceso. El cordero se atendió siguiendo los cuidados de salud y bienestar de acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999.

### **Recolección de huevos de *H. contortus***

Se recolectaron heces directamente del recto del animal infectado. Posteriormente se lavaron con agua limpia a través de tamices de diferente diámetro (240, 150, 120 y 30 µm) y la suspensión del último tamiz se colectó en tubos Falcon de 15 ml conteniendo los parásitos. En seguida los tubos se centrifugaron a 3,500 rpm durante 5 min (tres veces) con la finalidad

de obtener huevos libres de residuos de heces. Finalmente se cuantificaron mediante alícuotas para verificar una concentración de  $100 \pm 15$  huevos en una suspensión acuosa de  $50 \mu\text{l}$ <sup>(30)</sup>.

### **Obtención de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *H. contortus***

Las L<sub>3</sub> se obtuvieron mediante coprocultivos del animal donador. Las heces colectadas del animal se mantuvieron húmedas a temperatura ambiente durante siete días. Después del tiempo requerido las larvas se recuperaron mediante la técnica de Baermann<sup>(31)</sup>. Las L<sub>3</sub> obtenidas se almacenaron en cajas de cultivo a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Previo a realizar los bioensayos las L<sub>3</sub> se suspendieron en hipoclorito ( $187 \mu\text{l}$  cloro y  $4,813 \text{ ml}$  de agua destilada) durante 5 min con la finalidad de que se desenvainaran. En seguida las L<sub>3</sub> se lavaron con agua destilada tres veces mediante centrifugación ( $3,500 \text{ rpm}$  por 5 min). Posteriormente se realizaron diferentes diluciones hasta obtener  $100 \pm 15$  L<sub>3</sub> contenidas en  $50 \mu\text{l}$  de una suspensión acuosa.

### **Inhibición de la eclosión de huevos (IEH)**

Se realizaron bioensayos en placas de microtitulación de 96 pozos. Cada extracto se evaluó de forma individual por triplicado considerando cuatro repeticiones por replica ( $n=12$ ). Los E-HAs de las cuatro especies arbóreas se evaluaron a concentraciones de 50, 25, 12.5 y 6.25 mg/ml. Asimismo, en cada bioensayo se incluyó agua destilada como control negativo e ivermectina (5 mg/ml) como control positivo. A cada pozo se colocaron  $50 \mu\text{l}$  de una suspensión acuosa conteniendo  $100 \pm 15$  huevos y en seguida se agregaron  $50 \mu\text{l}$  de extracto a la concentración requerida o controles según correspondiera. Las placas se incubaron en cámara húmeda a  $25\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 h. Pasado el tiempo se contabilizó el número de huevos y larvas en cada pozo (microscopio a  $10\times$  Motic®). El porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (%IEH) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\%IEH = [(\text{número de huevos})/(\text{número de larvas} + \text{número de huevos})] \times 100$$

### **Mortalidad larval**

Los bioensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pozos ( $n=12$ ). Cada extracto se evaluó de forma individual por triplicado considerando cuatro repeticiones por replica ( $n=12$ ). Los tratamientos fueron los extractos a diferentes concentraciones (100, 75, 50 y 25 mg/ml). Ivermectina (5 mg/ml) y agua destilada fueron usados como control positivo y negativo respectivamente. A cada pozo se depositó una suspensión acuosa de  $50 \mu\text{l}$  conteniendo  $100 \pm 15$  L<sub>3</sub> y en seguida se agregaron  $50 \mu\text{l}$  de los tratamientos según correspondiera. Las placas se incubaron en cámara húmeda a  $25\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 h. Posteriormente se cuantificaron las larvas vivas y muertas contenidas en cada pozo basándose

a los criterios descritos por Olmedo-Juárez *et al*<sup>(32)</sup>. El porcentaje de mortalidad larval (ML) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%ML = \left[ \frac{(\text{número de larvas muertas})}{(\text{número de larvas vivas} + \text{número de larvas muertas})} \right] \times 100$$

### **Análisis estadístico**

Los porcentajes de IEH y ML fueron previamente normalizados usando la raíz cuadrada y analizados mediante un ANOVA bajo un diseño completamente al azar con el modelo lineal general (PROC GLM) del paquete estadístico SAS versión 9.0<sup>(33)</sup>. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia de 0.05. Los tratamientos con efecto dependiente a la concentración se sometieron a un análisis de regresión para determinar las concentraciones letales 50 y 90 (CL50 y CL90) mediante el sistema PROC PROBIT del paquete estadístico SAS<sup>(33)</sup>.

## **Resultados**

### **Inhibición de la eclosión de huevos y mortalidad larval**

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de la actividad ovicida y larvicida del EHA de *B. alicastrum* sobre el nematodo *H. contortus*. Dicha actividad fue diferente ( $P < 0.05$ ) en cada concentración evaluada, obteniendo el mayor efecto inhibitorio de la eclosión de huevos a 50 mg/ml. Por otro lado, en la prueba de mortalidad larval, solo se logró un porcentaje de mortalidad de 29 % a 100 mg/ml.

**Cuadro 1:** Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (%IEH) y mortalidad de larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus* causadas por un extracto hidroalcohólico de *Brosimum alicastrum*

Tratamientos	Promedio de huevos y larvas		%IEH ± DE	Promedio de larvas vivas y muertas		% Mortalidad ± DE
	Huevos	Larvas		Muertas	Vivas	
Agua destilada	2.9	138.2	2.07 ± 1.0 <sup>f</sup>	2.8	74.5	4.6 ± 4.3 <sup>c</sup>
Ivermectina (5 mg/ml)	127.2	0.8	99.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	139.3	0	100 <sup>a</sup>
EHA-Ba (mg/ml)						
100.0	---	---	---	34.8	87.7	29.0 ± 11.1 <sup>b</sup>
75.0	---	---	---	32.3	94.1	26.1 ± 7.6 <sup>b</sup>
50.0	92.8	21.1	81.4 ± 3.5 <sup>b</sup>	14.3	103.6	14.4 ± 14.4 <sup>b</sup>
25.0	82.0	36.6	69.1 ± 5.1 <sup>c</sup>	11.3	121.6	8.5 ± 5.2 <sup>c</sup>
12.5	75.5	43	63.8 ± 2.4 <sup>d</sup>	---	---	---
6.25	70.0	56.1	55.5 ± 1.7 <sup>e</sup>	---	---	---
Coefficiente de variación			0.62			23.1
R <sup>2</sup>			0.99			0.95
Error estándar de la media (EEM)			0.04			0.15
Valor de P			<0.001			<0.0001

EHA-Ba=Extracto hidroalcohólico de *Brosimum alicastrum*. ---= no evaluado. DE= desviación estándar.

<sup>a-f</sup> Medias con distinta literal dentro de la misma columna indican diferencia ( $P < 0.05$ ).

El EHA de *G. ulmifolia* exhibió un efecto ovicida cercano al 100 % a partir de la concentración 6.25 mg/ml, siendo estadísticamente igual a la que se obtuvo con ivermectina hasta la concentración de 12.5 mg/ml (Cuadro 2). Un efecto similar se observó usando el EHA de *E. americana* a concentraciones de 50, 25 y 12.5 mg/ml (Cuadro 3).

**Cuadro 2:** Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos y mortalidad de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Haemonchus contortus* causadas por un extracto hidroalcohólico de *Guazuma ulmifolia*

Tratamientos	Promedio de huevos y larvas		%IEH ± DE	Promedio de larvas vivas y muertas		% Mortalidad ± DE
	Huevos	Larvas		Muertas	Vivas	
Agua destilada	5.5	135.3	2.07 ± 1.0 <sup>f</sup>	1.9	153.8	1.1 ± 1.8 <sup>e</sup>
Ivermectina (5 mg/ml)	127.3	0	99.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	158.1	0	100 <sup>a</sup>
EHA-Gu (mg/ml)						
100.0	---	---	---	109.7	18.5	85.9 ± 7.4 <sup>b</sup>
75.0	---	---	---	85.3	60.5	57.2 ± 15.5 <sup>c</sup>
50.0	118.8	0.4	99.5 ± 0.7 <sup>ab</sup>	43.5	103.8	26.8 ± 15.0 <sup>d</sup>
25.0	112.5	2.3	97.8 ± 2.8 <sup>ab</sup>	11.3	138	7.7 ± 4.9 <sup>e</sup>
12.5	120.8	0.75	99.4 ± 0.9 <sup>ab</sup>	---	---	---
6.25	113.4	3.9	96.78 ± 5.3 <sup>b</sup>	---	---	---
Coefficiente de variación			3.12			21.3
R <sup>2</sup>			0.99			0.95
Error estándar de la media (EEM)			0.03			0.18
Valor de P			<0.001			<0.0001

DE= desviación estándar; EHA-Ba=Extracto hidroalcohólico de *Guazuma ulmifolia*. ---= no evaluado.

<sup>a-f</sup> Medias con distinta literal dentro de la misma columna indican diferencia ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 3:** Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos y mortalidad de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Haemonchus contortus* causadas por un extracto hidroalcohólico de *Erythrina americana*

Tratamientos	Promedio de huevos y larvas		%IEH ± DE	Promedio de larvas vivas y muertas		% Mortalidad ± DE
	Huevos	Larvas		Muertas	Vivas	
Agua destilada	5.9	134.0	4.1 ± 2.0 <sup>c</sup>	3.0	96.3	3.6 ± 2.9 <sup>d</sup>
Ivermectina (5 mg/ml)	111.5	0.2	99.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	145.4	0	100 <sup>a</sup>
EHA-Ea (mg/ml)						
100.0	---	---	---	93.4	49.1	60.0 ± 13.5 <sup>b</sup>
75.0	---	---	---	102.7	50.1	58.0 ± 24.8 <sup>b</sup>
50.0	111.4	2.6	97.0 ± 7.5 <sup>ab</sup>	86.8	49.2	62.6 ± 10.2 <sup>b</sup>
25.0	86.4	0.5	99.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	50.3	93.3	35.8 ± 7.3 <sup>c</sup>
12.5	91.3	2.0	97.7 ± 2.6 <sup>a</sup>	---	---	---
6.25	94.0	9.3	88.8 ± 19.0 <sup>ab</sup>	---	---	---
Coeficiente de variación			10.7			21.4
R <sup>2</sup>			0.94			0.89
Error estándar de la media (EEM)			0.12			0.16
Valor de P			<0.0001			<0.0001

EHA-Ba=Extracto hidroalcohólico de *Erythrina americana*. ---= no evaluado. DE=desviación estándar.

<sup>a-d</sup> Medias con distinta literal dentro de la misma columna indican diferencia ( $P < 0.05$ ).

La mayor actividad larvicida (85 % ML) del extracto de *G. ulmifolia* se logró usando la concentración más alta (100 mg/ml). Mientras que el EHA de *E. americana* solo causó un 60 % de mortalidad a la misma concentración. Por otro lado, los resultados obtenidos con el EHA a partir de *L. leucocephala* mostraron el mayor porcentaje de IEH (83.2 %) cuando se usó la concentración de 50 mg/ml. Y para ML solo se logró 63 % al usar 100 mg/ml del EHA (Cuadro 4).

**Cuadro 4:** Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos y mortalidad de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Haemonchus contortus* causadas por un extracto hidroalcohólico de *Leucaena leucocephala*

Tratamientos	Promedio de huevos y larvas		%IEH ± DE	Promedio de larvas vivas y muertas		% Mortalidad ± DE
	Huevos	Larvas		Muertas	Vivas	
Agua destilada	7.7	131.3	5.6 ± 3.5 <sup>c</sup>	4.7	122.0	5.2 ± 2.9 <sup>d</sup>
Ivermectina (5 mg/ml)	112.5	0.1	99.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	145.4	0	100 <sup>a</sup>
EHA-L1 (mg/ml)						
100.0	---	---	---	75.7	40.0	63.0 ± 22.9 <sup>b</sup>
75.0	---	---	---	27.6	99.5	21.7 ± 8.4 <sup>c</sup>
50.0	97.0	20.4	83.2 ± 12.4 <sup>a</sup>	13.0	95.2	12.0 ± 2.1 <sup>cd</sup>
25.0	53.9	66.8	48.9 ± 31.7 <sup>b</sup>	7.5	114.2	6.2 ± 2.9 <sup>d</sup>
12.5	50.5	65.9	48.4 ± 35.3 <sup>b</sup>	---	---	---
6.25	44.4	65.9	45.9 ± 38.6 <sup>b</sup>	---	---	---
Coeficiente de variación			46.1			29.2
R <sup>2</sup>			0.59			0.93
Error estándar de la media (EEM)			0.35			0.21
Valor de P			<0.0001			<0.0001

EHA-Ba=Extracto hidroalcohólico de *Leucaena leucocephala*. ---= no evaluado. DE= desviación estándar.

<sup>a-d</sup> Medias con distinta literal dentro de la misma columna indican diferencia ( $P < 0.05$ ).

### Concentraciones letales (CL)

Las Cs 50 y 90 requeridas para causar IEH y mortalidad larval son mostradas en el Cuadro 5. El análisis de regresión indicó que los extractos con mejor efecto inhibitorio de la eclosión de huevos fueron EHA-Ea (CL<sub>50</sub>= 0.16 mg/ml y CL<sub>90</sub>= 4.41 mg/ml) y EHA-Gu (CL<sub>50</sub>=2.7 mg/ml y CL<sub>90</sub>=4.4 mg/ml). En lo que respecta a la mortalidad larval el mejor tratamiento fue observado en EHA-Gu con CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de 64.0 y 125.2 mg/ml, respectivamente.

### Identificación de metabolitos secundarios

El análisis fitoquímico permitió observar la presencia de metabolitos secundarios en los cuatro extractos de las plantas tales como taninos, cumarinas, saponinas, alcaloides y flavonoides (Cuadro 6).

**Cuadro 5:** Concentraciones letales (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>) de extractos hidroalcohólicos de cuatro forrajeras arbóreas requeridas para inhibir la eclosión de huevos y matar larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Haemonchus contortus* a las 48 horas

Planta	% Inhibición de la eclosión de huevos				% Mortalidad de larvas infectantes (L <sub>3</sub> )			
	CL <sub>50</sub>	IC limites 95% (inferior- superior)	CL <sub>90</sub>	IC limites 95% (inferior- superior)	CL <sub>50</sub>	IC limites 95% (inferior- superior)	CL <sub>90</sub>	IC limites 95% (inferior- superior)
EHA-Ba	4.8	(3.88-5.70)	197	(145.6-293.1)	187.8	(156.67-2.70.6)	608.7	(376.7- ..)
EHA-Gu	2.7	(2.6-2.8)	4.4	(2.62-2.80)	64.0	(62.45-65.66)	125.2	(119.6-132.0)
EHA-Ea	0.16	(0.04-0.38)	4.1	(2.8-5.4)	NA	---	NA	---
EHA-LI	17.9	(16.8-19.1)	201.9	(167.6-251.0)	93.12	(91.61-94.71)	124.5	(119.6-131.36)

IC= intervalo de confianza. NA= no activo. EHA-Ba=*Brosimum alicastrum*, EHA-Gu=*Guazuma ulmifolia*, EHA-Ea=*Erythrina americana*.

**Cuadro 6:** Resultados del análisis fito-químico cualitativo de los extractos hidroalcohólicos

Metabolito	Reacción colorimétrica	Extracto hidroalcohólico (E-HA)			
		<i>Brosimum alicastrum</i>	<i>Guazuma ulmifolia</i>	<i>Erythrina americana</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	+
	Mayer	-	-	-	+
	Wagner	-	-	-	++
Cumarinas	Borntraegen	-	+	+	+
Flavonoides	Mg <sup>2+</sup> y HCL	-	-	+	+
	Cloruro férrico	+++	+++	+++	+++
Taninos	Solución de gelatina	-	-	-	-
	Gelatina y solución salina	-	-	-	-
	Solución salina	+++	+++	+++	+++
Triterpenos/ Esteroides	Liebermann-Burchard	-	+	-	+
	Salkowski	+	+	+	+
Saponinas	Formación de espuma	+	-	+	++

(-) No se detectó (+) reacción positiva de luz (++) reacción positiva (+++) reacción positiva fuerte.

## Discusión

Los productos naturales obtenidos de plantas ricas en metabolitos secundarios han sido evaluados para diferentes fines medicinales tales como antioxidantes, antimicrobianos y antiparasitarios<sup>(34-36)</sup>. Los cuatro extractos hidroalcohólicos evaluados en el presente estudio exhiben actividad nematocida contra *Haemonchus contortus*, un parásito hematófago de mayor prevalencia en ovinos y caprinos que afecta su salud. Existen pocos estudios del uso de *Brosimum alicastrum* como antihelmíntico, a pesar de que es un recurso abundante en las regiones tropicales; se ha observado que el extracto de acetona: agua (70:30) sobre larvas de *H. contortus* inhibe el 95 % de la capacidad de desenvainar con una concentración de 1.2 mg/ml<sup>(37)</sup>. Mientras que en el presente estudio usando extracto a base de metanol:agua se requirió 187.8 mg/ml para causar 50 % de mortalidad. Por otra parte, se ha demostrado que un extracto acetónico de *G. ulmifolia* exhibe actividad ovicida sobre *Cooperia punctata*, otro nematodo parásito de bovinos, inhibiendo hasta 70 % de la eclosión a una concentración de

9.6 mg/ml<sup>(38)</sup>. Asimismo, un extracto etanólico (100 mg/ml) de esta especie vegetal, ha mostrado efecto nematicida sobre *Pheritima posthuma*<sup>(39)</sup>. En un estudio reciente, se ha demostrado que un extracto hidroalcohólico de *G. ulmifolia* exhibe importante efecto ovicida (90 % IEH) a concentración de 0.50 mg/ml<sup>(40)</sup>. La actividad ovicida reportada en el presente estudio con el extracto hidroalcohólico de *G. ulmifolia* indica que se requiere mayor concentración (CL<sub>50</sub>=4.4 mg/ml) a lo reportado por el trabajo anterior. Esto podría explicarse a que se utilizó una especie vegetal colectada en distinta región y probablemente el contenido de compuestos bioactivos podría ser diferente entre ambas especies vegetales. Aunque en el presente trabajo se ha reportado que *G. ulmifolia* contiene algunos compuestos secundarios tales como taninos, flavonoides, cumarinas y terpenos, es de suma importancia conocer el contenido de cada uno de dichos compuestos para relacionarlos con la actividad antihelmíntica. Por otro lado, también se han realizado estudios *in vivo* en cabritos infectados artificialmente con larvas infectantes de *H. contortus*, los cuales fueron alimentados con 10 % de follaje de *G. ulmifolia* y no se obtuvieron diferencias entre el conteo de huevos por gramo de heces (HPG) comparados con el grupo testigo<sup>(41)</sup>. Los mismos resultados se observaron en ovejas Pelibuey alimentadas con 30 % de *G. ulmifolia*, no obstante, se observó tendencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ) hacia la disminución del HPG en estas ovejas<sup>(19)</sup>.

Es conocido que las especies del género *Erythrina* poseen una amplia variedad de alcaloides que han sido identificados y se les atribuye un efecto de bloqueo neuromuscular<sup>(20)</sup> además, el uso de extracto metanólico sobre *Daphnia magna* resultó ser altamente tóxico<sup>(21)</sup>, por lo que el efecto nematicida encontrado en el presente estudio podría atribuirse a esos compuestos. Un extracto metanólico de *E. variegata* ha sido evaluado contra los crustáceos del género *Artemia*, así como en lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) y helmintos parásitos de aves como *Ascardi galli* y *Raillietina spiralis* y se reportó mortalidad sobre esos modelos biológicos usando concentraciones de 10 mg/ml<sup>(42,43)</sup>. Por otro lado, en un estudio realizado en ovinos Pelibuey alimentados con follaje *E. americana* no manifestaron cambios en el conteo de huevos durante la fase experimental<sup>(12)</sup>.

Las CLs 50 y 90 para *B. alicastrum* en larvas de nematodos gastrointestinales reportados en otro estudio fueron 291.6 y 666.6 mg/ml, respectivamente<sup>(44)</sup>, las cuales fueron similares a las reportadas en el presente estudio (187.8 y 608.7 mg/ml). En lo que respecta, a *G. ulmifolia* los resultados del presente estudio indican que para inhibir el 50 % de la eclosión de huevos de *H. contortus*, se requieren 2.2 mg/ml del extracto hidroalcohólico, mientras que en otro estudio con un extracto acetona:agua (70:30) de *G. ulmifolia* contra *C. punctata* fue de 8.84 mg/ml<sup>(38)</sup>. En ese mismo estudio los autores reportan una CL<sub>50</sub> del extracto 70:30 acetona:agua de *L. leucocephala*, de 11.77 mg/ml<sup>(38)</sup>. En el presente trabajo de investigación las CLs calculadas para el EHA de las hojas de esta arbórea fueron más altas (CL<sub>50</sub>=52.8 y CL<sub>90</sub>=308 mg/ml) respectivamente (Cuadro 5)<sup>(45)</sup>. La CL de *E. americana* sobre *H. contortus* no ha sido reportada previamente, sin embargo, para la especie *E. variegata*, sobre

crustáceos del género *Artemia*, la CL50 fue de 3.99 mg/ml<sup>(43)</sup>, valor superior al del presente estudio (0.19 mg/ml).

Algunos metabolitos secundarios tales como taninos, saponinas y cumarinas se han identificado en corteza y hojas de *B. alicastrum*<sup>(46,47)</sup>. En el presente estudio, el perfil químico en el extracto de *B. alicastrum* indicó la presencia taninos y saponinas. Por otro lado, en *G. ulmifolia* se han reportado saponinas, glucósidos cianogénicos, fenoles y esteroides de manera cualitativa<sup>(48)</sup>, mismos que fueron encontrados en el presente estudio. En otras especies del género *Erythrina*, se ha reportado que contienen metabolitos secundarios parecidos a los que se encontraron en el extracto hidroalcohólico de *E. americana*. Se ha notificado que *E. variegata* contiene alcaloides, saponinas y flavonoides<sup>(43)</sup>. En otro estudio en *E. americana* proveniente de Tabasco, México se ha identificado altos niveles de taninos<sup>(12)</sup>. Los metabolitos secundarios reportados en *L. leucocephala* dependen del tipo de extracto; por ejemplo, en extractos acuosos y etanólicos se han identificado saponinas, fenoles, taninos, terpenos entre otros, similar al perfil encontrado en este estudio<sup>(45,49-51)</sup>.

## Conclusiones e implicaciones

Se concluye que el extracto hidroalcohólico de los cuatro árboles estudiados pueden ser una opción para el control de *Haemonchus contortus* en pequeños rumiantes, en especial *G. ulmifolia* y *E. americana*. Se recomienda continuar con su estudio para identificar los compuestos activos en cada caso.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías por el financiamiento durante el periodo de Estudios Doctorales del autor principal (número de beca: 429558).

## Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

## Literatura citada:

1. Sieuchand S, Charles R, Caruth J, Basu A, von Samson-Himmelstjerna G, Georges K. A field study on the occurrence of gastrointestinal nematodes in sheep over the wet and dry seasons in two West Indian Islands. *Transbounda Transbound Emerg Dis* 2020;67(2):193-200.
2. Emery DL, Hunt PW, Le Jambre, LF. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int J Parasitol* 2016;46(12):755-769.

3. Fly JK, Hill FI, Hernandez MD. A Review: *Haemonchus contortus* infection in pasture-based sheep production systems, with a focus on the pathogenesis of anaemia and changes in haematological parameters. *Animals* 2022;12:1238.
4. Höglund J, Enweji N, Gustafsson K. First case of monepantel resistant nematodes of sheep in Sweden. *Vet Parasitol: Reg Stud Rep* 2020;22:100479.
5. Castillo-Linares EB, López-Herrera MA, Vélez-Izquierdo A, Oliva-Hernández J. Harvest and haulage silvopastoral system as an option for sustainable sheep production in the humid tropic. *Rev Mex Cienc Forest* 2021;12(66):5-25.
6. Torres-Fajardo RA, González-Pech PG, Ventura-Cordero J, Ortíz-Campo GI, Sandoval-Castro CA, Torres-Acosta JFJ. Feed resource selection of Criollo goats is the result of an interaction between plant resources, condensed tannins and *Haemonchus contortus* infection. *Appl Anim Behav Sci* 2018;208:49-55.
7. Rojas-Schroeder JA, Sarmiento-Franco L, Sandoval-Castro CA, Santos-Rical RH. Utilización del follaje de Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) en la alimentación. *Trop Subtrop Agroecosystems* 2017;20:363-371.
8. Rodríguez-Villanueva H, Puch-Rodríguez J, Muñoz-González J, Sanginés-García J, Aguilar-Urquiza E, Chay-Canul A, *et al.* Intake, digestibility, and nitrogen balance in hair sheep fed *Pennisetum purpureum* supplemented with tropical tree foliage. *Agrofor Syst* 2020;94:665-674.
9. Mayren-Mendoza FJ, Rojas-García AR, Maldonado-Peralta MA, Ramírez-Reynoso O, Herrera-Pérez J, Torres-Salado N, *et al.* Comportamiento productivo de ovinos Pelibuey en pastoreo suplementados con follaje de *Guazuma ulmifolia* Lam. *Agroproductividad* 2018;11:29-33.
10. Milla LM, Cruz BL, Ramírez VS, Arjona JG, Zapata CC. Contenido de proteína y fibra en forrajes tropicales no afecta la preferencia en conejos de engorda. *Abanico Vet* 2021;11:1-11.
11. Oliva-Hernández J, López-Herrera MA, Castillo-Linares EB. Composición química y producción de follaje de *Erythrina americana* (Fabaceae) en cercos vivos durante dos épocas climáticas. *Rev Biol Trop* 2021;69(1):90-101.
12. Hernández-Espinoza DF, Ramos-Juárez JA, González-Garduño R, Lagunes-Espinoza LDC, López-Herrera MA, Oliva-Hernández J. Consumo de follaje de *Erythrina americana* Miller en ovejas Blackbelly x Pelibuey. *Rev Mex Cien Pecu* 2020;11(1):70-88.

13. Verdecia DM, Herrera RS, Ramírez JL, Leonard I, Andrés S, Giráldez FJ, *et al.* Effect of age of regrowth, chemical composition and secondary metabolites on the digestibility of *Leucaena leucocephala* in the Cauto Valley, Cuba. *Agroforest Syst* 2020;94:1247-1253.
14. Azuara-Morales I, López-Ortiz S, Jarillo-Rodríguez J, Pérez-Hernández P, Ortega-Jiménez E, Castillo-Gallegos E. Forage availability in a silvopastoral system having different densities of *Leucaena leucocephala* under Voisin grazing management. *Agroforest Syst* 2020;94:1701-1711.
15. González-González RM, Barragán-Mendoza L, Peraza-Campos AL, Muñiz-Valencia R, Ceballos-Magaña SG, Parra-Delgado H. Validation of an HPLC-CAD method for the determination of plant phenolics. *Rev Bras Farmacogn* 2019;29(5):689-693.
16. Morais SM, Calixto-Júnior JT, Ribeiro LM, Sousa HA, Silva AAS, Figueiredo FG, *et al.* Phenolic composition and antioxidant, anticholinesterase and antibiotic-modulating antifungal activities of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) ethanol extract. *S Afr J Bot* 2017;110:251-257.
17. Rambo DF, Biegelmeyer R, Toson NS, Dresch RR, Moreno PRH, Henriques AT. The genus *Erythrina* L.: A review on its alkaloids, preclinical, and clinical studies. *Phyther Res* 2019;33(5):1258-1276.
18. Romero N, Areche C, Cubides-Cárdenas J, Escobar N, García-Beltrán O, Simirgiotis JM, *et al.* *In vitro* anthelmintic evaluation of *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala*, and *Pithecellobium dulce*: fingerprint analysis of extracts by UHPLC-orbitrap mass spectrometry. *Molecules* 2020;25(13):3002.
19. Le Bodo E, Hornick JL, Moula N, Zuñiga SA, Martínez-Alfaro JC. Assessment of gastrointestinal parasites and productive parameters on sheep fed on a ration supplemented with *Guazuma ulmifolia* leaves in Southern Mexico. *Animals* 2020;10(9):1617.
20. Auró de Ocampo A, Jiménez ME. La herbolaria medicinal en el tratamiento de las enfermedades de los peces en México. *Vet Mex* 1993;24:291-295.
21. García MR, Soto HM, Martínez VM. Toxicidad de los extractos de las semillas de *Erythrina americana*. *Ciencia Ergo Sum* 2000;7:166-170.
22. Govindarajan M, Sivakumar R. Larvicidal, ovicidal, and adulticidal efficacy of *Erythrina indica* (Lam.) (Family: Fabaceae) against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 2014;113:777-791.

23. Antonio-Irineo N, Flota-Bañuelos C, Hernández-Marín A, Arreola-Enríquez J, Fraire-Cordero S. Estudio preliminar sobre la inhibición *in vitro* de nematodos gastrointestinales de ovinos con extractos acuosos de plantas forrajeras. *Abanico Vet* 2021;11:1-15.
24. INEGI. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Tamuín, San Luis Potosí. 2009. <http://www3.inegi.org.mx/>.
25. Wagner HXS, Bladt Z, Gain EM. *Plant drug analysis*. Berlin, Germany: Springer Verlag; 1996.
26. Domínguez XA. *Métodos de investigación fitoquímica.*, México: Limusa; 1973.
27. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, Nuevo León; 2016.
28. Ringuelet J, Vina S. *Productos naturales negetales*. 1ª ed., Buenos Aires, Argentina. Universidad nacional de la Plata; 2013.
29. Kuklinski C. *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega; 2000.
30. Coles G, Baue C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992;44:35-44.
31. Lumbreras H. Aplicación de la “Técnica de Baermann modificada en copa” en el diagnóstico y control terapéutico de la Balantidiosis. *Rev Med* 1961;30:21-25.
32. Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, Zamilpa A, Mendoza-de Gives P, Arece-García J, López-Arellano ME, *et al.* *In vitro* larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. *Vet Res Commun* 2017;41:227–232.
33. SAS. *The SAS System for Windows. Version 9*. SAS Institute. Inc., Cary, NC, USA; 2004.
34. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chem* 2022;383:132531.
35. Álvarez-Martínez FJ, Barrajon-Catalán E, Herranz-López M, Micol V. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils; An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine* 2021;90:153626.

36. Spiegler V, Liebau E, Hensel A. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against nematodes 2017;34:627-643.
37. Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. Vet Parasitol 2011;181:360-364.
38. von Son-de Fernex E, Alonso DMA, Mendoza GP, Valles MB, Zamilpa A, González CM. Actividad ovicida de extractos de cuatro especies de plantas contra el nematodo gastrointestinal *Cooperia punctata*. Vet Méx 2016;3.
39. Shekhawat N, Vijayvergia R. Anthelmintic of extracts of some medicinal plants. Int J Comp Sci Math 2011;3:183-187.
40. Rezéndiz-González G, Higuera-Piedrahita RI, Lara-Bueno A, González-Garduño R, Cortes-Morales JA, González-Cortazar M, *et al.* *In vitro* anthelmintic activity of a hydroalcoholic extract from *Guazuma ulmifolia* leaves against *Haemonchus contortus*. Pathogens 2022;11(10):1160.
41. León CY, Olivares PJ, Rojas HS, Villa MA, Valencia AMT, Hernández CE, *et al.* Effect of three fodder trees on *H. contortus* control and weight variations in kids. Ecos Rec Agropec 2015;2:193-201.
42. Satish BK, Ravindra AF. Investigation of anthelmintic potential of some plants claimed by trials of satpuda hills. Int J Pharm Tech Res 2009;1:68-72.
43. Shahriar M, Khair NZ, Sheikh Z, Chowdhury SF, Kamruzzaman, Bakhtiar SI, *et al.* Phytochemical analysis, cytotoxic and *in vitro* antioxidant activity of *Erythrina variegata* Bark. Eur J Med Plants 2016;11:1-5.
44. Alonso-Díaz A, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Hoste H. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. Vet Parasitol 2008;153:3113-319.
45. López-Rodríguez G, Rivero-Pérez N, Olmedo-Juárez A, Valladares-Carranza B, Rosenfield-Miranda C, Hori-Oshima S, *et al.* Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Leucaena leucocephala* sobre la eclosión de *Haemonchus contortus in vitro*. Abanico Vet 2022;12:1-12
46. García CH, Martell DO, Guyat DMA, Capote PV, Aguirre DB. Caracterización química del follaje, la corteza y la madera de cinco especies forestales de la Sierra Maestra. Rev Forestal Baracoa 2006;25:57-64.

47. Tení MDM. Tamizaje fitoquímico fraccionado y evaluación biocida del extracto de diclorometano y metanólico de *Brosimum alicastrum* Swartz (Ramón) Fruto, Semilla y Hojas. (Undergraduate Thesis). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 2008.
48. López HMA, Rivera LJA, Ortega RL, Escobedo MJG, Magaña MMA, Sanginés GJR, *et al.* Contenido nutritivo y factores antinutricionales de plantas nativas forrajeras del norte de Quintana Roo. *Tec Pecu* 2008;46:205-215.
49. Deivasigamani R. Phytochemical analysis of *Leucaena leucocephala* on various extracts. *J Phytopharm* 2018;7:480-482.
50. Rivero PN, Jaramillo CA, Peláez AA, Rivas JM, Ballesteros RG, Zaragoza BA. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* pod on gastrointestinal nematodes of sheep (*in vitro*). *Abanico Vet* 2019;1-9.
51. Ademola IO, Idowu SO. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* seed extract on *Haemonchus contortus* infective larvae. *Vet Record* 2006;158:485-486.