

Universidad Autónoma del Estado de Morelos



Facultad de Ciencias Biológicas
Centro de Investigación en Biotecnología

**Actividad antihelmíntica *in vitro* de
Prosopis laevigata contra huevos y larvas infectantes de
*Haemonchus contortus***

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Naturales
Línea Terminal en Biotecnología

Presenta:

MSP. Edgar Jesús Delgado Núñez

Tutor: **Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez**
Co-Tutor: **Dr. Pedro Mendoza de Gives**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos, a 26 de octubre del 2020

NOMBRAMIENTO DE COMISIÓN REVISORA DE TESIS DE GRADO

Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez (director de tesis, CIByC UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (cotutor, INIFAP)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (INIFAP)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS)

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez (CIBIS)

Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega (CEIB UAEM)

Por este conducto, me permito informarle que ha sido asignado integrante de la Comisión Revisora de tesis que presenta el C. **Edgar Jesús Delgado Núñez**, titulada: **“Actividad antihelmíntica *in vitro* de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*”**, realizada bajo la dirección del Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez, en el Programa Educativo de Doctorado en Ciencias Naturales.

Agradezco su valiosa participación en esta Comisión y quedo a sus órdenes para cualquier aclaración o duda al respecto.

A T E N T A M E N T E

“Por una humanidad culta”

DRA. MARÍA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA
Coordinadora del Doctorado En Ciencias Naturales

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA | Fecha:2020-10-26 12:17:30 | Firmante

YQRK7J9YZzF2dtrki7RH4ME3ZE2US1YyP67C9L618tKYONByM9NwQcHq/DaawxJ7xraL8u0KEb2G6YpQu2PLAil8gG3bG0lp9XJYONbza/6wZfWafXp+Ur5xL3YP2V4VL4Gq0GVGSnA09U6R2n0pm4zufwR9e/D/plhKW6ZM8xKziyQV6gwfOcbOPiQFlmqLmOkpfikyZ6jvASngm+WOUJ0c4xAT7kIAJTB/3yjdS0t1HooX7Rlxz0/w8Abvp9E/OdYla36PzB0EBHuoHDxwEBNJ7r/iWS0dLPrgOL2Ldn8Xihh6Q/3siEwJzUiOU29rdFpFal4figCh1fWr9fHQ==

MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha:2020-10-26 12:21:22 | Firmante

k90ICc1oWrafP/8z3kuD0QUildjWlhm02PftLRthv/R93MnzAwe7/sa64u/9FODENxgLNbrbrq2tzAMNpaWhvrtwpaN84aXwawSLYF6mCiYigZaHU6ePAynnDhBhQHLAiDSKkhhbfp43Z/RJQFotKNIY4Hkol1fpof1fRHUkw01Wy8vS9e5ePBuN7pHPoDdcs+T71T3fRb2r3zF5yA3saCh7j6jmGXKOEER9UpkX+fp54JgfwldlrqhBxPhHPmqC9vq61/aAbI8a5j+4x/6yxfFFw1YMNfmj8E5SnrQ+LVILRSm1flc+eWosWXWx7nyTBJT+wGJRPK+DYqjxEGPHdmg==

DAVID OSVALDO SALINAS SANCHEZ | Fecha:2020-10-26 12:43:34 | Firmante

We2NurU8Gc1I0B6IN7uyaeMOSTCdoZKRiG192GZrNPNkaXyvKmuEGF+kZt4GanuOF+goEXV6chb/q9yp9NIM6oJx6SD5K2zqJH0ehXHS7jAvfJqOd2VSNPNBW7Ep8SPJAdbw c3ijf8yCPO8kEFZT/FhZRDMDCRUsaTwmJJrsQr7o+0wv/KgwwE/PwOyZuTuTNJKgCpN+Tn3bkeKc72IIU6v7F0RAqjk4lrcB8N25RGS31rP0ESjqYiAr2q4jwc4v6PP7q5OuLOxZ36qSSC01P9isHqB2CgcaZq4d5t6OaI01d1YojuAwEEBoaKmwQNOZVh7YISXQUpw72cuJAbBZQ==

ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ | Fecha:2020-10-26 12:49:47 | Firmante

g7Ld3QBYYHUBA9C/vwk0fIIP/obLiNfMNSYjLynDDaYCNna92BrAD2kYR0ch0jhCPj7XpxV0SPE6T5aQeDjovIN9/1kzs1TILpFM/PKky7U5amPOoOEbQPc4D5V3bXb9YBdXo +/26HBClw11DyHMYUitJP7+G/Pg9RWT3cTR7VZpz+FCM3SciuOTTv7Atvfnb3hwtLN7JZiYSEmTFdOZbC/pumi6BAfV9asoEvvAxT+floOe3skDzekR/QsD4Yoi7a9PCTkVeCn GcRvuF8pKxGqd07dpU18hCoqW33RLxyo60+SSG0UCQAKIlz6WVj4XMCgwwZavyEgU7i/qlw==

AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ | Fecha:2020-10-26 13:36:57 | Firmante

P5Ozd7uwo3SAPcjbW7MK8upJ0gYHJTR0Ci+Cmxc3UodwTY3crP1h+/b/FsxG5wiHXnsbZkQ/X9RqzwJ2IEnCbtpKTTCYikoBSMijCaNiyPuZZISy1gsIRNX6fz0wNgHfNZQLk0I6 GmklNen5zu5fMGEknVQ8MHT9F6l6QqVuiMPSAS8nHUye0+C3Vu8LcrEut0xRNuJwDyzLmXjN7Tvd9mwpZcpMupKI7NOV2ANbDKDxA2CJJKBLEgwxO17r0JlUqYkyu/wIEMH rRsg9RO97niwyKM5+UYNt2+Ag527FNVelGKkppxFdi9V3m8HJfA+BzaanqV8L9E0OVMAFRnQ==

PEDRO MENDOZA DE GIVES | Fecha:2020-10-26 17:00:49 | Firmante

mDKE2SzAiJsVCKt8OB4/KaQ3E0ry9qi7otMgsmOzERN6wPhqz/LMFTvaANGCzFzRfWbzTOLHiSvuiuoGIMjV6SEolOis7gCJnjdgTEx5T309EstkXsqkvnxOHXdkouMU4gXs+7BEf 6l0vviPWHwwDAJtMfCJS1NxuLhG8AZk1Bv1yOq3WmxqKd4ln1nqZga1jrtR4v1cMNK+MKzq8pOm1Y5Aex8PYApHKr7FgacAFPFLtoidYMPJ2dqFWLkcmW1sNZxcTsA5y4+S wtAVK9zw6EeMukvBCgf1XquAth2MVRxVdh8+DxJEWaxopQwNrvVj1sZyAvem3DmQldLumhdA==

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2020-10-28 14:37:32 | Firmante

i9IBaRdDNKvMfrBv3XQi7do687hbJCTL8fYCECsQz6Akt8MnJnE0qoSnh0c6/sruRIRluaWf05s0MCLVLSj3OWhmVvqMHBPr/rGw54x39qn4zeGHIOo4fq4bxGdMjFNNwi4w66 8KrV1tSpraZ+Dx3mFMWGN8AL6Zl4PElyXuUilo37qKJtcWxyLPSQorU4706hETVRi83wIAjFwFuTOORvd3XN2JrqEvTVRE8NU8OjEUawbfnaDf1AwXlvRTN9jirexV44JGsk0JI7Y b/NZADWvX5j6q+rhGEv9gUfwGw3AlfZHMCPihNJT1r9bL4QSWfwG2+XE3Ltb4l8zJWw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



FbRk20

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vdAys9Azt7ounYwJHWAKiYUpsiUXHqJC>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 26 de octubre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez (director de tesis, CIByC UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (cotutor, INIFAP)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (INIFAP)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS)

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez (CIBIS)

Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega (CEIB UAEM)

Tesis: Actividad antihelmíntica *in vitro* de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Alumno que lo presenta a revisión: EDGAR JESÚS DELGADO NÚÑEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha:2020-12-01 14:53:47 | Firmante

qDXtG73kF5WZFBEvCjyKzWzLDHC06pIII7IqHhlp5qbelY8ogwssZXTLw1qEU6cBBDxJOHsIxBfulYwJKC3hqQANfsuP2qL9SDpeGaynFJxMJBDFGpjY5FvPs7H7YVD4S0iir1Ayly/
KFlcRHsCBIJlyDC90dTLQBB+fuVGHWGw7OmjqOalkFAwX59jX8pR+h2VUvJjWZOv6klhbgMU2ZOH7oMQ1V3d9LeHYix/z/qkHr.JQJytN9z4Yv9sZs47hXzc0AyCdYGMATJg4F
2QMS/jw68WmhaMoHw6WslNh7T19j8b8/fGFE1i3z4Wzr4Vy2j4p1Df9vnkkXuTmjszYbg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



T8Vly6

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/PtsZV5xL16atMbtQ79F1Y0LPBeseMzLO>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 26 de octubre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez (director de tesis, CIByC UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (cotutor, INIFAP)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (INIFAP)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS)

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez (CIBIS)

Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega (CEIB UAEM)

Tesis: Actividad antihelmíntica *in vitro* de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Alumno que lo presenta a revisión: EDGAR JESÚS DELGADO NÚÑEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ | Fecha:2020-11-30 20:42:51 | Firmante

t53hXQ4PFM8acFpwo/wmijjkbpngroUaANMXkQMb7MhCZLjt66t3V04dfTE180PkcU5//ldhpMliZGRXJTJ7rW43TG76b7Zk/Nr4ASv9cRDYnpo4YatJjWseiBP8YzEVZHrt2X3vyHFZ
MUQ3TrwGZHT68LVPin1zsknVLRBtdpL2Wajz11MrA6HzlWmzSkYDr66ofytwlMVcy6jxO70sjgGc3cafSh2FaYOHsoDTrVmGbH1qVY7bw6RjL+X8X8E+eDn+gyUqOPCTRj4qWt
ySilka0UkALGaMi/6NtmJO7iq/7rBcaGPFwNC18iKxiNTJBzPTUBcPvtZowZ1dJjksKA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[XTmQaL](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kfsEpvWgyvIGjVwICxWv7bHedDjQU1G>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 26 de octubre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez (director de tesis, CIByC UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (cotutor, INIFAP)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (INIFAP)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS)

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez (CIBIS)

Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega (CEIB UAEM)

Tesis: Actividad antihelmíntica *in vitro* de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Alumno que lo presenta a revisión: EDGAR JESÚS DELGADO NÚÑEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ | Fecha:2020-12-01 12:58:21 | Firmante

BGoCDtp97wwkkPrn2ljNijldDa3wJaVlvnrUWvykS10oS9UqRNkRYL6i+wOf3XILQxQfm4ljWkk72mXRb1+R2a4NOAOCWkj9GXMZf/OYe0vKX9vBftoSVr8lmaBJ86i8oxAqNHFP
xU2vXZXmW14vqJxrcssf+ywabGlda+69BIXGGQb4ZDTqEa08W8f0HxfyhHOSQTLXIFW52LNY+FNqzPLBhlqe7RsR8lhx16pJzh+BZHckG/QVO3jLDlWlJJ5dqxdnnXNSM/tvXIDX
8dpxPHWSgAbQJh5eLuAG6y+7erJKPhLIBwwHov51JPhZayo4YACd1diEHnrvzN3YXPDg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



C5az7b

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/PkrlwCBBpvEDqnqvCT4MAzKe2LIX7gso>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 26 de octubre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez (director de tesis, CIByC UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (cotutor, INIFAP)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (INIFAP)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS)

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez (CIBIS)

Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega (CEIB UAEM)

Tesis: Actividad antihelmíntica *in vitro* de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Alumno que lo presenta a revisión: EDGAR JESÚS DELGADO NÚÑEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. DAVID OSVALDO SALINAS SÁNCHEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAVID OSVALDO SALINAS SANCHEZ | Fecha:2020-11-30 16:25:25 | Firmante

bi+UrqCnyiiAD7tLrUDu2rZkqu8bngaLcQYfjhcxBjO3Uom0rrAXoTOPXtINZvm5dZKPy2liiYJQYy1Op/YWY8ceOeqk2YwDXFjoyp2Lg/l0+DgLCO2aPgROXJYG2rAOaxnmUCOowx00W0CBcg8m6Q+JtpKi/c4ppRlt2mzR0D2twVMcRXDMKeB8bJVXzHXvsyEu9c8mrU+x7c3r9kDO9kgepm496n9z0k3gnEswu3Yi7WpwmdeWbeQJNA+zVYYMULuQ6t1zicHaDy/FOEhyL2lt/8yWryiQ6SUQTp3akoJRr09wDB93xN86CNxRxzlaPDpARp/hXkMbdjiniZp0suQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



1d8D5I

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/UEnF2B9tN01MbOB82kw8isspBxCqJvrP>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 26 de octubre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez (director de tesis, CIByC UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (cotutor, INIFAP)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (INIFAP)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS)

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez (CIBIS)

Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega (CEIB UAEM)

Tesis: Actividad antihelmíntica *in vitro* de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Alumno que lo presenta a revisión: EDGAR JESÚS DELGADO NÚÑEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. PEDRO MENDOZA DE GIVES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PEDRO MENDOZA DE GIVES | Fecha:2020-12-01 12:54:20 | Firmante

eKhZgw4p37wsZXssAbBaEAL8NVhIH4n3bToZnertAfiETHuwUEGC15q5yHqvfnInPu8RQTUaKWLOQmvrIOVnwpGY3Qn9DoSICPJW67Dk2kXF85g85eIglJMSouAaAbh2eTij0xOtmrVX0EMXjRv5tkdwwO5xonmtpV4hDi7MvZxAyW8nFSH+OkpC9i2J+55QJKOQgur7CdSwgxx9TcPhi48ydullvbw1KsLncSIWAdH2/C6kp67zDnC+CJsK2ImmSD4W80CGd5714RAQqQ46cWU4nbh8all1g9j+h1fkQ9kLsBtqJ7opuHQFWppA3Tu0ducAjoFJMzN/p+RETYHQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[hvarXy](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/IUFVPMq2yheElgmVMXdAZ09FzFF5Dzxe>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 26 de octubre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez (director de tesis, CIByC UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (cotutor, INIFAP)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (INIFAP)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS)

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez (CIBIS)

Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega (CEIB UAEM)

Tesis: Actividad antihelmíntica *in vitro* de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Alumno que lo presenta a revisión: EDGAR JESÚS DELGADO NÚÑEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2020-11-30 19:01:26 | Firmante

CnT1ibMTqOdh8A5ujKjijNktdQxjgcpfGEfYo4bjBZDnZEP44mN1rir4IZDRWI0QEqtFXz00ZFJ4cHZCfga61Cb0jYtara4pslc/PVy2zqfP3HWR15nUIJDzNcuy/SoKqst8AHdyZYKB5
KSSGGunNSqC1fBnSkeLA/QMB6gaz6KesAqfW9dMmpHxVsF/ST2vXZ7CYWCWMOZ3seDi7yOZqkol5UWqH7Go0R26zE0Jehr20ObLLW596jff08AZjxP7gD+bFXL98raWEtfzLO
LZOLUQUERwIhjZAF2voEFpQJsjDecRiZEUhiLUcwj5rWQzwyjPlinPdRi82yRzj5bjA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



CS2pIB

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/CadzUWu1mfQH4C18mNTiyhhHldQbTtVo>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos a 26 de octubre del 2020.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez (director de tesis, CIByC UAEM)

Dr. Pedro Mendoza de Gives (cotutor, INIFAP)

Dr. Agustín Olmedo Juárez (INIFAP)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB UAEM)

Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS)

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez (CIBIS)

Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega (CEIB UAEM)

Tesis: Actividad antihelmíntica *in vitro* de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Alumno que lo presenta a revisión: EDGAR JESÚS DELGADO NÚÑEZ

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA LUISA TERESA VILLAREAL ORTEGA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA | Fecha:2020-12-01 10:01:28 | Firmante

ci6+RhsfMCPedU2HuDdMe0C4ifvIasTIUicGhdpSikZL14C6xHDNBR0L2GPayE4Ma8L71HxmuywTJLwQBokmnauklUa09userl9WwBINhtkdLmbeoj23E8eXdQ4FPtwicuWoF+qQMo/xSScr3ooY5/GWD2aGzgjckjIhW6iwj4kY+sDDsd4b5pWDcB4mWGtnl334R647uPEiVNiReNgKopd/uh9Q3oaq1hK/MfdShfSjFWuL++zt39DFC+WdB7uZfJB3DKxdbnJjV2uWO/6J4yh/1GU36plEoFU0jkv7knbe5IB7JEZEpat5unntle5UmOcNi61gfDplI8zflQncw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



YjAsWt

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/IDGHTH2SgmZVM6fDSCGkOniguiykj9hT>



COMITÉ TUTORAL

Comité evaluador	SNI	Adscripción
Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez - Director	1	CIByC
Dr. Pedro Mendoza de Gives - Codirector	2	INIFAP
Dr. Agustín Olmedo Juárez	1	INIFAP
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa	2	CEIB
Dr. Manases González Cortázar	2	CIBIS
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez	2	CIBIS
Dra. María Luisa Teresa Villareal Ortega	3	CEIB

El Doctorado en Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo.

El alumno del Doctorado en Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Edgar Jesús Delgado Núñez, recibió un convenio de beca por parte del Rector de la UAGro el Dr. Javier Saldaña Almazán a partir del 01 de febrero de 2017 a enero de 2021, tramite realizado por conducto de la Universidad Autónoma de Guerrero.

El presente trabajo se llevó acabo en:

inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

**Laboratorio de Helmintología del Centro
Nacional de Investigación Disciplinaria en
Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI-
INIFAP). Jiutepec, Morelos.**



**Departamento de Farmacología y de
Fitoquímica del Centro de Investigación
Biomédica del Sur del Instituto Mexicano
del Seguro Social (CIBIS-IMSS).
Xochitepec, Morelos.**



**Laboratorio de Fitoquímica y Productos
Naturales del Centro de Investigación en
Biodiversidad y Conservación (CIByC-
UAEM).**

DEDICATORIA

A mis padres quienes me formaron como una persona de bien y apoyándome de manera incondicional para lograr todas mis metas. Todo mi cariño y admiración.

A mis hermanos y mi amada novia por ser parte importante en mi vida y estar presente siempre en todos los momentos.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez, gracias por su apoyo en mi proceso de mi formación además por ser un guía excepcional en el ámbito académico y su invaluable apoyo durante mis estudios de doctorado.

A mi Co-tesis el Dr. Pedro Mendoza de Gives le agradezco enormemente por todo su apoyo y dedicación para forjarme como investigador, gracias Dr. Pedrito lo considero un extraordinario investigador y un gran amigo muy sincero.

A mi amigo el Dr. Javier Saldaña Almazán Rector de la Universidad Autónoma de Guerrero, por autorizar mi beca para estudiar un doctorado de alta calidad, gracias por tu invaluable apoyo y brindarme su amistad.

A la Dra. María Luisa Villareal Ortega quien como ex coordinadora y parte de mi comité tutorial del Doctorado quien confió en mí, por sus comentarios siempre tan atinados para mejorar mi desempeño en mi proceso de formación, su motivación y consejos bien atinados en cada uno de mis seminarios desafiando retos y obstáculos, sinceramente gracias.

Al Dr. Agustín Olmedo Juárez gracias por su enorme enseñanza y su confianza desde el inicio de mi formación, por compartir enormes momentos y experiencias que fueron consolidando una sincera amistad para ti mi querido amigo, mi cariño y admiración.

Al Dr. Alexander Cardoso Taketa lo admiro por su alto espíritu profesional como investigador en la enseñanza en el mundo de los productos naturales y su amable atención con mis dudas.

Al Dr. Alejandro Zamilpa y al Dr. Manasés González por todo el tiempo que me brindaron en el tiempo que estuve como aprendiz, ustedes son el ADN de lo que soy en el área de la fitoquímica de productos naturales, a ustedes mi cariño, admiración y mi interminable gratitud.

Al M.C. Gabriel Flores Franco un extraordinario taxónomo por apoyarme en la identificación de las plantas utilizadas en mi proyecto y por ser un amigo.

A mis compañeros Amigos estudiantes de doctorado, Edgar, Samuel, Jaime, Orthon, Caleb, Erubiel y Liliana.

Al CENID Parasitología-Veterinaria, INIFAP, por darme la facilidad para desarrollar proyecto de tesis.

Al Centro de Investigación Biomédica del Sur, por recibirme y ser parte importante en mi desarrollo académico.

Al Centro de Investigación en Biotecnología por permitirme ser parte de tan distinguida institución.

A mi centro de adscripción la Unidad Académica Preparatoria No 10 de la Universidad Autónoma de Guerrero.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por formarme profesionalmente y brindarme las herramientas necesarias y los conocimientos para mi formación profesional.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	7
Clasificación taxonómica de <i>Haemonchus contortus</i>	7
Descripción anatómica de <i>Haemonchus contortus</i>	8
Ciclo biológico.....	10
Fase de vida libre a fase parasitaria de <i>Haemonchus contortus</i>	11
Ecología de <i>Haemonchus contortus</i>	12
Patogénesis y Enfermedad.....	13
Diagnóstico	14
Inmunización.....	14
Quimioterapia y Resistencia Antihelmíntica	16
Mecanismos de acción de los Antihelmínticos	17
Plantas con propiedades antihelmínticas	20
El género <i>Prosopis</i> spp.....	26
Descripción botánica	28
Localización geográfica de <i>Prosopis</i> en México y en el Mundo	28
Fitoquímica y compuestos químicos del género <i>Prosopis</i>	32
<i>Prosopis laevigata</i> (Mezquite)	35
Distribución geografía de <i>P. laevigata</i> en México	38
Uso en la medicina tradicional de <i>P. laevigata</i>	39
Contenido nutricional y aplicaciones de <i>P. laevigata</i>	39
Farmacología de <i>P. laevigata</i>	45
JUSTIFICACIÓN	46
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	47
HIPÓTESIS	47
OBJETIVO GENERAL	47
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	48
Ubicación	48
Colecta del material vegetal	48
Obtención del E-HA y fraccionamiento químico a partir de hojas de <i>Prosopis laevigata</i>	49

Aislamiento, purificación e identificación de fitoconstituyentes a partir de la F-AcEt de <i>P. laevigata</i> .	50
Tamizaje cualitativo fitoquímico del E-HA y fracciones de <i>P. laevigata</i> .	52
Identificación de alcaloides	52
Identificación de cumarinas volátiles	53
Identificación de flavonoides	53
Identificación de taninos	53
Identificación de triterpenos y esteroides	54
Identificación de saponinas	54
Análisis de extractos, fracciones y compuestos 1-3 por CLAR	55
Análisis por espectrometría de masas de los compuestos 1-3	55
Obtención de huevos y larvas de <i>Haemonchus contortus</i> .	55
Prueba de la mortalidad larval mediante un ensayo biodirigido	56
Prueba ovicida utilizando compuestos de <i>P. laevigata</i> .	57
Análisis estadístico.	58
RESULTADOS .	59
Rendimientos de E-HA y fracciones	59
Estudio cualitativo fitoquímico de E-HA y fracciones	59
Prueba de la actividad larvicida del E-HA y fracciones Aq y AcEt.	61
Actividad larvicida de las subfracciones y compuestos	62
Prueba ovicida de los compuestos identificados	64
Análisis químico de <i>Prosopis laevigata</i> por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	65
Estructuras químicas de compuestos identificados por RMN ¹ H y ¹³ C y espectrometría acoplada a masas.	66
Análisis por microscopía por AxioCam, microscopía electrónica láser confocal (MELC) y microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA) de huevos y larvas de <i>H. contortus</i>	70
DISCUSIÓN	75
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	81
BIBLIOGRAFÍA	82

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de un extracto hidroalcohólico y fracciones de la leguminosa *Prosopis laevigata* contra el nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*, así como la purificación e identificación de al menos un constituyente químico responsable de la actividad nematicida. Se preparó una solución hidroalcohólica de Agua-MeOH (70:30) a partir de hojas de *P. laevigata* y, posteriormente, el extracto (E-HA) fue biparticionado con acetato de etilo (AcEt) para obtener dos fracciones: una acuosa (F-Aq) y otra orgánica (F-AcEt); los disolventes se eliminaron y finalmente se liofilizaron. El fraccionamiento químico de la F-AcEt se realizó por cromatografía de columna abierta y de capa fina (CCA-CCF) utilizando diferentes sistemas de elución. El tamizaje cualitativo fitoquímico del E-HA y F-Aq y F-AcEt se llevaron a cabo por técnicas de reacciones químicas colorimétricas. Se usaron micrografías a partir de una cámara ultra digital (AxioCam) acoplada a microscopía láser confocal, microscopía electrónica laser confocal (MELC) y microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA). Para el seguimiento en el aislamiento e identificación de los compuestos se usaron técnicas por análisis por HPLC (high-performance liquid chromatography), espectrometría de gases masas y RMN ^1H ^{13}C . Finalmente, el material biológico se obtuvo mediante técnicas coproparasitoscópicas usando un ovino donador de huevos del parásito *H. contortus*, previamente infectado con larvas infectantes (L₃). La confrontación *in vitro* de huevos y larvas con el extracto hidroalcohólico (E-HA), fracciones (Aq y AcEt), subfracciones y compuestos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pozos (n=4) a diferentes concentraciones. Se usaron controles negativos agua destilada y MeOH al 2% (prueba ovicida) y MeOH al 4% (prueba larvicida), además de ivermectina (0.5 mg/mL) como control positivo. Las lecturas se llevaron a cabo a las 48 h

(prueba ovicida) y 72 h (prueba larvicida) post-confrontación. Los resultados de las pruebas *in vitro* se analizaron bajo un diseño completamente al azar a través de un análisis ANOVA utilizando el modelo lineal general (GLM); se utilizó la prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre tratamientos utilizando el programa SAS. Los resultados mostrados por el E-HA en la prueba ovicida fueron cercanos al 100% a 25 mg/mL; mientras que la F-AcEt mostró un efecto letal ovicida del 100% a 0.75 mg/mL. En contraste la F-Aq no fue activa. Por otro lado, en la prueba del porcentaje de mortalidad (larvicida), el E-HA mostró un 85% de mortalidad a 150 mg/mL, mientras que la F-AcEt a 50 mg/mL exhibió una actividad larvicida del 96%; la F-Aq no mostró ninguna actividad. Los resultados de actividad larvicida de las subfracciones evaluadas *in vitro* contra larvas L₃ fueron los siguientes: subfracción C₁F₁ a 15 mg/mL =79.47%; subfracción C₂F₁ a 7.5 mg/mL =100 %; subfracción C₂F₂ a 7.5 mg/mL= 100 % y con la subfracción C₂F₃ a 15 mg/mL =100%. Por otro lado, los compuestos como la luteolina y 4'-O-metilcatequina resultaron sin actividad ovicida, ni larvicida. Por otro lado, la mezcla que correspondía a luteolina e isoramnetina exhibió una elevada actividad ovicida del 96% a 0.15 mg/mL; en contraste, esta mezcla no registró actividad larvicida. Mientras tanto, la isoramnetina fue la responsable de una actividad nematocida del 100% contra huevos del parásito a una concentración de 0.07 mg/mL y contra larvas mostró una mortalidad del 100% a 7.5 mg/mL. El tamizaje fitoquímico del E-HA, F-Aq y F-AcEt reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos/esteroles y saponinas. En tanto, el análisis por CLAR del extracto, fracciones y subfracciones y compuestos revelaron compuestos mayoritarios polares y de polaridad media correspondientes a compuestos fenólicos entre ellos al grupo de flavonoides. Por espectrometría de gases masas y RMN ¹H y ¹³C se identificaron como luteolina, 4'-O-metilcatequina e isoramnetina. Las micrografías tomadas por una cámara digital de alta resolución AxioCam, MELC y MEBA,

revelaron daños internos en huevos y larvas del parásito atribuidos al compuesto. Los resultados de esta investigación demuestran que las hojas de la planta *P. laevigata* contiene un flavonoide llamado isoramnetina con actividad antihelmíntica *in vitro* contra *H. contortus*. Esta investigación es el primer informe detallado a nivel mundial acerca de la caracterización química de un flavonoide presente en hojas de la planta *P. laevigata* con actividad antiparasitaria *in vitro*, lo que podría ser una herramienta potencial prometedora contra la hemoncosis ovina.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos son parásitos que afectan plantas, animales y a humanos, además generan pérdidas económicas y están asociadas a la pobreza a nivel mundial (Ruppert and Barnes, 2000; Matamoros *et al.*, 2017; Coello y Guevara, 2019). En la ovinocultura, los nematodos gastrointestinales (NGI) o tricostrongilidosis representan unos de los problemas de salud más frecuentes, complejos y persistentes en todo el mundo (Vázquez-Prats, 2004; Hoste *et al.*, 2011). Los NGI afectan la salud de los animales y son los principales responsables de causar daños fisiopatológicos que generalmente van asociados con cuadros de diarrea, anorexia, debilidad, mucosas pálidas y presencia de edema submaxilar (Macedo-Barragán *et al.*, 2009; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017; Jacobson, 2020). Debido a ello, existen diversos métodos de control donde el más empleado es el uso de drogas de naturaleza química (antihelmínticos AH) de amplio espectro que incluyen a los benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas que continúan siendo la quimioterapia más usada en animales (Coles *et al.*, 2006). Se ha comprobado que el uso irracional e indiscriminado de estas drogas ha desencadenado problemas de resistencia a nivel mundial (Islam *et al.*, 2018; Lambertz *et al.*, 2019; Bosco *et al.*, 2020; Bihagi *et al.*, 2020). Ante el problema de resistencia antihelmíntica, surge el interés en buscar otras alternativas naturales e integrales como el uso de plantas o extractos de plantas con propiedades antihelmínticas contra los NGI en condiciones *in vitro* e *in vivo*, y en ese sentido, existe información y evidencia científica sobre la actividad antiparasitaria contra los NGI que afectan a los pequeños rumiantes (von Son de- Fernex *et al.*, 2015; García-Hernández *et al.*, 2017; Olmedo-Juárez *et al.*, 2017). El uso tradicional y terapéutico a partir de plantas medicinales se han usado desde tiempos milenarios de manera empírica (Salmerón-Manzano *et al.*, 2020). Sin embargo, durante las últimas décadas, la

ciencia ha ido más allá en la publicación de una gran cantidad de estudios sobre los principios bioactivos de los fitofármacos en el que se han descubierto diversos compuestos bioactivos de uso potencial en el tratamiento y control de ciertas enfermedades (Jamshidi-Kia *et al.*, 2018; Maldonado *et al.*, 2020). En este sentido, la amplia diversidad de flora mexicana ha sido muy apreciada por su riqueza y conocimiento etnobotánico en la medicina tradicional, de modo que, en la actualidad, se disponen de numerosas publicaciones en el uso de las plantas con propiedades medicinales y antiparasitarias, lo que convierte a este recurso natural en una alternativa para el control de NGI en pequeños rumiantes (Phillipson, 2007; Gallegos-Zurita 2016; Espinosa-Moreno *et al.*, 2016; Escareño-Díaz *et al.*, 2019).

Prosopis laevigata [(Humb. et Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston] es una leguminosa que pertenece a familia de las Fabáceas y en México es conocido como “Mezquite”. Esta planta arbórea se encuentra en regiones de zonas áridas y semiáridas de México y otras partes del mundo (Rzedowski, 2006). Las hojas hervidas de esta planta se usan tradicionalmente para tratar problemas en ojos a manera de colirio, dolor de cabeza, como purgante, desordenes estomacales, diarrea, disentería, escalofríos, gripe, catarros, sarampión, bronquitis, inflamación, comezón, afecciones de garganta y heridas; los frutos cocidos de esta leguminosa son usados para disolver cálculos vesiculares (Lewis, 1977; Gómez, 2008; Rzedowski, 2015).

Este género ha sido ampliamente estudiado en la medicina tradicional por la variedad de fitoconstituyentes (flavonoides, alcaloides, taninos, esteroides) con efecto analgésico, antipirético, antitumorales, antihiperlipidémico, antioxidante y antihipercolesterolémico (Garg and Mittal, 2013), antifúngico, antibacteriano y bactericida (Ahmad *et al.*, 1985) y propiedades anti-inflamatorias (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). La amplia gama de propiedades medicinales mostradas por *P. laevigata* en el control de diversos padecimientos motivó a

explorar algún posible efecto antihelmíntico de esta planta y sus fitoconstituyentes en contra de *H. contortus*, que es considerado como uno de los parásitos más importantes que afectan a la salud y a la productividad de pequeños rumiantes en granjas en todo el mundo. Por lo tanto, en el presente estudio se planteó el siguiente objetivo: Evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* de un extracto hidroalcohólico (E-HA) y dos fracciones (F-Aq y F-AcEt) obtenidos a partir de hojas de *P. laevigata* (Mezquite) contra huevos y larvas de *Haemonchus contortus*; así como la identificación química de algún compuesto responsable de la actividad antihelmíntica.

ANTECEDENTES

Haemonchus contortus es considerado como el nematodo estrogílido más patógeno e importante que afecta la salud de los pequeños rumiantes domésticos y salvajes en zonas subtropicales y tropicales en el mundo (Besier *et al.*, 2016; Selemon, 2018). Este parásito habita en el abomaso, se alimenta de sangre causando anemia y en ocasiones puede ser mortal especialmente en animales jóvenes (Crilly *et al.*, 2020). Es muy adaptable en diferentes zonas climáticas debido quizás al cambio climático, esto podría conducir a un posible aumento en la prevalencia de la hemoncosis en aquellas áreas geográficas donde actualmente eran consideradas de bajo riesgo, adicionalmente con la creciente resistencia antihelmíntica debido al mal uso de los antihelmínticos. Estos factores incrementan más los costos de la producción y la necesidad de desarrollar nuevas estrategias preventivas y sostenibles contra la hemoncosis ovina (Besier *et al.*, 2016; Munguía-Xóchihua *et al.*, 2018). En el Cuadro 1 se muestra la clasificación taxonómica del nematodo *H. contortus*.

Clasificación taxonómica de *Haemonchus contortus*

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del nematodo *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) Cobb, 1898).

Taxonomía de <i>Haemonchus contortus</i>	
Reino	Animalia
Filo	Nemathelminthes
Clase	Secernentea
Orden	Strongylida
Sub-orden	Strongylina
Superfamilia	Trichostrongyloidea
Familia	Trichostrongylidae
Subfamilia	Haemonchinae
Género	<i>Haemonchus</i>
Especie	<i>contortus</i>

Fuente: Taylor *et al.*, 2016

Descripción anatómica de *Haemonchus contortus*

Los huevos de *H. contortus* miden de 74 x 44 μm , presentan un borde elíptico con paredes laterales en forma de barril y numerosos blastómeros ocupando casi la totalidad del huevo (16 a 32 células). Los machos adultos miden de 19 a 22 mm y las hembras entre 25 y 34 mm (Love and Hutchinson, 2003; Taylor *et al.*, 2007). Este parásito se alimenta de sangre y en exámenes en fresco se observa a un característico color rojizo o marrón debido a la sangre ingerida. El sistema reproductor presenta un color blanquecino que está enrollado en forma de espiral alrededor del intestino que a su vez le dan un aspecto rayado (poste de barbero) (Taylor *et al.*, 2007). En los adultos, la cavidad bucal presenta una lanceta dorsal o diente que utilizan para erosionar la mucosa gástrica (Figura 1).

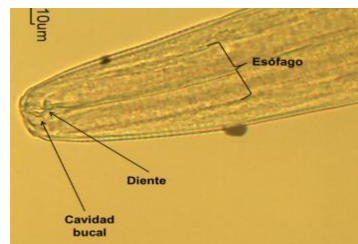


Figura 1. Cavidad bucal de un macho y la presencia de un diente en el interior.
(Fuente: Rodríguez-Vivas, 2015).

Los machos poseen lóbulos laterales y bolsa copulatriz alargados, las espículas presentan una apariencia en forma de lengüeta (Figura 2).

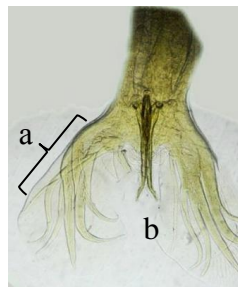


Figura 2. Estructura reproductiva de *Haemonchus contortus* mostrando una bolsa copulatriz (a) y espículas (b).
(Fuente: González-Garduño *et al.*, 2013)

El aparato genital de las hembras, los ovarios están enrollados en espiral alrededor del intestino, la vulva se encuentra en la parte posterior del cuerpo expuesta o cubierta (solapa), puede presentarse en diferentes tamaños o estar ausente (Figura 3 y 4) (Cordero del Campillo, *et al.*, 1999; González-Garduño *et al.*, 2013; Rodríguez-Vivas 2015).



Figura 3. Hembras de *H. contortus*. La solapa puede estar presente o ausente en la región de la vulva. (Fuente: Rodríguez-Vivas, 2015)



Figura 4. Se observan los ovarios alrededor del intestino de una hembra de *H. contortus*. (Fuente: Rodríguez-Vivas, 2015)

Ciclo biológico

El ciclo biológico de *H. contortus* (Figura 5) es directo, posee un único hospedero definitivo (monoxénico) y presenta dos fases: exógena no parásita (desde huevo hasta L₃) y endógena o parásita las larvas infectantes (L₃), son ingeridas por los animales durante el pastoreo en pastos contaminados. En la fase endógena las larvas L₃ atraviesan la capa interna del abomaso (estómago verdadero) donde evolucionan a L₄. Las larvas L₄ o histiotróficas mudan a L₅ (pre-adultos). En su forma adulta los machos y hembras copulan y la hembra producen huevos, habitan en el abomaso donde además se alimentan de sangre. Las hembras ovipositan de 5.000 a 10.000 huevos por día, que se son liberados a través de las heces al pasto. Cuando las condiciones climáticas son favorables (suelo cálido y húmedo), los huevos eclosionan a larvas L₁ (juveniles de la primera etapa). Las larvas L₁ evolucionan a las etapas L₂ y L₃. Un gran número de larvas infectantes (L₃) pueden acumularse en pastos muy pastoreados (Crilly *et al.*, 2020).

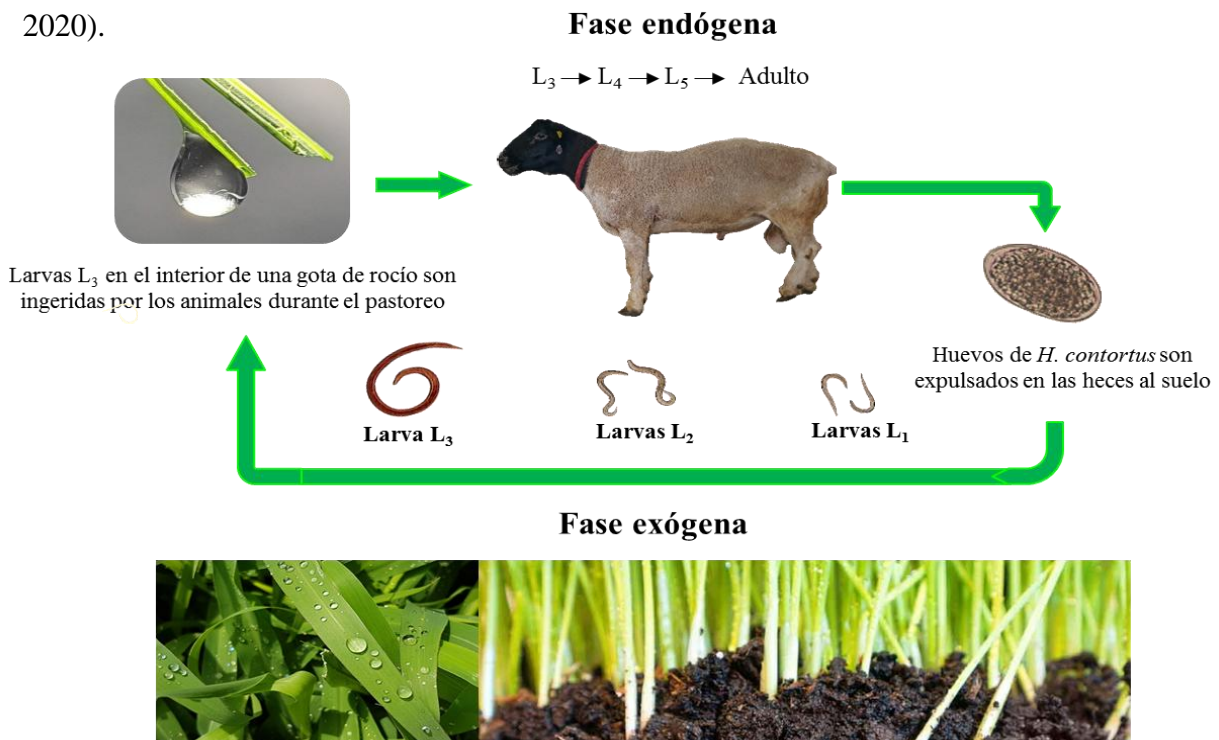


Figura 5. Ciclo de vida de *H. contortus*

Fase de vida libre a fase parasitaria de *Haemonchus contortus*

Esta fase inicia si existen condiciones óptimas de temperatura que oscilan entre 20 y 35°C y una humedad relativa del 60%, el desarrollo del huevo a la etapa L₁ se inicia entre las primeras 24 y 30 horas de incubación debido a la activación de enzimas como la quitinasa y la proteasa (enzimas de la eclosión) donde ambas son responsables de fracturar las paredes del huevo permitiendo la ecdisis de la larva (L₁) (Rogers and Brooks 1977; O'Connor *et al.*, 2006). Los huevos eclosionan y se desarrollan en las etapas juveniles L₁ y L₂ en las heces mientras se alimentan de bacterias, materia orgánica, agua, son vulnerables a las variaciones de temperatura. La etapa L₁ puede tardar entre 4 y 6 días en desarrollarse a temperaturas entre 24°C a 29°C y la etapa L₂ se desarrolla luego evoluciona en la etapa L₃ que se conoce como larvas infectantes (Schnieder *et al.*, 1999). Esta etapa L₃ presenta una vaina que le permite resistir las variaciones ambientales además de ser muy activa esta tiene la habilidad de migrar por los pastos hacia las gotas de rocío (fototropismo a la luz tenue: Figura 6) en espera de ser ingerida por un huésped final que se infecta después de la ingestión (Cuellar, 2002). Posteriormente, migra hasta llegar al abomaso donde se desarrolla a la etapa L₄; esta larva a su vez muda su cutícula y se desarrolla en la etapa pre adulta (L₅). Los nematodos llegan a una etapa madura donde machos y hembras se aparean y viven en el abomaso donde se alimentan de la sangre del huésped (Bowman, 2011; Emery *et al.*, 2016; Crilly, 2020).



Figura 6. Larvas infectantes de *H. contortus* en el interior de una gota de agua sobre una hoja de pasto, con fototropismo positivo (ausencia parcial de luz).

Ecología de *Haemonchus contortus*

En los climas tropicales en todo el mundo, donde las condiciones de humedad y el crecimiento de los pastizales son favorables para el desarrollo de este parásito, las larvas L₃ se encuentran viables y en óptimas condiciones durante todo el año (Rose *et al.*, 2015). En los climas templados a cálidos se favorece el desarrollo de *H. contortus* durante varios meses del año; en cambio, durante la temporada de invierno cuando no son suficientemente fríos no afecta el desarrollo sobre las larvas infectantes de acuerdo a O'Connor *et al.* (2006) ver figura 7.

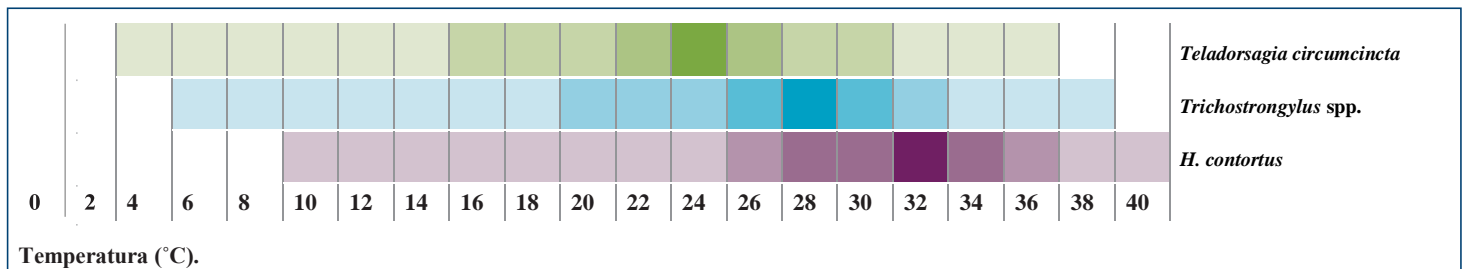


Figura 7. Las diferentes tonalidades de sombreado indica la adaptación de larvas infectantes a diferentes rangos de temperatura. El sombreado más pálido indica los límites del desarrollo larvario. El sombreado más oscuro indica el rango de temperatura más favorable y óptima para el crecimiento y desarrollo de larvas infectantes de *H. contortus* y otras especies de nematodos que afectan a los pequeños rumiantes. *Haemonchus contortus* presenta un óptimo desarrollo larvario en temperaturas altas, mientras que a temperaturas bajas es más notable la supervivencia que otras especies de parásitos.

Por otro lado, durante en verano cuando existen precipitaciones pluviales frecuentes, el contacto de *H. contortus* con el rebaño se presenta con mas intensidad, por tanto, la proliferación de L₃ dependen mas de las condiciones de lluvias con respecto a climas secos (Soca *et al.*, 2005). En áreas geográficas donde las condiciones del clima son frias, la supervivencia de *H. contortus* es sostenible debido a su capacidad de inhibir de manera temporal o prolongada el desarrollo de larvas L₃ en el ambiente por el fenómeno de hipobiosis (Gibbs, 1986). En este sentido, no es raro mencionar que en estos últimos años el cambio climático ha contribuido de manera sugnificativa con la resistencia y adaptabilidad a estos

cambios ambientales, no solo de *H. contortus*, sino también otros nematodos gastrointestinales y, por tanto, no deben de limitar su importancia actual (Waller y Chandrawathani, 2005; Van Dijk *et al.*, 2010; Rinaldi, *et al.*, 2015).

Patogénesis y Enfermedad

Las infecciones por este nematodo generalmente son leves, asintomáticas y parcialmente poco patógenas, siendo que sólo las infecciones masivas pueden provocar enfermedad clínica (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). En este sentido *H. contortus* es un parásito que, debido a sus hábitos hematófagos, provoca cuadros clínicos como anemia e hipoproteinemia que pueden ser mortales especialmente en animales jóvenes. El principal signo de la hemoncosis visible en los animales infectados es la palidez en las mucosas oculares, anorexia, niveles de hematocrito inferiores al 15%, va acompañada casi siempre de una debilidad extrema e insuficiencia respiratoria el cual indica un grave pronóstico para el animal infectado (Selemon, 2018). La anemia es la principal característica responsable de la patogénesis, debido a ello la causa de muerte por infección aguda de *H. contortus* produce anemia hemorrágica, hipoproteinemia, edema submandibular, diarrea con pérdida de líquidos y por ende la deshidratación que conduce a shock hipovolémico (González, 2006; Saminathan *et al.*, 2015). Por otro lado, otros de los problemas que provoca la hemoncosis ovina son los relacionados con el hígado el cual presenta una degeneración de los hepatocitos e infiltración de células mononucleares asociadas a la hipoproteinemia, anemia y finalmente a la hipoxia (Mir *et al.*, 2007; Zacharias *et al.*, 2008; Kelkele *et al.*, 2012).

Diagnóstico

El diagnóstico es un complemento necesario para el tratamiento de las parasitosis de manera adecuada y oportuna. Existen dos métodos de diagnóstico: los directos e indirectos. El primero consiste en observar e identificar por exámenes parasitológicos o parasitoscópicos los elementos parasitarios o fases parasitarias como: parásitos adultos, segmentos, larvas y huevos eliminados en las heces. Los métodos indirectos determinan los cambios tisulares y humorales provocados por los parásitos, que permiten diagnosticar temprana y eficazmente el transcurso de la enfermedad particularmente cuando el parásito aún no ha alcanzado la madurez sexual, de modo que se utilizan anticuerpos específicos, estudios enzimáticos o hematológicos que determina si presenta un mayor o menor grado de acuerdo al tipo y la gravedad de la enfermedad parasitaria (Quiroz-Romero *et al.*, 2011; Abbot, 2018; Selemon, 2018).

Inmunización

El desarrollo de vacunas para controlar los helmintos comenzó en la década de 1950 mediante el uso de larvas atenuadas por radiación de *Dictyocaulus viviparus*, las cuales demostraron que se podía brindar protección a terneros (Nisbet *et al.*, 2016). Ante la dependencia de antihelmínticos para hacer frente a la hemoncosis ovina, los métodos de inmunización tendrían un papel relevante en la protección continua, ya que esto ayudaría a minimizar el riesgo de mortalidad y al mismo tiempo reducir la gravedad en la resistencia antihelmíntica (Besier *et al.*, 2016). El desarrollo de vacunas eficaces para controlar la hemoncosis radica en la identificación de moléculas y complejos inmunogénicos a partir de los productos secretores y excretorios del nematodo y antígenos “ocultos” derivados del intestino (Smith and Zarlenga

2006). Sin embargo, durante las últimas dos décadas se han realizado mejoras significativas para identificar varios antígenos de *H. contortus* (Wang *et al.*, 2017). Por otro lado, previamente se habían investigado el uso de proteasas intestinales de *H. contortus* como componentes de una vacuna, como la proteasa de cisteína con propiedades fibrinogenolíticas (Boisvenue *et al.*, 1992), el complejo de glicoproteínas de membrana intestinal (H-gal-GP) (Smith *et al.*, 1994), una aminopetidasa H11 (Smith *et al.*, (1997), una proteasa metaloendopeptidasa (Redmond *et al.*, 1997) y la proteasa de aspartilo (Longbottom *et al.*, 1997) como componentes de una vacuna con posible eficacia. Una glucoproteína de membrana integral fue considerada como una candidata durante pruebas de reducción de nematodos en abomaso y en el recuento de huevos en heces. Sin embargo, de acuerdo a estudios recientes, fue comercializada para su uso en Australia la vacuna llamada Barbervax, WormVax, que contiene dos proteínas de membrana integral nativas de *H. contortus* la H11 y H-gal-GP (Nisbet *et al.*, 2016). Asimismo, para evaluar los posibles riesgos de seguridad de la vacuna Barbervax se realizaron estudios de serología y determinaron que los títulos de anticuerpos fueron significativos en los animales vacunados y, por tanto, la vacuna demostró ser segura (Vanhoy *et al.*, 2018). Los hallazos demostrados sobre la eficacia de la vacuna Barbervax fueron llevados a estudios con ovejas periparturientas con suplementos nutricionales, lo que mostró una reducción del 80% en el recuento de huevos fecales en las ovejas vacunadas y títulos de anticuerpos más altos. Por otro lado, la combinación de la vacuna con una mejor nutrición causaría un mejor efecto protector contra la infección por *H. contortus* (Bassetto *et al.*, 2018; Ehsan *et al.*, 2020).

Quimioterapia y Resistencia Antihelmíntica

Existen varios tipos de antihelmínticos (AH) disponibles para el tratamiento y control de las parasitosis, estos AH se agrupan de acuerdo a su composición química y su efectividad dependiendo de la etapa del ciclo biológico del parásito (Sumano y Ocampo, 2006). En la actualidad, existen tres grupos antihelmínticos de amplio espectro más utilizados para el tratamiento de las nematodiasis en ovinos: los benzimidazoles (BZ), imidazotiazol (levamisol, LEV) e hidropirimidinas (pirantel/morantel) y las lactonas macrocíclicas (avermectinas y milbemicinas, ML) (Márquez, 2007; Ruiz y Hernández, 2010; Arsenopoulos *et al.*, 2020). Con este antecedente, es importante conocer amplia y profundamente la farmacología de este tipo de drogas sintéticas, de tal modo, sirvan de fundamento para el uso racional de los fármacos antihelmínticos (Pérez-Fernández, 2010). Sin embargo, actualmente nos enfrentamos a un aumento progresivo y exagerado en el uso constante e irracional de sustancias químicas de origen sintético con el propósito de desparasitar al ganado, lo que implica cambios sobre el genoma de los parásitos que como parte de su proceso de adaptativo natural también le permite evadir el efecto perjudicial de los antihelmínticos por mecanismos de detoxificación (pérdida o disminución progresiva de receptores para el fármaco), lo que se conoce como resistencia antihelmíntica. (Köhler, 2001; Lambertz *et al.*, 2019).

Actualmente existen casos de resistencia antihelmíntica en más de 40 países, en muchos casos, los nematodos muestran múltiple resistencia a los antihelmínticos comercialmente disponibles: benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (Várady *et al.*, 2011). Sin embargo, existe evidencia científica acerca de la resistencia antihelmíntica de algunos antiparasitarios de uso frecuente en ovinos como en bovinos en México, una muestra de ello, es de acuerdo a los datos registrados por Figueroa-Castillo *et al.*, 2000. Estos resultados muestran una clara

evidencia de resistencia antihelmíntica a los benzimidazoles (sulfóxido de albendazol), que no redujo significativamente la eliminación de huevos en las heces, ni el número de animales positivos en ovinos infectados. Por otra parte, los estudios realizados por Encalada-Mena *et al.*, 2008 revelan por primera vez en México, sobre la resistencia antihelmíntica a ivermectinas en bovinos infectados naturalmente nematodos gastrointestinales, lo cual es seriamente preocupante debido a la importancia en la producción ganadera de esta especie. En un contexto general, los nematodos gastrointestinales constituyen el principal problema sanitario y productivo. Ante este escenario, se han propuesto nuevos antihelmínticos disponibles para el control de parásitos resistentes como el monepantel para el control de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus spp.* con resistencia múltiple a ivermectina y fenbendazol en pequeños rumiantes (Jackson *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 2016).

Mecanismos de acción de los Antihelmínticos

Los principales mecanismos de acción de los antihelmínticos actúan en áreas bioquímico-fisiológicas específicas compuestas principalmente por proteínas como: canales iónicos, enzimas, proteínas estructurales y moléculas de transporte ver cuadro 2.

Cuadro 2. Modos de acción de los antihelmínticos.

Canales iónicos	Microtúbulos	Bioenergéticos	Desconocido
Tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel)	Benzimidazoles (tiabendazol, albendazol, mebendazol, netobimin)	Salicilanilidas (closantel)	Praziquantel
Imidazotiazoles (levamisol)		Sulfonamidas clorinadas (clorsulon)	Triclabendazol
Lactonas macrocíclicas (ivermectina, moxidectina)			
Piperazina			

Fuente: Köhler, 2001

Para comprender los mecanismos de acción de algunas antihelmínticos, tenemos que conocer las principales funciones vitales del parásito como la alimentación, crecimiento y reproducción (Botana-López *et al.*, 2002). En este sentido, las bases farmacológicas del mecanismo de acción de la mayoría de los antihelmínticos generalmente estas asociados a la interferencia de las funciones del parásito relacionada con los siguientes procesos: obtención de energía, coordinación neuromuscular y reproducción del parásito (Sumano y Ocampo, 2006; Pérez-Fernández, 2010).

Los mecanismos de acción de algunos antihelmínticos para producir la eliminación o muerte del parásito requieren de un período de contacto prolongado como por ejemplo los benzimidazoles como el albendazol (Figura 8a) y fenbendazol (Figura 8b), actúan a través de los procesos metabólicos relacionados a la obtención de energía, (Botana-López *et al.*, 2002; Sumano y Ocampo, 2006; Pérez-Fernández, 2010; Cooper *et al.*, 2016). Los benzimidazoles son los inhibidores en el transporte de glucosa (Sumano y Ocampo, 2006). Al ser ingeridos por los helmintos son captados por las células del esófago e intestino donde se une a la tubulina inhibiéndolo y evitando la captación y utilización de la glucosa (Pérez-Fernández, 2010). Además produce un efecto letal para huevos y larvas presentando un efecto tóxico para las formas adultas y larvas en estado hipobiótico (Köhler, 2001; Jackson *et al.*, 2012).

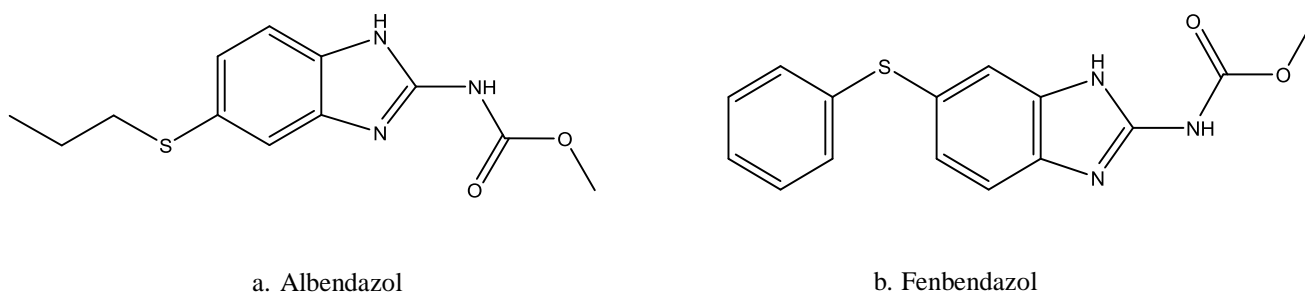


Figura 8. Estructura química de los benzimidazoles más comunes

Por otro lado, los imidazotiazoles (levamisol y tetramisol) y las tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel) ver Figura 9 a, b ,c y d, actúan como agonistas de los receptores colinérgicos nicotínicos activando los receptores nicotina-acetilcolina de las células musculares ganglionares (Botana-López *et al.*, 2002); otro modo de acción, es bloquear la acción de la enzima fumarato reductasa, disminuyendo síntesis de ATP, afectando la actividad normal de las células musculares del parásito, ambas acciones dan resultado una parálisis y posteriormente la expulsión del nematodo (Holden-Dye y Walker, 2014; Zajac, 2006).

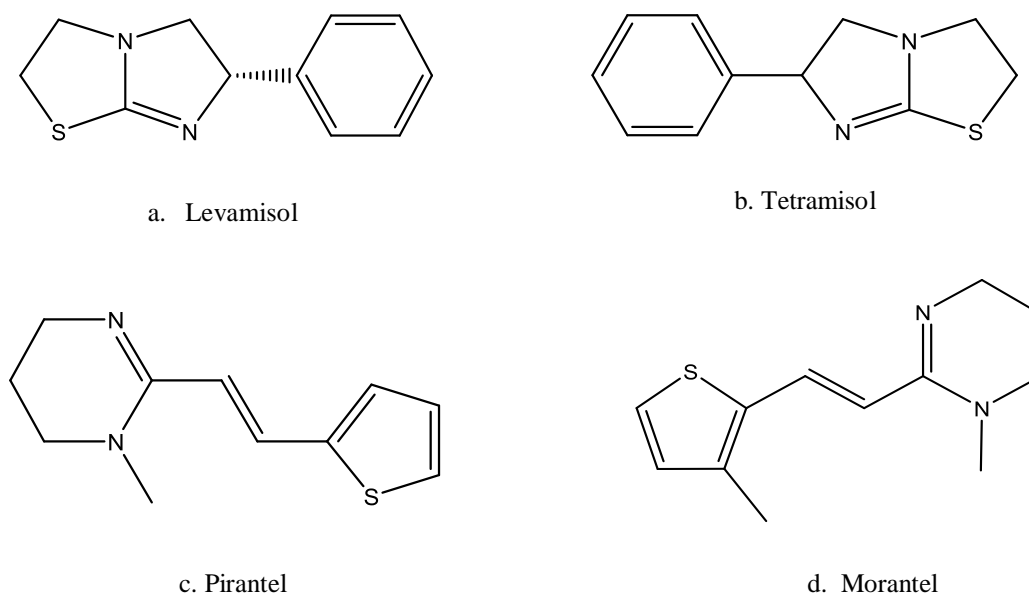


Figura 9. Estructura química de los antihelmínticos que actúan como agonistas colinérgicos nicotínicos

Las lactonas macrocíclicas (ej. ivermectinas y milbemicinas) (Figura 10). Su mecanismo de acción es a partir del receptor celular de los canales de glutamato de cloro (GluCl), ocasionando parálisis en las fibras musculares bloqueando el movimiento faríngeo que provocan la muerte del nematodo por inanición (Geary *et al.*, 1993; Alvinerie *et al.*, 1997; Martin, 1997; Koetze, 1998).

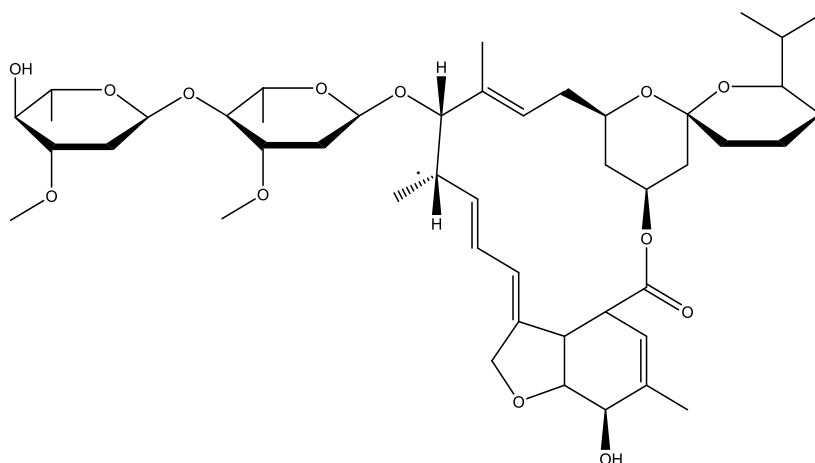


Figura 10. Estructura química de las lactonas macrocíclicas.

Plantas con propiedades antihelmínticas

Desde tiempos remotos y en todas las culturas del mundo las plantas han sido utilizadas por su contenido nutracéutico y sus propiedades medicinales, esta última, de gran utilidad para curar diferentes enfermedades incluyendo las parasitosis gastrointestinales (Rahmann and Seip, 2007; Gallegos-Zurita, 2016). En México, existen un vasto número de publicaciones etnobotánicas acerca del empleo de los recursos herbolarios como remedios para el cuidado de la salud (Espinosa and Centurión *et al.*, 2016). Se ha observado que determinadas plantas de otras especies presentan actividad contra nematodos gastrointestinales, principalmente aquellas que son capaces de inhibir altos porcentajes en la eclosión de huevos. Por tal motivo, el uso de plantas con principios bioactivos podrían desempeñar un papel importante en el control de las parasitosis en pequeños rumiantes (Sepúlveda-Vázquez *et al.*, 2018). Por ejemplo, un extracto acuoso a partir de hojas de *Annona muricata* redujo la eclosión de huevos de *H. contortus* en un 84,91% a una dilución del 50% siendo que esta actividad fue cercana al

50% incluso a concentraciones del 6.25 % (Ferreira *et al.*, 2013). Otros trabajos demuestran las propiedades antihelmínticas de algunas plantas como los realizados por Palacios-Landín *et al.*, 2015, que al combinar y evaluar los extractos de *Allium sativum* y *Tagetes erecta* fueron evaluados contra larvas L₃ de *H. contortus* en gerbos infectados *in vivo*, mostraron una reducción en la carga parasitaria del 87.5% a 40 mg/mL. Este resultado demuestra que los metabolitos presentes en los extractos pueden potencializar la actividad nematicida (sinergismo), pero por separado. Un trabajo similar realizado por De Jesús Gabino *et al.*, 2010 demuestra la actividad antihelmíntica *in vivo* en gerbos infectados de una fabácea *P. laevigata* contra larvas de *H. contortus*, esta confrontación redujo la carga parasitaria del 42% a una concentración de 40 mg/mL. Por otro lado, los estudios realizados por Galicia-Aguilar *et al.*, 2008 los extractos de *Tagetes erecta*, *Argemone mexicana* y *Castela tortuosa*, contra larvas L₃ de *H. contortus*, exhibieron una potente actividad con *T. erecta* (99.7%) y *C. tortuosa* (85.8%) a 20 mg/mL respectivamente. En nuestro país, algunos autores han evaluado algunas plantas con propiedades antihelmínticas con resultados muy prometedores como, por ejemplo, algunas plantas forrajeras de la familia de las fabáceas bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* presenta un potencial antihelmíntico contra nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes (Torres-Acosta *et al.*, 2012; von Son-de-Fernex, *et al.*, 2012; Espinosa-Moreno *et al.*, 2015; von Son-de-Fernex, *et al.*, 2015; Olmedo *et al.*, 2017; González-Cortazar *et al.*, 2018). De acuerdo con Githiori *et al.* (2006) se ha confirmado el uso de plantas con potencial antihelmíntico con un enfoque novedoso para el control de enfermedades gastrointestinales en pequeños rumiantes, como p.ej, el trébol de patas de pájaro (*Lotus corniculatus*), la escarola o achicoria (*Cichorium intybus*), el ajo (*Allium sativa*), hojas de papaya (*Carica papaya*), neem (*Azadirachta indica*), o algunas arbustivas como: *Leucaena leucocephala*, *Acacia cochliacantha* y *Lysiloma acapulcensis* entre otras Githiori *et al.*, 2006; Chagas *et al.*, 2008; von Son-de-Fernex, *et al.*,

2015; Castillo-Mitre *et al.*, 2017; González-Cortazar *et al.*, 2018; Islam *et al.*, 2019). En el Cuadro 3 se muestra el uso de algunas especies de plantas con efecto antiparasitario en contra de diversos padecimientos.

Cuadro 3. Diferentes especies vegetales y usos tradicionales.

Especies vegetal	Familia	Usos medicinales
<i>Brachylaena discolor</i>	Asteraceae	Purgativos contra parásitos intestinales, antihelmínticos para terneros, ovinos y caprinos.
<i>Zanthoxylum capense</i>	Rutaceae	Trastornos gástricos e intestinales, antihelmínticos, tos, bronquitis, pleuresía.
<i>Clorodendrum glabrum</i>	Lamiaceae	Parásitos intestinales, tos, fiebre y diabetes.
<i>Heteromorpha trifoliata</i>	Apiaceae	Gusanos intestinales, cólicos en caballos y vermífugas, enemas para trastornos abdominales.
<i>Apodytes dimidiata</i>	Icacinaceae	Enemas para parásitos intestinales, purgantes, inflamación del oído.
<i>Strychnos mitis</i>	Strychnaceae	Malaria, fiebres.
<i>Maesa lanceolata</i>	Maesaceae	Antihelmínticos, tratamiento de heridas e infertilidad.
<i>Indigofera frutescens</i>	Papilionaceae	Antihelmínticos.
<i>Leucosidea sericea</i>	Rosaceae	Tratamiento de oftalmia, antihelmíntico, astringente y vermífugo.
<i>Melia azedarach</i>	Meliaceae	Antihelmínticos efectivos, eméticos, catárticos y tratamiento del eczema.
<i>Clausena anisata</i>	Rutaceae	Antihelmínticos, purgantes, reumatismo, fiebres y miasis.
<i>Cyathea dregei</i>	Cyatheaceae	Antihelmínticos.
<i>Milletia grandis</i>	Papilionaceae	Antihelmínticos y tranquilizantes.

(Fuente: Adamu *et al.*, 2013)

Los antihelmínticos de origen vegetal han estado a la vanguardia actualmente por toda la comunidad científica a nivel mundial incluyendo la veterinaria (Hammond *et al.*, 1997). Una razón importante acerca de estos AH podría ser que son de gran ayuda en la categoría de la medicina etnoveterinaria de fácil aplicación en el desarrollo (por su aporte nutricional) y la preservación de la salud (compuestos activos presentes para una determinada enfermedad) en el ganado (McCorkle, 1986; Mathias, 1994). Así que, el estudio de la medicina herbal puede servir para revelar pistas sobre remedios naturales con mayor potencial. En consecuencia, la contribución de la medicina etnoveterinaria (MEV), ha ofrecido una alternativa en el cuidado de la salud animal de generación en generación por los ganaderos y pastores rurales que han observado muy de cerca sus animales y su medio. Todo esto incluye en una serie de habilidades presentes como el conocimiento de la biodiversidad, la productividad de los

animales, el diagnóstico de enfermedades cuando un animal está enfermo y como curarlo. El uso de plantas medicinales, principalmente forrajeras, a menudo vienen con un conocimiento tradicional o indígena y que ha ayudado a resolver algunos problemas que aquejan al ganado y animales domésticos (Molina-Flores, 2004). Existen antecedentes sobre la importancia de las plantas con actividad antihelmíntica de acuerdo a Danø y Bøgh (1999) (ver cuadro 4). El uso de las plantas medicinales y sus principios bioactivos para el control de la parasitosis en rumiantes también presenta algunas limitantes (Hammond *et al.*, 1997). El primer obstáculo es la insuficiente información científica sobre los compuestos activos, su mecanismo de acción, la toxicidad y los factores que influyen en su efectividad, debido a ello, es de suma y vital importancia realizar estudios *in vivo* para estandarizar y buscar una adecuada posología para encontrar su efecto benéfico (Githiori *et al.*, 2006). Bajo esta perspectiva, el uso de plantas y extractos vegetales tienen un papel promisorio como una posible herramienta alternativa adicional para el control parasitario bajo un concepto etnobotánico que permita promover un cambio en el control de estos parásitos, aminorando el uso de formulaciones químico-sintético y potencializando los recursos naturales para la salud y cuidado animal (Hounzangbe-Adote, 2004; Rochfort *et al.*, 2008).

Cuadro 4. Plantas de uso tradicional con actividad antihelmíntica

Planta	Parte	Compuesto activo	Actividad	Animal	Referencia
<i>Acacia albida</i>	Semillas		Lombrices	Ovejas, cabras	Nwude and Ibrahim (1980)
<i>Agrimonia eupatori</i>			Antihelmíntico	Humanos	Farnsworth et al. (1985)
<i>Alangium lamarckii</i>	Corteza de la raíz		Ascáridos	Aves de corral	Dubey and Gupta (1969)
<i>Albizia anthelmintica</i>	Corteza y Raíz		Antihelmíntico, Fasciolosis, y gusanos pulmonares	Bovinos, caprinos, ovinos, camellos	Minja (1989) ITDG and IIRR (1996)
<i>Albizia coriavera</i>	Corteza		Fasciolosis, gusanos pulmonares,	Bovinos, caprinos, ovinos	ITDG and IIRR (1996)
<i>Allium sativum</i>	Bulbo		lombrices intestinales		
<i>Aloe barteri</i>	Hojas	Antraquinona	<i>Nippostrongylus braziliensis</i>	Ratas	Ibrahim et al. (1984)
<i>Ananas comosus</i>	Frutos		<i>Ascaridia galli</i>	Pollos	Fernández (1991)
<i>Annona cherimolia</i>		Acetogeninas		Ratas	Bories et al. (1991)
<i>Annona muricata</i>			<i>Nippostrongylus</i>		
<i>Annona braziliensis</i>					
<i>Annona senegalensis</i>	Hoja				
	Corteza	Antraquinona	<i>Nippostrongylus braziliensis</i>	Ratas	
	Raíz				Ibrahim et al. (1984)
<i>Anogeissus leiocarpus</i>	Corteza	Antraquinona	<i>Nippostrongylus braziliensis</i>	Ratas	
	Semillas				
<i>Areca catechu</i>	Nuez	Arecolina y otros alcaloides	Taenicida	Bovinos Caprinos Perros	Roepke (1996)
<i>Artemisia maritima</i>		Santonin Artemisinina	<i>Neoscaris vitulorum</i>	Ternero de búfalo	Akhtar et al. (1982) Farnsworth et al. (1985) Sherif et al. (1987)
<i>Bixa orellana</i>	Semillas		<i>Ascaridia galli</i> <i>Ascaris suum</i>	Pollos Cerdos	Fernández (1991)
<i>Boswellia dalzielii</i>	Corteza		Antihelmintico	Ovinos Cabras	Nwude and Ibrahim (1980)
<i>Butea frondosa</i>			Oxiuros	Raton	Metha and Parashar (1966)
<i>Caesalpinia crista</i>	Semillas		<i>Toxocara vitulorum</i> <i>Ascaridia galli</i>	Terneros de búfalo Pollo	Akhtar et al. (1985) Javed et al. (1994)
<i>Callindra portoricensis</i>	Raices		<i>Toxocara canis</i>	Perros	Adewunmi and Akubue (1981)
<i>Carica papaya</i>	Látex		<i>Ascaridia galli</i> <i>Ascaris suum</i> <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Pollos Cerdos Ratones	Mursof and He (1991) Satrija et al. (1994) Satrija et al. (1995)
<i>Carissa edulis</i>	Semillas		<i>Ascaridia galli</i>	Pollos	Fernández (1991)
<i>Cassia occidentalis</i>	Hojas	Antraquinona	<i>Nippostrongylus braziliensis</i>	Ratas	Ibrahim et al. (1984)
<i>Cassia spectalis</i>			Lombrices intestinales	Bovinos, caprinos, ovinos	ITDG and IIRR (1996)
<i>Chrysanthemum spp.</i>		Piretrina	<i>Ascaridia lineata</i>	Pollos	Rebrassier (1934)
<i>Chrysophyllum cainito</i>	Tallos		<i>Haemonchus contortus</i>	Ovinos	Fernández (1991)

Cuadro 4. Continuación

<i>Cissampelos mucromata</i>	Raíces		Antihelmítico		Minja (1989)
<i>Clitorea ternatea</i>	Semillas		<i>Ascaridia galli</i>	pollos	Fernandez (1991)
<i>Combretum mucronatum</i>	Raíces		Gusano de Guinea	Humanos	Sofowora (1982)
<i>Croton macrostachys</i>	Hojas		Antihelmítico		Minja (1989)
<i>Diospyros mespilliformis</i>	Corteza		Antihelmítico		Minja (1989)
<i>Diospyros mollis</i>		Diospyrol	<i>Necator americanus</i>	Hamster Ratones	Sen et al. (1974)
<i>Dodonea viscosa</i>	Hojas		Gusanos intestinales		Sharma and Singh, (1989)
<i>Embelia kilimandschiraca</i>	Raíces		Antihelmítico		Minja (1989)
<i>Embelia Schimperii</i>	Semillas		Antihelmítico		Minja (1989)
<i>Embelia Schimperii</i>	Raíces				
<i>Embelia Schimperii</i>	Frutos	Embelin	<i>Hymenolepis diminuta</i>	Ratas	Bøgh et al. (1996)
<i>Erythrina senegalensis</i>	Corteza		Fasciolosis	Rumiantes	Nwude and Ibrahim (1980)
<i>Evodia rutaecarpa</i>		Atanine	Ascáridos	Cerdos	Perrett and Whitfield (1995)
<i>Evodia rutaecarpa</i>			<i>Ostertagia circumcincta</i>	Ovinos	
<i>Hagenia abyssainica</i>	Frutos		Lombrices intetsinales	Bovinos, caprinos, ovinos	ITDG and IIRR (1996)
<i>Lansium domesticum</i>	Semillas		<i>Ascaridia galli</i> <i>Ascaris suum</i> <i>Haemonchus contortus</i>	Pollo Cerdo Cabra	Fernández (1991)
<i>Lawsonia inermis</i>	Hojas		Fasciolosis	Ovinos y caprinos	Nwude and Ibrahim (1980)
<i>Leucaena leucocephala</i>	Semillas		<i>Ascaridia galli</i> <i>Ascaris suum</i> <i>H. contortus</i>	Pollos Cerdos Cabras	Fernández (1991)
<i>Mangifera indica</i>	Semillas		<i>Ascaridia galli</i>	Pollos	Fernández (1991)
<i>Mallotus philippinensis</i>			Cestodos	Cabra	Akhtar and Ahmad (1992)
<i>Mimosa pudica</i>	Tallos		<i>H. contortus</i>	Ovinos	Fernández (1991)
<i>Mitragyna stipulosa</i>	Raíz		Gusano de Guinea	Humanos	Sofowora (1982)
<i>Momordica charantia</i>	Tallos		<i>Ascaris suum</i> <i>Ascaridia galli</i>	Cerdo Pollos	Fernández (1991); Farnsworth et al. (1985)
<i>Peganum harmala</i>	Semillas	Tetrahydroharmina	Infección gastrointestinal mixta	Cabras	Akhtar and Ahmad (1991)
<i>Tamarindus indica</i>	Raíces		Lombrices	Bovinos, caprinos, ovinos	ITDG and IIRR (1996)
<i>Tribulus terrestris</i>	Planta		<i>Ascaridia galli</i>	Aves de corral	Chakraborty et al. (1979)
<i>Uvaria hookeri</i>	Corteza de la raíz	Acetogeninas	<i>H. contortus</i>		Padmaja et al. (1993)
<i>Vernonia anthelmintica</i>			Oxiuros	Ratones	Metha and Parashar (1966)

El género *Prosopis* spp.

El género *Prosopis* spp. o mezquite es un árbol perteneciente a la familia de las Fabáceas o leguminosas de rápido crecimiento, adaptable, resistente, perenne que habita en zonas semiáridas en todo el mundo (Chaturvedi y Sahoo, 2013). Uno de los aspectos ecológicos más importantes de este género es la capacidad de fijar el nitrógeno mejorando la fertilidad y aportando nutrientes al suelo, retiene la humedad además evita la erosión del suelo y por ende la desertificación (Villegas-Espinoza *et al.*, 2014). En los ecosistemas desérticos y semidesérticos, este árbol proporciona sombra y refugio para la fauna silvestre y doméstica, las hojas y frutos aporta nutrientes que son considerados como fuente de alimento (Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014). Asimismo, algunos autores han manifestado su enorme interés de utilizar al género *Prosopis* como una alternativa de fitorremediación debido a su capacidad de disminuir los niveles de sal presentes en el suelo, así como diferentes contaminantes provocados por la minería (Prasad, 2007; Solowey, 2007; Haque *et al.*, 2009; Mani y Kumar, 2013). Otro aspecto a considerar acerca de este género, son los múltiples usos que ofrece p.ej su recurso forestal maderable que es usada por los campesinos de las zonas áridas y semiáridas de México como material en la construcción y de combustible, donde varios autores han recomendado su cultivo para el mejoramiento y aprovechamiento en la producción forestal de la madera; las vainas son usadas como forraje y alimento para el hombre y animales; la resina que produce este árbol tiene utilidad en la fabricación de adhesivos, en la elaboración de barniz, mientras que las flores son fuente importante de néctar para abejas e indispensable en la apicultura en la producción de miel (Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014). En el cuadro 5 se muestra algunos usos del mezquite. Por otro lado, los conocimientos adquiridos de generación en generación acerca de la herbolaria precolombina de algunas plantas con propiedades

medicinales incluyendo al género *Prosopis*, juegan un papel trascendental en la medicina tradicional en los pueblos del presente actual. Para confirmar este hecho, un estudio realizado por Taisma (2017) en comunidades rurales de la península de Paraguaná Venezuela, acerca del uso medicinal de *Prosopis juliflora*, indicó que es empleada para tratar con mayor frecuencia algunos problemas de tipo traumatológico, oftalmológico y de la función sexual masculina (afrodisiaco) y con menos frecuencia en tratamientos para la diabetes, cáncer, enfermedades del sistema digestivo y urinario, control del colesterol, revitalizantes, adelgazantes, antihelmínticos y paliativos de síntomas de enfermedades virales. Todas las partes de la planta excepto las flores eran utilizadas por los pobladores a manera de infusión, decocción, crudos o en bálsamos.

Cuadro 5. Usos del Género *Prosopis*

Parte de la planta	Consumo humano	Medicina tradicional	Forraje	Forestal
Tronco y ramas		Ungüento (a partir de la ceniza mezclada con manteca de origen animal).	Desinflamatorio	Aperos, arados Ruedas para carreta, vivienda vigas, muebles, leña, carbón, cercas en potreros, artesanías
Corteza		Trozos de corteza y ramas jóvenes (infusión)	Disentería Gastritis	Curtiduría Corteza
Hojas		Infusión y emoliente	Antiséptico Colirio Disentería Gastritis	Ramoneo verde: Asnos Bovinos, caballos, caprinos, cerdos, mulas, ovinos Fertilizante orgánico
Vaina	Fruta fresca Fruta en almíbar Pinole Queso (alimento básico chichimeca) Piloncillo Atole Vino		Harina a partir de vainas de mezquite	Pólvora Tintes
Flores	Fuente de néctar en la producción de miel.			
Goma	Golosinas	Infusión	Laringitis	

(Fuente: Cervantes, 2002).

Descripción botánica

El mezquite es un árbol espinoso que mide hasta 15 m de altura; su sistema radical puede alcanzar a más de 50 m de profundidad y 15 m laterales; el tronco es de corteza oscura o negruzca y presentan ramas flexuosas; los tallos son delgados y muy espinosos que hace las funciones de hojas atrofiadas o caducas. Presentan hojas compuestas bipinnadas de 5 a 10 cm de largo, contiene 12 a 15 pares de folíolos lineares con 5 a 10 mm de largo. Las flores son bisexuales, actinomorfas de color amarillo con apariencia verdosa y se agrupan en racimos, miden de 4 a 10 mm contiene 5 sépalos y 10 estambres y producen una aroma y néctar para llevar la polinización. El fruto es una vaina de color rojizo a violáceo (lomento drupáceo e indehiscente) con forma alargada, recta o arqueada y a veces espiralada de 3 a 30 cm de largo; cada fruto contiene de 12 a 20 semillas. Su composición química presenta el 13% proteínas y 35% sacarosa, la madera contiene del 5 al 9% de taninos. Algunas variedades de este género son tolerantes a la sal y son capaces de crecer en lugares con niveles de salinidad marina (CONAZA, 1994).

Localización geográfica de *Prosopis* en México y en el Mundo

Etiológicamente se trata de un grupo muy primitivo de la subfamilia Mimosoideae probablemente originado en África tropical, donde aún permanece *Prosopis africana* con características poco especializadas. No obstante, su distribución actual se cree que algunas especies hayan sido introducidas como producto de la actividad humana, no sólo desde la llegada de los europeos, sino también el intercambio que hubo en la agricultura en la época precolombina. Algunos autores afirman que, en los últimos 200 años, se han introducido o reintroducido especies de *Prosopis* en determinadas zonas de Argentina, Chile, Perú, México

y Estados Unidos, así como en algunas regiones de Asia, África, India y Australia, la mayoría de las especies introducidas pertenecían a *P. juliflora*, *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. Ex Willd.) Kunth., *Prosopis glandulosa* Torr. y *Prosopis velutina* Wooton. Las dos primeras especies prevalecen en los trópicos, mientras que las dos últimas se encuentran en áreas más subtropicales. Especies como *Prosopis alba* Griseb. (*P. alba*) y *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz. (*P. chilensis*) han demostrado estar bien adaptadas y son localmente comunes en algunas regiones (Pasiecnik *et al.*, 2001). Sin embargo, las contribuciones de Burkart (1976), este género comprende 5 secciones. La sección afroasiática abarca a *Prosopis* y *Anonychium* y 3 se distribuyen en el continente americano. La sección *Monilicarpa* incluye 1 especie. La sección *Strombocarpa* comprende 7 especies y están distribuidas en Norteamérica y Sudamérica. La sección *Algarobia* incluye 30 especies y tienen una amplia distribución en el sur de estados Unidos, México, Centroamérica, Ecuador y Argentina en áreas desérticas o semidesérticas. En cambio, este género comprende 44 especies, 42 de ellas se encuentran en el continente americano distribuidas en dos grandes centros el norteamericano (mexicano-tejano) y el sudamericano (argentino-paraguayo-chileno), 29 especies existen en Argentina considerado como el centro de diversidad de *Prosopis* y el resto son consideradas endémicas INE (1994). De acuerdo a Rzedowski (1988) y Palacios (2006), Norteamérica cuenta con 14 especies de *Prosopis* distribuidos en casi todo el territorio mexicano (Cuadro 6) y (Figura 11). En nuestro país, hay cerca de 4 millones de hectáreas de mezquiales distribuidos en regiones áridas y semiáridas, no obstante, su amplia cobertura ecológica le permite adaptarse en zonas con temperaturas de 20 a 29°C, con precipitaciones pluviales que oscilan entre 350 y 1200 mm anuales, además, pueden estar presentes a nivel del mar hasta los 2200m de altitud. Algunos individuos de este género se han localizado en las islas de Hawái y otras islas cercanas la cual

se introdujo convirtiéndose en un árbol muy apreciado por sus diversos usos (Andrade-Montemayor *et al.*, 2011; Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014).

Cuadro 6. Biodiversidad y distribución de los mezquites mexicanos.

Género y especie	Estados de la República Mexicana
<i>P. articulata</i>	Sonora y Baja California Sur
<i>P. glandulosa</i>	Coahuila, Chihuahua, Sonora, Sinaloa, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas y SLP
<i>P. juliflora</i>	Yucatán
<i>P. laevigata</i>	Nuevo León, Durango, Tamaulipas, Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Estado de México, Veracruz, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca y Chiapas
<i>P. mayana sp. nov.</i>	Yucatán, Baja California Norte, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas
<i>P. mezcalana sp. nov.</i>	Guerrero y Michoacán, Nuevo León, Tamaulipas, SLP y Veracruz
<i>P. odorata</i>	Baja California Norte y Sur, Sonora, Sinaloa
<i>P. palmeri</i>	Chihuahua, Tamaulipas, Nuevo León y Zacatecas
<i>P. pubescens</i>	Baja California
<i>P. reptans var. cinerscens</i>	Chihuahua
<i>P. tamaulipana</i>	Tamaulipas
<i>P. velutina</i>	Tamaulipas, Nuevo León, San Luis Potosí y Veracruz
<i>P. vidaliana</i>	Sonora
<i>P. yaquiana sp. Nov.</i>	Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas
	Sonora, Baja California Sur y Sinaloa



Figura 11. Distribución geográfica: ● *P. odorata* ■ *P. glandulosa* ▲ *P. laevigata* ▲ *P. velutina* * *P. articulata*.

Contenido nutricional de *Prosopis* spp.

De manera general, *Prosopis* spp. ha demostrado ser una fuente importante de alimento, sin embargo, no se utiliza todas las partes de la planta debido a que existe escasa información en este aspecto (Choge *et al.*, 2007), de modo que la vaina del mezquite tiene un mayor uso en su consumo por su alto valor nutritivo. De acuerdo a Sawal *et al.* (2004) las vainas contienen entre 7-22% de proteína, 30-75% de carbohidratos, 11-35% de fibra cruda, 1-6% de grasa y 3-6% de ceniza. En cambio, la utilización de esta planta como forraje en la alimentación animal puede variar en relación a su valor nutricional. A este respecto se deben tomar algunas consideraciones como la especie, parte de la planta, territorio, las condiciones edafológicas, estadio fenológico (Andrade-Montemayor *et al.*, 2009). El contenido de nutrientes de diferentes especies más comunes del género *Prosopis* se muestra en el cuadro 7.

Cuadro 7. Contenido nutricional de diferentes especies de *Prosopis*.

Especie	País	Parte aérea	%M.S	% M.O	FDN	FDA	P.C
<i>P. cineraria</i>	India	Hojas	86.1	-	44.6	35.2	15.5
<i>P. juliflora</i>	India	Semillas	90.2	-	29.1	27.6	33.0
<i>P. juliflora</i>	Etiopia	Hojas	92.3	-	27.1	18.2	21.6
<i>P. flexuosa</i>	Argentina	Hojas y ramas	37.1	34.7	39.7	-	14.1
<i>P. laevigata</i>	México	Vainas	91.71	-	26.45	16.91	11.74
<i>P. ruscifolia</i>	Argentina	Semillas	-	-	-	-	33.81
<i>P. cineraria</i>	-	Hojas	-	90.2	53.5	39.5	12.9
<i>P. palida</i>	Perú	Vainas	85.9	-	-	-	9.1
<i>P. chillensis</i>		Semillas	-	-	-	-	25.36

M.S= materia seca, M.O=materia orgánica, FDN=fibra detergente neutro, FDA=fibra detergente acido, P.C=proteína cruda, (Fuente: Ruíz-Nieto *et al.*, 2020).

Fitoquímica y compuestos químicos del género *Prosopis*

Existen diferentes clases de metabolitos secundarios que sintetiza la planta con el propósito de protegerse del estrés, en heridas, en las enfermedades provocadas por diferentes microorganismos y herbívoros (Dahms *et al.*, 2014). De acuerdo con algunos autores, se han reportado diferentes metabolitos presentes en la planta con diversas propiedades farmacológicas que incluyen los alcaloides, taninos, fenólicos, esteroides, terpenos, flavonoides, proteínas, azúcares y ácidos grasos en diferentes estructuras de *Prosopis* (Prabha *et al.*, 2014), como hojas, corteza, vainas, raíces y polen (de Brito-Damasceno *et al.*, 2017). Por ejemplo, los alcaloides presentan diferentes propiedades farmacéuticas importantes como antioxidante (Tapia *et al.*, 2000; Almaraz-Abarca *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007; Napar *et al.*, 2012; Quispe *et al.*, 2014), antipirética (Manikandar *et al.*, 2009), analgésica (Ayanwuyi *et al.*, 2010), antitumoral (Robertson *et al.*, 2011), actividad antipalúdica (Preeti *et al.*, 2015) y antibacteriana (Raghavendra *et al.*, 2009; Othman *et al.*, 2016; Henciya *et al.*, 2017). Los taninos (Prabha *et al.*, 2014) son de gran interés en la nutrición animal debido a que pueden tener efectos tóxicos o anti-nutricionales; como consecuencia disminuye el suministro de nitrógeno en los animales (McSweeney *et al.*, 2001) o altera la población microbiana en el rumen (Piluzza *et al.*, 2014). Los terpenos tienen propiedades insecticidas, además, poseen actividad farmacológica que incluye las antibacterianas, antifúngicas, molusquicidas, antihelmínticas y antipalúdicas (Gurib-Fakim, 2006). Otro grupo de compuestos fenólicos de mayor relevancia son los flavonoides que de acuerdo a su actividad farmacológica muestran propiedades antioxidantes y anticancerígenas. De hecho, la combinación de taninos y flavonoides puede sinergizar el potencial antioxidante y anticancerígeno (Deepa *et al.*, 2013; Muhammad *et al.*, 2013). Fitoconstituyentes obtenidos a partir del género *Prosopis* son

mostrados en la Figura 12 (Ruiz-Nieto *et al.*, 2020) y el cuadro 8 se muestra la actividad farmacológica de diferentes especies (Ukande *et al.*, 2019).

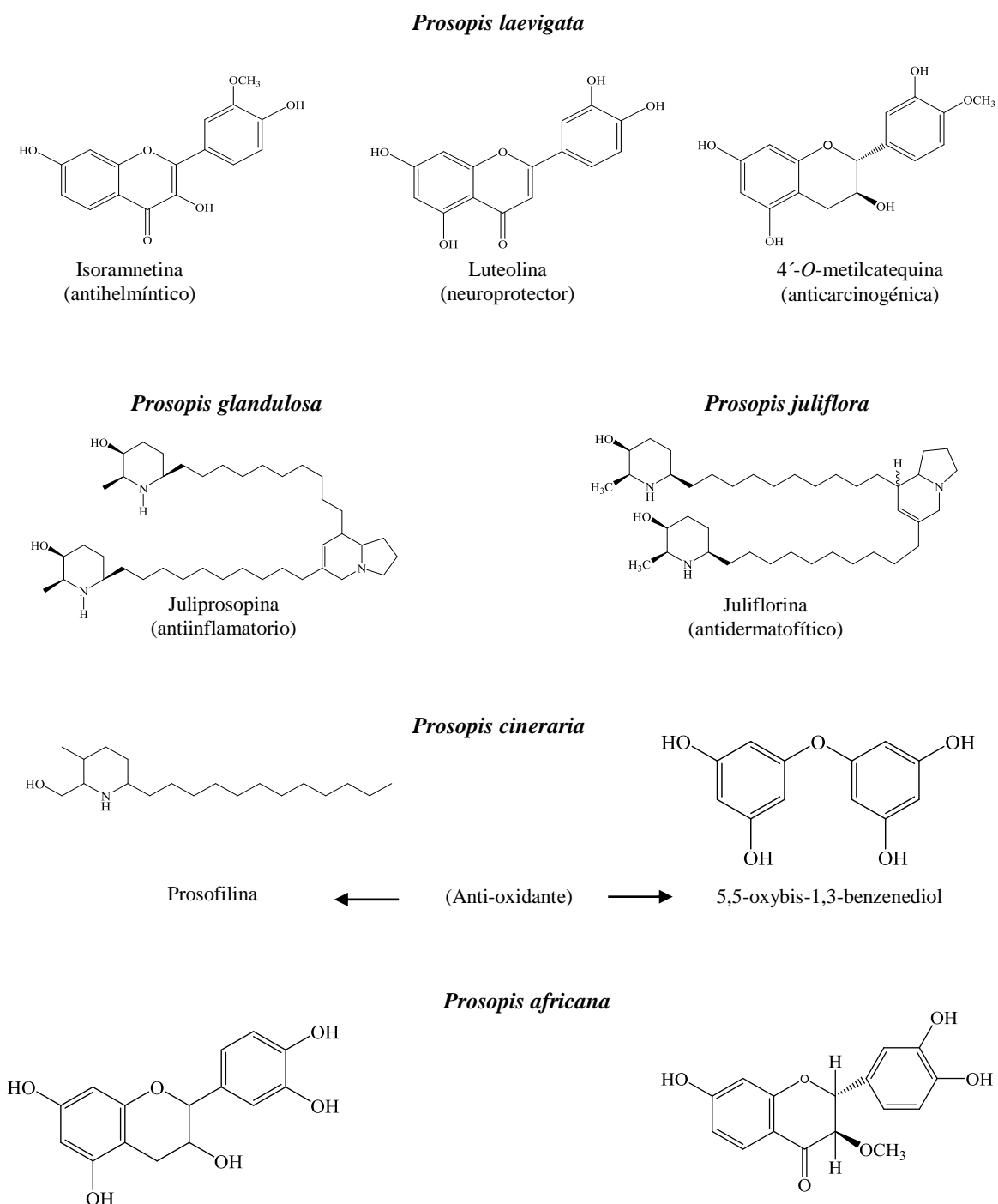


Figura 12. Compuestos fitoquímicos del género *Prosopis* spp.

Cuadro 8. Compuestos bioactivos medicinales de partes aéreas de *Prosopis* spp. (Leguminosae, Mimosaceae).

Especies	Parte aérea	Actividad farmacológica	Compuesto activo	Referencias
<i>P. juliflora</i>	Hojas	Inhibición de acetilcolinesterasa Bloqueo de canales de calcio.	Juliflorina	Choudhary <i>et al.</i> , 2005
	Hojas Vainas	Disminución de la producción de gas durante la digestión ruminal.	Juliprosopina Prosopiflorina Juliprosina	dos Santos <i>et al.</i> , 2013
	Frutas	Actividad contra el carcinoma de pulmón.	Patulitrina	Sathiya <i>et al.</i> , 2010
	Madera	Actividad antioxidante	(-) -Mesquitol	Sirmah <i>et al.</i> , 2009
	Hojas	Inhibición de hongos resistentes a fármacos. Activación de las células gliales.	Alcaloides de piperidina	Valli <i>et al.</i> , 2014 Silva <i>et al.</i> , 2013
<i>P. cineraria</i>	Semillas y hojas	Inhibición de H ⁺ , K ⁺ , ATPasa de <i>H. pylori</i> .	Alcaloides Flavonoides Taninos Antraquinonas Quinonas	Gobinath <i>et al.</i> , 2013
	Vainas	Actividad antioxidante	Triterpenoides, Prosopiflorina	Garg and Mittal, 2013
<i>P. africana</i>	Hojas, raíces y tallo Corteza del tallo	Actividad antitripanosomal	Taninos Flavonoides	Atawodi <i>et al.</i> , 2009
<i>P. chilensis</i>	Hojas	Actividad de unión al ADN	β -fenetilamina Triptamina	Astudillo <i>et al.</i> , 2000
<i>P. glandulosa</i> var. <i>glandulosa</i>	Hojas	Anti-infeccioso Antiparasitarios	Δ 1,6-juliprosopina	Astudillo, 2000 Rahman, 2011
<i>P. flexuosa</i>	Partes aéreas	Antioxidante	Catequina	Tapia <i>et al.</i> , 2000
<i>P. tamarugo</i>	Hojas	Antioxidante	Catequina	Astudillo <i>et al.</i> , 2000
<i>P. alpataco</i>	Semilla	Antibacterial	Triterpenos pentacíclicos	Mazzuca <i>et al.</i> , 2003
<i>P. pallida</i>	Frutos	Antihiper glucemia	Compuestos fenólicos	Pinto <i>et al.</i> , 2009
<i>P. cineraria</i>	Toda la planta	Actividad anticonvulsiva	Alcaloides	Sachdeva <i>et al.</i> , 2014

Prosopis laevigata (Mezquite)

Esta planta es una leguminosa arborea perteneciente a la familia de las Fabáceas del género *Prosopis* conocida comúnmente en México como “Mezquite” y se caracteriza por la producción de vainas con semillas. Además de ser un género ampliamente distribuido en zonas áridas y semiáridas de México y también se le encuentra cerca del nivel del mar (Palacios, 2006; Carrillo-Parra *et al.*, 2010). Estos árboles miden desde 40 cm hasta 20 m de altura y se adaptan a cualquier condición climática, ya que este puede crecer en lugares con lluvias menores a los 100 mm anuales y resistiendo temperaturas máximas de 40°C durante el verano (Ríos-Saucedo *et al.*, 2013; Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2007). Son un recurso natural de gran importancia económica de México y en el mundo por su madera que es usada como combustible, como material de construcción, sus frutos (vainas) se usan como forraje y sirve para el consumo humano, así como en animales (Rzedowsky 2006).

Taxonomía y descripción botánica

Nombre común: Mezquite

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida (Dicotiledoneas)

Subclase: Rosidae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Prosopis*

Nombre científico: *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd).

Prosopis laevigata es la especie que pertenece exclusivamente al estrato arbóreo, mide entre de 6 a 12 m de altura (Figura 13) (Rzedowsky 2006). El tronco mide por lo general de 30 a 60 cm hasta de 1 m de diámetro; su corteza es gruesa de color café-negrusco parcialmente fisurada. La raíz es profunda y el tallo ramifica a baja altura, algunas veces a nivel del suelo (Rosales *et al.*, 2011). La copa del árbol es más ancha que alta y sus ramas presentan espinas de 1 a 4 cm de largo. Las hojas son compuestas, bipinnadas con 10 a 40 pares de folíolos de 5 a 10 mm de largo; las flores están agrupadas en espigas densas de 5 a 10 cm de largo, con pedicelos de 0.5 a 1 mm de largo, cáliz campanulado, la corola presenta 5 pétalos linear-lanceolados, de 2.5 a 4mm de largo. Contienen 10 estambres, filamentos libres, blancos; ovario glabro o lanosos, estilo vellosa, estigma truncado son de color blanco-amarillentas (Grether, 2007); el fruto (vaina) presenta una coloración amarillenta con tonalidades moradas o rojizas, su forma es alargada, recta o arqueada mide de 7 a 20 cm de largo por 0.7 a 1.4 mm de ancho y 6 a 8 mm espesor (Figura 14) (Rodríguez-Sauceda *et al.*, 2014). Contiene entre 4-10 a 20-25 semillas de forma aovada a elíptica, son lisas de color café claro, cada una y miden de 4.2 a 5 mm de longitud, de 3.5 a 4.6 mm de ancho y de 2.0-2.5 mm de grosor (Rosales *et al.*, 2011).



Figura 13. Árbol de Mezquite (*P. laevigata*).



Figura 14. *Prosopis Laevigata*: **a.** Rama con racimos, **b.** Hojas; **c.** Glándula interpediolar; **d.** Folíolo; **e.** Flor y bráctea; **f.** Perianto extendido y estambres; **g.** Pistilo; **h.** Fruto. (Tomado de: Grether *et al.*, 2006).

Distribución geográfica de *P. laevigata* en México

El mezquite [*P. laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston] es la especie prominente de las zonas áridas y semiáridas que ocupa una extensa distribución geográfica en el territorio mexicano (Figura 15). Tomando en cuenta lo antes mencionado, es importante señalar, que esta extensión no es continua, sin embargo, en algunos casos esta interrumpida por zona montañosas. Esta especie se distribuye en varios estados de la república mexicana, comprende la vertiente del pacífico (Jalisco hasta Chiapas), la del Golfo de México (Nuevo León, Tamaulipas y el norte de Veracruz), región centro-norte (Estado de México, Morelos, Puebla, Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí, Durango, Hidalgo, Zacatecas), de manera que esta especie es capaz de establecerse en área con una amplia diversidad en condiciones climáticas, lo cual coincide con lo referido por Rzedowsky (2006) y Palacios-Romero *et al.*, (2016).

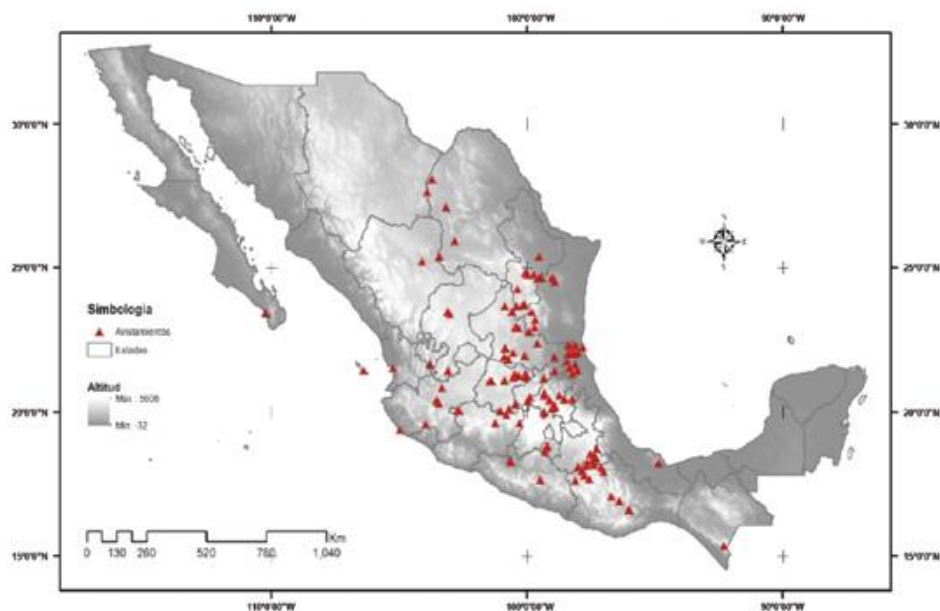


Figura 15. Distribución de *Prosopis laevigata* en México (Fuente: Palacios *et al.*, 2016).

Uso en la medicina tradicional de *P. laevigata*

El uso medicinal de esta especie ha sido importante desde la cultura prehispánica hasta nuestros días, p ej., en el estado de Guanajuato la corteza de la raíz a manera decocción ha sido empleada para curar algunas afecciones de ojos, disentería y como purgante (García-Moya, 1986; Rzedowski, 1988). Por otro lado, la decocción de la corteza a partir de ramas jóvenes, se utiliza como bebida para aliviar los cólicos en bebés. En cuanto a las partes aéreas de esta especie, las hojas son utilizadas para padecimientos oculares, en problemas gastrointestinales, como antiparasitario y antimicrobiano (Figueiredo, 1990; Argüelles *et al.*, 1991). Las flores hervidas se emplean con fines curativos durante la ducha para el alivio del salpullido, no obstante, los indígenas de Norte América cocían las flores y las usaban como vomitivo y purgante (CONAZA, 1994). Los frutos hervidos en agua, se usan para disolver cálculos vesiculares. Las hojas y frutos en infusión se usan como anticancerígeno, como purgante, gastralgia, escalofríos, diarrea, disentería, excrecencias, ojos, gripe, dolor de cabeza, bronquitis, inflamación, comezón, sarampión, garganta, y heridas (González *et al.*, 2004; Ríos-Saucedo *et al.*, 2011; García-Andrade *et al.*, 2013).

Contenido nutricional y aplicaciones de *P. laevigata*

En lo que respecta a las características nutricionales que ofrece esta planta, existen estudios bromatológicos, químicos, físico-químicos acerca de la vaina (frutos) del mezquite que, por su alto contenido de proteínas, azúcares y otros nutrientes desempeña un papel primordial como suplemento alimenticio para consumo humano y de animales. Y en ese sentido, un estudio realizado por Andrade-Montemayor *et al.* (2011) las vainas de *P. laevigata* poseen un alto contenido de proteína cruda soluble que es rápidamente degradable y asimilable por los

animales. De acuerdo a los trabajos realizados por Peña-Avelino et al. (2014), el valor nutricional a partir de vainas y semillas de la misma especie vegetal se muestra en cuadro 9.

Cuadro 9. Composición química de vainas y frutos de *P. laevigata*.

Componente	Vaina	Semilla
M.S g/kg	855	950
FDN, g/kg M.S	307	182
FDA, g/kg M.S	237	127
Azúcares, g/kg M.S	198	8
P.C, g/kg M.S	77	285
Cenizas, g/kg M.S	39	35
Grasa, g/kg M.S	27	26
Taninos mg/g M.S	0.1	0.4

Materia seca= M.S; Fibra detergente Neutro= FDN; Fibra Detergente Ácido=FDA; Proteína Cruda=P.C.

En relación a la cantidad de componentes nutraceuticos encontrados en esta especie, el mismo autor realizó un estudio *in vivo* utilizando las vainas de *P. laevigata* en dietas de engorde a partir de corderos, mostrando que esta mezcla mejoró sustancialmente la ganancia diaria promedio. Asimismo, el consumo de este alimento proporcionó una benéfica fuente de carbohidratos solubles y tamaño de partícula que mejoró el metabolismo de nitrógeno en el rumen (Peña-Avelino *et al.*, 2016). Por otro lado, un trabajo realizado por Carranza-Montaña et al. (2003) cerca de 20 especies de plantas forrajeras incluyendo a *P. laevigata* fueron analizados mediante estudios bromatológicos. Las hojas y frutos contenían más del 12% de proteína de modo que representa una de las principales especies de plantas forrajeras con un alto valor proteico, nutrimentos y minerales, donde evidentemente se convierte en una fuente potencialmente valiosa de alimento en zonas áridas y semiáridas en nuestro país. En consecuencia, los frutos de esta especie han sido utilizados para el consumo animal, pero en algunas zonas rurales, la harina a partir de vainas de mezquite es usada por los pobladores

como fuente de alimento (Cervantes, 2002). La caracterización nutricional de la harina de mezquite como posible suplemento para consumo humano realizado por Barba de la Rosa et al. (2006) es mostrada en el cuadro 10. La cantidad de aminoácidos esenciales a partir de las vainas del mezquite y los valores mínimos requeridos para adultos y niños por día, así como la cantidad de metionina y cisteína, fenilalanina y tirosina según lo estipulado por FAO (1993), son mostrados en el cuadro 11.

Cuadro 10. Caracterización nutricional de la harina y postre (muffin) a partir de vainas de *P. laevigata*.

Características	Harina	Postre (muffin) a base de harina
Proteína cruda	10.0	9.7
Grasas	3.6	11.2
Cenizas	5.8	8.8
Fibra cruda	26.7	7.8
Carbohidratos	53.9	62.5

Cuadro 11. Cantidad de aminoácidos esenciales presentes en harina a partir de vainas de *P. laevigata* en mg a.a/g de proteína.

Aminoácidos (a.a)	Harina	FAO	
		Niños	Adultos
Histidina	45	19	16
Treonina	45	34	9
Lisina	20	58	16
Triptófano	53	11	5
Valina	62	35	13
Metionina + cisteína	14	25	17
Isoleucina	26	28	13
Leucina	56	66	19
Fenilalanina + Tirosina	28	22	19

Otros estudios revelan las propiedades de esta leguminosa transformada en harina a partir de las semillas de *P. laevigata*, debido a que contienen un elevado valor en fibra (7.73 g/100 g), proteína (36.51 g/100 g), grasas 4.83 g/100 g y los aminoácidos presentes en la harina son mostrados en el cuadro 12. El valor nutracéutico de esta fabácea es valiosa en su forma cruda

y extruida la cual es una forma útil de tecnología para aprovecharla en la industrialización como lo sugiere Díaz-Batalla et al. (2018).

Cuadro 12. Perfil de aminoácidos presentes en harina de semillas de mezquite.

Aminoácidos	Harina de semillas	*FAO, 2013
Aspartato	83.4	
Treonina	29.8	25
Serina	48.1	
Glutamina	177.2	
Prolina	62.6	
Glisina	50.6	
Alanina	43.1	
Valina	34.8	40
Isoleucina	29.2	30
Leucina	69.1	61
Tirosina	22.8	
Fenilalanina	35.6	
Histidina	24.2	16
Lisina	54.8	48
Argenina	112.2	
Cisteína	25.9	
Metionina	9.1	
Triptófano	6.5	6.6
Metionina + Cisteina	34.9	23
Fenilalanina + Triptófano	58.4	41

*Norma recomendada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) para seres humanos mayores de 3 años.

Fitoquímica de *Prosopis laevigata*

En una búsqueda exhaustiva de la información acerca de los metabolitos secundarios y compuestos activos con actividad biológica presentes en esta especie en particular, existe una limitada información al respecto. Sin embargo, algunos trabajos han podido revelar información muy valiosa y en ese sentido, se han logrado aislar e identificar diferentes metabolitos secundarios utilizando diferentes partes de la planta empleando diversos métodos de extracción. Por ejemplo, un estudio realizado por García-Andrade et al. (2013), mediante

una extracción con acetona-acuosa a partir de hojas secas de *P. laevigata*, la fracción polar se obtuvieron e identificaron por HPLC algunos compuestos fenólicos y flavonoides (Figura 16).

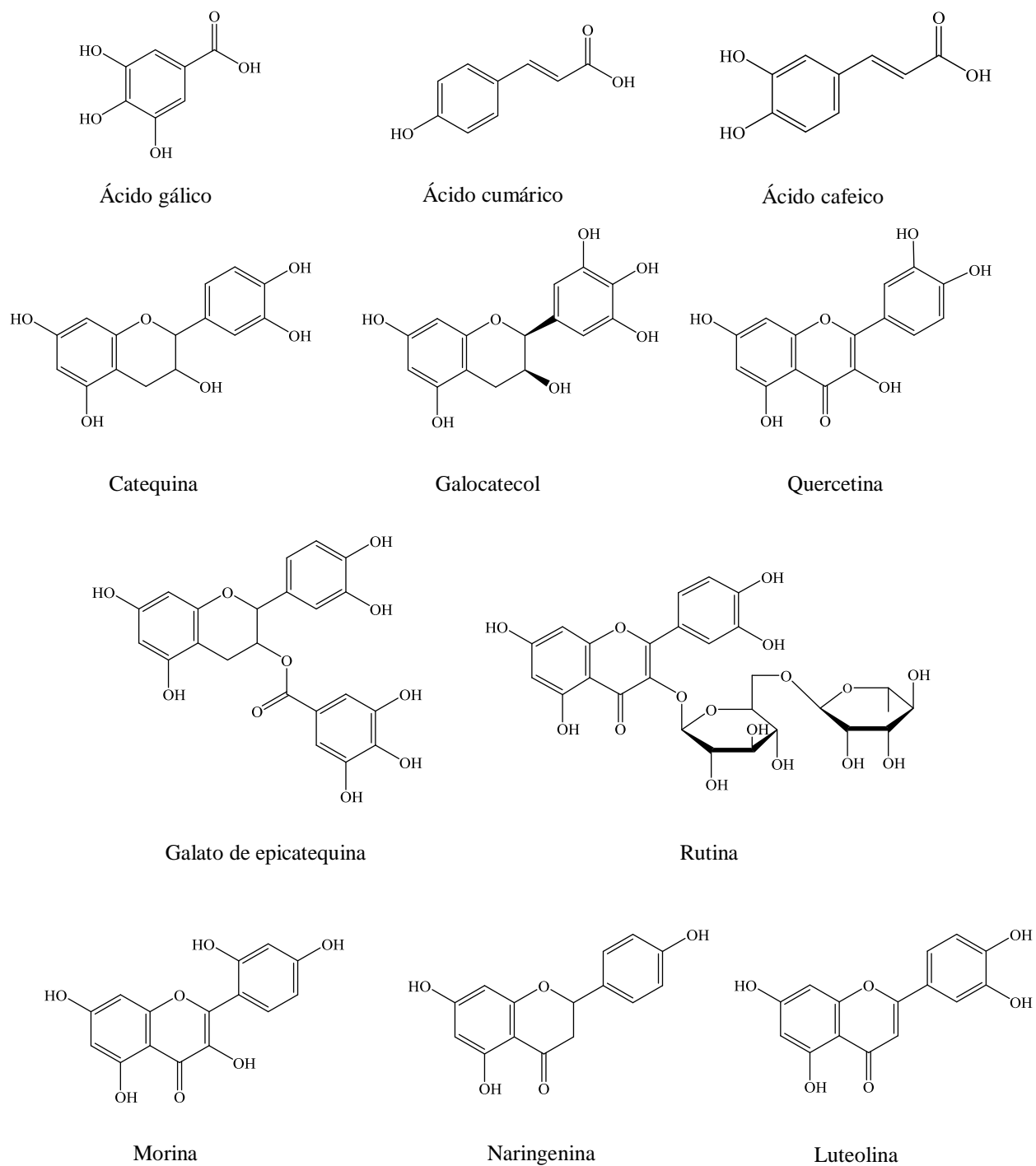


Figura 16. Metabolitos secundarios identificados a partir de hojas de *P. laevigata*.

En una investigación realizada por Delgado-Altamirano et al. (2017), a partir de un extracto acuoso utilizando hojas y ramas de *P. laevigata*, se obtuvieron metabolitos polares como alcaloides y algunos compuestos fenólicos como las antraquinonas. Desde una perspectiva muy general, los hallazgos fitoquímicos de acuerdo a Ruiz-Nieto et al. (2020) evidencian la presencia de varias clases de metabolitos secundarios que incluyen flavonoides, alcaloides, cumarinas, taninos, esteroides, terpenos, en diferentes especies de *Prosopis* (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis químico de algunas especies de *Prosopis*

Fitoconstituyentes									
Especie	Parte	Flvs	Alcs	Cums	Tans	Trs/Ets	Saps	Referencia	
<i>P. torquata</i>	Forraje	ND	-	ND	+	+	+	Rossi et al., 2007	
<i>P. flexuosa</i>		ND	+	ND	+	+	+	Rossi et al., 2007	
<i>P. flexuosa</i> var. <i>depressa</i> (alpataco)	Hojas	+	+	ND	-	+	+	Ardoino et al., 2013	
<i>Prosopis flexuosa</i> var. <i>flexuosa</i> (algarrobo)		+	+	ND	+	+	+		
<i>P. laevigata</i>	Corteza y hojas	+	+	+	+	+	-	Sánchez et al., 2016	
	Hoja	+/+	+/+		+/+	+/+	+/+		
	Vaina	+/+	+/+		+/+	+/-	-/-	Khandelwal et al., 2016a	
<i>P. cineraria</i>	Flor	+/+	+/+	ND	-/-	-/+	-/-		
<i>P. juliflora</i>	Tallo	-/+	-/-			-/-	+/-	-/-	Khandelwal et al., 2016b
	Raíz	+/+	+/+			+/+	+/+	+/+	
	Semilla	+/+	-/-		-/-	+/+	-/-		
<i>P. pallida</i>	Hojas	+	ND	ND	+	+	+	Cárdenas-Camacho et al., 2017	
<i>P. velutina</i>	Hojas	+	-	ND	ND	ND	-	Ramírez-Rojo et al., 2019	
<i>P. laevigata</i>	Hojas	+	+	+	+	+	+	Delgado-Núñez et al., 2020	

Flavonoides=Flvs; Alcaloides=Alcs; Cumarinas=Cums; Taninos=Tans; Triterpenos/Esteroles=Trs/Est
Saponinas=Saps. Positivo (+), Negativo (-), No detectado (ND).

Farmacología de *P. laevigata*

En una revisión profunda de la literatura, no existen estudios fehacientes acerca de la identificación de fitocompuestos con actividad biológica de *P. laevigata*. No obstante, algunos autores han reportado actividad antihelmíntica, antimicrobiana, antioxidante, entre otras, utilizando extractos orgánicos de esta planta. Como por ejemplo, en un trabajo realizado por López-Aroche et al. (2008), se evaluaron *in vitro* un total de 20 extractos de plantas, incluidos tallos y hojas de *P. laevigata*, utilizando tres disolventes diferentes, contra larvas L₃ de *H. contortus*, donde registraron poco más del 85% de actividad antihelmíntica a partir de un extracto hexánico. En otro estudio llevado a cabo por De Jesús-Gabino et al. (2010) se administró por vía oral un extracto hexánico de *P. laevigata* a jerbos infectados artificialmente de *H. contortus* en busca de actividad antihelmíntica, sus resultados mostraron una reducción del 42% de la carga parasitaria atribuida al efecto nematicida del extracto.

Otros estudios han demostrado que algunas plantas medicinales empleadas en la reserva de la biosfera Sierra de Huautla Morelos, México, entre ellas *P. laevigata* a partir de extractos orgánicos, exhiben actividad antibacteriana y antifúngica de acuerdo a lo realizado por Salinas-Sánchez et al. (2009). Los frutos de esta planta, además de presentar un buen aporte nutracéutico como se mencionó anteriormente, también contiene propiedades antioxidantes como lo demuestra Gallegos-Infante et al. (2013). Asimismo, el extracto acetónico a partir de hojas de *P. laevigata* mostró un efecto antioxidante y cardioprotector que mediante un análisis preliminar por cromatografía líquida de alta resolución se observaron diferentes metabolitos secundarios como: compuestos fenólicos como ácido gálico, catequina, galocatequina, galato de epicatequina, rutina y luteolina, que probablemente pueden atribuirse estas propiedades antioxidantes y biológicas.

Por otro lado, existen registros en el uso de extractos de metanólicos de diferentes especies vegetales entre ellos *P. laevigata* contra bacterias nosocomiales; los resultados preliminares de las pruebas antimicrobianas revelaron que el extracto de *P. laevigata* fue el más activo obteniendo el mayor diámetro de inhibición (2.8 ± 0.5 cm) contra todos los aislados clínicos evaluados Sánchez et al. (2016). En cambio, en un experimento realizado por Delgado-Altamirano et al. (2017), probaron extractos orgánicos y acuosos a partir de plantas ampliamente utilizadas en la medicina tradicional mexicana para comprobar su actividad como antiparasitario y citotóxica. El extracto acuoso hojas y ramas de *P. laevigata* fue el segundo más potente en pruebas contra la leishmaniasis (22.8 ± 2.9) y citotóxica (35.2 ± 4.7), respectivamente. La presencia de terpenos, muy probablemente, son responsables de la actividad leishmanicida.

JUSTIFICACIÓN

El presente estudio ha sido diseñado con la finalidad de buscar compuestos naturales con actividad nematocida a partir de la planta *Prosopis laevigata* (Pl) también conocida como “Mezquite”, utilizando como modelo de estudio a *Haemonchus contortus* (Hc) que es uno de los parásitos más patógenos y de mayor repercusión económica en la industria ovina en México. La obtención e identificación de moléculas con una elevada actividad nematocida contra Hc abre nuevas perspectivas en la búsqueda de alternativas de control contra la hemoncosis ovina desde una perspectiva sustentable y natural; sin los efectos indeseables de las drogas químicas que actualmente se utilizan como desparasitantes y que dañan el medio ambiente al ser eliminados por los animales a través de las heces y la orina; además de que causar resistencia en los parásitos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El extracto hidroalcohólico (E-HA) y fracciones obtenidas a partir de hojas *P. laevigata* ejercen un efecto antihelmíntico contra *H. contortus* en un modelo *in vitro*?

HIPÓTESIS

Las hojas de *P. laevigata* poseen compuestos con actividad antihelmíntica *in vitro* contra *H. contortus*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* del extracto hidroalcohólico a partir de hojas de *P. laevigata* contra huevos y larvas de *H. contortus*.
- Fraccionar el E-HA por bipartición y evaluar las fracciones acuosa y orgánica de *P. laevigata* contra huevo y larvas infectantes de *H. contortus*.
- Aislar y purificar mediante cromatografía en columna abierta y de capa fina (CCA-CCF), asimismo, evaluar las sub-fracciones de *P. laevigata* contra huevos y larvas de *H. contortus*.
- Identificar la estructura del compuesto(s) activo(s) mediante métodos espectroscópicos (RMN ^1H , ^{13}C) y espectrométricos (GM).
- Identificar posibles cambios en la estructura de huevos y larvas expuestos al compuesto(s) activo(s) por métodos de microscopia digital de alta resolución (AxioCam) acoplada a color, microscopía electrónica de laser confocal (MELC) y electrónica de barrido ambiental (MEBA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

Las pruebas de confrontación *in vitro* y el perfil de metabolitos secundarios se realizaron en el Laboratorio de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI-INIFAP), en Progreso Jiutepec, Municipio del Estado de Morelos, México. La obtención y purificación de compuestos bioactivos se realizaron en el Centro de Investigación Biomédica Sur (CIBIS-IMSS), en Xochitepec, Morelos, México. Las micrografías fueron tomadas en el Departamento de Biotecnología, en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, México.

Colecta del material vegetal

Hojas de *P. laevigata* (4.6 kg) se colectaron en la comunidad de Huixastla, Municipio de Tlaquiltenango, ubicado al Sur del Estado de Morelos (18°28'45" N y 99°8'41" W) perteneciente a la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH) durante estación seca de abril-mayo 2017 (Figura 17). Las hojas fueron depositadas en el herbario del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC-UAEM) e identificadas taxonómicamente por M.C. Gabriel Flores Franco con código voucher 34873.

Comunidad de Huixastla, Morelos

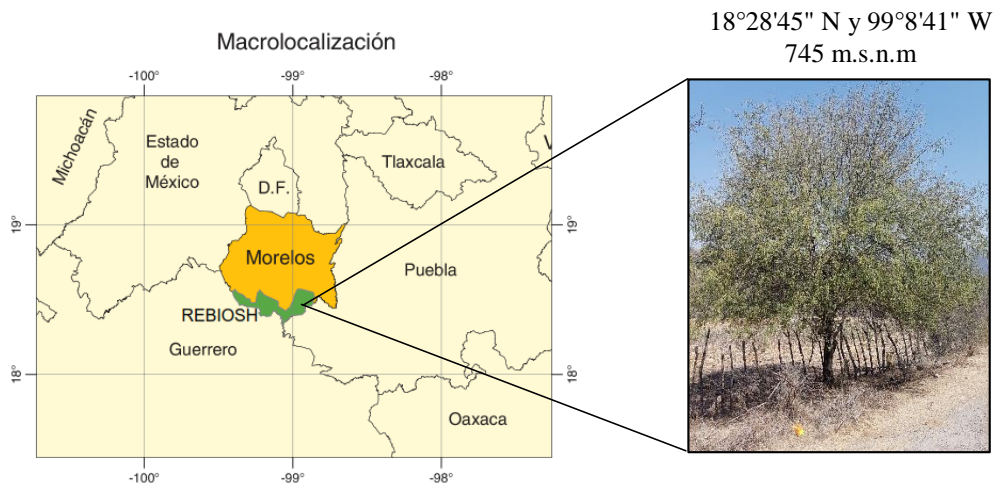


Figura 17. Mapa del Estado de Morelos México muestra la reserva de la biosfera sierra de Huautla la (REBIOSH) perteneciente al Municipio de Huixastla y la imagen un árbol de *Prosopis laevigata*

Obtención del E-HA y fraccionamiento químico a partir de hojas de *Prosopis laevigata*.

Las hojas frescas de *P. laevigata* se secaron en condiciones de oscuridad a 25-28 °C durante 5 días. Las hojas secas (4,6 kg) se trituraron en un molino Pulvex Plastic Grinder® a un tamaño de partícula de 4–6 mm y se colocaron en recipientes de cristal de 46 L. Las hojas secas y molidas se maceraron con agua-etanol (70:30%); se mantuvieron durante 24 horas a temperatura ambiente (18-25 °C). El extracto hidroalcohólico se filtró con el propósito de eliminar restos de material vegetal a través de varios tamices que fueron tela gasa, algodón y papel filtro Whatman no. 4. Los disolventes se eliminaron por destilación a baja presión utilizando un rotaevaporador (40-50 °C, Büchi R-300, Flawil, Suiza) para obtener un extracto semisólido que finalmente se liofilizó. El extracto se mantuvo a 4 °C para ensayos biológicos y fitoquímicos. El extracto hidroalcohólico (726.34 g), se biparticionó usando acetato de etilo (Merck, Alemania) en relación 1:1 v/v (1000 ml cada uno), obteniendo dos fracciones: una

acuosa (F-Aq) y otra orgánica de acetato de etilo (F-AcEt). Los disolventes de ambas fracciones se eliminaron por destilación a presión reducida usando un rotaevaporador (Buchi R-300, Flawil, Suiza) a temperatura de 40-50 °C y posteriormente se secaron mediante procesos de liofilización (Labconco, Kansas, MO, EE. UU.). Las pruebas de actividad antihelmíntica *in vitro* de ambas fracciones y del E-HA se evaluaron utilizando huevos y larvas de *H. contortus* como modelos biológicos.

Aislamiento, purificación e identificación de fitoconstituyentes a partir de la F-AcEt de *P. laevigata*.

La fracción más activa (F-AcEt 18 g) se procesó mediante técnicas cromatográficas con sílice gel en una columna abierta (200 g, malla 70-230; Merck, Darmstadt, Alemania). Luego, la solución se eluyó usando un sistema de gradiente con *n*-hexano/acetato de etilo/ MeOH, con polaridad creciente en fase móvil comenzando con 100% de *n*-hexano y terminando con 100% de metanol. Se obtuvieron un total de cuarenta y cinco fracciones de 300 ml. Las fracciones se agruparon en función de su similitud química usando técnicas de cromatografía en capa fina (CCF), los disolventes se eliminaron mediante un rotaevaporador a baja presión. Como resultado, se obtuvieron cuatro subfracciones finales y se registraron de la siguiente manera: C₁F₁ (5.7 g), C₁F₂ (6.0 g), C₁F₃ (3.5 g) y C₁F₄ (1.5 g). Todas las fracciones y subfracciones se analizaron mediante CCF en un gel de sílice 60 F254 (Merck, Alemania) usando luz UV a 254 y 360 nm. Todas las fracciones se evaluaron mediante ensayos antihelmínticos *in vitro*. La fracción más activa (C₁F₁, 5.7 g) se sometió a fraccionamiento cromatográfico en columna abierta con gel de sílice fase normal en gel de sílice (30 g, malla 70-230; Merck, Darmstadt, Alemania). Después, se utilizó un gradiente de *n*-hexano y acetato de etilo como fase móvil,

de la cual se obtuvieron un total de 74 fracciones. Estas fracciones se agruparon de acuerdo a su similitud química según lo determinado por análisis de CCF, resultando en tres subfracciones (C_2F_1 , C_2F_2 y C_2F_3), las cuales fueron evaluadas contra larvas L_3 de *H. contortus*. Estas tres subfracciones resultaron con la misma elevada actividad larvicida. El análisis de CL_{50} de estas tres subfracciones resultaron sin ninguna diferencia estadística entre ellas; así que se seleccionó la sub-fracción (C_2F_2 , 2 g) de las otras dos, porque teníamos un poco más de muestra de esta sub-fracción para seguir adelante con su proceso cromatográfico usando una columna de fase normal (30 g, 70-230 mesh; Merck, Alemania). Por otro lado, para el aislamiento y purificación de compuestos a partir de esta subfracción, se utilizó un sistema fase reversa por cromatografía en columna abierta con sílice gel polygoprep® 60-50 C18 usando un gradiente agua/acetonitrilo como fase móvil, comenzando con 100% de H_2O y terminando con 100% de CH_3CN obteniendo un total de 41 fracciones.

Las fracciones 14, 15 y 16 se combinaron usando CCF para producir un polvo amarillo sólido (1, 40 mg). Las fracciones 17 y 18 produjeron una mezcla de compuestos (1, 376.0 mg y 2, 157.7 mg dando un total de 533.7 mg), la fracción 22 contenía el compuesto 2, (60 mg), mientras tanto, la fracción 26 produjo el compuesto 3 (45 mg). La identificación de los compuestos se realizó mediante técnicas y análisis de RMN de 1H y ^{13}C , utilizando un espectrómetro Agilent DD2-600 a 25 °C como disolventes se usaron CD_3OD y $DMSO-D_6$ (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, MA, EE. UU.), y el TMS fue usado como referencia.

Tamizaje cualitativo fitoquímico del E-HA y fracciones de *P. laevigata*.

El E-AH y sus fracciones (Aq y AcEt) se caracterizaron fitoquímicamente para determinar la presencia de alcaloides, cumarinas volátiles, flavonoides, taninos condensados, terpenos/esteroles y saponinas mediante reacciones químicas y colorimétricas.

Identificación de alcaloides

La presencia de alcaloides se determinó utilizando reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner. La solución de Dragendorff (a) se preparó con 4.25 mg de nitrato de bismuto (III) y 50 g de ácido tartárico disueltos en 200 ml de agua. La solución de yoduro de potasio (b) se preparó utilizando 80 g de yodo disuelto en 200 mL de agua. Los reactivos se mantuvieron a 4 °C hasta su uso. El reactivo de Mayer (a) se preparó utilizando 2.72 g de cloruro de mercurio disuelto en 120 mL de agua y (b): 10 g de yoduro de potasio disuelto en 20 mL de agua. Ambas soluciones se mezclaron y diluyeron con agua hasta completar 200 mL. El reactivo de Wagner se preparó utilizando 2.54 g de yodo y 4 g de yoduro de potasio disueltos en 10 mL de agua. La solución se añadió con agua hasta completar 200 ml. La técnica para identificar la presencia de alcaloides fue la siguiente: se colocaron 50 mg de extracto hidroalcohólico en un tubo de ensayo y se agregaron 6 mL de HCl (10%). La mezcla se calentó durante 10 min a 100 °C. Después de eso, el tubo se enfrió y se filtró. La solución se dividió en tres tubos de ensayo y se añadieron 10 gotas de los reactivos (reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner). El precipitado y una ligera turbidez, así como el cambio de color a un precipitado rojo, naranja, blanco o marrón, se consideran una evidencia de la presencia de alcaloides (Ringuelet and Viña, 2013).

Identificación de cumarinas volátiles

Se colocó un volumen de 3 mL del extracto hidroalcohólico en un tubo de ensayo para analizar cumarinas volátiles. La abertura del tubo de ensayo se revistió con papel de filtro impregnado con una solución de NaOH 1N. El tubo de ensayo se colocó en un baño de agua a 100 °C durante 10 min. El papel de filtro se observó bajo luz ultravioleta para visualizar la presencia de fluorescencia de color amarillo indicativa de cumarinas (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

Identificación de flavonoides

Se colocaron 2 mL del extracto hidroalcohólico en un tubo de ensayo y se adicionó un pequeño trozo de banda de magnesio (5 x 5 mm) y 20 mL de ácido clorhídrico (36%) y se incubó a temperatura ambiente (25-28 °C). Después de 24 h, un cambio de color (rojo) indicó flavonoides (Domínguez, 1973).

Identificación de taninos

Para identificar la presencia de taninos, se prepararon las siguientes soluciones: (a) solución de cloruro férrico al 20%; (b) solución de gelatina al 1%; (c) solución de gelatina y sal (500 mg de gelatina y 5 g de cloruro de sodio en 50 mL de agua destilada); (d) solución salina al 10%. La presencia de taninos en *P. laevigata* se determinó disolviendo 100 mg de extracto hidroalcohólico en 10 mL de agua destilada, y se colocaron 3 mL del extracto resultante en un tubo de ensayo y se agregaron de 1 a 3 gotas de solución de cloruro férrico al 20%. Para confirmar la presencia de taninos, el extracto restante se dividió en tres partes iguales de 10 mL. En cada tubo de ensayo se añadió 1 ml de cada solución de gelatina, solución de gelatina + sal y solución salina. La presencia de un precipitado en los tubos con solución de gelatina y

gelatina + sal indica la presencia de taninos. Se obtiene un resultado negativo cuando se observa la formación de un precipitado en el tubo de ensayo con solución salina (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

Identificación de triterpenos y esteroides

Para identificar la presencia de triterpenos y esteroides se solubilizaron 50 mg del extracto hidroalcohólico en el tubo de ensayo de vidrio de 30/100 mm usando 10 mL de cloroformo y luego se filtraron usando papel Whatman (No. 4). La solución se dividió en dos tubos de ensayo para reaccionar con los reactivos de Liebermann-Burchard y Salkowski. El primero se preparó utilizando 1 mL de anhídrido acético al que se le adicionó 0.5 mL de reactivo de Salkowski (ácido sulfúrico concentrado) manipulando la solución en agua fría. Ambas soluciones se agregaron individualmente a cada tubo que contenía la fase clorofórmica. El cambio de color a amarillo/rojo se consideró positivo a la presencia de triterpenos o esteroides (Kuklinski, 2000).

Identificación de saponinas

La presencia de saponinas se determinó de la siguiente manera: se depositaron 5 mL del extracto hidroalcohólico y fracciones en tubos de ensayo por separado y luego se colocaron en agua hirviendo durante 2 minutos. Después de enfriar, cada tubo se agitó vigorosamente. La presencia de espuma persistente indica la presencia de saponinas (Ringuelet and Viña, 2013).

Análisis de extractos, fracciones y compuestos 1-3 por CLAR

El análisis cromatográfico por HPLC se realizó utilizando un módulo de HPLC Waters 996, equipado con un detector de matriz de fotodiodos y el software EmpowerPro (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.). La separación química se logró utilizando una columna Supelcosil LC-F (4,6 mm 50 mm), con un tamaño de partícula de 5µm, (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, EE. UU.). La fase móvil consistió en una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,5% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) en un sistema de gradiente (0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% B; 4-20 min, 30 % B; 21 a 23 minutos, 50% B; 24 a 25 minutos, 80% B; 26 a 27 100% B; 28 a 30 minutos, 0% B). El flujo se mantuvo a 0,9 ml/min. El volumen de inyección fue de 10µL. El detector de matriz de fotodiodos se fijó a una longitud de onda de 310 nm para la identificación de compuestos fenólicos.

Análisis por espectrometría de masas de los compuestos 1-3

Los pesos moleculares de los compuestos aislados (**1-3**) se determinaron en el espectrómetro de masas triple cuádruple (MS) de Waters (Milford MA, EE. UU.), equipado con una ionización por electrospray (ESI). La fuente de ionización se calentó a 150°C. La temperatura de desolvatación fue de 450 °C y la tasa de flujo de gas nitrógeno fue de 900 L/h. El argón se utilizó como gas de colisión a una velocidad de flujo de 0.10 mL/min (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania).

Obtención de huevos y larvas de *Haemonchus contortus*

Los huevos del parásito se obtuvieron de un cordero infectado artificialmente por *H. contortus* (cepa INIFAP). Un cordero macho de 3 meses de edad, libre de parásitos, con 22 kg de peso

corporal, fue infectado por vía oral con aproximadamente 350 larvas infectadas de *H. contortus* por kg de peso corporal. Después de un período prepatente de 21 días, las heces se recolectaron directamente del recto del animal. El procedimiento de extracción de huevos se realizó de acuerdo a von Son-de Fernex et al. (2015). Las larvas infectantes del parásito se obtuvieron por cultivos fecales mediante la técnica de embudos de Baermann en un periodo de incubación de 7 días a temperatura ambiente (18-25 °C) de acuerdo a la metodología descrita por Zarza-Albarrán et al. (2020). Las larvas se desenvainaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.187% durante 10 minutos, después se lavaron con agua destilada por centrifugación para eliminar los residuos de hipoclorito de sodio. Las larvas desenvainadas limpias se resuspendieron en agua destilada estéril y se utilizaron inmediatamente para las pruebas de mortalidad.

Prueba de la mortalidad larval mediante un ensayo biodirigido

El ensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pozos (4 pozos por tratamiento). Este experimento fue realizado por triplicado. Los tratamientos se establecieron de acuerdo con los siguientes pasos: Paso 1) E-HA (100, 125, 150 mg/mL) F-Aq y F-AcEt (10, 20, 30, 40 y 50 mg/mL); Paso 2) subfracciones correspondientes a la columna 1 (C₁F₁-C₁F₄) a 3.75 a 15.00 mg/ml, subfracciones de la columna 2 (C₂F₁-C₂F₃) a 1.80 a 15.00 mg/ml y compuestos (1, 2 y 3, así como una mezcla de 1 y 2) a 0.60–15.00 mg / mL. Se utilizaron dos controles negativos: agua destilada para disolver el F-Aq y MeOH al 4% para disolver la F-AcEt, subfracciones y compuestos) y un control positivo (ivermectina, 0.5 mg/mL). En cada pozo se depositaron 50 µL de una suspensión acuosa que contenía aproximadamente 150 larvas infectantes desenvainadas de *H. contortus* (n=4 pozos). Además, se añadieron 50 µL de fracciones,

subfracciones, compuestos y controles a cada pozo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 72 h. Después de la incubación, se extrajeron diez alícuotas de 10 µL de cada pozo y se depositaron en un portaobjetos para su examen microscópico. Tanto las larvas vivas como las muertas se contaron según los criterios descritos por Olmedo-Juárez et al. (2017). La tasa de mortalidad se expresó como un porcentaje de mortalidad y se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Mortalidad} = \left[\frac{\text{larvas muertas}}{\text{larvas vivas} + \text{larvas muertas}} \right] \times 100$$

Prueba ovicida utilizando compuestos de *P. laevigata*

Esta prueba se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pozos. Los tratamientos se establecieron de la siguiente manera: compuestos (1, 2 o 3) 0.3, 0.15 y 0.07 mg/mL. Se depositaron 50 µL de los compuestos (1, 2 o 3) en cada pozo, más 50 µL de una suspensión acuosa que contenía ±100 huevos de *H. contortus* (n=4 pozos por tratamiento). El experimento se realizó por triplicado. Se utilizó agua destilada y 2% MeOH como control negativo y 0.5 mg/mL de ivermectina como control positivo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 48 hrs. El porcentaje de la prueba de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) se estimó utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{ EHT} = \left[\frac{\text{número de huevos}}{\text{número de larvas} + \text{número de huevos}} \right] \times 100$$

Observación de huevos y larvas de *H. contortus* usando microscopía electrónica laser confocal (MELC) y microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA)

Los cambios morfológicos en huevos y larvas expuestos a los compuestos se visualizaron en detalle utilizando dos técnicas de microscopía: MEBA y MELC. Primero, la MEBA se realizó usando un microscopio CarlZeiss, Modelo EVO LS10 (Munich, Alemania). Las muestras se montaron sobre tubos de aluminio y se unieron con cinta conductora de carbono de doble cara y un detector de electrones retrodispersos ajustado a 20 kV y 20 Pa de presión. Las imágenes se capturaron a 200 y 1000x de aumentos en formato TIFF (2048 x 1536 píxeles). La MELC se realizó usando un microscopio Carl Zeiss, modelo LSM 800 (Munich, Alemania). Las muestras se montaron en portaobjetos de vidrio y se observaron en modo lambda en el que se recogió una secuencia de imágenes a longitudes de onda láser de 405 nm, 488 nm, 561 nm y 640 nm (4% de capacidad). Se utilizó el software de edición ZEN 2.6 Zeiss Blue. Las imágenes fueron tomadas a 20 y 40x aumentos con el Plan Apocromático, 1.3 apertura pinhole de 1 Unidad Airy (AU); se obtuvieron imágenes con una resolución de 2048 x 2048 pixeles en formato TIFF. Para fotografías en color las muestras fueron montadas en portaobjetos de vidrio y observadas mediante el equipo de microscopía confocal como se describió anteriormente, y se tomaron usando una cámara HD acoplada (AxioCam, Carl Zeiss, Modelo 305, color, Göttingen, Alemania).

Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas *in vitro* obtenidos en la prueba de IEH y el % de mortalidad de larvas, se analizaron bajo un diseño completamente al azar mediante un análisis ANOVA utilizando el modelo lineal general (GLM). Se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0,05$) para

identificar diferencias significativas entre tratamientos, además, se determinaron las concentraciones letales 50% y 90% (CL₅₀ y CL₉₀) con el procedimiento PROC PROBIT incluido dentro del paquete estadístico SAS.

RESULTADOS

Rendimientos de E-HA y fracciones

El extracto hidroalcohólico crudo (E-HA) produjo 726.34 g (15.79%) de un polvo café marrón. En cambio, cuando se dividió el E-AH, las subfracciones F-Aq y F-AcEt produjeron rendimientos de 2.48% (18 g) y 97.52% (708.34 g), respectivamente.

Estudio cualitativo fitoquímico de E-HA y fracciones

Las fracciones E-HA, F-Aq y F-AcEt a partir de hojas de *P. laevigata* contenían alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos / esteroides y saponinas (Cuadro 14).

Cuadro 14. Grupos de metabolitos identificados de las hojas de *Prosopis laevigata* mediante reacciones química general.

Metabolitos	Reacción	Reacción colorimétrica	E-HA	F-Aq	F-AcEt
Alcaloides	Dragendorff		+++	+++	+
	Mayer	Turbidez o precipitación	+++	+++	+
	Wagner	(rojo a naranja, blanco a crema y marrón)	+++	+++	+
Cumarinas	Bornträger	Fluorescencia amarilla (U.V.)	-	-	-
Flavonoides	Mg ²⁺ y HCL	Rojo, naranja y violeta	++	-	+++
	Cloruro férrico	Taninos hidrolizados (azul) Taninos condensados (verde)	- +++	- +	- +++
Taninos	Confirmación				
	Solución de gelatina	Precipitado	+	+	+
	Gelatina y solución salina	Precipitado	+	+	+
	Solución salina	Precipitado	-	-	-
Triterpenos/esteroles	Liebermann-Burchard	Verde, azul-rojo (esteroles)	-	-	+
	Salkowski	Amarillo a rojo (saponinas triterpenoidales/esteroidales)	-	-	+
	Salkowski (modificado)	Amarillo, rojo a púrpura (triterpenos)	+	+	+
Saponinas	Agua	Formación de espuma	+	++	-

(-) No detectado (+) reacción positiva débil (++) reacción moderada (+++) reacción positiva fuerte.

Prueba de la actividad larvica del E-HA y fracciones Aq y AcEt

La prueba del porcentaje de mortalidad de larvas infectantes de *H. contortus* a partir de la F-Aq y la F-AcEt se muestra en el Cuadro 15. La F-Aq no registró actividad contra el parásito a las concentraciones probadas. Mientras tanto, la F-AcEt produjo el mayor efecto larvica del 96.01% a 50 mg/mL.

Cuadro 15. Resultados de la evaluación *in vitro* de la fracción acuosa (Aq-F) y fracción de acetato de etilo (EtAc-F) a partir de hojas de *Prosopis laevigata* contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus* a las 72 post-confrontación.

Tratamientos	Promedio de larvas recuperadas larvas muertas/total	% de Mortalidad (±DE)
Primer paso (Fraccionamiento: actividad larvica)		
Extracto hidroalcohólico (E-HA) (mg/mL)		
150	84/97.3	85.68 (± 5.68) ^c
125	52/84.62	62.08 (± 1.16) ^d
100	21.6/83.22	26.68 (± 1.42) ^f
Fracción acuosa (F-Aq) (mg/mL)		
50	0.75 / 105.62	0.72 ± 0.67 ^g
40	0.62 / 104.4	0.60 ± 49 ^g
30	0/ 104.25	0 ^g
20	0/ 104.62	0 ^g
10	0/ 103.87	0 ^g
Fracción de acetato de etilo (F-AcEt) (mg/mL)		
50	72.5 / 75.3	96.01 ± 0.75 ^b
40	93.5 / 101.25	92.32 ± 0.87 ^c
30	81.8 / 101.55	80.45 ± 0.83 ^d
20	82.5 / 109.87	75.13 ± 0.81 ^e
10	34.3 / 110.55	31.12 ± 0.76 ^f
Agua destilada	0.7 / 86.7	0.9 ^g
MeOH (4%)	1.5 / 69.4	2.98 ± 0.26 ^f
Ivermectina (0.5 mg/mL)	81 / 81	100 ^a
Coefficiente de variación		1.17
R ²		0.99

Nota: medias dentro de la misma columna con literal diferente indica diferencias estadísticas ($p < 0.05$); MeOH=Metanol; DE=Desviación Estándar.

Actividad larvica de las subfracciones y compuestos

Los porcentajes de mortalidad correspondientes a las subfracciones C₁F₁, C₁F₂, C₁F₃, C₁F₄, C₂F₁, C₂F₂, C₂F₃ y los compuestos **1** isoramnetina, **2** luteolina, **3** 4'-*O*-metilcatequina y la mezcla de compuestos **1** y **2** así como la CL₅₀ se muestran en el Cuadro 15. Las subfracciones C₁F₁, C₁F₂, C₁F₃ y C₁F₄ registraron mortalidades del 79,4%, 24,4%, 6,8% y 5,7%, respectivamente. Por otro lado, las subfracciones C₂F₁ y C₂F₂ mostraron el %100 de mortalidad larvica a 7.5 mg/mL. Mientras tanto, la C₂F₃ mostró una mortalidad cercana al 95% a la misma concentración. Finalmente, el compuesto **1** mostró un defecto larvica total a 7.5 y 15.00 mg/mL. Asimismo, las concentraciones más bajas también dieron lugar a una alta mortalidad de larvas a 3.7 mg/mL = 88.2% y 2.5 mg/mL = 68.15%. En contraste, el compuesto **2** y **3** así como la mezcla (**1** y **2**) tenían un efecto larvica nulo (Cuadro 16).

Cuadro 16. Porcentajes de mortalidad in vitro y concentraciones letales (95%) atribuidos al efecto de cuatro subfracciones y compuestos derivados de la F-AcEt de *Prosopis laevigata* contra las larvas L₃ de *Haemonchus contortus*.

Subfracciones y compuestos (paso 2)	Promedio de larvas recuperadas larvas muertas/total	% de Mortalidad ±DE	Concentraciones letales 95% (IC limites inferior-superior)	
			CL ₅₀ (mg/mL)	CL ₉₀ (mg/mL)
C ₁ F1 (mg/mL)				
15	67.5 / 84.75	79.47 ^b		
7.5	18.15 / 76.75	24.12 ^d		
3.7	8 / 77.2	10.47 ^d		
C ₁ F2 (mg/mL)				
15	11.2 / 70	24.45 ± 2.44 ^d		
C ₁ F3 (mg/mL)				
15	4.5 / 66.25	6.82 ± 0.72 ^e		
C ₁ F4 (mg/mL)				
15	3 / 78.5	5.75 ± 2.56 ^e		
C ₂ F1 (mg/mL)				
15	127.5 / 0	100 ^a		
7.5	126.5 / 0	100 ^a	2.82	3.82
3.75	107.5 / 122.5	87.8 ± 3.46 ^b	(2.72 - 2.92)	(3.69 - 3.96)
1.87	2 / 120	2.27 ± 0.45 ^e		
C ₂ F2 (mg/mL)				
15	120.0 / 0	100 ^a		
7.5	121 / 0	100 ^a	2.68	3.84
3.7	101.5 / 115	88.2 ± 0.47 ^b	(2.45 - 2.86)	(3.67 - 4.02)
1.8	10.75 / 107.5	10.0 ± 0.77 ^d		
C ₂ F3 (mg/mL)				
15	117 / 0	100 ^a		
7.5	109.7 / 116.5	94.22 ± 1.63 ^b	3.04	5.66
3.7	77.7 / 115.2	67.47 ± 1.29 ^c	(2.89 - 3.19)	(5.32 - 6.07)
1.8	2.5 / 115.2	2.15 ± 0.51 ^e		
Isoramnetina (mg/mL) (1)				
15	126 / 0	100 ^a		
7.5	127 / 0	100 ^a		
3.7	101.5 / 115	88.25 ± 0.47 ^b	2.07	3.79
2.5	73.25 / 107.5	68.15 ± 4.46 ^c	(1.98 - 2.16)	(3.60 - 4.02)
1.2	14.5 / 106.75	13.6 ± 3.19 ^d		
0.6	2.25 / 105.75	2.15 ± 0.50 ^e		
Isoramnetina y luteolina (2.5 mg/mL) (1,2)	0 / 103.82	0 ^f		
Luteolina (2.5 mg/mL) (2)	0.5 / 107.2	0.47 ± 0.95 ^f		
4'- <i>O</i> -metilcatequina (2.5 mg/mL) (3)	0 / 104.2	0 ^f		
Agua destilada	0 / 71.25	0 ^f		
MeOH (4%)	0 / 69.87	0 ^f		
Ivermectina (0.5 mg/mL)	73.5 / 73.5	100 ^a		
Coficiente de variación		3.56		
R ²		0.99		

Medias dentro de la misma columna con literal diferente indica diferencias estadísticas Tukey ($p < 0.05$); MeOH=Metanol; DE=Desviación Estándar; IC=Intervalo de Confianza.

Prueba ovicida de los compuestos identificados

La luteolina y la 4'-*O*-metilcatequina no mostraron ninguna actividad ovicida. Sin embargo, la mezcla de isoramnetina/luteolina presentó el 100% de actividad ovicida. Mientras tanto, el compuesto puro requirió únicamente 0.07 mg/mL para obtener la misma actividad total (Cuadro 17). Esta diferencia indica que la isoramnetina pura era 5.2 veces más potente que la F-AcEt.

Cuadro 17. Resultados de la IEH y concentraciones letales (CL₅₀ y CL₉₀) de compuestos obtenidos a partir de hojas de *Prosopis laevigata* a diferentes concentraciones contra huevos de *Haemonchus contortus* después de 48 h de interacción.

Tratamientos	%IEH ±DE	Concentraciones letales 95% (IC límites inferior-superior)	
		CL50 (mg/mL)	CL90 (mg/mL)
Isoramnetina (mg/mL) (1)			
0.3	100 ^a		
0.15	100 ^a		
0.07	100 ^a		
Mezcla de isoramnetina y luteolina (mg/mL) (1,2)			
0.3	100 ^a		
0.15	96.03 ± 1.36 ^b	0.10	0.13
0.07	4.18 ± 1.23 ^c	(0.09 - 0.10)	(0.13 - 0.14)
Luteolina (mg/mL) (2)			
0.3	0 ^c		
0.15	0 ^c		
0.07	0 ^c		
4'- <i>O</i> -metilcatequina (mg/mL) (3)			
0.3	0 ^c		
0.15	0 ^c		
0.07	0 ^c		
MeOH 2%	1.50 ± 0.6 ^c		
Ivermectina (0.5 mg/mL)	100 ^a		
Coefficiente de variación	2.92		
R2	0.99		

Medias dentro de la misma columna con literal diferente indica diferencias estadísticas Tukey ($p < 0.05$); MeOH=Metanol; DE=Desviación Estándar; IC=Intervalo de Confianza.

Análisis químico de *Prosopis laevigata* por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Los cromatogramas por CLAR del E-HA, F-AcEt y compuestos de *P. laevigata* responsables de la actividad antihelmíntica se muestran en la Figura 18. El análisis por CLAR duró 30 minutos para su registro; en los cromatogramas se aprecian diferentes tiempos de retención p. ej, el E-HA contenía compuestos polares, de polaridad intermedia y de baja polaridad y al menos seis compuestos que incluyeron algunos compuestos fenólicos con tiempos de retención de 4.5 y 8.3 min y cuatro flavonoides (8.6, 8.9, 9.5 y 25.6 min). La F-AcEt revelaron compuestos de tipo flavonoide en diferentes tiempos de retención (8.7, 9.0, 9.5, 10.0, 10.3 y 15.7 min) (Figura 18b). El cromatograma de la subfracción C₁F₁, así como los compuestos identificados (isoramnetina, luteolina y 4'-*O*-metilcatequina) a partir de la F-AcEt se muestran en la Figura 18 c-f.

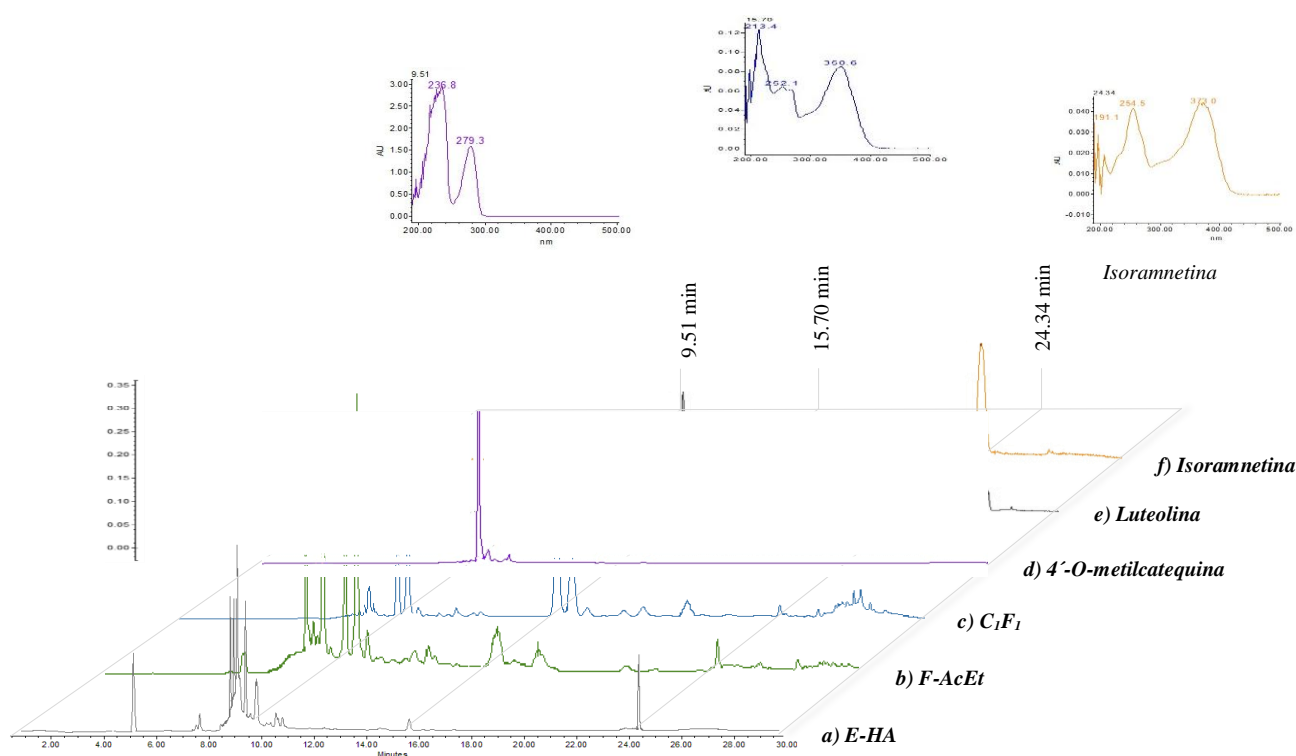


Figura 18. Perfil fitoquímico por HPLC de a) extracto hidroalcohólico (E-HA), b) fracción de acetato de etilo (F-AcEt), c) sub-fracción (C₁F₁), d) 4'-*O*-metilcatequina, e) luteolina y f) isoramnetina.

Estructuras químicas de compuestos identificados por RMN ^1H y ^{13}C y espectrometría acoplado a masas.

El análisis por RMN ^1H y ^{13}C permitió identificar los compuestos presentes en la subfracción C_2F_2 , la cual reveló la presencia de tres flavonoides, la isoramnetina, una mezcla de isoramnetina-luteolina, luteolina y 4'-*O*-metilcatequina (Figura 19).

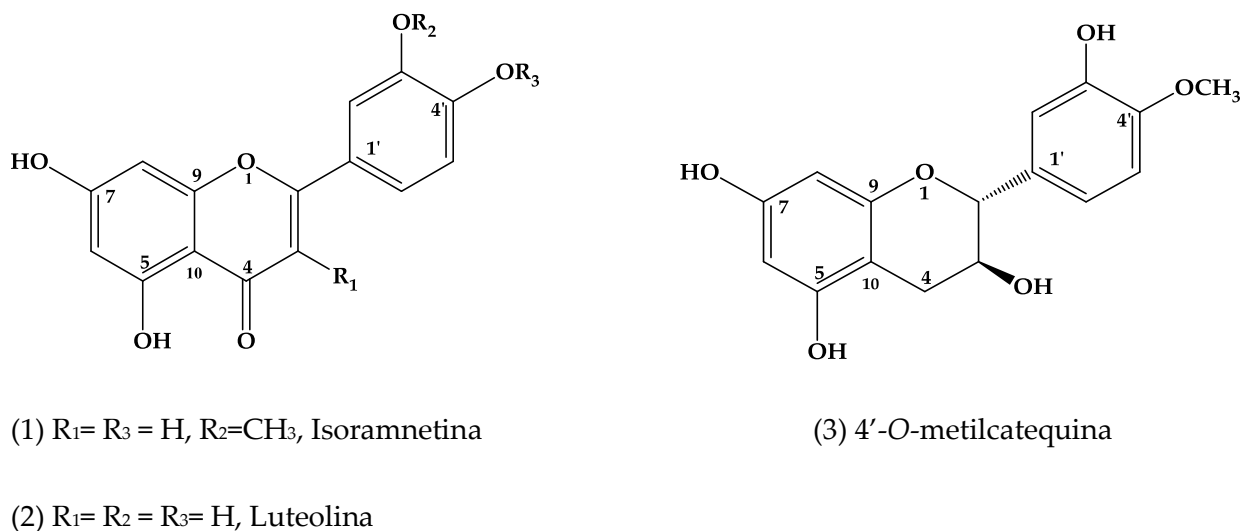


Figura 19. Estructuras de compuestos químicos (1, 2 y 3) obtenidas de las hojas de *P. laevigata*.

El compuesto (**1**) fue aislado con características de un polvo amarillo. El espectro UV reveló que el compuesto tenía un λ_{\max} a 254 y 373 nm, característico de un flavonoide. Además, los datos registrados por espectrometría de gases masas, el ion negativo EI-MS, produjo picos de iones cuasimolares a m/z 316 $[M+H]^-$ (cal. para $C_{16}H_{12}O_7$, 316.05) (Figura 20).

Análisis del espectrómetro de masas (EM)
QCA902

15-Oct-2019
 11:55:51
 7: MS2 ES-
 1.62e5

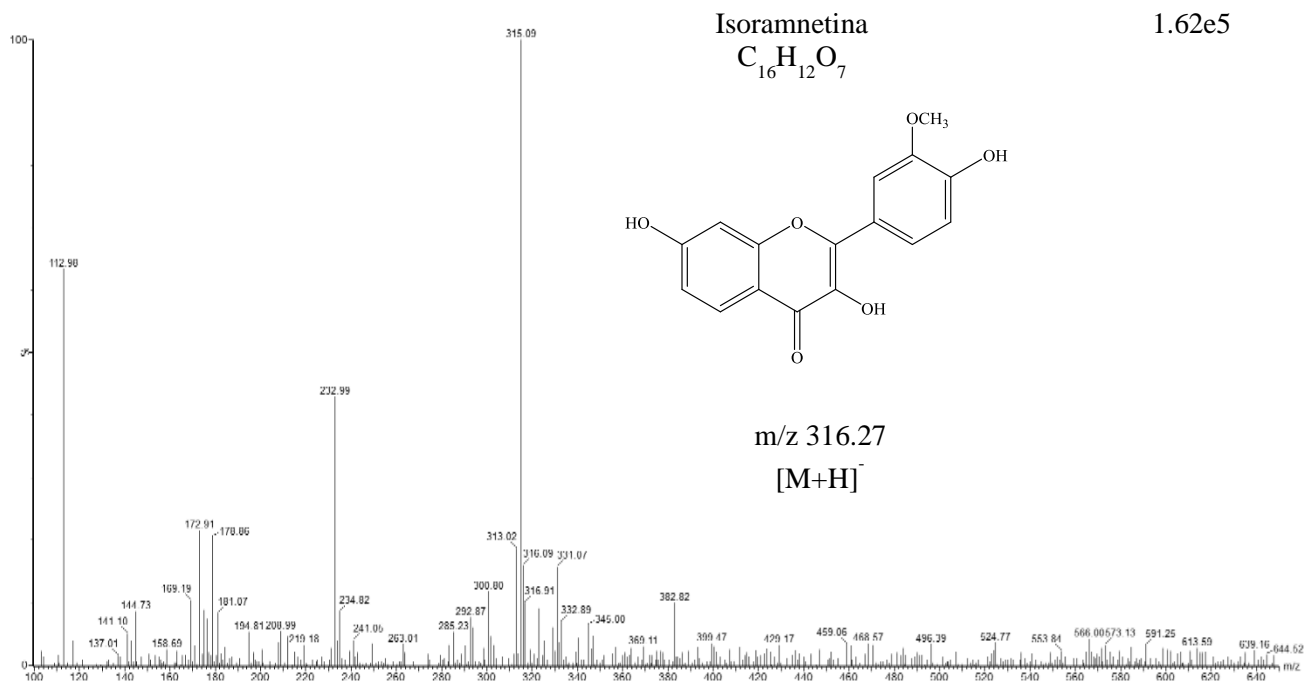


Figura 20. Espectrometría de gases masas del compuesto (**1**) correspondiente al flavonoide isoramnetina.

Adicionalmente, los espectros por RMN 1H registraron dos sistemas aromáticos: un sistema AB [δ 6.19 (1H, d, 1.9 Hz, H-6) y 6.47 (1H, d, 2.4 Hz, H-8)] y un sistema ABX [δ 7.75 (1H, d, 2.3 Hz, H-2'), 6.94 (1H, d, 8.4 Hz, H-5') y 7.68 (1H, dd, 2.4, 8.4 Hz, H-6')]. Además, se observó una señal correspondiente a un protón de base oxigenada en δ 3.8, que integra tres protones mostrado por HSQC con la señal del carbono en δ 55.7, que es característico de los grupos metoxilos en la posición C-3'. A partir de estos datos, el compuesto (**1**) se identificó

como isoramnetina, de modo que las comparaciones de acuerdo a la literatura son similares a los descritos por Manivannan and Shopna (2015).

El aislamiento del compuesto (**2**) produjo un polvo naranja, que de acuerdo a la señal en el espectro UV presentó una λ_{max} a 205, 255 y 368 nm, característico de los flavonoles. Por otro lado, el ion negativo EI-MS reveló un ion cuasimolar pico atm/z de 286 $[\text{M-H}]^-$ (cal. para $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$, 286.05) (Figura 21).

Análisis del espectrómetro de masas (EM)
QCA902

12-Nov-2019
10:32:08
7: MS2 ES-
3.04e5

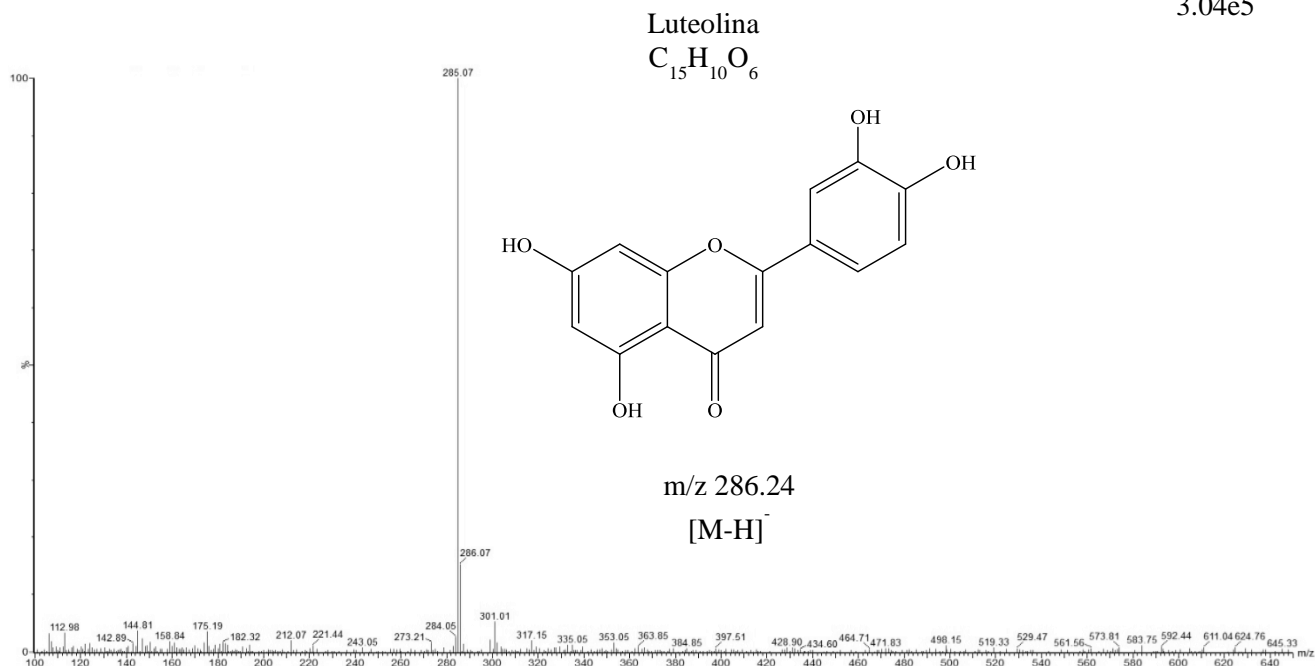


Figura 21. Espectrometría de gases masas del compuesto (**2**) identificado como luteolina.

Por otra parte, el análisis de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto (**2**) mostró cierta similitud al compuesto (**1**), ya que presentaba las mismas señales de desplazamiento químico, excepto que el compuesto (**2**) carecía de una señal correspondiente al grupo metoxilo en C-3', lo que indicaba la característica del flavonoide luteolina (**2**). De acuerdo con los datos

revelados por RMN de ^1H y ^{13}C , las señales del desplazamiento químico y las constantes de acoplamiento son muy similares a los descritos por Rahate and Rajasekaran (2018).

El aislamiento del compuesto (**3**) dio como resultado la producción de un polvo rosa. Este compuesto mostró un espectro de absorción de UV entre valores de λ_{max} 236 y 279 nm; característica de un flavonoide llamado catequina. Los registros por espectrometría de gases masas, el ion negativo EI-MS del compuesto **3**, se observó un pico de ion cuasimolar en m/z 304 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_6$, 304,09) (Figura 22). El análisis de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C mostró señales características de la 4'-*O*-metilcatequina (**3**). De acuerdo a la literatura, estos resultados son muy similares a los reportados por Dueñas et al. (2010).

Análisis del espectrómetro de masas (EM)
QCA902

12-Nov-2019
10:54:55
7: MS2 ES-
2.88e4

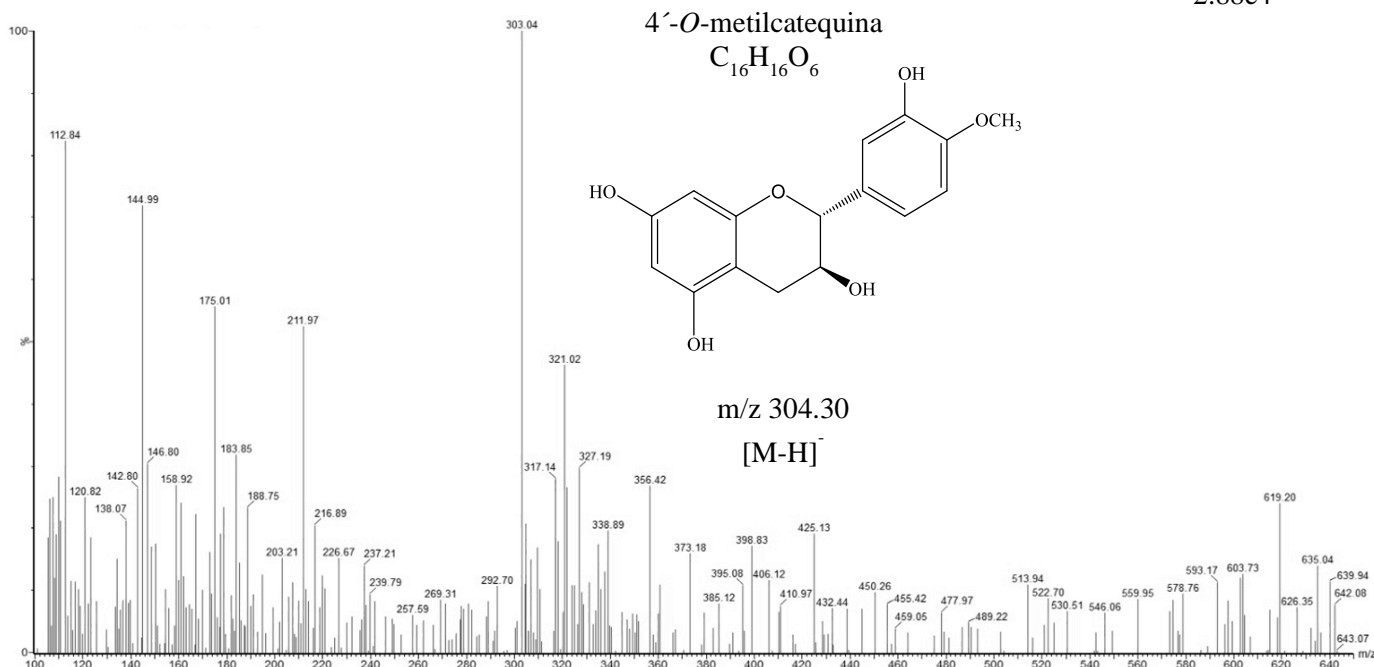


Figura 22. Espectrometría de gases masas del compuesto (**3**) identificado como una catequina.

Isoramnetina (1): ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6); δ 6.19 (1H, d, 1.9 Hz, H-6), 6.47 (1H, d, 2.4 Hz, H-8), 7.75 (1H, d, 2.3 Hz, H-2'), 6.94 (1H, d, 8.4 Hz, H-5'), 7.68 (1H, dd, 2.4, 8.4 Hz, H-6'), 3.8(OCH₃), 12.4(1H, s, 5-OH); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6); δ 146.6 (C-2), 135.8 (C-3), 175.8 (C-4), 160.6 (C-5), 98.2 (C-6), 163.9 (C-7), 93.5 (C-8), 156.1 (C-9), 103.0 (C-10), 121.9 (C-1'), 111.7 (C-2'), 147.3 (C-3'), 148.7 (C-4'), 115.5 (C-5'), 121.7 (C-6'), 55.7 (3'-OCH₃).

Luteolina (2): ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6); δ 6.19 (1H, d, 2.0 Hz, H-6), 6.44 (1H, d, 2.0 Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-3), 7.39 (1H, d, 2.0 Hz, H-2'), 6.89 (1H, d, 8.6 Hz, H-5'), 7.41 (1H, dd, 2.0, 8.1 Hz, H-6'), 12.9(1H, s, 5-OH); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6); δ 146.6 (C-2), 102.8 (C-3), 181.6 (C-4), 161.4 (C-5), 98.8 (C-6), 164.1 (C-7), 93.8 (C-8), 157.2 (C-9), 103.7 (C-10), 121.5 (C-1'), 113.3 (C-2'), 145.7 (C-3'), 149.6 (C-4'), 116.0 (C-5'), 118.9 (C-6').

4'-O-metilcatequina (3): ^1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6); δ 4.51 (1H, d, 7.5 Hz, H-2), 3.82 (1H, m, H-3), 2.65 (1H, dd, 5.1, 15.9 Hz, H-4a), 2.35 (1H, dd, 8.3, 15.9 Hz, H-4b), 5.69 (1H, d, 2.3 Hz, H-6), 5.89 (1H, d, 2.3 Hz, H-8), 6.76 (1H, d, 1.9 Hz, H-2'), 6.87 (1H, d, 8.3 Hz, H-5'), 6.72 (1H, dd, 1.9, 8.3 Hz, H-6'), 3.75 (OCH₃); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6); δ 80.7 (C-2), 66.3 (C-3), 27.8 (C-4), 156.1 (C-5), 93.8 (C-6), 156.4 (C-7), 95.14 (C-8), 155.2 (C-9), 99.0 (C-10), 132.2 (C-1'), 114.3 (C-2'), 146.1 (C-3'), 147.1 (C-4'), 111.8 (C-5'), 118.2 (C-6'), 55.6 (4'-OCH₃).

Análisis por microscopía por AxioCam, microscopía electrónica láser confocal (MELC) y microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA) de huevos y larvas de *H. contortus*

Las características generales y las diferencias estructurales de huevos no expuestos y expuestos a la isoramnetina (a 7.5 mg/mL) se muestran en la figura 23. Las imágenes tomadas por una cámara digital de alta resolución acoplada a microscopía confocal (AxioCam) y microscopía electrónica láser confocal (MELC) revelaron que los huevos sin exposición a la isoramnetina tenían estructuras internas y externas normales, la mórula ocupaba casi todo el espacio interno del huevo (Figura 23 A, C). Por otro lado, los huevos expuestos a la isoramnetina mostraron cambios estructurales significativos, que incluyeron la interrupción de su desarrollo embrionario y una reducción de la masa celular del huevo (mórula) de aproximadamente un 30% (Figura 23 D-1). Además, algunos huevos tenían bordes irregulares

y deformaciones que producían una apariencia arrugada (Figura 23 B, D). Las micrografías tomadas por MELC a partir de huevos expuestos a la isoramnetina revelaron una autofluorescencia que producía la mórula a longitudes de onda entre 515 y 560 nm (Figura 23 D). En una muestra en fresco de huevos sin exposición al compuesto, esta fluorescencia no fue vista. Esta característica nos permitió identificar una superposición entre la fluorescencia emitida por la mórula y la fluorescencia emitida por la isoramnetina en fragmentos (cromóforos) presentes en la muestra y fijados en la superficie de la mórula (Figura 23 D-2). Es importante señalar, que la MELC permitió visualizar la fluorescencia de color naranja de la isoramnetina la cual emitía longitudes de onda entre 560 nm y 600 nm (Figura 23 D-3). El análisis de los huevos sin exposición al compuesto vistos por microscopia electrónica de barrido ambiental (MEBA), tenían una superficie lisa en la membrana del huevo si daños ni alteraciones. En el interior del huevo la mórula no se observó sin ningún cambio aparente en las células que conforman la mórula su arquitectura permanece normal característico de un huevo sano. (Figura 23 E). Por el contrario, los huevos expuestos a la isoramnetina exhibieron una pérdida de la estructura arquitectónica celular (Figura 23 F-1). Las deformaciones observadas en estos huevos incluían la presencia de grietas en la mórula, así como espacios intracelulares anormales (Figura 23 F-2).

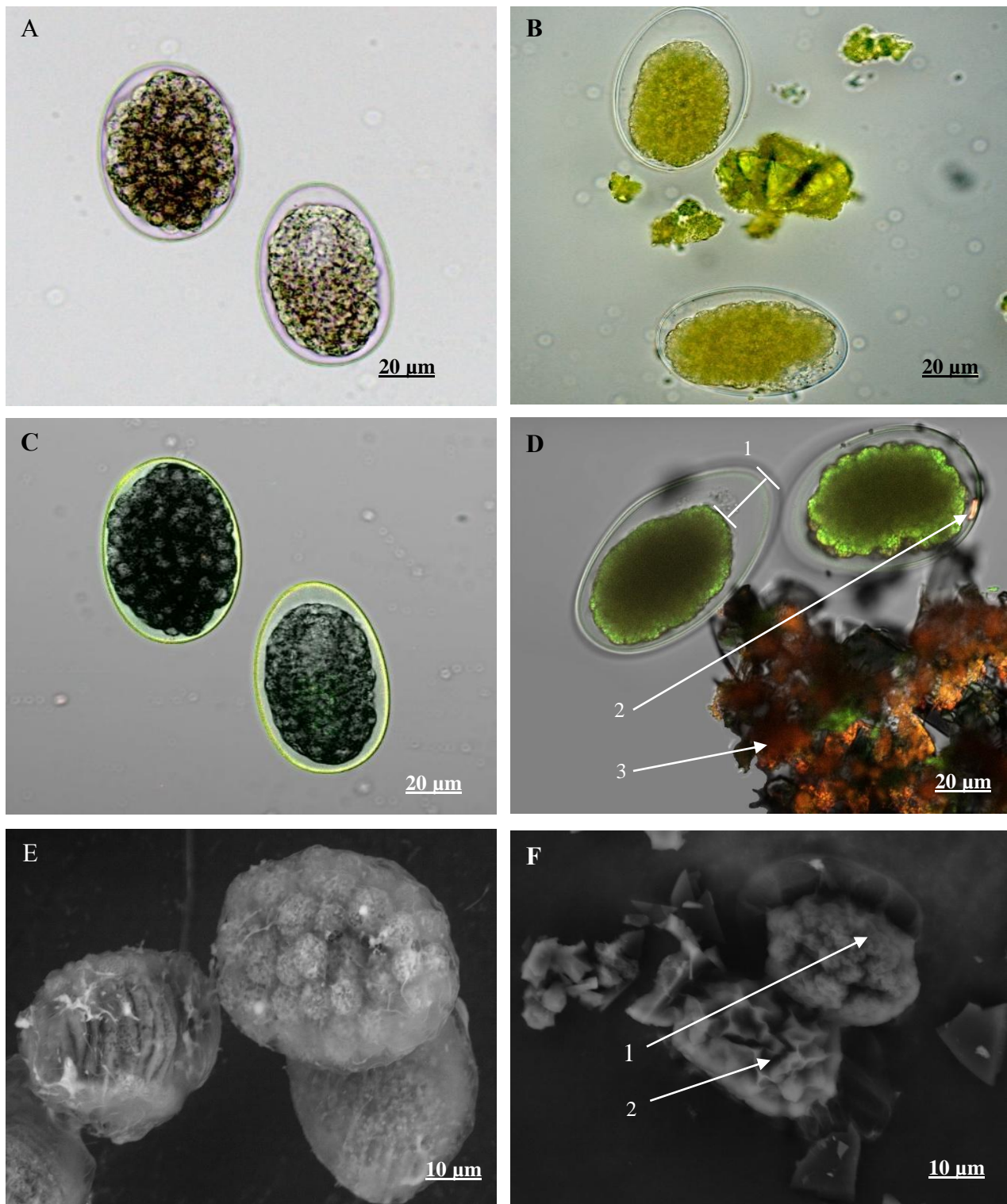


Figura 23. Micrografías tomadas con AxioCam (A, B), microscopía electrónica láser confocal (MELC, C, D) y microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA, E, F), muestran huevos *Haemonchus contortus* expuestos a la isoramnetina (B, D, F) y huevos sin exposición al compuesto (A, C, E).

Los cambios estructurales externos e internos de larvas no expuestas y las expuestas a la isoramnetina (a 7.5 mg/mL) fueron observados utilizando microscopía AxioCam, MELC y MEBA, ver Figura 24. Las larvas no expuestas mostraron una nitidez y profundidad, ya que la luz emitida por microscopía podía atravesar libremente sus cuerpos. Además, no se observaron cambios aparentes en la estructura del nematodo, así como la organización de las células intestinales o en la cutícula externa (Figura 24 A, C, E). Por el contrario, los cuerpos de las larvas expuestas a isoramnetina mostraron algunos cambios en sus órganos internos, incluida la pérdida de la integridad arquitectónica de las células intestinales (Figura 24 B).

Asimismo, se observaron algunos cambios morfo-anatómicos en las larvas expuestas a isoramnetina. Las imágenes revelaron la presencia de un color oscuro irregular que se difunde a lo largo de la longitud del cuerpo larval, así como algunos espacios pálidos irregulares entre la capa superficial y la capa interna, también se observaron ondulaciones anormales en la cutícula interna que recubre los órganos internos del nematodo (Figura 24 B, D). Las imágenes observadas por MEBA de larvas no expuestas a la isoramnetina mostraron una superficie cuticular lisa normal sin ningún cambio anormal aparente sano (Figura 24 E). Por el contrario, los cuerpos de las larvas expuestas a isoramnetina parecían deformadas, con pérdida de la integridad estructural de sus órganos internos (Figura 24 F). Además, las larvas también mostraron cambios en su cutícula externa, la cual se observaba un aspecto rugoso y recto con formaciones onduladas principalmente en los cordones nerviosos laterales a lo largo del cuerpo (24 F-1).

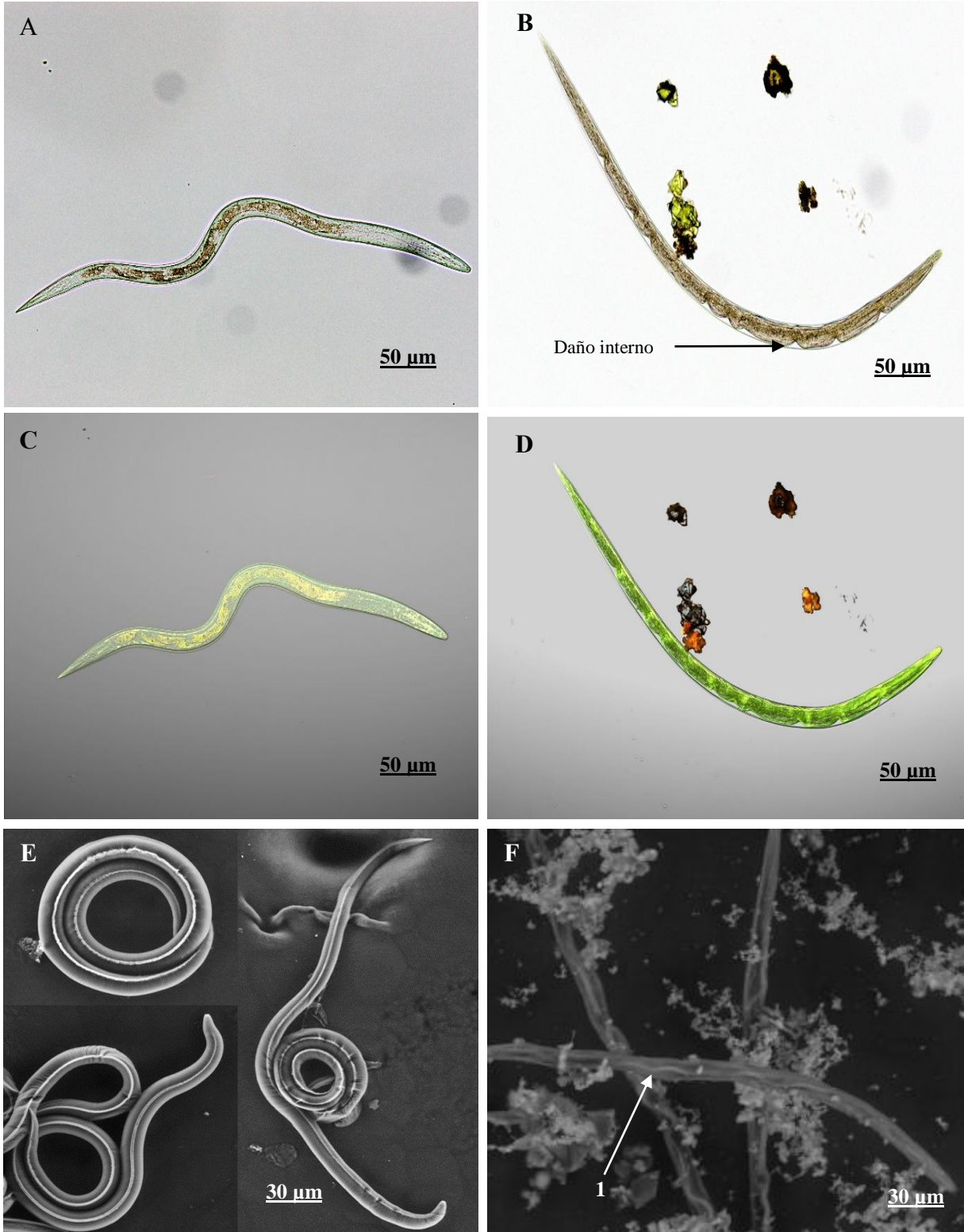


Figura 24. Micrografías tomadas por microscopía acoplada confocal AxioCam (A, B), microscopía electrónica láser confocal (MELC, C, D) y microscopía electrónica de barrido ambiental (MEBA, E, F) se observan larvas de *Haemonchus contortus* expuestas (B, D, F) y no expuestas a la isoramnetina (A, C, E). F1 muestra las formaciones onduladas en el cordón nervioso lateral.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio revelaron que las hojas de *P. laevigata* poseen compuestos activos contra las larvas infectantes de *H. contortus*. A este respecto, es importante comentar que la isoramnetina pura mostró el 100% de mortalidad larvaria (ML) a las concentraciones de 15 y 7.5 mg/mL e incluso a 2.5 mg/mL provocó el 68.15% de ML. En contraste, los otros dos compuestos (luteolina y 4'-*O*-metilcatequina) a 2.5 mg/mL tuvieron una actividad del 0% de ML. A nuestro parecer, aunque la isoramnetina no es el compuesto principal, los resultados del presente estudio indican claramente que este flavonol es definitivamente el compuesto responsable del efecto antihelmíntico contra larvas L₃ de *H. contortus*. Por otro lado, cuando se evaluó la mezcla isoramnetina + luteolina en la misma concentración (2.5 mg/mL), se registró un efecto nulo, lo que sugiere que la luteolina actúa como un antagonista de la isoramnetina, lo que inhibió el efecto de mortalidad larvaria de este compuesto.

Asimismo, es importante señalar que la actividad ovicida mostrada por la isoramnetina pura en concentraciones muy bajas también fue muy alta. Es interesante destacar el hecho de que la luteolina mostró dos efectos diferentes: cuando se combinó con la isoramnetina, la luteolina inhibió la mortalidad larval de la isoramnetina, pero no influyó en la elevada actividad ovicida de la isoramnetina. Una posible explicación de este hecho podría ser que quizás los receptores de membrana del huevo y los receptores de la cutícula de larvas L₃ podrían interferir a favor o en contra de la actividad de este compuesto; aunque esta es solo una propuesta hipotética habría que ser estudiado con más profundidad. El hecho de que la isoramnetina provoca el 100% en la IEH en concentraciones tan bajas, es una característica muy buena que convierte a este compuesto en un candidato potencial para futuros estudios *in vivo*.

En una revisión extensa de la literatura, encontramos poca información sobre la actividad antihelmíntica de los extractos de *P. laevigata* y hasta donde sabemos, el presente estudio es el primer reporte de la actividad ovicida del E-HA y la fracción de acetato de etilo de *P. laevigata* contra *H. contortus*. Se identificaron varios metabolitos secundarios de otras familias de fabáceas que pertenece *Prosopis* utilizando diferentes partes de la planta, asimismo, la actividad nematocida de estos grupos de metabolitos se han descrito en otras plantas de otros géneros (Cuadro 18). Cabe mencionar que las plantas de otros géneros y especies mostraron actividad nematocida frente a diferentes nematodos de importancia para la agricultura y la ganadería (Cuadro 19). En este contexto, es claro que independientemente del género/especie, las plantas responden con un patrón de actividad biológica diferente, independientemente del sistema de separación utilizado.

Cuadro 18. Metabolitos con actividad nematocida presentes en diferentes extractos de plantas de la familia Fabaceae contra diferentes nematodos.

Metabolito (s)	Nematodo	Planta/parte de la planta	Solvente	Referencias
Cumarinas	Actividad AH (no especificado)	<i>Psoralea corylifolia</i> /Frutos	No registrado	Sardari <i>et al.</i> , 2000
Taninos	<i>H. contortus</i>	<i>Laguncularia racemosa</i> /Hojas	Acetona-agua	Vargas-Magaña <i>et al.</i> , 2014
Alcaloides, saponinas, taninos	<i>H. contortus</i>	<i>Prosopis juliflora</i> /Hojas	Etanol	Rechab <i>et al.</i> , 2014
Taninos	<i>H. contortus</i>	<i>Acacia pennatula</i> /Hojas	Acetona-agua	Castañeda-Ramírez <i>et al.</i> , 2017
Cumarinas	<i>Cooperia punctata</i>	<i>Gliricidia sepium</i> /Hojas	Acetona	von Son-de Fernex <i>et al.</i> , 2017

Cuadro 19. Actividad antihelmíntica de diferentes extractos de plantas/plantas contra nematodos de importancia agrícola y ganadera.

Planta /partes de la planta	Solvente	Nematodo	Actividad (%)	Referencias
<i>Prosopis juliflora/</i>	Metanol	<i>Pratylenchus coffeae</i>	97.0	Sundararaju and Cannayane, 2002
<i>Tagetes erecta</i>	Acetona	<i>H. contortus</i> L ₄	99.7	Galicia-Aguilar <i>et al.</i> , 2008
<i>Castela tortuosa</i>	n-hexano		85.8	
<i>Prosopis laevigata</i>	Acetona Metanol	<i>Spodoptera frugiperda</i>	96.0 33.0	Salinas-Sánchez <i>et al.</i> , 2009
<i>Lysiloma latisiliquum</i>			19.5	Vargas-Magaña <i>et al.</i> , 2014
<i>Laguncularia racemosa</i>			47.8	
<i>Rhizophora mangle</i>	Acetona-agua	<i>H. contortus</i> (IEH)	94.3	
<i>Avicenna germinans</i>			47.9	
<i>Theobroma cacao</i>			50.5	
<i>Coffea arabica</i>			94.7	
<i>Prosopis juliflora</i>	Etanol	<i>H. contortus</i> (ovicida)	95.0	
<i>Prosopis juliflora</i>	Etanol	<i>H. contortus</i> (IEH)	90.7	Cheruiyot <i>et al.</i> , 2015
<i>Acacia pennatula</i>	Acetona-agua	<i>H. contortus</i>	99.8	Castañeda-Ramírez <i>et al.</i> , 2017
<i>Acacia cochliacantha</i>	Hidroalcohólico	<i>H. contortus</i> <i>Cooperia punctata</i> <i>Haemonchus placei</i>	97.7 99.2 97.0	Olmedo-Juárez <i>et al.</i> , 2017
<i>Acacia cochliacantha</i>	Hidroalcoholico	<i>H. contortus</i>	100	Castillo-Mitre <i>et al.</i> , 2017
<i>Gliricidia sepium</i>	Acetona	<i>Cooperia punctata</i>	100	von Son-de Fernex <i>et al.</i> , 2017

La F-AcEt de *P. laevigata* registró una mortalidad del 96% a 50 mg/mL contra larvas L₃ *H. contortus* a las 72 horas de exposición. Estas mortalidades fueron similares a otros resultados obtenidos a partir de una fabácea *Lysiloma acapulcensis*. La F-AcEt causó el 100% de mortalidad contra larvas L₃ de *H. contortus* a la misma concentración y al mismo tiempo de exposición (González-Cortazar *et al.*, 2018). Estos autores reportaron la misma ineficacia larvicida de la F-Aq de *L. acapulcensis* que encontramos con *P. laevigata*. El análisis fitoquímico mostró varios grupos de compuestos, incluyendo flavonoides, taninos, alcaloides y cumarinas, ante este análisis, el compuesto con mayor actividad antihelmíntica fue un

flavonoide. El análisis por CLAR reveló que E-HA contenía compuestos fenólicos (Figura 18 a), mientras que F-AcEt contenía compuestos de tipo flavonoides (Figura 18 b).

Es importante mencionar que la isoramnetina es un flavonoide que se ha aislado previamente de varias especies de plantas, entre ellas la *Persicaria glabra* (Manivannan and Shopna 2015) y *Cleome africana* (Rahate and Rajasekaran 2018).

La isoramnetina posee varias actividades biológicas, incluyendo citotóxica (Jaramillo *et al.*, 2010), antimicrobiana (Jnawali *et al.*, 2016), antiviral (Dayem *et al.*, 2015), antioxidante (Pengfei *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2011), hepatoprotectora y cardioprotector (Igarashi and Ohmuma 1995; Katan, 1997), neurológica (Watanabe *et al.*, 2001), anticancerígeno (Li *et al.*, 2014), antiinflamatorio (Kim *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2013) y antidiabético (Lee *et al.*, 2005). Sin embargo, el presente trabajo de investigación parece ser el primer informe de la actividad antihelmíntica de la isoramnetina contra los nematodos parásitos que afectan a los pequeños rumiantes.

El uso de técnicas por microscopía AxioCam, MELC y MEBA apoyó la hipótesis de que la isoramnetina es el compuesto responsable de producir los cambios estructurales morfológicos contra los huevos y las larvas del parásito asociados a la presencia de la isoramnetina. Asimismo, el mecanismo de la actividad antihelmíntica de la isoramnetina contra los huevos y larvas de *H. contortus* sigue siendo incierto y será motivo de estudio a futuro. Existe información acerca del mecanismo celular de los flavonoides, en este sentido generalmente pueden actuar como sustratos en el transporte de proteínas, interfieren con las propiedades eléctricas de las membranas, interactúan con las capas lipídicas de las membranas y pueden favorecer o afectar los procesos biológicos y fisiológicos (Hendrich, 2006; Zhao, 2015). En este sentido, algunos autores han reportado que los compuestos fenólicos, incluidos los taninos

condensados y los flavonoides, que son capaces de unirse a las proteínas de membrana en huevos de nematodos y estas son vitales para el desarrollo óptimo y actividades biológicas de las larvas (Molan and Faraj *et al.*, 2010).

Sin embargo, las membranas de nematodos como *H. contortus* están constituidas por tres tipos diferentes de capas que incluyen una capa externa compuesta por de proteínas, una capa media compuesta de fibrillas y quitina (para los huevos y las larvas, respectivamente) y una capa basal compuesta de lípidos semipermeable (Mansfield *et al.*, 1992; Thompson and Geary 1995). Como preámbulo, los procesos de eclosión de huevos se inician como resultado de un estímulo ambiental que promueve un proceso mediado por proteínas y enzimas que desencadena la liberación de la larva del huevo. Las proteínas que promueven la eclosión del huevo se llaman "enzimas de eclosión" e incluyen proteasas, lipasas, beta-glucosidasas, quitinasas y leucina-aminopeptidasas, que actúan directamente para estimular la eclosión del huevo (Sommerville and Rogers 1987; Mansfield *et al.*, 1992).

A este respecto, se cree que estas interacciones entre los compuestos y las proteínas pueden causar importantes cambios estructurales que afectan a la permeabilidad de las membranas, como el intercambio de oxígeno y la liberación de sustancias intra y extracelulares, así mismo los compuestos pueden interactuar directamente en la inhibición de algunas enzimas relacionadas en la eclosión de huevos evitando la liberación de las larvas (Rogers and Brooks 1977; Molan and Faraj 2010; Vargas-Magaña *et al.*, 2014). Por esa razón, puesto que la isoramnetina es un compuesto fenólico del grupo de los flavonoides, podría actuar de manera similar al unirse a los receptores de membrana del parásito para causar daños en los tejidos internos de huevos y larvas de *H. contortus*; sin embargo, ésta es sólo una propuesta de hipótesis que debe ser validada mediante técnicas más avanzadas.

Molan and Faraj (2010) y Lakshmi et al. (2010) demostraron que los compuestos fenólicos, incluidos los taninos condensados y los flavonoides, poseen importantes actividades antihelmínticas. Por ejemplo, Barrau et al. (2005) mostraron que los flavonoles tri-glicosilados aislados de *Onobrychis viciifolia* Scop. inhibió la migración de larvas en *H. contortus* en condiciones *in vitro*. Posteriormente, Klongsiriwet et al. (2015) demostraron los efectos sinérgicos de una combinación de taninos condensados y flavonoides, que incluían quercetina y luteolina, razón por la cual esta combinación mejoró la actividad antihelmíntica. Una de las principales hipótesis sobre el mecanismo de acción de estos compuestos es que pueden estimular la permeabilidad de la membrana de huevo y de la cutícula de las larvas (Castelli *et al.*, 1999; Vargas-Magaña *et al.*, 2014). Sin embargo, el modo de entrada de los compuestos fenólicos en la membrana depende de su estructura química. Esto se produce mediante la formación de enlaces de hidrógeno que contienen en la cabeza polar lipídica y porciones hidrófilas de flavonoides, así como con grupos hidroxilo que interactúan con las membranas parasitarias (Van Dijk *et al.*, 2000; Engström *et al.*, 2016). La confrontación de huevos y larvas con la isoramnetina mostraron alteraciones internas observadas por microscopía y en ese sentido, el hecho de que la superficie externa de la membrana del huevo no se observan cambios estructurales, sugiere que la entrada de isoramnetina por si sola o combinada con luteolina logró cruzar la membrana del huevo para causar la muerte del embrión y larvas infectantes. Por último, nuestros ensayos se utilizaron como objetivos blanco huevos y larvas infectantes de *H. contortus* bajo condiciones *in vitro* que corresponden a etapas de vida libre, por tal motivo es necesario diseñar pruebas complementarias *in vivo* que monitoreen el impacto de la isoramnetina en la etapa endógena del parásito.

CONCLUSIONES

- La fracción de acetato de etilo obtenido de un extracto hidroalcohólico a partir de hojas de la planta *P. laevigata* posee actividad antihelmíntica contra huevos y las larvas infectantes de *H. contortus* considerado el parásito económicamente más importante que afecta a los pequeños rumiantes a nivel mundial.
- Los métodos cromatográficos facilitaron la separación, aislamiento y la identificación de tres compuestos flavonoides (1-3). De estos, la isoramnetina obtuvo una elevada actividad antihelmíntica contra este parásito.
- Las técnicas por MELC y MEBA revelaron importantes características anormales en la estructura de los parásitos atribuidos a la isoramnetina. Por tanto, este es el primer reporte a nivel mundial de la actividad antihelmíntica *in vitro* de la especie *P. laevigata* y el flavonoide isoramnetina contra el parásito de ovinos *H. contortus*.

PERSPECTIVAS

- Los resultados del presente estudio sugieren llevar a cabo estudios *in vivo* con animales infectados de forma experimental con el parásito, para evaluar la posible actividad antihelmíntica de la fracción orgánica.
- Se sugiere llevar a cabo pruebas de toxicidad en animales experimentales para determinar la inocuidad del compuesto isoramnetina, con la finalidad de poder explorar el uso de este producto como una alternativa contra la hemoncosis ovina.
- Realizar estudios *in vivo* sobre el consumo de hojas de esta planta en ovinos, para determinar su beneficio nutricional y adicionalmente su efecto antiparasitario.

BIBLIOGRAFÍA

Abbot K. (2018). The Practice of Sheep Veterinary Medicine. 10.20851/sheep-medicine.

Adamu, M., Naidoo V and N Eloff J. (2013). Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *Vet Res.* 9(38), 2-8.

Adewunmi, C.O., Akubue, P.I. (1981). Preliminary studies on the anthelmintic properties of the aqueous extract of *Callindra portoricensis*. (Jacq.) Benth. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 29(2): 171-5.

Aguilar-Rodríguez, S., Terrazas, T., Aguirre-León, E., Huidobro-Salas, M.E. (2007). Modificaciones en la corteza de *Prosopis laevigata* por el establecimiento de *Tillandsia recurvata*. *Bol Soc Bot Méx.* 81: 27-35.

Ahmad, A; Khan, K.A; Ahmad, V.U and Qazi, S. (1985). Antibacterial Activity of Juliflorine Isolated from *Prosopis juliflora*. *Planta Med.* 285-288.

Akhtar, M.S., Ahmad, I. (1992). Comparative efficacy of *Mallotus philippinensis* fruit (Kamala) or Nilzan R drug against gastrointestinal cestodes in Beetal goats. *Small Ruminant Research*, 8(1-2): 121-8.

Akhtar, M.S., and Ahmad, I. (1991). Evaluation of antinematodal efficacy of tetrahydroharmine in goats. *Vet Arh.* 6(5): 307-11.

Akhtar, M.S., Chattha, M.I., Chaudry, A.H. (1982). Comparative efficacy of santonin and piperazine against *Neoascaris vitulorum* in buffalo calves. *J Vet Pharmacol Ther.* 5(1): 71-6.

Akhtar, M.S., Javed, I., Hayat, C.S and Shah, B.H. (1985). Efficacy and safety of *Caesalpinia crista* Linn. Seeds, its extracts in water and methanol against natural *Neoascaris vitulorum* infection in buffalo calves. *Pak Vet J.* 5: 192-6.

Almaraz-Abarca, N., Campos, M.D.G., Ávila-Reyes, J.A et al. (2007). Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J Food Compos Anal* 20: 119–124.

Alvinerie, M., Galtier, P. (1997). Comparative pharmacokinetic properties of moxidectin and ivermectin in different animal species. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 20 (Suppl. 1), 74.

Andrade-Montemayor, H.F, Pacheco-López, M., Aguilar-Borjas, H et al. (2009) Effect of dry roasting on composition, digestibility and degradability of fiber fractions of mesquite pods (*Prosopis laevigata*) as feed supplement in goats. *Trop Subtrop Agroecosyst* 11:237–243.

Andrade-Montemayor, H.M., Cordova-Torres, A.V., García-Gasca, T and Kawas, J. R. (2011). Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). *Small Ruminant Research*, 98(1-3): 83–92.

Ardoino, S.M., Boeris, M.A., Toso, R.E. (2013). Caracterización fitoquímica de *Prosopis flexuosa* var. *flexuosa* (algarrobo) y *Prosopis flexuosa* var. *depressa* (alpataco), plantas con acción farmacológica. *Rev Cien Vet.* 15(1): 115-125.

Argüelles G., A., y R. Montoya A. (1991). Explotación del mezquite en San Luis Potosí, una perspectiva histórica. Ediciones del Archivo histórico del Estado de San Luis Potosí. S.L.P., México. 88 p.

Arsenopoulos, K., Minoudi, S., Symeonidou, I., Triantafyllidis, A., Katsafadou, A., Lianou, D., ... Papadopoulos, E. (2020). Frequency of resistance to Benzimidazoles of *Haemonchus contortus* Helminths from Dairy Sheep, Goats, Cattle and Buffaloes in Greece. *Pathogens*, 9(5), 347.

Astudillo, L., Schmeda-Hirschmann, G., Herrera, J.P., Cortés, M. (2000). Proximate composition and biological activity of Chilean *Prosopis* species. *J Sci Food Agric.* 80(5): 567-73.

Atawodi, S.E., Ogunbusola, F. (2009). Evaluation of anti-trypanosomal properties of four extracts of leaves, stem and root barks of *Prosopis africana* in laboratory animals. *Bikemistri.* 21(1): 101-108.

Ayanwuyi, L.O., Yaro, A.H., Abodunde, O.M. (2010). Analgesic and anti-inflammatory effects of the methanol stem bark extract of *Prosopis africana*. *Pharm Biol* 48(3): 296–299.

Barba de la Rosa, A.P., Frías-Hernández, J.T., Olalde-Portugal, V., González-Castañeda, J. (2006). Processing, nutritional evaluation, and utilization of whole mesquite flour (*Prosopis laevigata*). *J Food Sci.* 71(4): S315–S320.

Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H. (2005). Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: Role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology.* 131, 531–538.

Bassetto, C., Almeida, F., Newlands, G.F.J., Smith, W., Castilhos, A., Fernandes, S., Siqueira, E., Amarante, A. (2018). Trials with the *Haemonchus vaccine*, Barbervax®, in ewes and lambs in a tropical environment: Nutrient supplementation improves protection in periparturient ewes. *Vet. Parasitol.* 264, 52–57.

Besier, R.B., Kahn, L.P., Sargison, N.D., Van Wyk, J.A. (2016). The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Adv Parasitol.* (93), 97-143.

Bihaqi, S.J., Allaie, I.M., Banday, M.A.A., Sankar, M., Wani, Z. A., and Prasad, A. (2020). Multiple anthelmintic resistance in gastro-intestinal nematodes of Caprines on mountain research Centre for Sheep and Goat at Kashmir Valley, India. *Parasite Epidemiology Control.* e00163.

Bøgh, H.O., Andreassen, J., Lemmich, J. (1996). Anthelmintic usage of extracts of *Embelia schimperi* from Tanzania. *J Ethnopharmacol.* 50: 35-42.

Boisvenue, R.J., Sti, M.I., Tonkinson, L.V., Cox, G.N. (1992). Hageman, R. Fibrinogen-degrading proteins from *Haemonchus contortus* used to vaccinate sheep. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1263–1265.

Bories, C., Loiseau, L., Cortes, D., Myint, S.H., Hoquemiller, R., Gayral, P., Cave, A. and Laurens, A. (1991). Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cheromolia* seeds. *Planta Medica*, 54: 434-6.

Bosco, A., Kiebler, J., Amadesi, A., Varady, M., Hinney, B., Ianniello, D., ... Rinaldi, L. (2020). The threat of reduced efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in sheep from an area considered anthelmintic resistance-free. *Parasites and Vectors*, 13(1).

Botana López, L.M; Landoni M.F; Jiménez T.M. (2002). Farmacología terapéutica y veterinaria. (*Primera edición*). España. Ed. Mc Graw-Hill/Interamericana. 529-570 pp.

Bowman, D.D., (2011). Georgis: Parasitología Veterinaria. Novena edición. Elsevier Saunders. Barcelona, España. 60-79 pp.

Burkart, A. (1976). A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae. Subfam. Mimosoideae). *J. Arnold Arbor.* 27: 219-249 y 450-529.

Cárdenas-Camacho, C., Ruiz-Quiroz, J., Castro-Luna, A., Ramos-Cevallos, N., Rojas-Armas, J., Ramos-Perfecto, D. (2017). Antibacterial and antioxidant activity of ethanolic extract from

leaves of *Prosopis pallida* leaves (American carob). *Rev. Cuba. de Plantas Medicinales*. 22(4).

Carranza-Montaña, M.A., Sánchez-Velásquez, L.R., Pineda-López, M.R., Cuevas-Guzmán, R. (2003). Calidad y potencial forrajero de especies del bosque tropical caducifolio de la sierra de Manantlán, México. *Agrociencia*. 37(2): 203-210.

Carrillo-Parra A., Hapla, F., Carsten, Mai and Garza-Ocañas, F. (2010). Durability of wood of *Prosopis laevigata* and the effect of its extractives on wood-decaying fungus. *Madera y Bosques*. 17(1): 7-21.

Castañeda-Ramírez, G.S., Mathieu, C., Vilarem, G., Hoste, H., Mendoza-de-Gives, P., González-Pech, P.G., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A. (2017). Age of *Haemonchus contortus* third stage infective larvae is a factor influencing the *in vitro* assessment of anthelmintic properties of tannin containing plant extracts. *Vet Parasitol*. 243. 130–134.

Castelli, F., Uccella, N., Trombetta, D., Saija, A. (1999). Differences between coumaric and cinnamic acids in membrane permeation as evidenced by time-dependent calorimetry. *J Agric. Food Chem*. 47. 991–995.

Castillo-Mitre, G. F., Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., González-Cortázar, M., Mendoza-de Gives, P., Hernández-Beteta, E. E., Zamilpa, A. (2017). Caffeoil and coumaroil derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *J Ethnopharmacol*. 204, 125–131.

Cervantes, M. (2002). Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México. 1ra ed. Ed. UNAM. México, D.F. 155 p.

Chagas, A. C. S., Vieira, L. S., Freitas, A. R., Araújo, M. R. A., Araújo-Filho, J. A., Araguão, W. R., & Navarro, A. M. C. (2008). Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes® in Morada Nova sheep. *Vet Parasitol.* 151(1), 68–73.

Chakraborty, B., Ray, N.M., Sidkar, S. (1979). Study of anthelmintic property of *Tribulus terrestris* Linn. *Indian J Anim Health.* 1: 23-5.

Chaturvedi, O. H and Sahoo, A. (2013). Nutrient utilization and rumen metabolism in sheep fed *Prosopis* spp. pods and Cenchrus grass. *SpringerPlus.* 2(1):1-7.

Cheruiyot, K., Kutima, L.H., Kareru, G.P., Njonge, K.F., Rechab, S.O., Mutembei, K.J., Madivoli, E. (2015). *In vitro* ovicidal activity of encapsulated ethanolic extract of *Prosopis juliflora* Against *Haemonchus contortus* Eggs. *J Pharm Biol Sci.* 10(5): 18-22.

Choge, S.K., Pasiecznik, N.M., Harvey, M., Wright, J., Awan, S.Z., Harris, P.J. (2007). *Prosopis* pods as human food with special reference to Kenya. *Waters SA.* 33(3): 419-424.

Choudhary, M.I., Nawaz, S.A., Zaheer-ul-Haq, Azim, M.K., Ghayur, M.N., Lodhi, M.A., Jalil, S., Khalid, A., Ahmed, A., Rode, B.M., Atta-ur-Rahman, Gilani, A.U., Ahmad, V. U. (2005). *Juliflorine*: A potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase

with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimers disease therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 332(4): 1171-1179.

Coello Kuon Yeng, L., & Rey Guevara, R. (2019). Ascariasis: Actualización sobre una Parasitosis Endémica. *Revista Científica Hallazgos*21, 4(1), 87- 99.

Coles, G.C., Jackson F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Samson-Himmelstjerna, G.V., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology.* 136, 167–185.

CONAZA, (1994). Mezquite (*Prosopis* spp.). Cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México. COMISIÓN NACIONAL DE LAS ZONAS ÁRIDAS (CONAZA). Instituto Nacional de Ecología. 30-52 pp.

Cooper, L., Cerutti, J., Mohn, C., Torrents, J., Suarez, A.G., Anziani, O.S (2016). Eficacia del monepantel para el control de aislamientos de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus* spp. con resistencia múltiple (ivermectina y febendazole) en caprinos. *Revista FAVE – Sección Ciencias Veterinarias* 15. 5-8.

Cordero del Campillo, M., Rojo, F., Martínez, A., Sánchez, M., Hernández, S., Navarrete, I., Diez, P., Quiroz, H., Carvalho, M. (1999). *Parasitología Veterinaria*. Editorial Mc Graw- Hill. España. pp. 238-240.

Crilly, J.P., Evans, M., Tähepõld, K., Sargison, N. (2020). Haemonchosis: dealing with the increasing threat of the barber's pole worm. *Livestock*. 25(5): 237-246.

Cuellar, J.A. (2002). El ambiente y su efecto sobre la cantidad de parásitos en las praderas y agostaderos. En: Memorias. 2do. Curso Internacional “Epidemiología y control integrado de nematodos gastrointestinales de importancia económica en pequeños rumiantes”. (Eds. F.J. Torres & A.J. Aguilar). Yucatán, México. 10 p.

Dahms, H.U; Malliga, P; Sethuraman, P.D (2014). Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp.—a review. *J Coast Life Med*. 2(11): 918-924.

Danø A.R and Bøgh H.O. (1999). Utilización de hierbas medicinales contra los helmintos en el ganado: Renacimiento de una antigua tradición. *World Animal Review*. 93-1999/2. FAO.

Dayem, A.A., Choi, H.Y., Kim, Y.B., Cho, S.-G. (2015). Antiviral effect of methylated flavonol isorhamnetin against influenza. *PLoS ONE*. 10, e0121610.

de Brito-Damasceno, G.A., Ferrari, M., Giordani, R.B. (2017). *Prosopis juliflora* (SW) D.C., an invasive specie at the Brazilian Caatinga: Phytochemical, pharmacological, toxicological and technological overview. *Phytochem Rev*. 16, 309-331.

De Jesús-Gabino, A.F., Mendoza-de Gives, P., Salinas-Sánchez, D.O., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E., Hernández-Velázquez, V.M., Valladares-Cisneros, G. (2010).

Anthelmintic effects of *Prosopis laevigata* n-hexanic extract against *Haemonchus contortus* in artificially infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Helminthol.* 84, 71–75.

Deepa, N., Nayaka, S.C., Girish, K., Raghavendra, M.P. (2013). Synergistic effect of *Prosopis juliflora* extract and chemical fungicides against seed borne toxigenic fungi. *Int J Adv Life Sci (IJALS)*. 6(4): 312-317.

Delgado-Altamirano, R., Monzote, L., Piñón-Tápanes, A., Vibrans, H., Rivero-Cruz, J.F., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A. (2017). *In vitro* antileishmanial activity of Mexican medicinal plants. *Heliyon*, 3(9), e00394.

Díaz-Batalla, L., Hernández-Uribe, J.P., Gutiérrez-Dorado, R., Téllez-Jurado, A., Castro-Rosas, J., Pérez-Cadena, R., Gómez-Aldapa, C.A. (2018). Nutritional characterization of *Prosopis laevigata* legume tree (mesquite) seed flour and the effect of extrusion cooking on its bioactive components. *Foods*, 7(8), 124.

Domínguez, X.A. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. México: Limusa. 281 p.

dos Santos, E.T., Pereira, M.L., da Silva, C.F., Souza-Neta, L.C., Geris, R., Martins, D., Santana, A.E., Barbosa, L.C., Silva, H.G., Freitas, G.C., Figueiredo, M.P., de Oliveira, F.F., Batista, R. (2013). Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on *in vitro* ruminal digestion. *Int J Mol Sci.* 14(4): 8496-8516.

Dubey, M.P., Gupta, I. (1969). Anthelmintic activity of *Alangium lamarckii*. *Indian J Physiol Pharmacol.* 12: 35-6.

Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A., Santos-Buelga, C. (2010). Antioxidant evaluation of *O*-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *J. Pharm. Biomed.* 51, 443–449.

Ehsan, M., Hu, R.-S., Liang, Q.-L., Hou, J.-L., Song, X., Yan, R., ... Li, X. (2020). Advances in the Development of Anti-*Haemonchus contortus* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Vaccines*, 8(3): 555.

Emery, D.L., Hunt, P.W and Le Jambre, L.F. (2016). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Int J Parasitol*, 46(12), 755–769.

Encalada-Mena, L.A., López-Arellano, M.E., Mendoza de Gives, P., Liébano-Hernández, E., Vázquez-Prats, V., Vera Ycuspinera, G. (2008). First report in Mexico on ivermectin resistance on naturally infected calves with gastrointestinal nematodes. *Vet. Mex.* 39 (4). 423-428.

Engström, M.T., Karonen, M., Ahern, J.R., Baert, N., Payré, B., Hoste, H., Salminen, J.-P. (2016). Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* Nematodes. *J Agric Food Chem.* 64. 840–851.

Escareño, D.S., Alonso, D.E., Mendoza-de-Gives, P., Castillo, G.E. and von-Son-de-Fernex, E. (2019). Anthelmintic – like activity of poliphenolic compounds an their interactions against the cattle nematode *Cooperia punctata*. *Vet Parasitol.* 274, 108908.

Espinosa, M.J. and Centurión, H.D. (2016). *In vitro* anthelmintic activity of three plant species traditionally used in Tabasco, Mexico. *Polibotanica*. 41, 91-100.

Espinosa-Moreno, J; Centurión-Hidalgo, D, Guillermo-Vera y Cuspinera, G.G; Pérez-Castañeda, E; Zaragoza-Vera, C.V; Martínez-Martínez, S; Mendoza-de-Gives, P; González-Cortázar- M. (2015). *In vitro* antihelmintic activity of three plant species traditionally used in tabasco, Mexico. *Polibotánica*. 41: 91-100.

FAO. Valor nutritivo y usos en la alimentación humana de los cultivos autóctonos sub explotados en Meso América. Oficina regional para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile.

FAO. (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition; Report of an FAO Expert Consultation; FAO Food and Nutrition Paper 92; FAO: Rome, Italy.

Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin WHO*. 63(6): 965-81.

Fernández, T.J. (1991). Local plants having anthelmintic activity. *ASEAN J. Sci. Technol. Develop.* 8(2): 115-19.

Ferreira, L.E., Castro, P.M.N., Chagas, A.C.S., França, S.-C., Beleboni, R.O. (2013). *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental Parasitology*, 134(3): 327–332.

Figueiredo, A. (1990). Mesquite: history, composition and food uses. *Food Technology*. 44: 118-128.

Figueroa-Castillo, J.A., Méndez-Medina, R.D., Berruecos-Villalobos, J.M., Álvarez-León, J.A. (2000). Detección y resistencia en *Haemonchus contortus* al sulfóxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovino. *Vet. Méx.* (31): 309-313.

Galicia-Aguilar, H.H., Mendoza de Gives, P., Salinas-Sánchez, D.O., Liébano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., López-Aroche, U and Valladares-Cisneros, G. (2008). *In vitro* nematocidal activity of plant extracts of Mexican flora against *Haemonchus contortus* fourth larval stage. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1149: 158-160.

Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., González-Laredo, R.F., García-Casas, M.A. (2013). Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*), *CyTA - J Food*. 11(2): 162-170.

Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac med*. 77(4): 327-32.

García-Andrade, M., González-Laredo, R.F., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Rosales-Castro, M., Medina-Torres, L. (2013). Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Ind Crops Prod.* 44: 336-432.

García-Hernández, C., Arece-García, J., Rojo-Rubio, R., Mendoza-Martínez, G.D., Albarrán-Portillo, B., Vázquez-Armijo, J.F., Avendaño-Reyes, L., Olmedo-Juárez, A., Marie-Magdeleine, C., López-Leyva, Y. (2017). Nutraceutical effect of free condensed tannins of *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) Benth on parasite infection and performance of Pelibuey sheep. *Tropical Animal Health and Production.* 49: 55-61.

García-Moya, E. (1986). Usos del mezquite (*Prosopis* L.) en el Altiplano Potosino. *Agrociencia* 63: 7-15.

Garg, A and Mittal, S.K. (2013). Review on *Prosopis cineraria*: A potential herb of Thar desert. *Drug Invention Today.* 5(1): 60–65.

Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Thompson, D.P. (1993). *Haemonchus contortus*: Ivermectin-induced paralysis of the Pharynx. *Experimental Parasitology*, 77(1): 88–96.

Gibbs, H.C. (1986). Hypobiosis in parasitic nematodes - An Update. *Adv Parasitol.* (25), 129-174.

Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M. (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol.* 139(4): 308–320.

Gobinath, S.M., Reddy, K.S., Shankar, T. (2013). To evaluate the antipyretic activity of *Prosopis juliflora* ethanolic extract in Brewer's yeast induced hyperthermia in rats. *J Biotech Biosaf.* 1(2): 28-32.

Gómez L., F. (2008). Apuntes del Curso de Vegetación Nativa de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo. Bermejillo, Dgo. 230 p.

González O.A. (2006). Fisiopatología veterinaria. Disfunciones órgano sistémicas. La Habana. Ed. Félix Varela. 448 p.

González, E.M., López. E.I.L., González, E.S., Tena, F.J.A. (2004). Plantas medicinales del Estado de Durango y zonas aledañas. CIIDIR Durango - Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 210 pp.

González-Cortazar, M., Zamilpa, A., López-Arellano, M.E., Aguilar-Marcelino, L., Reyes-Guerrero, D.E., Olazarán-Jenkins, S., Ramírez-Vargas, G., Olmedo-Juárez, A., Mendoza-de-Gives, P. (2018). *Lysiloma acapulcensis* leaves contain anthelmintic metabolites that reduce the gastrointestinal nematode egg population in sheep faeces. *Comp. Clin. Pathol.* 27, 189–197.

González-Garduño, R., Navarro-Martínez, F., Arias-Julián, J., Gutiérrez-Cruz, S., Zaragoza-Vera, M., Zaragoza-Vera, C. (2013). Morphological Description of *Haemonchus contortus* and *Mecistocirrus digitatus* of Sheep and Cattle in Tabasco, México. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 28(2): 76-85.

Grether, R. (2007). *Prosopis* L. emend. Burkart. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes 150: 202-209.

Grether, R., Martínez-Bernal, A., Luckow, M., Zárate, S. (2006). Mimosaceae Tribu Mimoseae. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán* 44. Instituto de Biología. Departamento de Botánica. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

Gurib-Fakim A. (2006). Medicinal plants: Tradition of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27:1-93.

Hammond, J.A., Fielding, D and Bishop, S.C. (1997). Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res Commun*, 21: 213-228.

Haque, N., Peralta-Videa, J.R., Duarte-Gardea, M., Gardea-Torresdey, J.L. (2009). Differential effect of metals/metalloids on the growth and element uptake of mesquite plants obtained from plants grown at a copper mine tailing and comercial sedes. *Bio. Technol.* 100(24): 6177-6182.

Henciya, S., Seturaman, P., James A.R et al. (2017). Biopharmaceutical potentials of *Prosopis* spp. (Mimosaceae, Leguminosa). *J Food Drug Anal* 25:187–196.

Hendrich, A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacol. Sin.* 27, 27–40.

Holden-Dye L and Walker R.J. (2014). Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.143.2.

Hoste, H., Sotiraki, S., Torres-Acosta, JFJ. (2011). Control of endoparasitic nematode infections in goats. *Veterinary Clinics North America Food Animal Practice.* 27(1): 163-73.

Hounzangbe-Adote, S. (2004). Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Bénin. 205 p.

Ibrahim, M.A., Nwude, N., Ogunsusi, R.A., Aliu, Y.O. (1984). Screening West African plants for anthelmintic activity. *ILCA Bulletin*, 17: 19-23.

Igarashi, K., Ohmuma, M. (1995). Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 595–601.

Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT (INE). (1994). Mezquite. *Prosopis spp.* Cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México. Instituto Nacional de Ecología. México. 30 p.

Islam, R., Zahra, S. F. T., Sumon, S. M. I., Parvin, S., Hasan, K., Ahmed, M., Siddique, A. T., Haque, T. (2019). Evaluation of anthelmintic activity of ethanolic extracts of *Carica papaya* leaves using *Paramphistomum cervi* and *Haemonchus contortus*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 13(12): 146-150.

Islam, S., Dey, A.R., Akter, S., Biswas, H., Talukder, M.H., and Alam, M.Z. (2018). Status of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in organized sheep and goat farms. *Asian J Med Biol Res*, 4(4), 378–382.

ITDG and IIRR. (1996). *Ethnoveterinary medicine in Kenya: a field manual of traditional animal health care practices*. Nairobi, Intermediate Technology Development Group and International Institute of Rural Reconstruction. 226 p.

Jackson, F., Varady, M., Bartley, D.J. (2012). Managing anthelmintic resistance in goats—Can we learn lessons from sheep? *Small Ruminant Research*. 103: 3–9.

Jacobson, C., Larsen, J.W., Besier, R.B., Lloyd, J.B., and Kahn, L. P. (2020). Diarrhoea associated with gastrointestinal parasites in grazing sheep. *Veterinary Parasitology*, 109139.

Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: past history and future perspective. *J Herbmed Pharmacol*. 7(1):1-7.

Jaramillo, S., López, S., Varela, L.M., Rodríguez-Arcos, R.; Jiménez, A., Abia, R., Muriana, F.J. (2010). The flavonol isorhamnetin exhibits cytotoxic effects on human colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10869–10875.

Javed, I., Akhtar, M., Rahman, Z., Khaliq, T., Ahmad, M. (1994). Comparative anthelmintic efficacy and safety of *Caesalpinia crista* seed and piperazine adipate in chickens with artificially induced *Ascaridia galli* infection. *Acta Vet. Hung.* 42. 103-9.

Jnawali, H.N., Jeon, D., Jeong, M.-C., Lee, E., Jin, B., Ryoo, S., Kim, Y. (2016). Antituberculosis activity of a naturally occurring flavonoid, isorhamnetin. *J. Nat. Prod.* 79, 961–969.

Katan, M.B. (1997). Flavonoids and heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 1542–1543.

Kelkele, F.A., Tolossa, Y.H., Kassa, G.M. (2012). Experimental infection of Ethiopian highland sheep by different infective doses of *Haemonchus contortus* (L3): haematological and parasitological parameters, serum protein concentrations and clinical responses. *Ethiop. Vet. J.* 16(1): 41-57.

Khandelwal, P., Sharma, R.A., Agrawal, M. (2016a). Phytochemical analyses of various parts of *Prosopis juliflora*. *Mintage J Pharm Med Sci.* (ISSN: 2320-3315), 16-18.

Khandelwal, P.J., Sharma, R.A., Agarwal, M. (2016b). Phytochemical analyses of various parts of *Prosopis cineraria*. *Int J Pharm Chem.* 2(1): 6-9.

Kim, T.H., Ku, S.-K., Bae, J.-S. (2012). Anti-inflammatory activities of isorhamnetin-3-O-galactoside against HMGB1-induced inflammatory responses in both HUVECs and CLP-induced septic mice. *J. Cell. Biochem.* 114, 336–345.

Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A.R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E.M., Hoste, H. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Int J Parasitol. Drugs.* 5, 127–134.

Koetze, A.C. (1998). Effects of macrocyclic lactones on ingestion in susceptible and resistant *Haemonchus contortus* larvae. *J Parasitol.* 84(3): 631-635.

Köhler, P. 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol.* 31(4): 336-345.

Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega. Barcelona.

Lakshmi, V., Joseph, S.K., Srivastava, S., Verma, S.K., Sahoo, M.K., Dube, V., Murthy, P.K. (2010). Antifilarial activity *in vitro* and *in vivo* of some flavonoids tested against *Brugia malayi*. *Acta Trop.* 116, 127–133.

Lambertz, C., Pouloupoulou, I., Wuthijaree, K., and Gauly, M. (2019). Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in sheep raised under mountain farming conditions in Northern Italy. *Vet. Rec. Open*, 6(1), e000332.

Lee, Y.S., Lee, S., Lee, H.S., Kim, B.-K., Ohuchi, K., Shin, K.H. (2005). Inhibitory effects of Isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol. Pharm. Bull.* 28. 916–918.

Lewis W.H. and Elvin-Lewis, P.F. (1977). Medical botany: Plants affecting man's health. John Wiley & Sons, New York. 353 p.

Li, C., Yang, X., Chen, C., Cai, S., Hu, J. (2014). Isorhamnetin suppresses colon cancer cell growth through the PI3K-Akt-mTOR pathway. *Mol. Med. Rep.* 9, 935–940.

Longbottom, D., Redmond, D.L., Russell, M., Liddell, S., Smith, W.D., Knox, D.P. (1997). Molecular cloning and characterisation of a putative aspartate proteinase associated with a gut membrane protein complex from adult *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 88, 63–72.

López-Aroche, U., Salinas-Sánchez, D.O., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E., Valladares-Cisneros, G., Arias-Ataide, D.M., Hernández-Velázquez, V.M. (2008). *In vitro* nematicidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, Mexico against *Haemonchus contortus* infective larvae. *J Helminthol.* 82, 25–31.

Love, S.C.J and Hutchinson, G.W. (2003). Pathology and diagnosis of internal parasites in ruminants. In *Gross Pathology of Ruminants, Proceedings 350*, Post Graduate Foundation in Veterinary Science, University of Sydney, Sydney; Chapter 16:309-338.

Macedo-Barragán, R., Arredondo-Ruiz, V., Ramírez-Rodríguez, J., García-Márquez, L.J. (2009). ¿Envenenamiento por consumo de *Asclepias curassavica* o nematodiasis gastrointestinal en ovinos de pastoreo? Hallazgos de un estudio de caso. *Veterinaria México*. 40(3): 271-281.

Maldonado, C., Paniagua-Zambrana, N., Bussmann, R.W., Zenteno-Ruiz, F.S. and Fuentes, A.F. (2020). The importance of medicinal plants, their taxonomy and the search for a cure for the disease caused by the coronavirus (COVID-19). *Ecología en Bolivia*. 55(1): 1-5.

Mani, D and Kumar, C. (2013). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13: 299-308.

Manikandar, R.V.M., Rajesh, V., Kumar, R.S., Perumal, P., Raj, C.D. (2009). Analgesic and anti-pyretic activity of stem bark of *Prosopis cineraria* (Linn.) Druce. *J Pharm Res* 2(4): 60–662.

Manivannan, R., Shopna, R. (2015). Isolation of quercetin and isorhamnetin derivatives and evaluation of anti-microbial and anti-inflammatory activities of *Persicaria glabra*. *Nat. Prod. Sci.* 21, 170–175.

Mansfield, L.S., Gamble, H.R., Fetterer, R.H. (1992). Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*—I. Structural components. *Comp. Biochem. Physiol.* 103, 681–686.

Márquez, L.D. (2007). Resistencia a Antihelmínticos en Nematodos de Rumiantes y Estrategias para su Control. Ed Produmedios, Bogotá, Colombia. 86 pp.

Martin R. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs, *Vet. J.* 154:11-34.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. and M.^a J. Tuñón, M.a J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17:271-278.

Matamoros, G; Schultz, J; Fontecha, G.A; Sanchez, A.L. (2017). Persistencia de los geohelminthos en Honduras: pobreza, baja eficacia del tratamiento y potencial emergencia de resistencia parasitaria. *Invest Clin* 58(4): 393-405.

Mathias, E. (1994). Importance and use of indigenous knowledge in sustainable development: a training module. International Institute of Rural Reconstruction (IIRR), Silang, Philippines.

Mazucca, M., Kraus, W., Balzaretto, V. (2003). Evaluation of the biological activities of crude extracts from Patagonian *Prosopis* seeds and some of their active principles. *J Herb Pharmacother.* 3(2): 31-7.

McCorkle, C. (1986). An introduction to ethnoveterinary research and development. *J Ethnobiol.* 6(1); 129 -149.

McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., Krause, D.O. (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim Feed Sci Technol* 91: 83–93.

Metha, R.K and Parashar, G.C. (1966). Effect of *Butea frondosa*, *Vernonia anthelmintica*, and *Carica Papaya* against Oxyurids in mice. *Indian Vet. J.* 43: 73-8.

Minja, M.M.J. (1989). Collection of Tanzanian medicinal plants for biological activity studies. In Proceedings of the 7th Tanzania Veterinary Association Scientific Conference, Arusha. 7: 67-78.

Mir, R.A., Chishti, M. A., Zargar, H., Ganie, S.A. (2007). Clinicopathological changes in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *World. J. Agric. Sci.* 3(5): 562-566.

Molan, A.L., Faraj, A.M., (2010). The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: trichostrongylidae). *Folia Parasitol.* 57, 62–68.

Molina-Flores, B. (2004). Medicina etnoveterinaria. Una síntesis bibliográfica. *Vétérinaires sans frontières*. Lyon, 4-26 p.

Muhammad, I., Muhammad, N., Amanat, A., Viqar, A., Munawwer, R. (2013). Phytochemical analyses of *Prosopis juliflora* Swartz DC. *Pak J Bot.* 45(6): 2101-2104.

Munguía-Xóchihua, J., Navarro-Grave, R., Hernández-Chávez, J., Molina-Barrios, R., Cedillo-Cobián, J., Granados-Reyna, J. (2018). Gastroenteric parasites, population *Haemonchus contortus* in goats in semiarid climate of Bacum, Sonora, México. *Abanico Veterinario.* 8(3): 42-50.

Mursof, E.P., He, S. (1991). A potential role of *Papaya latex* as an anthelmintic against patent *Ascaridia galli* in chicken. *Heamara Zoa*, 74: 1-5.

Napar, A., Hadi, B., Muhammad, A.Z. et al. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of Mimosaceae plants; *Acacia modesta* Wall (Phulai), *Prosopis cineraria* (Linn.) and *Prosopis juliflora* (Swartz). *J Med Plants Res.* 6(15): 2962-2970.

Nisbet, A.J., Meeusen, E.N., González, J.F., Piedrafita, D.M. (2016). Immunity to *Haemonchus contortus* and Vaccine Development. *Advances in Parasitology.* 353–396.

Nwude, N., Ibrahim, M.A. (1980). Plants used in traditional veterinary medical practice in Nigeria. *J Vet Pharmacol Ther.* 3(4): 261-73.

O'Connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P. (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet. Parasitol.* 42, 1-15.

Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Zamilpa, A., Mendoza-de Gives, P., Arece-García, J., López-Arellano, M.E., von Son-de Fernex, E. (2017). *In vitro* larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. *Vet Res Commun.* 41, 227-232.

Othman, A.M., Awadh Ali N.A., Saif, A.A and Al-Fadhli, E.A. (2016). Topical herbal antimicrobial formulation containing *Prosopis juliflora* methanol extract. *World Journal of Pharmaceutical Research.* 5(10): 151-163.

Padmaja, V., Thankamany, V and Hisham, A. (1993). Antibacterial, antifungal and anthelmintic activities of root barks of *Uvaria hookeri* and *Uvaria narum*. *J Ethnopharmacol.* 40(3): 181-6.

Palacios, R.A. (2006). Los Mezquites Mexicanos: Biodiversidad y Distribución Geográfica. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 41 (1-2): 99 – 121.

Palacios-Landín, J., Mendoza de Gives, P., Salinas-Sánchez, D.O., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E., Hernández-Velázquez, V.M., Valladares-Cisneros, M.G. (2015). *In vitro* and *in vivo* nematocidal activity of *Allium sativum* and *Tagetes erecta* extracts against *Haemonchus contortus*. *Turkiye Parazitol Derg. Original Investigation.* 39: 1-5.

Palacios-Romero, A., Rodríguez-Laguna, R., Hernández-Flores, M.L., Jiménez-Muñoz, E., Tirado-Torres, D. (2016). Distribución potencial de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex

Willd) M. C. Johnston basada en un modelo de nicho ecológico. *Rev Mex Cienc For.* 7 (34): 35-46 p.

Pasiecznik NM; Felker P; Harris PJ; Harsh LN; Cruz G; Tewari JC; et al. (2001). The *Prosopis juliflora-Prosopis pallida* complex: a monograph. Coventry, UK: HDRA. 172 p.

Peña-Avelino, L.Y., Pinos-Rodríguez, J.M., Yáñez-Estrada, L., Juárez-Flores, B.I., Mejía, R., Andrade-Zaldivar, H. (2014). Chemical composition and *in vitro* degradation of red and white mesquite (*Prosopis laevigata*) pods. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 44 (3): 298.

Peña-Avelino, L.Y., Pinos-Rodríguez, J.M.L., Juárez-Flores, B.I., Yáñez-Estrada, L. (2016). Effects of *Prosopis laevigata* pods on growth performance, ruminal fermentation and blood metabolites in finishing lambs. *S. Afr. J. Anim. Sci.* vol. 46(4), 360.

Pengfei, L., Tiansheng, D., Xianglin, H., Jianguo, W. (2009). Antioxidant properties of isolated isorhamnetin from the sea buckthorn marc. *Plant Food Hum. Nutr.* 64, 141–145.

Pérez-Fernández, R. (2010). Farmacología Veterinaria. Universidad de Concepción. Chile. 350 p.

Perrett, S and Whitfield, P.J. (1995). Atanine (3-dimethylallyl-4-methoxy-2-quinolone), an alkaloid with anthelmintic activity from the Chinese plant *Evodia rutaecarpa*. *Letter, Planta Med.* 61(3): 276-8.

Phillipson, J. D. (2007). Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*, 68 (22-24), 2960–2972.

Piluzza, G., Sulas, L., Bullitta, S. (2014). Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass Forage Sci* 69:32–48.

Pinto, M.D., Ranilla, L.G., Apostolidis, E., Lajolo, F.M., Genovese, M.I., Shetty, K. (2009). Evaluation of antihyperglycemia and antihypertension potential of native Peruvian fruits using *in vitro* models. *J Med food*. 1;12(2): 278-91.

Prabha, D.S; Dahms, H.U; Malliga, P. (2014). Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis spp.*—a. *J Coast Life Med*. 2: 918–924.

Prasad, M. N. V. (2007). Phytoremediation in India. *Phytorem. Methods Biotechnol*. 23(4):435-454.

Preeti, K., Avatar, S., Mala, A. (2015). Pharmacology and therapeutic application of *Prosopis juliflora*: a review. *JPS* 3:234–240.

Quiroz-Romero, H., Figueroa-Castillo, J.A., Ibarra-Velarde, F., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E. (2011). Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Ecología de larvas de nematodos gastrointestinales de bovinos, ovinos y caprinos. México. pp. 254-272.

Quispe, C., Petroll, K., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G. (2014). Antioxidant effect and characterization of South American *Prosopis* pods syrup. *Food Res Int* 56:174–181.

Raghavendra, M.P., Satish, S., Raveesha, K.A. (2009). Alkaloids isolated from leaves of *Prosopis juliflora* against *Xanthomonas pathovars*. *Archiv für Pflanzenschutz* 42: 1033–1041.

Rahate, K.P., Rajasekaran, A. (2018). Isolation and identification of flavone aglycones in roots of *Desmostachya bipinnata*. *Indian J. Pharm. Sci.* 80, 551–556.

Rahman, A.A., Samoylenko, V., Jacob, M.R., Sahu, R., Jain, S.K., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Muhammad, I. (2011). Antiparasitic and antimicrobial indolizidines from the leaves of *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*. *Planta Med.* 77: 1639e43.

Rahmann G., and Seip H. (2007). Bioactive forage and phytotherapy to cure and control endoparasite diseases in sheep and goat farming systems - a review of current scientific knowledge. *Landbauforschung Völkenrode.* 57: 285-295.

Ramírez-Rojo, M.I., Vargas-Sánchez, R.D., Hernández-Martínez, J., Martínez-Benavidez, E et al. (2019). Antioxidant activity of mesquite leaf extracts (*Prosopis velutina*). *Biotecnia.* XXI (1): 113-119.

Rebrassier, R.E. (1934). Pyrethrum as an anthelmintic for *Ascaridia lineata*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 84: 645-8.

Rechab, S.O., Kareru, G.P., Kutima, L.H., Nyagah, C.G., Njonge, K.F., Waithaka, W.R. (2014). Evaluation of *in vitro* ovicidal activity of ethanolic extracts of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC (Fabaceae). *J Pharmacy Biol Sci.* 9(3): 15-18.

Redmond, D.L., Knox, D.P., Newlands, G., Smith, W.D. (1997). Molecular cloning and characterisation of a developmentally regulated putative metallopeptidase present in a host protective extract of *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85, 77–87.

Ringuelet, J and Vina, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales*, 1a ed. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Ríos-Saucedo, J.C., Valenzuela-Núñez, L.M., Trucíos-Caciano, R.X., Martínez-Salvador, M., López-Hernández, J.A., Sosa-Pérez, G., Rosales-Serna, R. (2011). Lineamientos técnicos para el aprovechamiento del mezquite. Importancia de las poblaciones de mezquite en el norte-centro de México. SAGARPA-INIFAP. Libro Técnico 8: 1-195.

Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica* Nuevo León: OmniaScience.

Robertson, S., Narayanan, N., Raj Kapoor, B. (2011). Antitumour activity of *Prosopis cineraria* (L.) Druce against Ehrlich ascites carcinoma-induced mice. *Nat Prod Res* 25(8): 857–862.

Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 69: 299-322.

Rodríguez-Sauceda, E.N., Rojo-Martínez, G.E., Ramírez-Valverde, B., Martínez-Ruiz, R., Cong-Hermida, M.D.LC., Medina-Torres, S.M., Piña-Ruiz, H.H. (2014). Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai*. 10(3):173-193.

Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., de León, A. A. P., Villela, H. S., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Sánchez, H. F., Salas-D.R., Cruz, R.R., Saldierna. F., Carrasco, D. G. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8, 61–74.

Rodríguez-Vivas, R.I. (2015). Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. AMPAVE-CONASA. México, D.F.

Roepke, D.A. (1996). Traditional and re-applied veterinary medicine in East Africa. In McCorkle, C.M., Mathias, E., Schillhorn van Veen, T.W., eds *Ethnoveterinary research and development*. London, Intermediate Technology Publications.

Rogers, W.P., Brooks, F. (1977). The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol*. 7, 61–65.

Rosales, S.R., Valenzuela, N.L.M., Ríos, S.J.C., Jiménez, O.R., Ibarra, F.J.M. (2011). Diversidad genética en poblaciones naturales de mezquite del norte-centro de México. *En: Importancia de las poblaciones de mezquite en el Norte-Centro de México. Libro técnico No. 25. INIFAP. CENID-RASPA. Gómez Palacio, Durango. 3-19 pp.*

Rose, H., Caminade, C., Bolajoko, M.B., Phelan, P., van Dijk, J., Baylis, M., ... Morgan, E. R. (2016). Climate-driven changes to the spatio-temporal distribution of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*, in sheep in Europe. *Global Change Biology*, 22(3): 1271–1285.

Rossi, C.A., De León, M., González, G.L., Pereyra, A.M. (2007). Secondary metabolites presence in ten browse woody plants in the xerophitic woodland in the argentine arid Chaco region. *Trop Subtrop Agroecosyst*. 7(2): 133-143.

Ruiz C.J.G., Hernández, A.I. (2010). *Farmacología para Médicos Veterinarios Zootecnistas* In Press. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 309 p.

Ruiz-Nieto, J.E., Hernández-Ruiz, J., Hernández-Marín, J., Mendoza-Carrillo, J., Abraham-Juárez, M., Isiordia-Lachica, P.M., Mireles-Arriaga, A.I. (2020). Mesquite (*Prosopis* spp.) tree as a feed resource for animal growth. *Agrofores Sys*. 94: 1139 - 1149.

Ruppert, E.E., y Barnes, R.D. (2000). *Zoología de invertebrados*. 6a. ed. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. 288-304 pp.

RZEDOWSKI, J. (1988). Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Bot. Mexicana* 3: 7-18.

Rzedowski, J. (2006). Vegetación de México. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 504 pp.

Rzedowski, J. (2015). Algunas reflexiones en torno al trabajo florístico en México. *Botanical Sciences* 93: (1): 1-2.

Sachdeva, S., Kaushik, V., Saini, V. (2014). A review on phytochemical and pharmacological potential of *Prosopis cineraria*. *Int J Ethnobiol Ethnomed.* 1(1): 1-4.

Salinas-Sánchez, D.O., Arteaga-Nájera, G.L., León-Rivera, I., Dorado-Ramírez, O, Valladares-Cisneros, Ma. G., Navarro-García, V.M. (2009). Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla Sierra Biosphere Reserve in Morelos (México). *Polibotánica.* 28, 213-225.

Salmerón-Manzano, E., Garrido-Cardenas, J.A., and Manzano-Agugliaro, F. (2020). Worldwide research trends on medicinal plants. *Int J Environ Res Public Health*, 17(10), 3376.

Saminathan, M., Gopalakrishnan, A., Latchumikanthan, A., Milton, A.A.P., Aravind, M., Dhama, K., Singh, R. (2015). Histopathological and parasitological study of blood-sucking *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(2): 99-108.

Sánchez, E., Rivas-Morales, C., Castillo, S., Leos-Rivas, C., García-Becerra, L., Ortiz-Martínez, D.M. (2016). Antibacterial and antibiofilm activity of methanolic plant extracts against nosocomial microorganisms. *Evid Based Complementary Altern Med.* 1-8.

Sardari, S., Nishibe, S., Daneshtalab, M. (2000). Coumarins, the bioactive structures with antifungal property. *Bioact. Nat. Prod.* 23. 335-393.

Sathiya, M., Muthuchelian, K. (2010). Evaluation of antioxidant and antitumor potentials of *Prosopis juliflora* DC. leaves *in vitro*. *Pharmacol Online.* 2: 328-43.

Satrija, F., Nansen, P., Bjørn, H., Murtini, S., He, S. (1994). Effect of papaya latex against *Ascaris suum* in naturally infected pigs. *J Helminthol.* 68, 343-6.

Satrija, F., Nansen, P., Murtini, S., He, S. (1995). Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *J Ethnopharmacol.* 48, 161-4.

Sawal, R.K., Ratan, R., Yadav, S.B.S. (2004). Mesquite (*Prosopis juliflora*) pods as a feed resource for livestock - A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 17 (5): 719-725.

Schnieder, T., Heise, M., Epe, C. (1999). Genus-specific PCR for the differentiation of eggs or larvae from gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasitology Research.*; 85: 895-898.

Selemon, M. (2018). Review on Control of *Haemonchus Contortus* in Sheep and Goat. *J Vet Med Res.* 5(5): 1139.

Sen, H.G., Joshi, B.S., Parthasarathy, P.C., Kamat, V.N. (1974). Anthelmintic efficacy of *Diospyrol* and its derivatives. *Arzneimittel Forschung.* 24(12): 2000-2003.

Seo, K., Yang, J.H., Kim, S.C., Ku, S.K., Ki, S.H., Shin, S.M. (2013). The antioxidant effects of isorhamnetin contribute to inhibit COX-2 expression in response to inflammation: A potential role of HO-1. *Inflammation.* 37, 712–722.

Sepúlveda-Vázquez, J., Torres-Acosta J.F., Sandoval-Castro, C.A., Martínez-Puc, J.F., Chan-Pérez J.I. (2018). The importance of secondary metabolites in the control of gastrointestinal nematodes in sheep with emphasis on Yucatán, Mexico. *J. Selva Andina Anim. Sci.* 5(2): 79-95.

Sharma, P.K., Singh, V. (1989). Ethnobotanical studies in Northwest and Trans-Himalaya. Ethnoveterinary medicinal plants used in Jammu and Kashmir, India. *J Ethnopharmacol.* 27(1-2): 63-70.

Sherif, A., Hall, R.G., el-Amamy, M. (1987). Drugs, insecticides and other agents from *Artemisia*. *Med. Hypotheses.* 23(2): 187-93.

Silva, A.M.M., Silva, A.R., Pinheiro, A.M., Freitas, S.R.V.B., Silva, V.D.A., Souza, C.S., Hughes, J.B., El-Bachá, R.S., Costa, M.F.D., Velozo, E.S., Tardy, M and Costa, S.L. (2007).

Alkaloids from *Prosopis juliflora* leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate NO production. Elsevier. *Toxicon* 49. 601–614 p.

Silva, V.D.A., Pitanga, B.P.S., Nascimento, R.P., Souza, C.S., Coelho, P.L.C., Menezes-Filho, N., Costa, S.L. (2013). Juliprosopine and Juliprosine from *Prosopis juliflora* leaves induce mitochondrial damage and cytoplasmic vacuolation on cocultured glial cells and neurons. *Chem Res Toxicol.* 26(12): 1810–1820.

Sirmah, P., Dumarçay, S., Masson, E., Gerardin P. (2009). Unusual amount of (-)-mesquitol from the heartwood of *Prosopis juliflora*. *Nat Prod Res.* 23: 183-189.

Smith, T.S., Graham, M., Munn, E.A., Newton, S.E., Knox, D.P., Coadwell, W., McMichael-Phillips, D., Smith, H., Smith, W., Oliver, J.J. (1997). Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Biochimica Biophysica Acta* (BBA), 1338, 295–306.

Smith, W.D and Zarlenga, D.S. (2006). Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139(4): 347–359.

Smith, W.D., Smith, S.K., Murray, J.M. (1994). Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol.* 16, 231–241.

Soca, M., Roque, E., Soca, M. (2005). Epizootiología de los nematodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes. *Pastos y Forrajes.* 28(3): 175-185.

Sofowora, A. (1982). *Medicinal plants and traditional medicine in Africa*. Chichester, UK, John Wiley and Sons.

Solowey, E. (2007). Phytoremediation of soil deficiencies in arid and saline area by nitrogen fixing arboreal legumes. *In: Golan, A. (Ed.). Nutrient biofortification and exclusion of pollutants in food plants, COST Action 859. Ben-Gurion University of the Negev, Sede-Boqer Campus, Israel. 54 p.*

Sommerville, R.I., Rogers, W.P. (1987). The nature and action of host signals. *Adv. Parasitol.* 26, 239–293.

Sumano L.H.S y Ocampo C.L. (2006). *Farmacología veterinaria*. 3ra ed. México. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 451-603 pp.

Sundararaju, P., Cannayane I. (2002). Antinemic activity of plant extracts against *Pratylenchus coffeae* infecting banana. *Ind J Nematol.* 32(2): 121-124.

Taisma, M.A. (2017). Usos medicinales de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. en comunidades rurales de la península de Paraguaná, Venezuela. *Rev. Peru Biol,* 24(1): 79-86.

Tapia, A., Egly F.G., Bustos, D., Astudillo, L., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G. (2000). Biologically active alkaloids and a free radical scavenger from *Prosopis* species. *J Ethnopharmacol.* 71(1-2): 241-246.

Taylor, M.A., Coop R.L., Wall, R.L. (2016). *Veterinary Parasitology* 4rd Edn. Ames, IA: Blackwell Publishing Ltd.

Taylor, M.A., Coop, R.L. and Wall, R.L. (2007). Parasites of sheep and goats. In *Veterinary Parasitology* (3rd ed.). Oxford, Blackwell Publishing. 158-159 pp.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology*, third ed. Blackwell

Thompson, D.P., Geary, T.G. (1995). The structure and function of helminth surfaces. *Biochem Mol Biol Parasites*. 203–232.

Torres-Acosta J.F., Molento, M., Mendoza-de Gives P. (2012). Research and implementation of novel approaches for the control of nematode parasites in Latin America and the Caribbean: is there sufficient incentive for a greater extension effort? *Vet Parasitol*. 186(1-2) 132-42.

Ukande, M., Shaikh, S., Murthy, K and Shete, R. (2019). Review on Pharmacological potentials of *Prosopis juliflora*. *J drug deliv ther* 9(4-s): 755-760.

Valli, S., Gokulshankar, S., Mohanty, B.K., Ranjit, M.S., Ashutosh, S.R., Remya, V. (2014). Antistreptococcal activity of alkaloid rich fraction of leaves of *Prosopis juliflora* future promising supplementary therapy for Cryptococcosis and *Cryptococcal meningitis*. *Int J Pharm Pharmacol Sci*. 6(2): 490-495.

Van Dijk, C., Driessen, A.J., Recourt, K. (2000). The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochem. Pharmacol*. 60. 1593–1600.

Van Dijk, J., Sargison, N.D., Kenyon, F., Skuce, P.J. (2010). Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. *Animal*. 4(3), 377-392.

Vanhoy, G., Carman, M., Habing, G., Lakritz, J., Hinds, C.A., Niehaus, A., Kaplan, R.M., Marshy, A.E. (2018). Safety and serologic response to a *Haemonchus contortus* vaccine in alpacas. *Vet. Parasitol.* 252, 180–186.

Várady, M., Papadopoulos, E., Dolinská, M., y Königová, A. (2011). Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: sheep versus goats. *Helminthologia*. 48, 137–144.

Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A; Hoste, H., Chan-Pérez, J.I. (2014). Anthelmintic activity of acetone–water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Vet. Parasitol.* (3-4): 322-327.

Vázquez, Prats, V.M., Flores, C.J., Santiago, V.C., Herrera, R.D., Palacios, F.A., Liébano, H.E. (2004). Frecuencia de nematodos gastroentéricos en bovinos de tres áreas de clima subtropical húmedo de México. *Técnica Pecuaria en México*. 42:237-245.

Villegas-Espinoza, J.A., Rueda-Puente, E.O., Murillo-Amador, B., Puente, M.E., Ruiz-Espinoza, F.H., Zamora-Salgado, S y Beltran-Morales, F.A. (2014). Bacterias promotoras de

crecimiento de plantas autóctonas y su efecto en *Prosopis chilensis* (Molina) Stunz. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 5(6):1041-1053.

von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M. A., Valles-de la Mora, B., Capetillo-Leal, C. M. (2012). *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*, 131(4), 413–418.

von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M.A., Valles de la Mora, B., Mendoza-de Gives, P., González-Cortazar, M., Zamilpa, A. (2017). Anthelmintic effect of 2H-chromen-2-one isolated from *Gliricidia sepium* against *Cooperia punctata*. *Exp Parasitol.* 178, 1–6.

von Son-de-Fernex, E., Alonso-Díaz, M.A., Mendoza de Gives, P., Valles de la Mora, B., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Castillo Gallegos, E. (2015). Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *VETPAR-7795*; 1-7.

Waller, P.J and Chandrawathani, P. (2005). *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Trop Biomed.* 22(2): 131–137.

Wang, C., Li, F., Zhang, Z., Yang, X., Ahmad, A.A., Li, X., Du, A., Hu, M. (2017). Recent research progress in China on *Haemonchus contortus*. *Front. Microbiol.* 8. 1509.

Watanabe, C.M.H., Wolfram, S., Ader, P., Rimbach, G., Packer, L., Maguire, J.J., Gohil, K. (2001). The *in vivo* neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 6577–6580.

Zacharias, F., Guimarães, J.E., Araújo, R.R., Almeida, M.A., Ayres, M.C. (2008). Effect of homeopathic medicine on helminth parasitism and resistance of *Haemonchus contortus* infected sheep. *Homeopathy*. 97(3): 145-151.

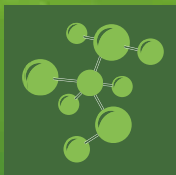
Zajac, A.M. (2006). Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 22, 529–541.

Zarza-Albarrán, M.A., Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Mendoza-de-Gives, P., González-Cortazar, M., Tapia-Maruri, D., Mondragón-Ancelmo, J., García-Hernández, C., Blé-González, E.A., Zamilpa. (2020). A galloyl flavonoids from *Acacia farnesiana* pods possess potent anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. *J. Ethopharmacol*. 249, 112402.

Zhao, J. (2015). Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom. *Trends Plant Sci*. 20. 576–585.

Zuo, A., Yu, Y., Jing, L., Xu, B., Yu, X., Qiu, Y., Cao, S. (2011). Study on the relation of structure and antioxidant activity of isorhamnetin, quercetin, phloretin, silybin and phloretin isonicotinyl hydrazone. *Free Radic.Antioxid*. 1, 39–47.

IMPACT
FACTOR
4.694

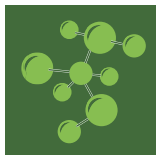


biomolecules

an Open Access Journal by MDPI



Academic Open Access Publishing
since 1996



an Open Access Journal by MDPI








Editor-in-Chief

Assoc. Prof. Dr. Vladimir N. Uversky

Message from the Editor-in-Chief

Biomolecules is a multidisciplinary open-access journal that reports on all aspects of research related to biogenic substances, from small molecules to complex polymers. We invite manuscripts of high scientific quality that pertain to the diverse aspects relevant to organic molecules, irrespective of the biological question or methodology. We aim for a competent, fair peer review and rapid publication. Please look at some of the exciting work that has been published in *Biomolecules* so far. We would be delighted to welcome you as one of our authors.

Author Benefits

-  **Open Access** Unlimited and free access for readers
-  **No Copyright Constraints** Retain copyright of your work and free use of your article
-  **Rapid Publication** First decision provided to authors approximately 18 days after submission; acceptance to publication is undertaken in 7.89 days (median values for papers published in this journal in 2018)
-  **Thorough Peer-Review**
-  **Coverage by Leading Indexing Services** SCIE-Science Citation Index Expanded (Clarivate Analytics), MEDLINE (NLM), PubMed Central, EMBASE and Scopus (Elsevier), CAS - Chemical Abstracts
-  **No Space Constraints, No Extra Space or Color Charges** No restriction on the length of the papers, number of figures or colors
-  **Discounts on Article Processing Charges (APC)** If you belong to an institute that participates with the MDPI Institutional Open Access Program

Aims and Scope

Biomolecules (ISSN 2218-273X) is an international, peer-reviewed journal focusing on organic molecules and their functions, structures, systems properties, environment, and interactions with other molecules. *Biomolecules* publishes original research papers, short communications, and cutting-edge reviews.

The scope of *Biomolecules* is broad and multi-disciplinary, including:

Small molecules: lipids, sterols, carbohydrates, vitamins, hormones, neurotransmitters, metabolites

Monomers: amino acids, nucleotides

Polymers: peptides, proteins, nucleic acids, polysaccharides, lignin, glycoproteins

Diverse approaches covered: biochemical, structural, molecular, cell biology, genetic, physiological, and computational approaches

Editorial Office

Biomolecules Editorial Office
biomolecules@mdpi.com
MDPI, St. Alban-Anlage 66
4052 Basel, Switzerland
Tel: +41 61 683 77 34
Fax: +41 61 302 89 18
www.mdpi.com
mdpi.com/journal/biomolecules

MDPI is a member of




Follow Us

 facebook.com/MDPIOpenAccessPublishing

 twitter.com/MDPIOpenAccess

 linkedin.com/company/mdpi

 weibo.com/mdpicn

 Wechat: MDPI-China

 blog.mdpi.com

MDPI
St. Alban-Anlage 66
CH-4052 Basel
Switzerland
Tel: +41 61 683 77 34
Fax: +41 61 302 89 18



www.mdpi.com


mdpi.com/journal/biomolecules

See www.mdpi.com for a full list of offices and contact information. MDPI AG is a company registered in Basel, Switzerland, No. CH-270.3.014.334-3, whose registered office is at St. Alban-Anlage 66, CH-4052 Basel, Switzerland.

Basel, June 2019

Article

Isorhamnetin: A Nematocidal Flavonoid from *Prosopis laevigata* Leaves Against *Haemonchus contortus* Eggs and Larvae

Edgar Jesús Delgado-Núñez ^{1,2}, Alejandro Zamilpa ³, Manasés González-Cortazar ³, Agustín Olmedo-Juárez ⁴, Alexandre Cardoso-Taketa ¹, Ernesto Sánchez-Mendoza ⁵, Daniel Tapia-Maruri ⁶, David Osvaldo Salinas-Sánchez ^{7,*} and Pedro Mendoza-de Gives ^{4,*}

¹ Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma de Morelos, Doctorado en Ciencias Naturales (CEIB-UAEM) Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos CP 62209, México; edgarjezus@gmail.com (E.J.D.-N.); ataketa@uaem.mx (A.C.-T.)

² Unidad Académica, Preparatoria No. 10, Universidad Autónoma de Guerrero, Carretera Nacional Iguala-Taxco, s/n, Iguala, Guerrero CP 40000, México

³ Centro de Investigación Biomédica del Sur, CIBIS-IMSS, Argentina 1, Col Centro, Xochitepec, Morelos CP 62790, México; azamilpa_2000@yahoo.com.mx (A.Z.); gmanases2000@gmail.com (M.G.-C.)

⁴ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI-INIFAP), Carretera Federal Cuernavaca-Cuatla No. 8534, Col. Progreso C.P. 62550 Jiutepec, Morelos A.P. 206-CIVAC, México; aolmedoj@gmail.com

⁵ Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, CDMX CP 04960, México; ersame@yahoo.com

⁶ Departamento de Biotecnología, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Carretera Yautepec-Jojutla Km 6, Calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos CP 62731, México; dmaruri@ipn.mx

⁷ Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC-UAEM), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos CP 62209, México

* Correspondence: davidos@uaem.mx (D.O.S.-S.); pedromdmgives@yahoo.com (P.M.-d.G.); Tel.: +52-5577715510074 (D.O.S.-S.); +52-5573192860 (ext. 124) (P.M.-d.G.)

Received: 24 March 2020; Accepted: 13 May 2020; Published: 15 May 2020



Abstract: *Haemonchus contortus* affect small ruminants all over the world. Anthelmintics cause resistance, contamination, and a risk of public health. *Prosopis laevigata* is a plant used as a home remedy against many diseases in Mexico. This study arose from a preliminary study where a *P. laevigata* hydroalcoholic extract (*Pl-hae*) showed anthelmintic activity (*aa*) against *H. contortus*. Searching for bioactive compounds (*bac*) with high *aa*, the *Pl-hae* was fractioned obtaining an aqueous (*Aq-F*) and an ethyl acetate fraction (*EtAc-F*), and a flavonoid with *aa* identified as isorhamnetin was obtained from *EtAc-F*. Both fractions were in vitro assessed by the egg hatch test (*eht*) and larval mortality (*lm*) assays. The *bac* obtained from *EtAc-F* were characterised by NMR analysis. The highest *aa* were recorded with *EtAc-F*, resulting in 100% *eht* and 80.45% *lm* at 0.75 and 30 mg/mL, respectively. Alterations in eggs and larvae attributed to isorhamnetin were recorded by environmental scanning electron microscopy, confocal laser scanning and by high-resolution digital-coupled camera. This flavonoid caused 100% *eht* at 0.07 mg/mL after 48 h and 100% *lm* at 7.5 mg/mL after 72 h exposure. Isorhamnetin has promising potential as an anthelmintic against sheep haemonchosis.

Keywords: *Prosopis*; flavonoid; isorhamnetin; nematocidal activity; *Haemonchus*

1. Introduction

Haemonchus contortus is the most pathogenic parasitic nematode; it feeds on the blood of animals and causes severe anaemia capable of killing animals [1]. The regular administration of anthelmintic chemical drugs to animals is a common practice used by farmers to control this parasite [2]. However, this strategy has disadvantages; for instance, it promotes anthelmintic resistance in parasites [3]. Furthermore, drug residues can remain in the milk and meat of treated animals [4,5], and once the drugs are eliminated through the urine or faeces of treated animals they can contaminate the soil or water, which is hazardous to the environment [6]. Plants with medicinal properties are increasingly of interest to farmers, who are searching for alternative methods to control the parasites that do not contain the undesirable features possessed by chemical anthelmintic drugs [7]. *Prosopis laevigata* (Fabaceae), also called “Mezquite”, is a leguminous tree found throughout a wide region of arid and semi-arid zones of Mexico and other parts of the world [8]. Medicinal properties, such as antibacterial [9], antimicrobial [10], fungicidal [11], antioxidant [12], and anti-inflammatory [13] activities of the plant were previously recorded. On the other hand, the genus *Prosopis* has been used to treat several diseases including ulcers and parasitosis [14] and it has been also used as a traditional remedy by rural communities of the Paraguaná peninsula in Venezuela to control gastrointestinal parasitic worms [15]. There are only a few studies about the nematocidal activity of *P. laevigata* extracts against ruminant parasitic nematodes. In a study by López-Aroche et al. [16] an important in vitro activity against *H. contortus* infective larvae was reported; and later on, the anthelmintic efficacy of a *P. laevigata* *n*-hexane extract reduced the *H. contortus* parasitic burden in gerbils that was used as an in vivo model of study [17]. This information opened new expectations to keep ahead with exploring the potential anthelmintic effect of extracts/fractions/compounds of this plant. The objectives of the present study were to evaluate the in vitro nematocidal activity of fractions obtained from a hydroalcoholic extract from *P. laevigata* leaves against eggs and larvae of *H. contortus* as well as and to identify main compounds associated with anthelmintic activity.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

The *P. laevigata* leaves (4.6 kg) were collected in the community of Huixtla, Morelos State, Mexico. This area belongs to the Sierra de Huautla Biosphere Reserve, Morelos (18°28′45″ N and 99°8′41″ W). Samples were collected in April and May of 2017. A specimen was deposited at the Herbarium of the Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) (Voucher number: 34873), and it was taxonomically identified by MSc Gabriel Flores Franco, at Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC-UAEM).

2.2. *Prosopis laevigata* Hydroalcoholic Extract Obtaining and Chemical Fractioning

Fresh *P. laevigata* leaves were dried under dark conditions at 25–28 °C for 5d. The dry leaves (4.6 kg) were ground and placed in 46 L crystal containers. Extraction using ground leaves was performed using water-ethanol (70:30%), which was maintained for 24 h at room temperature (18–25 °C). Extracts were filtered through a Whatman no. 4 paper and the solvent was removed by low-pressure distillation using a rotatory evaporator (45–50 °C, Büchi R-300, Flawil, Switzerland) to obtain a semi-solid extract that was finally lyophilised. The extract was kept at 4 °C for biological and phytochemical assays [18]. The hydroalcoholic extract was partitioned using liquid-liquid fractionation (1:1 *v/v*) with an immiscible mixture of water and ethyl acetate (1000 mL each, Merck, Germany) giving two fractions: an aqueous (Aq-F) and an ethyl acetate (EtAc-F). Both fractions were dried using low-pressure distillation and were totally dried using the lyophilisation process (Labconco, Kansas, MO, USA). The in vitro anthelmintic activities of the two fractions were evaluated using *H. contortus* eggs and larvae as biological models.

2.3. Isolation, Purification and Identification of Isorhamnetin from the *P. laevigata* Active Fraction (EtAc-F)

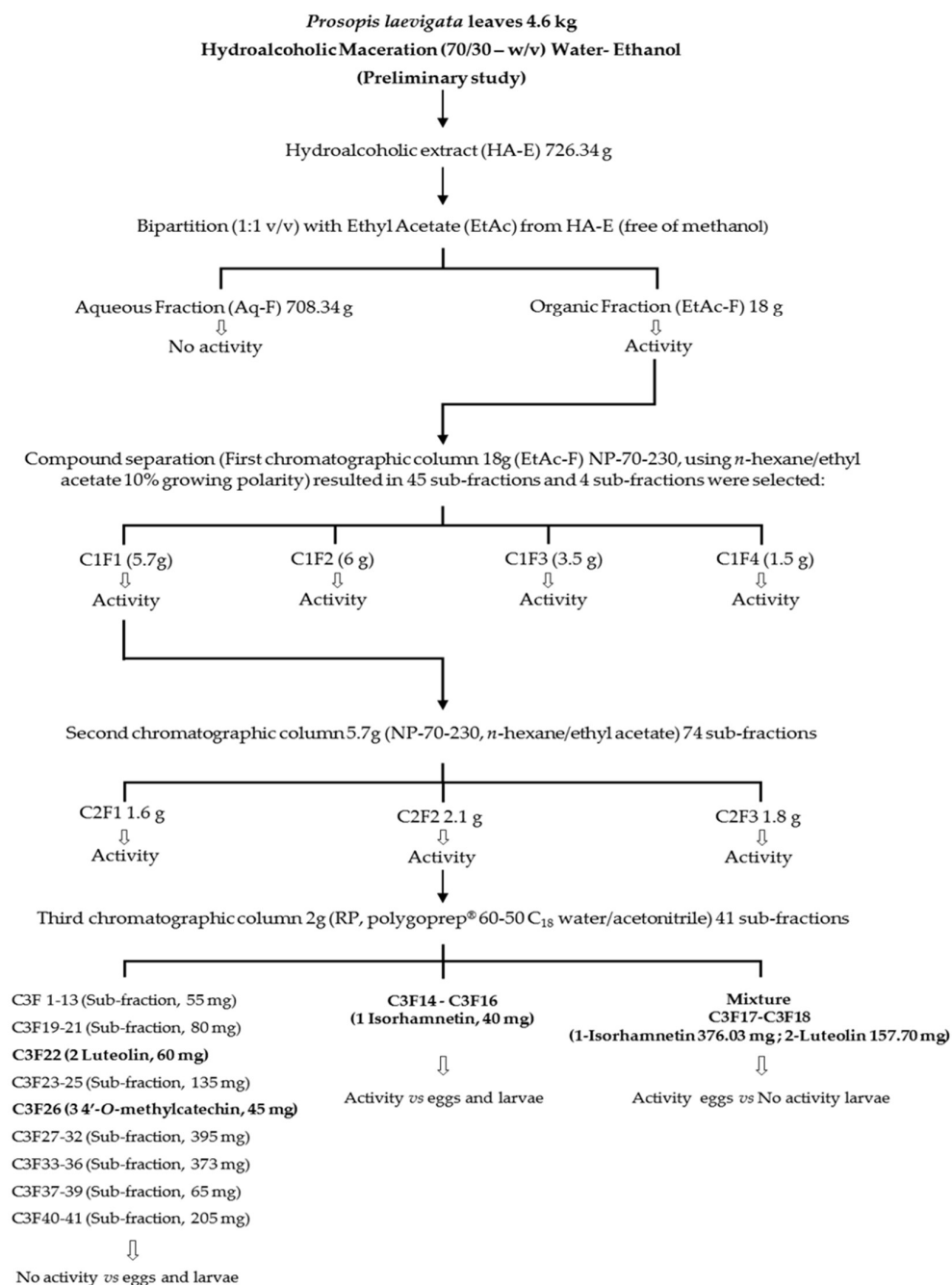
The most active fraction (EtAc-F, 18 g) was processed using chromatographic techniques with silica gel in an open column (200 g, 70–230 mesh; Merck, Darmstadt, Germany). Then, the solution was eluted using a gradient system with *n*-hexane/ethyl acetate/MeOH, with growing polarity as mobile phase starting with 100% *n*-hexane and ending with 100% methanol. Forty-five, 300 mL fractions were obtained. Fractions were grouped depending on their chemical similarity, which was monitored using thin layer chromatography (TLC) and were concentrated using a rotatory evaporator at low pressure. As a result, four final sub-fractions were obtained and recorded as follows: C1F1 (5.7 g), C1F2 (6.0 g), C1F3 (3.5 g), and C1F4 (1.5 g). All fractions and sub-fractions were analysed via TLC on a silica gel 60 F254 (Merck, Germany) using UV light at 254 and 360 nm. All fractions were assessed via *in vitro* anthelmintic assays. The most active fraction (C1F1, 5.7 g) was subjected to chromatographic fractionation in a glass column with silica gel. The sample (30 g) was placed on a silica gel column (200 g, 70–230 mesh; Merck, Darmstadt, Germany). A gradient of *n*-hexane and ethyl acetate was used as a mobile phase, from which 74 fractions were obtained. These fractions were grouped according to their similarity as determined by TLC analysis, resulting in three sub-fractions (C2F1, C2F2 and C2F3), which were evaluated in the bioassays. These three sub-fractions resulted with the same high larval mortality activity. After the LC50 analysis, these three sub-fractions resulted without any statistical difference among them; so sub-fraction (C2F2, 2 g) was selected from the other two, because we had a bit more amount of sample of this sub-fraction to keep ahead with its chromatographic process using a normal phase column (30 g, 70–230 mesh; Merck, Germany). A water/acetonitrile gradient system was used as mobile phase, starting with 100% of H₂O and ending with 100% CH₃CN to elute the column polygoprep® 60–50 C18, and 41 fractions were collected. Fractions 14, 15 and 16 were combined to eventually yield a solid yellow powder (1, 40 mg). Fractions 17 and 18 produced a mixture of compounds (1, isorhamnetin 376.03 mg and 2, luteolin 157.70 mg giving a total of 533.73 mg), fraction 22 contained compound 2, (60 mg), meanwhile, the fraction 26 produced compound 3 (45 mg) (See Scheme 1). Compound identification was carried by ¹H and ¹³C NMR analysis, using an Agilent DD2-600 spectrometer with one NMR probe at 25°C in CD₃OD and DMSO-D₆ (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, MA, USA) as a solvent and TMS as reference. Note: 1, 2 and 3 NMR spectra are available as Supplementary Materials.

2.4. Chemical Group Identification in *P. laevigata* Hydroalcoholic Extract (HA-E) and Fractions

The *P. laevigata* HA-E and its fractions were phytochemically characterised to determine the presence of alkaloids, volatile coumarins, flavonoids, condensed tannins, terpenes/sterols and saponins (see Chemical group identification as Supplementary Materials).

2.5. Analysis of Extracts, Fractions and Compounds 1–3 by HPLC

Chromatographic analysis by HPLC was performed using a Waters 996 HPLC module, equipped with a photodiode array detector and EmpowerPro software (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Chemical separation was achieved using a Supelcosil LC-F column (4.6 mm × 50 mm), with a 5-µm particle size, (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA). The mobile phase consisted of 0.5% trifluoroacetic acid aqueous solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B) in a gradient system (0–1 min, 0% B; 2–3 min, 5% B; 4–20 min, 30% B; 21–23 min, 50% B; 24–25 min, 80% B; 26–27 100% B; 28–30 min, 0% B). The flow rate was maintained at 0.9 mL/min. The injection volume was 10 µL. The photodiode array detector was set at a wavelength of 310 nm for the identification phenolic compounds.



Scheme 1. Bio-guided fractioning process to identify compounds with anthelmintic activity from *Prosopis laevigata* leaves against *Haemonchus contortus* eggs and larvae (L₃).

2.6. MS Analysis of Compounds 1–3

Molecular weights of the isolated compounds (1–3) were determined in Waters triple quadrupole mass spectrometer (MS) (Milford MA, EE. UU), equipped with an electrospray ionisation (ESI). The ionisation source was heated to 150 °C. The desolvation temperature was 450 °C and the nitrogen gas flow rate was 900 L/h. Argon was used as a collision gas at a flow rate of 0.10 mL/min (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

2.7. *Haemonchus contortus* Eggs and Larvae Obtaining

The eggs of the parasite were obtained from a *H. contortus* artificially infected lamb (INIFAP strain). One 3-month-old, parasite free, with 22 kg body weight, male lamb, was orally infected with

approximately 350 *H. contortus* infective larvae per kg body weight. After a 21-day, pre-patent period, faeces were collected directly from the rectum of the animal. The parasite egg extraction procedure was performed according to von Son-de Fernex et al. [19]. The infective larvae of the parasite were obtained from faecal cultures, using the Baermann technique [20]. After a 7-day incubation period at room temperature (18–25 °C), infective larvae were recovered from faecal cultures using a Baermann funnel apparatus for 12 h. The recovered larvae were washed using differential gradient centrifugation with 40% saccharose solution. Larvae were exsheathed with 0.187% sodium hypochlorite solution. Then, exsheathed larvae were washed by centrifugation with water to eliminate sodium hypochlorite residues. Clean larvae were re-suspended in sterile distilled water and immediately were used for mortality assay. The egg-donor lamb was maintained under controlled conditions according to principles of animal welfare and the elimination of unnecessary animal suffering, which are Good Management Practices policies well established at INIFAP. The Norma Oficial Mexicana (Official Mexican Standard) with official rule number NOM-052-ZOO-1995 (<http://www.senasica.gob.mx>), as well as the Ley Federal de Sanidad Animal (Federal Law for Animal Health) DOF 07-06-2012 (<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/118761/LFSA.pdf>) were strictly abided and all the procedures performed in this study were carried out in accordance with the ethical standards outlined by INIFAP.

2.8. Assessment of Larval Mortality by A Bio-Guided Assay

The assay was performed in 96-well microtiter plates (4 wells per treatment). This experiment was performed by triplicate. Treatments were established according to the following sequential steps: Step 1) Aq-F and EtAc-F (10, 20, 30, 40, and 50 mg/mL); Step 2) sub-fractions corresponding to column 1 (C1F1-C1F4) at 3.75–15.00 mg/mL, sub-fractions of column 2 (C2F1-C2F3) at 1.80–15 mg/mL and compounds (**1**, **2** and **3**, as well as a mixture of **1** and **2**) at 0.60–15.00 mg/mL. Each step was assessed using two proper negative controls (distilled water to dissolve Aq-F and 4% methanol to dissolve EtAc-F, sub-fractions, and compounds) and an anthelmintic (ivermectin, 0.5 mg/mL) as a positive control.

Fifty microliters of an aqueous suspension containing approximately 150 *H. contortus* exsheathed infective larvae were deposited into each well (n = 4 wells). Additionally, 50 µL of the corresponding fractions, sub-fractions, compounds, and controls were added to each well. Then, the plates were incubated at room temperature (18–25 °C) for 72 h [21]. After incubation, ten 10-µL aliquots were removed from each well and deposited onto a slide for microscopic examination. Both dead and live larvae were counted according to criteria described by Olmedo-Juárez et al. [18]. The mortality rate was expressed as a mortality percentage and was calculated according to the following formula:

$$\text{Mortality} = [(\text{dead larvae mean}) / (\text{live larvae mean} + \text{dead larvae mean})] \times 100$$

2.9. Assessing the Egg Hatch Test Using *P. laevigata* Compounds

This assay was carried out in 96-well microtiter plates. Fifty microliters of an aqueous suspension containing approximately 100 *H. contortus* eggs were deposited in each well of the plate (n = 4 wells per treatment). The experiment was performed by triplicate. Fifty microliters of the corresponding compound (**1**, **2** or **3**) were also deposited in their corresponding well. Treatments were established at 0.3, 0.15 and 0.07 mg/mL. Proper controls were used throughout the experiment, which included 2% MeOH and distilled water as negative controls and 0.5 mg/mL of ivermectin as positive control. Plates were incubated at room temperature (18–25 °C) for 48 h [22]. The egg hatch test percentage (EHT) was estimated using a formula described by Coles et al. [23].

$$\% \text{ EHT} = [(\text{number of eggs}) / (\text{number of larvae} + \text{number of eggs})] \times 100$$

2.10. Examination of *H. contortus* Eggs and Larvae Using Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Morphological changes in eggs and larvae post-exposure to bioactive compounds were visualised in detail using two microscopy techniques: ESEM and CLSM. First, ESEM was performed using a Carl Zeiss microscope, Model EVO LS10 (Munich, Germany). Samples were mounted on aluminium stubs and attached using double-sided carbon conductive tape and a retro-disperse electron detector set at 20 kV and 20 Pa pressure. Stubs were directly observed and images were captured at 200× and 1000× magnification in TIFF format (2048 × 1536 pixels). Second, CLSM was performed using A Carl Zeiss microscope, Model LSM 800 (Munich, Germany). Samples were mounted on glass slides and were observed in lambda mode in which a sequence of images was collected at laser wavelengths of 405 nm, 488 nm, 561 nm and 640 nm (4% capacity). The ZEN 2.6 Zeiss Blue edition software was used. Images were taken at 20× and 40× magnification with the Apochromatic Plan, 1.3 numerical opening and 1 Airy Unit (AU) of a pinhole opening. The images were obtained at a 2048 × 2048-pixel resolution in TIFF format. For colour photographs of samples mounted on glass slides and observed via confocal microscopy as previously described were taken using a coupled HD camera (AxioCam, Carl Zeiss, Model 305, colour, Göttingen, Germany)

2.11. Statistical Analysis

Egg hatch test and larval mortality percentages were normalised using the square root transformation and analysed based on a completely random design through an analysis of variance (ANOVA). Differences among means were compared using the Tukey test ($p < 0.05$). In addition, 50% and 90% lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) were determined with the PROC PROBIT procedure included within the SAS statistic package [24].

3. Results

3.1. HA-E and Fraction Yields

Crude hydroalcoholic extract (HA-E) yielded 726.34 g (15.79%) of a brown powder. Additionally, when HA-E was partitioned, EtAc-F and the Aq-F sub-fractions produced yields of 2.48% (18 g) and 97.52% (708.34 g), respectively.

3.2. Preliminary Phytochemical Screening of HA-E, Aq-F and EtAc-F

HA-E, Aq-F and EtAc-F fractions from *P. laevigata* leaves contained alkaloids, flavonoids, tannins, triterpenes or sterols, and saponins (Table 1).

Table 1. Groups of metabolites identified from *Prosopis laevigata* leaves using general chemical reaction assays.

Metabolite Group	Reagent	Colorimetric Reaction	AH-E	Aq-F	EtAc-F
Alkaloids	Dragendorff		+++	+++	+
	Mayer	Turbidity or precipitate	+++	+++	+
	Wagner	(red to orange, white to cream and brown)	+++	+++	+
Coumarins	Bornträger	Yellow fluorescence (UV)	-	-	-
Flavonoids	Mg ²⁺ and HCL	Red, orange and violet	++	-	+++
	Ferric chloride	Hydrolysable tannins (blue)	-	-	-
Tannins		Condensed tannins (green)	+++	+	+++
	Confirmation				
	Solution of gelatine	Precipitate white	+	+	+
	Gelatine and saline solution	Precipitate white	+	+	+
	Saline solution	Precipitate white	-	-	-
Triterpenes/sterols	Liebermann-Burchard	Green, blue-red (sterols)	-	-	+
	Salkowski	Yellow, red to purple (triterpenes)	-	-	+
	Salkowski (modified)	Yellow to red (triterpenoidal/steroidal saponins)	+	+	+
Saponins	Water	Foam formation	+	++	-

(-) Not detected (+) light positive reaction (++) positive reaction (+++) strong positive reaction.

3.3. Assessment of the Larvicidal Activity of Aq-F and EtAc-F

The nematocidal activity of Aq-F and EtAc-F against *H. contortus* larvae is shown in Table 2. The Aq-F did not show activity against the parasite at the tested concentrations. On the other hand, the EtAc-F produced the highest larvicidal effect and the concentration of 50 mg/mL resulted in 96.01% mortality.

Table 2. Results of the in vitro lethal assessment of two fractions from *Prosopis laevigata* leaves, aqueous fraction (Aq-F) and ethyl acetate fraction (EtAc-F) against *Haemonchus contortus* infective larvae (L₃) after 72 h confrontation.

Treatment	Mean of Recovered Larvae Dead Larvae/Total	% Mortality (\pm SD)
First step (Fractioning for larvicidal activity)		
Aqueous fraction (Aq-F) (mg/mL)		
50	0.75/105.62	0.72 \pm 0.67 ^g
40	0.62/104.4	0.60 \pm 49 ^g
30	0/104.25	0 ^g
20	0/104.62	0 ^g
10	0/103.87	0 ^g
Ethyl acetate fraction (EtAc-F) (mg/mL)		
50	72.5/75.3	96.01 \pm 0.75 ^b
40	93.5/101.25	92.32 \pm 0.87 ^c
30	81.8/101.55	80.45 \pm 0.83 ^d
20	82.5/109.87	75.13 \pm 0.81 ^e
10	34.3/110.55	31.12 \pm 0.76 ^f
Distilled water	0.7/86.7	0.9 ^g
MeOH (4%)	1.5/69.4	2.98 \pm 0.26 ^f
Ivermectin (0.5 mg/mL)	81/81	100 ^a
Variation coefficient		1.17
R ²		0.99

Note: Means with different letter into same column indicate statistic differences ($p < 0.05$); MeOH = Methanol; SD = Standard Deviation.

3.4. Larvicidal Activity of Sub-Fractions and Compounds

The mortality percentages corresponding to the sub-fractions C1F1, C1F2, C1F3, C1F4, C2F1, C2F2, C2F3 and compounds 1 isorhamnetin, 2 luteolin, 3 4'-O-methylcatechin and mixture of 1 and 2); as well as the LC₅₀ are shown in Table 3. The treatments with C1F1, C1F2, C1F3 and C1F4 produced larval mortalities of 79.4%, 24.4%, 6.8% and 5.7%, respectively. On the other hand, the C2F1 and C2F2 sub-fractions resulted in the total larval mortality (100%) at 7.5 mg/mL. Meanwhile, the C2F3 showed mortality close to 95% at the same concentration. Finally, the compound 1 displayed a total larvicidal effect at 7.5 and 15 mg/mL. Likewise, lower concentrations also resulted in high larval mortalities: 3.7 mg/mL = 88.2% and 2.5 mg/mL = 68.15%. Meanwhile, the 2 and 3 as well as the mixture (1 and 2) had a null larvicidal effect (Table 3).

Table 3. In vitro mortality percentages and lethal concentration (95%) attributed to the effect of four *Prosopis laevigata* sub-fractions and compounds derived from EtAc-F against *Haemonchus contortus* infective larvae (L₃).

Sub-Fractions and Compound (Step 2)	Mean of Recovered Larvae Dead Larvae/Total	% Mortality ±SD	Lethal Concentrations 95% (CI Limits Lower-Upper)	
			LC ₅₀ (mg/mL)	LC ₉₀ (mg/mL)
C ₁ F1 (mg/mL)				
15	67.5/84.75	79.47 ^b		
7.5	18.15/76.75	24.12 ^d		
3.7	8/77.2	10.47 ^d		
C ₁ F2 (mg/mL)				
15	11.2/70	24.45 ± 2.44 ^d		
C ₁ F3 (mg/mL)				
15	4.5/66.25	6.82 ± 0.72 ^e		
C ₁ F4 (mg/mL)				
15	3/78.5	5.75 ± 2.56 ^e		
C ₂ F1 (mg/mL)				
15	127.5/0	100 ^a		
7.5	126.5/0	100 ^a	2.82	3.82
3.75	107.5/122.5	87.8 ± 3.46 ^b	(2.72–2.92)	(3.69–3.96)
1.87	2/120	2.27 ± 0.45 ^e		
C ₂ F2 (mg/mL)				
15	120.0/0	100 ^a		
7.5	121/0	100 ^a	2.68	3.84
3.7	101.5/115	88.2 ± 0.47 ^b	(2.45–2.86)	(3.67–4.02)
1.8	10.75/107.5	10.0 ± 0.77 ^d		
C ₂ F3 (mg/mL)				
15	117/0	100 ^a		
7.5	109.7/116.5	94.22 ± 1.63 ^b	3.04	5.66
3.7	77.7/115.2	67.47 ± 1.29 ^c	(2.89–3.19)	(5.32–6.07)
1.8	2.5/115.2	2.15 ± 0.51 ^e		
Isorhamnetin (mg/mL) (1)				
15	126/0	100 ^a		
7.5	127/0	100 ^a		
3.7	101.5/115	88.25 ± 0.47 ^b	2.07	3.79
2.5	73.25/107.5	68.15 ± 4.46 ^c	(1.98–2.16)	(3.60–4.02)
1.2	14.5/106.75	13.6 ± 3.19 ^d		
0.6	2.25/105.75	2.15 ± 0.50 ^e		
Isorhamnetin and luteolin (2.5 mg/mL) (1,2)	0/103.82	0 ^f		
Luteolin (2.5 mg/mL) (2)	0.5/107.2	0.47 ± 0.95 ^f		
4'-O-methylcatechin (2.5 mg/mL) (3)	0/104.2	0 ^f		
Distilled water	0/71.25	0 ^f		
MeOH (4%)	0/69.87	0 ^f		
Ivermectin (0.5 mg/mL)	73.5/73.5	100 ^a		
Variation coefficient		3.56		
R ²		0.99		

Note: Means inside same column with different letter indicate significant differences (Tukey test) $p < 0.05$; MeOH = Methanol, SD = Standard deviation; CI = Confidence Interval.

3.5. Ovicidal Activity of the Purified Compounds

The luteolin and 4'-O-methylcatechin did not show any ovicidal activity. Nevertheless, the mixture of isorhamnetin/luteolin resulted in 100% of ovicidal activity. Meanwhile, the pure compound required solely 0.07 mg/mL to obtain the same total activity (Table 4). This difference indicates that pure isorhamnetin was 5.2 folds more potent than the EtAc-F.

Table 4. Results of EHT and lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) of compounds obtained from *Prosopis laevigata* leaves at different concentrations against *Haemonchus contortus* eggs after 48 h interaction.

Treatments	%EHT ± SD	Lethal Concentrations 95% (CI limits Lower-Upper)	
		LC ₅₀ (mg/mL)	LC ₉₀ (mg/mL)
Isorhamnetin (mg/mL) (1)			
0.3	100 ^a		
0.15	100 ^a		
0.07	100 ^a		
Mixture isorhamnetin and luteolin (mg/mL) (1,2)			
0.3	100 ^a		
0.15	96.03 ± 1.36 ^b	0.10	0.13
0.07	4.18 ± 1.23 ^c	(0.09–0.10)	(0.13–0.14)
Luteolin (mg/mL) (2)			
0.3	0 ^c		
0.15	0 ^c		
0.07	0 ^c		
4'-O-methylcatechin (mg/mL) (3)			
0.3	0 ^c		
0.15	0 ^c		
0.07	0 ^c		
MeOH 2%	1.50 ± 0.6 ^c		
Ivermectin (0.5 mg/mL)	100 ^a		
Variation coefficient	2.92		
R ²	0.99		

Note: Means into same column with different literals indicate significant differences $p < 0.05$; CI = Confidence Interval; SD = Standard deviation; MeOH = Methanol.

3.6. *Prosopis laevigata* Chemical Analysis Through High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The HPLC chromatograms from compounds responsible for the nematocidal activity of *P. laevigata* HA-E and EtAc-F are shown in Figure 1. The HA-E contained at least six compounds, including phenolic compounds with retention times of 4.5 and 8.3 min and four flavonoids (8.6, 8.9, 9.5 and 25.6 min). The EtAc-F chromatogram was used to identify flavonoid-type compounds (8.7, 9.0, 9.5, 10.0, 10.3 and 15.7 min) (Figure 1b). The C1F1 sub-fraction chromatogram as well as the identified compounds (isorhamnetin, luteolin and 4'-O-methylcatechin) and isorhamnetin of the EtAc-F chromatographic fraction are shown in Figure 1c–f.

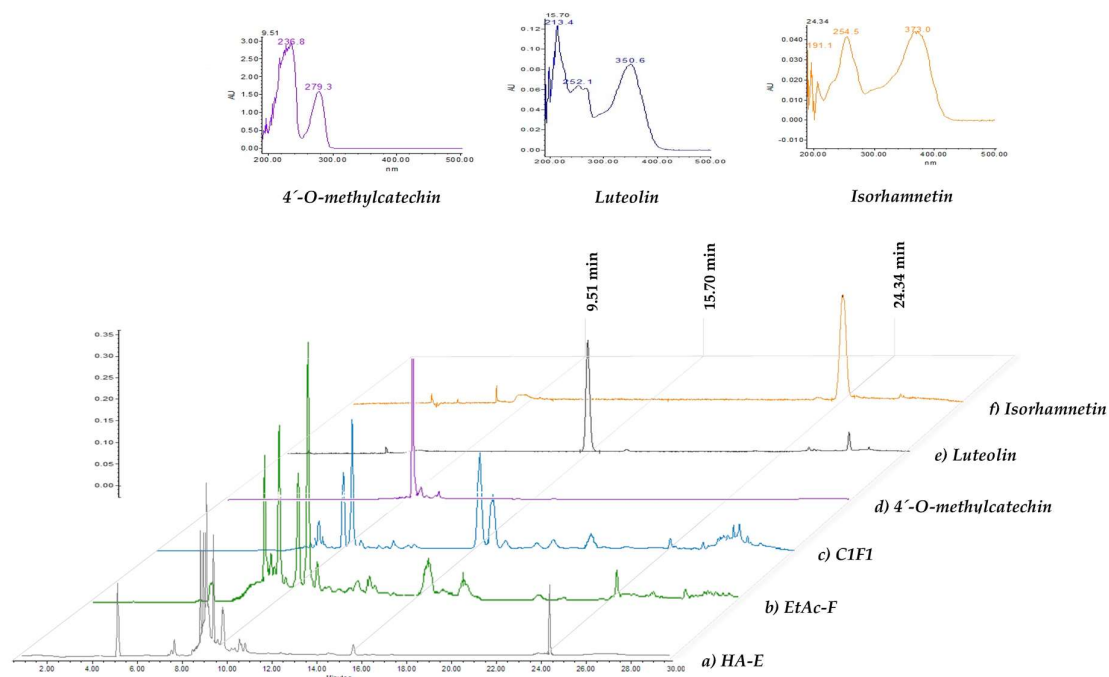


Figure 1. Phytochemical profile visualised by HPLC of (a) hydroalcoholic extract (HA-E), (b) ethyl acetate fraction (EtAc-F), (c) sub-fraction (C1F1), (d) 4'-O-methylcatechin, (e) luteolin and (f) isorhamnetin.

3.7. Chemical Structures of Identified Compounds

The analysis of spectra allowed researchers to identify compounds present in sub-fractions of *P. laevigata* extracts and revealed the presence of three flavonoids, isorhamnetin, an isorhamnetin-luteolin mixture, and luteolin. Furthermore, 4'-O-methylcatechin, which is a polyphenolic compound, was identified (Figure 2).

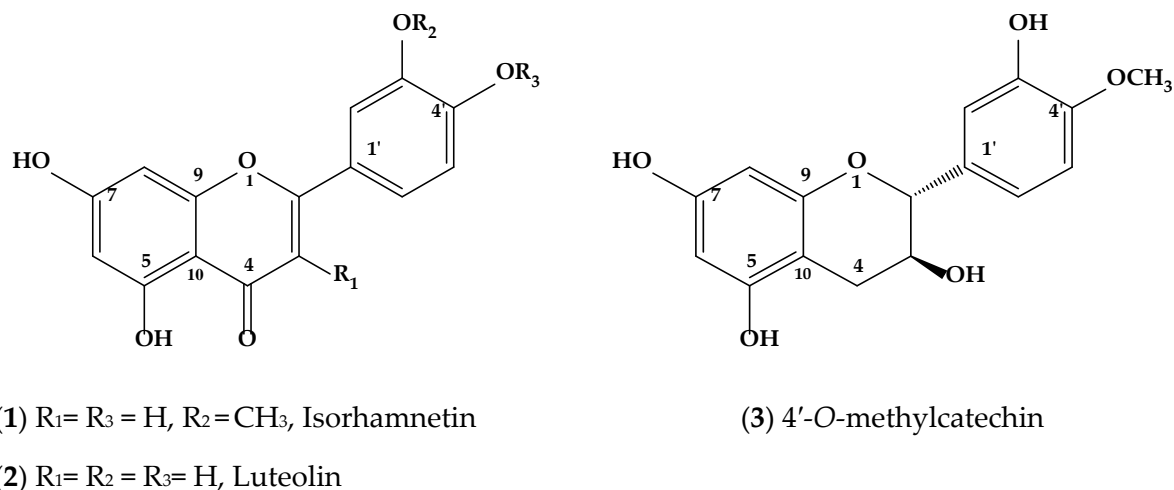


Figure 2. Chemical compound structures (1, 2 and 3) obtained from *p. laevigata* leaves.

Compound (1) was isolated as a yellow powder. Its UV spectrum revealed that the compound had a λ_{max} at 254 and 373 nm, which is a characteristic of a flavonoid. Negative ion EI-MS of compound 1, produced quasimolar ion peaks at m/z 316 $[M + H]^-$ (calcd. for $C_{16}H_{12}O_7$, 316.05) (See isorhamnetin mass spectra, as Supplementary Material). The 1H NMR spectra of 1 showed two aromatic systems: an AB system (δ 6.19 (1H, d, 1.9 Hz, H-6) and 6.47 (1H, d, 2.4 Hz, H-8)] and ABX system [δ 7.75 (1H, d, 2.3 Hz, H-2'), 6.94 (1H, d, 8.4 Hz, H-5') and 7.68 (1H, dd, 2.4, 8.4 Hz, H-6')]. In addition, a signal corresponding to an oxygenated base proton was observed in δ 3.8 that integrates three protons and

associates HSQC with the carbon signal in δ 55.7, which is characteristic of methoxyl groups at the C-3' position. On the basis of these data, and direct comparisons with spectroscopic data described in the literature, compound (1) was identified as isorhamnetin [25].

Once isolated, compound (2) was an orange powder with a UV λ_{\max} at 205, 255 and 368 nm, which is a distinguishing characteristic of flavonols. The negative ion EI-MS of (2) revealed a quasimolar ion peak at m/z of 286 [M-H]⁻ (calcd. for C₁₅H₁₀O₆, 286.05) (see luteolin mass spectra, in the Supplementary Material). Analysis of the ¹H and ¹³C NMR spectra of compound (2) showed that that compound was similar to (1), since it displayed the same chemical shift signals, except that compound (2) lacked a signal corresponding to the methoxyl group at C-3', indicating that its identity was luteolin (2) [26].

Isolation of compound (3) resulted in the production of a pink powder. This compound displayed a UV absorption spectrum between λ_{\max} values of 236 and 279 nm; a characteristic of catechin. In the negative ion EI-MS of 3, a quasimolar ion peak was calculated at m/z 304 [M-H]⁻ (calcd. for C₁₆H₁₆O₆, 304.09) (See 4'-O-methylcatechin mass spectra, as Supplementary Material). The analysis of the ¹H and ¹³C NMR spectra showed characteristic signals of 4'-O-methylcatechin (3) [27].

Isorhamnetin (1): ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆); δ 6.19 (1H, d, 1.9 Hz, H-6), 6.47 (1H, d, 2.4 Hz, H-8), 7.75 (1H, d, 2.3 Hz, H-2'), 6.94 (1H, d, 8.4 Hz, H-5'), 7.68 (1H, dd, 2.4, 8.4 Hz, H-6'), 3.8(OCH₃), 12.4(1H, s, 5-OH); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆); δ 146.6 (C-2), 135.8 (C-3), 175.8 (C-4), 160.6 (C-5), 98.2 (C-6), 163.9 (C-7), 93.5 (C-8), 156.1 (C-9), 103.0 (C-10), 121.9 (C-1'), 111.7 (C-2'), 147.3 (C-3'), 148.7 (C-4'), 115.5 (C-5'), 121.7 (C-6'), 55.7 (3'-OCH₃).

Luteolin (2): ¹H NMR (600 MHz, DMSO- *d*₆); δ 6.19 (1H, d, 2.0 Hz, H-6), 6.44 (1H, d, 2.0 Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-3), 7.39 (1H, d, 2.0 Hz, H-2'), 6.89 (1H, d, 8.6 Hz, H-5'), 7.41 (1H, dd, 2.0, 8.1 Hz, H-6'), 12.9(1H, s, 5-OH); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆); δ 146.6 (C-2), 102.8 (C-3), 181.6 (C-4), 161.4 (C-5), 98.8 (C-6), 164.1 (C-7), 93.8 (C-8), 157.2 (C-9), 103.7 (C-10), 121.5 (C-1'), 113.3 (C-2'), 145.7 (C-3'), 149.6 (C-4'), 116.0 (C-5'), 118.9 (C-6').

4'-O-Methylcatechin (3): ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- *d*₆); δ 4.51 (1H, d, 7.5 Hz, H-2), 3.82 (1H, m, H-3), 2.65 (1H, dd, 5.1, 15.9 Hz, H-4a), 2.35 (1H, dd, 8.3, 15.9 Hz, H-4b), 5.69 (1H, d, 2.3 Hz, H-6), 5.89 (1H, d, 2.3 Hz, H-8), 6.76 (1H, d, 1.9 Hz, H-2'), 6.87 (1H, d, 8.3 Hz, H-5'), 6.72 (1H, dd, 1.9, 8.3 Hz, H-6'), 3.75 (OCH₃); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆); δ 80.7 (C-2), 66.3 (C-3), 27.8 (C-4), 156.1 (C-5), 93.8 (C-6), 156.4 (C-7), 95.14 (C-8), 155.2 (C-9), 99.0 (C-10), 132.2 (C-1'), 114.3 (C-2'), 146.1 (C-3'), 147.1 (C-4'), 111.8 (C-5'), 118.2 (C-6'), 55.6 (4'-OCH₃).

3.8. Examination of *H. contortus* Eggs and Larvae ESEM and CLSM

General characteristics and structural differences between non-exposed and isorhamnetin-exposed eggs (at 7.5 mg/mL) are shown in Figure 3. AxioCam and CLSM images revealed that eggs that had not been exposed to isorhamnetin had normal internal and external structures, and their morula cells occupied almost the entire inner cavity of the eggshell as expected (Figure 3A,C). On the other hand, the eggs exposed to isorhamnetin displayed significant structural changes, which included the interruption of their embryonic development, and a cell mass reduction of the egg and eggshell of about 30% (Figure 3D-1). Additionally, some eggs had irregular edges and deformations that produced an appearance of wrinkled surface (Figure 3B,D).

CLSM micrographs of isorhamnetin-exposed eggs revealed autofluorescence that was emitted in the morula at wavelengths of 515 and 560 nm (Figure 3). This autofluorescence was not identified in the eggshell, which remained clear. This feature allowed us to identify a superposition between the fluorescence emitted by morula cells and fluorescence emitted by isorhamnetin using chromophore fragments that were fixed to the morula cell surface (Figure 3D-2). It is important to note that CLSM allowed us to visualise isorhamnetin fluorescence, which appeared in orange colour and was emitted between 560 nm and 600 nm (Figure 3D-3). ESEM further revealed that eggs that were not exposed to isorhamnetin had a smooth eggshell surface, and the morula developed normally (Figure 3E). In contrast, the isorhamnetin-exposed eggs exhibited a loss of cell architectural structure (Figure 3F-1).

Deformations observed in these eggs included the presence of cracks on the morula, as well as intracellular spaces (Figure 3F-2).

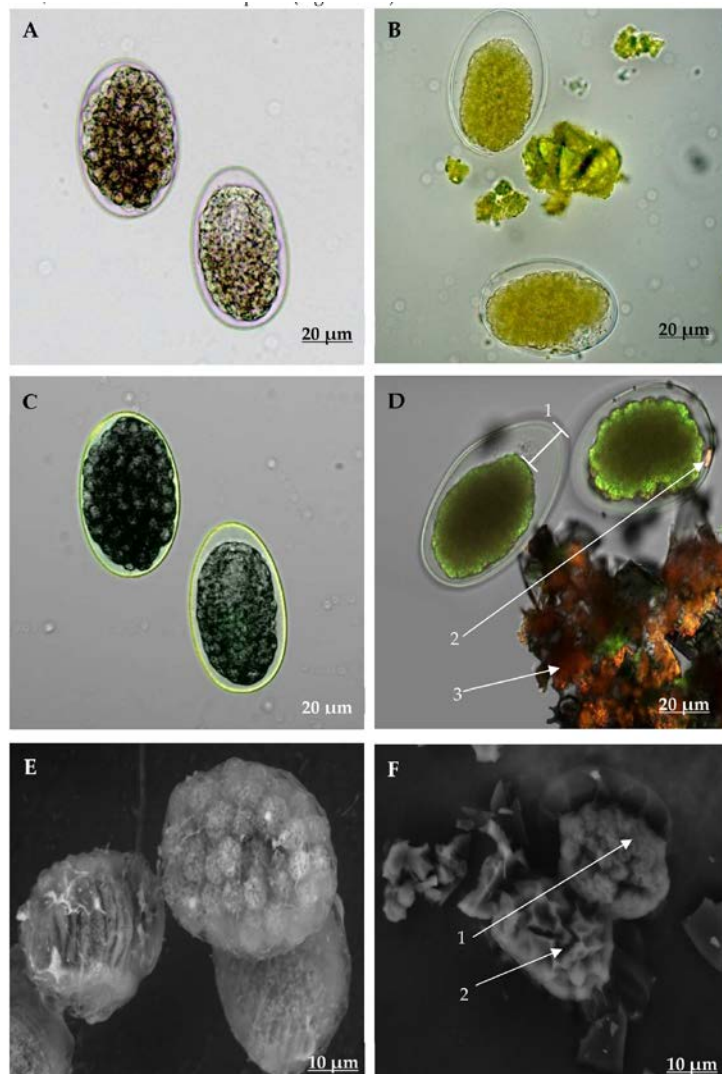


Figure 3. Micrographs taken with AxioCam (A,B), Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM, C,D) and Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM, E,F), showing the aspect of *Haemonchus contortus* eggs exposed (B,D,F) and non-exposed to isorhamnetin (A,C,E).

Differences observed using AxioCam CLSM and ESEM between non-exposed and isorhamnetin-exposed larvae (at 7.5 mg/mL) are shown in Figure 4. Non-exposed larvae displayed a sharpness and depth that resulted from the capacity of light to freely pass through their bodies. Furthermore, no apparent changes in their body conformation, intestinal cell organisation or in their external cuticle, were observed (Figure 4A,C,E). In contrast, the bodies of isorhamnetin-exposed larvae showed some changes in their internal organs, including the loss of architectural integrity of intestinal cells (Figure 4B). Likewise, some morpho-anatomic changes were observed in the isorhamnetin-exposed larvae i.e., the presence of an irregular dark colour that diffused throughout the larval body length as well as some irregular pale spaces between the surface coat and the inner coat that resembled tissue folds (Figure 4B,D). The ESEM of the isorhamnetin non-exposed larvae showed a normal smooth cuticular surface without any apparent abnormal changes (Figure 4E). In contrast, the bodies of isorhamnetin-exposed larvae appeared deformed, with loss of internal organ integrity (Figure 4F). In addition, these larvae also showed changes in their external cuticle, which appeared rough and

straight with wavy formations mainly in their lateral nervous cords along the body (4 F-1). Furthermore, the transversal size of exposed larvae was reduced in comparison with non-exposed larvae (Figure 4F).

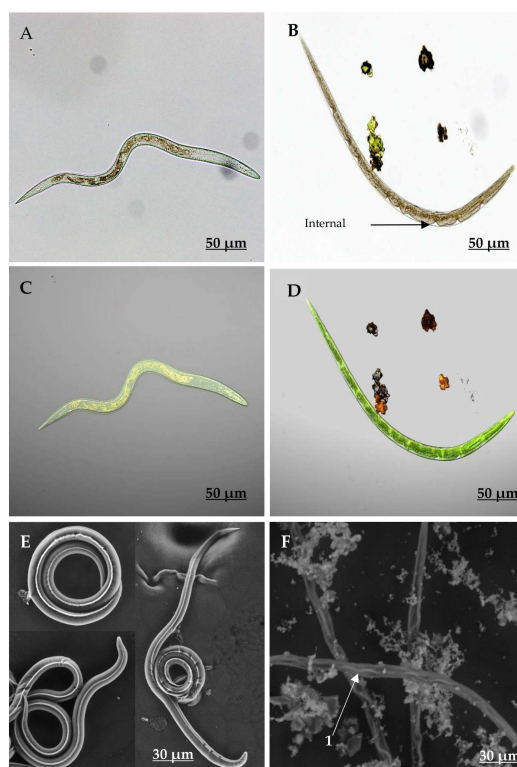


Figure 4. Micrographs taken with AxioCam (**A,B**), Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM, **C,D**) and Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM, **E,F**) showing the aspect of *Haemonchus contortus* larvae exposed (**B,D,F**) and non-exposed to isorhamnetin (**A,C,E**). F1 shows the wave formations at the lateral nervous cord.

4. Discussion

The results of the present study revealed that *P. laevigata* leaves possess compounds that are active against *H. contortus* infective larvae. It is interesting the fact that the pure isorhamnetin showed 100% larval mortality when used at 15 and 7.5 mg/mL and this effect decreased when concentration decreased and even at 2.5 mg/mL this sole compound provoked 68.15% LM. In contrast the other two identified compounds luteolin and 4'-*O*-methylcatechin both at 2.5 mg/mL resulted in 0% activity. Since our point of view; although isorhamnetin is not the major compound the results of the present study clearly indicate that isorhamnetin is definitively the compound responsible for the anthelmintic effect.

On the other hand, when the mixture isorhamnetin + luteolin at same concentration (2.5 mg/mL) was assessed, a null effect was also recorded, which suggests that luteolin act as an antagonist of isorhamnetin, which inhibited the isorhamnetin larval mortality effect.

Likewise, it is important to remark that the ovicidal activity showed by the pure isorhamnetin at different low concentrations was also very high. It is interesting to emphasise the fact that luteolin showed two different effects when combined with isorhamnetin; since the luteolin inhibited the larval mortality of the isorhamnetin; however, it did not influence the high ovicidal activity of isorhamnetin. A possible explanation about this fact could be that perhaps the differences in the membrane receptors between the eggshell and the cuticle coat could interfere either at favour or against the activity of this compound; although this is only a proposal that will have to be studied in depth. The fact that the isorhamnetin caused 100% EHT at such as low concentrations is a very good characteristic that makes it a potential candidate for future in vivo studies. It is interesting the fact that both C2F2 sub-fraction and isorhamnetin at 15 and 7.5 mg/mL respectively, caused 100% larval mortality. However, we actually do

not have a categorical explanation why the C2F2 that is a mixture of different compounds, including 20% isorhamnetin showed the same high percentage of larval mortality when compared with sole isorhamnetin. Other studies should be designed to clarify this question.

Previous assays performed in our laboratory showed an important nematocidal effect of the hydroalcoholic extract from this arboreal legume (unpublished data). In an extend review of the literature we found little information regarding the nematocidal activity of *P. laevigata* extracts against *H. contortus* which was solely related to activity against the larvae of the parasite. Therefore, as far as we know, the present study is the first report of the ovicidal activity of and organic ethyl acetate fraction extracts from *P. laevigata*.

Several metabolites from other *Prosopis* species were identified using different parts of the plant and with different solvent systems. The nematocidal activity of these groups of metabolites has been previously described in other *Prosopis* species and plant extracts from other genera. It is worth mentioning that plants from the *Prosopis* genus, and other genera and species of plants, displayed nematocidal activity against different nematodes of importance for agriculture and livestock industry. In this context, is clear that independently of the genus/specie fabaceae plants, they respond with a different biological activity pattern, regardless the separation system used.

Likewise, is important to consider that exploring other separation strategies would be beneficial to improve the bioactive compounds obtaining; for instance, using fresh plant material followed by the hydrogen peroxide pre-soaking method before the ammonium fibre expands, would led us to achieve an effective separation of lignin and cellulose to estimate the water content and eventually to improve not only the bioactive compound obtaining but also to get a better yield [28,29].

A methanolic extract obtained from fruit from other Fabaceae plant, *Caesalpinia coriaria*, resulted in 73% larval mortality at 150 mg/mL [30]. In our study, the *P. laevigata* EtAc-F resulted in 96% in vitro larval mortality against *H. contortus* at only 50 mg/mL after 72 h exposure. These mortalities were similar to other results obtained with a *Lysiloma acapulcensis* EtAc-F, which belongs to the same taxonomic group that caused 100% mortality against *H. contortus* infective larvae at the same concentration and same exposure time [31]. These authors reported the same larvicidal inefficacy of *L. acapulcensis* Aq-F that we found with *P. laevigata* Aq-F. The phytochemical screening showed different groups of compounds, including flavonoids, tannins, alkaloids, and coumarins. It is interesting that the compound with the highest nematocidal activity was a phenolic compound (flavonoid).

The HPLC analysis revealed that HA-E contained phenolic compounds (Figure 1a), while EtAc-F contained hydroxycinnamic acid derivate compounds and flavonoids (Figure 1b). It is important to mention that isorhamnetin is a flavonoid compound that has been previously isolated from several plant species including *Persicaria glabra* [25] and *Cleome africana* [32].

Isorhamnetin possesses several biological activities, including cytotoxic [33], anti-microbial [34], antiviral [35], anti-oxidant [36,37], hepato-protective and cardio-vascular protective [38,39], neurological [40], anti-cancer [41], anti-inflammatory [42,43] and anti-diabetes [44]. However, this seems to be the first report of the anthelmintic activity of isorhamnetin against parasitic nematodes affecting small ruminants.

Use of AxioCam, CLSM and ESEM techniques supported the hypothesis that isorhamnetin is the compound responsible for producing the morphological structural changes associated with pathogenic effects against eggs and larvae of the parasite. The use of AxioCam, CLSM and ESEM allowed identifying the presence of interesting changes in the morphological structure of eggs and larvae associated with the presence of the isorhamnetin. The mechanism of the anthelmintic activity of isorhamnetin against *H. contortus* eggs and larvae remains uncertain and will be motive of future studies.

The flavonoids generally interact with lipidic bilayers in membranes and may affect biological/physiological processes i.e., protein transportation. Beyond this, they may act as substrates, which interfere with the electric properties of membranes [45,46]. Some authors reported that phenolic compounds, including condensed tannins and flavonoids are capable of binding to membrane proteins of the eggshell that are vital for optimal development and biological activities of larvae [47]. However,

membranes of nematodes such as *H. contortus* are constituted of three different types of layers that include an external protein layer, a medial layer comprised of chitin fibrils and proteins (for eggs and larvae, respectively), and a semi-permeable internal lipid layer [48,49]. The egg hatching processes are initiated as a result of an environmental stimulus that promotes a protein/enzyme-mediated process that triggers the release of larva from the eggshell. The proteins that promote egg hatching are called “hatching enzymes” and they include proteases, lipases, beta-glucosidases, chitinases and leucine aminopeptidases, which directly act to promote eggshell membrane degradation [48,50]. It is believed that the compound-protein interactions may cause important structural changes that affect membrane permeability, oxygen interchange, and the release of substances and enzymes that promote eggshell degradation to eventually promote larval release [47,51,52]. Isorhamnetin, which is a flavonoid compound, could act similarly via binding to membrane receptors of the parasite in order to cause damage in nematode tissues; however, this is only a hypothesis that must be validated using more advanced techniques.

Molan et al. [53] and Lakshmi et al. [54] reported that phenolic compounds including condensed tannins and flavonoids possess important anthelmintic activities. For instance, Barrau et al. [55] noted that tri-glycosylated flavonols isolated from *Onobrychis viciifolia* Scop. inhibited the larval migration in *H. contortus* under in vitro conditions. Later on, Klongsiriwet et al. [56] demonstrated the synergic effects of a combination of condensed tannins and flavonoids, which included quercetin and luteolin. This combination improved the anthelmintic activity. One of the main hypotheses regarding the mechanism of action of these compounds states that they may promote eggshell and larval cuticle permeability [52,57]. Nevertheless, the mode of entry of the phenolic compounds into the membrane depends on their chemical structure. This occurs through the formation of hydrogen bonds among the groups of lipids containing polar head groups and hydrophilic portions of flavonoids as well as with hydroxyl groups that interact with parasitic membranes [58–60]. Larvae exposed to isorhamnetin displayed altered surface coat characteristics. The fact that the external surfaces of eggshells were not significantly affected, suggests that entry of isorhamnetin alone or combined with luteolin into the eggshell membrane occurs without producing these effects despite the capacity of isorhamnetin to cause embryo death. Finally, because of our assays used eggs and infective larvae of *H. contortus* as targets of the *P. laevigata* compounds and that both are free-living stages of the parasite, it is important to design complementary experiments about the impact of isorhamnetin on non-target nematodes of the soil.

5. Conclusions

The ethyl acetate fraction obtained from a hydroalcoholic extract of *P. laevigata* leaves possess a potent anthelmintic activity against *H. contortus* eggs and infective larvae, which is considered the most economically important parasite affecting small ruminants globally. Chromatographic procedures facilitated the isolation and identification of three flavonoid compounds (1–3). Of these, isorhamnetin possessed the highest degree of anthelmintic activity. CLSM and ESEM techniques revealed important structural features of parasites exposed to isorhamnetin. This is the first report of the in vitro anthelmintic activity of isorhamnetin against *H. contortus*.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2218-273X/10/5/773/s1>, Supplementary data: Chemical group identification.

Author Contributions: Conceptualisation, P.M.-d.G. and D.O.S.-S.; methodology, E.J.D.-N.; software, A.O.-J.; statistical analysis, A.O.-J.; data curation, A.Z., M.G.-C. and A.C.-T.; writing original draft preparation, E.J.D.-N., P.M.-d.G. and A.O.-J.; phytochemical analysis, A.Z., M.G.-C., E.S.-M. and A.C.-T.; microscopy analysis D.T.-M.; review and editing, P.M.-d.G., A.O.-J. and D.O.S.-S.; funding acquisition P.M.-d.G. and A.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. The materials and various expenses were covered with resources from CENID-SAI-INIFAP and CIBIS-IMSS.

Acknowledgments: This study was part of the PhD thesis work of MSc Edgar Jesús Delgado Núñez, who is a PhD student in Natural Sciences at the Autonomous University of Morelos, under the Direction of Pedro Mendoza de

Gives and David Osvaldo Salinas-Sánchez. Dr A. Zamilpa thanks the IMSS foundation. Selected plant specimens were taxonomically classified by the MSc Gabriel Flores Franco from the Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC-UAEM), Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Besier, R.B.; Kahn, L.P.; Sargison, N.D.; Van Wyk, J.A. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. *Adv. Parasitol.* **2016**, *93*, 95–143. [[PubMed](#)]
2. Cooper, L.; Cerutti, J.; Mohn, C.; Torrents, J.; Suarez-Archilla, G.; Anziani, O.S. Eficacia del monepantel para el control de aislamientos de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus* spp. con resistencia múltiple (ivermectina y febendazole) en caprinos. *Sección Cienc. Vet.* **2016**, *15*, 5–8. [[CrossRef](#)]
3. Coles, G.C.; Jackson, F.; Pomroy, W.E.; Prichard, R.K.; Samson-Himmelstjerna, G.V.; Silvestre, A.; Taylor, M.A.; Vercruyse, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **2006**, *136*, 167–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Masiá, A.; Suarez-Varela, M.M.; Llopis-Gonzalez, A.; Picó, Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *936*, 40–61. [[CrossRef](#)]
5. Novaes, S.F.; Schreiner, L.L.; Pereira e Silva, I.; Franco, R.M. Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. *Cienc. Rural* **2017**, *47*, 1–7. [[CrossRef](#)]
6. Aparicio-Medina, J.M.; Paredes-Vanegas, V.; González-López, O.; Navarro-Reyes, O. Effect of ivermectin on the environment. *La Calera* **2011**, *11*, 64–66. [[CrossRef](#)]
7. Gallegos-Zurita, M. Las plantas medicinales: Principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An. Fac. Med.* **2016**, *77*, 327–332. [[CrossRef](#)]
8. Rzedowski, J. *Vegetación de México*; 1ra Edición Digital; Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: México, México, 2006; p. 504.
9. Ahmad, A.; Khan, K.A.; Ahmad, V.U.; Qazi, S. Antibacterial activity of Juliflorine isolated from *Prosopis juliflora*. *Planta Med.* **1985**, *52*, 285–288. [[CrossRef](#)]
10. Othman, A.M.; Awadh-Ali, N.A.; Saif, A.A.; Al-Fadhli, E.A. Topical herbal antimicrobial formulation containing *Prosopis juliflora* methanol extract. *World J. Pharm. Res.* **2016**, *5*, 151–163.
11. Solanki, D.S.; Kumar, S.; Parihar, K.; Tak, A.; Gehlot, P.; Pathak, R.; Singh, S.K. Characterization of a novel seed protein of *Prosopis cineraria* showing antifungal activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *116*, 16–22. [[CrossRef](#)]
12. Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J.M.; Tuñón, J. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* **2002**, *17*, 271–278. [[PubMed](#)]
13. Sivakumar, T.; Srinivasan, K.; Rajavel, R.; Vasudevan, M.; Ganesh, M.; Kamalakannan, K. Isolation of chemical constituents from *Prosopis juliflora* bark and anti-inflammatory activity of its methanolic extracts. *J. Pharm. Res.* **2009**, *2*, 551–556.
14. Henciya, S.; Seturaman, P.; James, A.R.; Tsai, Y.H.; Nikam, R.; Wu, Y.C.; Dahms, H.U.; Chang, F.R. Biopharmaceutical potentials of *Prosopis* spp. (Mimosaceae, Leguminosa). *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 187–196. [[CrossRef](#)]
15. Taisma, M.A. Medicinal uses of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. In rural communitities from Paraguaná peninsula, Venezuela. *Rev. Peru Biol.* **2017**, *24*, 79–86. [[CrossRef](#)]
16. López-Aroche, U.; Salinas-Sánchez, D.O.; Mendoza-de-Gives, P.; López-Arellano, M.E.; Liéban-Hernández, E.; Valladares-Cisneros, G.; Arias-Ataide, D.M.; Hernández-Velázquez, V. In vitro nematicidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, México against *Haemonchus contortus* infective larvae. *J. Helminth* **2008**, *82*, 25–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. De Jesús Gabino, A.F.; Mendoza-de-Gives, P.; Salinas-Sánchez, D.O.; López-Arellano, M.E.; Liéban-Hernández, E.; Hernández-Velázquez, V.M.; Valladares-Cisneros, G. Anthelmintic effects of *Prosopis laevigata* n-hexanic extract against *Haemonchus contortus* in artificially infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Helminth* **2010**, *84*, 71–75.
18. Olmedo-Juárez, A.; Rojo-Rubio, R.; Zamilpa, A.; Mendoza-de-Gives, P.; Arece-García, J.; López-Arellano, M.E.; Von Son-de Fernex, E. In vitro larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. *Vet. Res. Commun.* **2017**, *41*, 227–232. [[CrossRef](#)]

19. Von Son-de Fernex, E.; Alonso-Díaz, M.A.; Mendoza-de-Gives, P.; Valles-de la Mora, B.; González-Cortazar, M.; Zamilpa, A.; Castillo-Gallegos, E. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Vet. Parasitol.* **2015**, *214*, 89–95. [[CrossRef](#)]
20. Mesquita, J.R.; Mega, C.; Coelho, C.; Cruz, R.; Vala, H.; Esteves, F.; Santos, C.; Vasconcelos-Nóbrega, C. ABC series on diagnostic parasitology part 3: The Baermann technique. *Vet. Nurse* **2017**, *8*, 558–562. [[CrossRef](#)]
21. Zarza-Albarrán, M.A.; Olmedo-Juárez, A.; Rojo-Rubio, R.; Mendoza-de-Gives, P.; González-Cortazar, M.; Tapia-Maruri, D.; Mondragón-Ancelmo, J.; García-Hernández, C.; Blé-González, E.V.; Zamilpa, A. Galloyl flavonoids from *Acacia farnesiana* pods possess potent anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. *J. Ethnopharmacol.* **2020**, *249*, 112402. [[CrossRef](#)]
22. García-Hernández, C.; Rojo-Rubio, R.; Olmedo-Juárez, A.; Zamilpa, A.; Mendoza-de-Gives, P.; Antonio-Romo, I.A.; González-Cortazar, M. Galloyl derivatives from *Caesalpinia coriaria* exhibit in vitro ovicidal activity against cattle gastrointestinal parasitic nematodes. *Exp. Parasitol.* **2019**, *200*, 16–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Coles, G.C.; Bauer, C.; Borgsteede, F.; Geerts, S.; Klei, T.R.; Taylor, M.A.; Waller, P.J. World association for advancement in veterinary parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **1992**, *44*, 35–43. [[CrossRef](#)]
24. SAS. *Statistic Analysis System, User's Guide Statistics*; Version 9.0.; SAS Institute Inc.: Cary, NC, USA, 2006; p. 956.
25. Manivannan, R.; Shopna, R. Isolation of quercetin and isorhamnetin derivatives and evaluation of anti-microbial and anti-inflammatory activities of *Persicaria glabra*. *Nat. Prod. Sci.* **2015**, *21*, 170–175.
26. Rahate, K.P.; Rajasekaran, A. Isolation and identification of flavone aglycones in roots of *Desmostachya bipinnata*. *Indian J. Pharm. Sci.* **2018**, *80*, 551–556. [[CrossRef](#)]
27. Dueñas, M.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.; Santos-Buelga, C. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *J. Pharm. Biomed.* **2010**, *51*, 443–449. [[CrossRef](#)]
28. Zhao, C.; Qiao, X.; Cao, Y.; Shao, Q. Application of hydrogen peroxide presoaking prior to ammonia fiber expansion pretreatment of energy crops. *Fuel* **2017**, *205*, 184–191. [[CrossRef](#)]
29. Zhao, C.; Qiao, X.; Shao, Q.; Hassan, M.; Ma, Z.; Yao, L. Synergistic effect of hydrogen peroxide and ammonia on lignin. *Ind. Crop. Prod.* **2020**, *146*, 112177. [[CrossRef](#)]
30. De Jesús-Martínez, X.; Olmedo-Juárez, A.; Olivares-Pérez, J.; Zamilpa, A.; Mendoza-de-Gives, P.; López-Arellano, M.E.; Rojas-Hernández, S.; Villa-Mancera, A.; Camacho-Díaz, L.M.; Cipriano-Salazar, M. In vitro anthelmintic activity of methanolic extract from *Caesalpinia coriaria* J. Willd fruits against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 7375693. [[CrossRef](#)]
31. González-Cortazar, M.; Zamilpa, A.; López-Arellano, M.E.; Aguilar-Marcelino, L.; Reyes-Guerrero, D.E.; Olazarán-Jenkins, S.; Ramírez-Vargas, G.; Olmedo-Juárez, A.; Mendoza-de-Gives, P. *Lysiloma acapulcensis* leaves contain anthelmintic metabolites that reduce the gastrointestinal nematode egg population in sheep faeces. *Comp. Clin. Pathol.* **2018**, *27*, 189–197. [[CrossRef](#)]
32. Abdullah, T.W.; Elsayed, W.M.; Abdelshafeek, K.A.; Nazif, N.M.; Nada, S.; Singab, A.N.B. The Flavonoids and biological activity of *Cleome africana* growing in Egypt. *RJPBCS* **2016**, *7*, 1094–1104.
33. Jaramillo, S.; Lopez, S.; Varela, L.M.; Rodriguez-Arcos, R.; Jimenez, A.; Abia, R.; Muriana, F.J. The Flavonol isorhamnetin exhibits cytotoxic effects on human colon cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10869–10875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jnawali, H.N.; Jeon, D.; Jeong, M.-C.; Lee, E.; Jin, B.; Ryoo, S.; Kim, Y. Antituberculosis activity of a naturally occurring flavonoid, isorhamnetin. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 961–969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Dayem, A.A.; Choi, H.Y.; Kim, Y.B.; Cho, S.-G. Antiviral effect of methylated flavonol isorhamnetin against influenza. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121610. [[CrossRef](#)]
36. Pengfei, L.; Tiansheng, D.; Xianglin, H.; Jianguo, W. Antioxidant properties of isolated isorhamnetin from the sea buckthorn marc. *Plant Food Hum. Nutr.* **2009**, *64*, 141–145. [[CrossRef](#)]
37. Zuo, A.; Yu, Y.; Jing, L.; Xu, B.; Yu, X.; Qiu, Y.; Cao, S. Study on the relation of structure and antioxidant activity of isorhamnetin, quercetin, phloretin, silybin and phloretin isonicotinyl hydrazone. *Free Radic. Antioxid.* **2011**, *1*, 39–47. [[CrossRef](#)]

38. Igarashi, K.; Ohmuma, M. Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 595–601. [[CrossRef](#)]
39. Katan, M.B. Flavonoids and heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *65*, 1542–1543. [[CrossRef](#)]
40. Watanabe, C.M.H.; Wolffram, S.; Ader, P.; Rimbach, G.; Packer, L.; Maguire, J.J.; Gohil, K. The in vivo neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6577–6580. [[CrossRef](#)]
41. Li, C.; Yang, X.; Chen, C.; Cai, S.; Hu, J. Isorhamnetin suppresses colon cancer cell growth through the PI3K-Akt-mTOR pathway. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *9*, 935–940. [[CrossRef](#)]
42. Kim, T.H.; Ku, S.-K.; Bae, J.-S. Anti-inflammatory activities of isorhamnetin-3-O-galactoside against HMGB1-induced inflammatory responses in both HUVECs and CLP-induced septic mice. *J. Cell. Biochem.* **2012**, *114*, 336–345. [[CrossRef](#)]
43. Seo, K.; Yang, J.H.; Kim, S.C.; Ku, S.K.; Ki, S.H.; Shin, S.M. The antioxidant effects of isorhamnetin contribute to inhibit COX-2 expression in response to inflammation: A potential role of HO-1. *Inflammation* **2013**, *37*, 712–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lee, Y.S.; Lee, S.; Lee, H.S.; Kim, B.-K.; Ohuchi, K.; Shin, K.H. Inhibitory effects of Isorhamnetin-3-O- β -D-glucoside from *Salicornia herbacea* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 916–918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hendrich, A.B. Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacol. Sin.* **2006**, *27*, 27–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhao, J. Flavonoid transport mechanisms: How to go, and with whom. *Trends Plant Sci.* **2015**, *20*, 576–585. [[CrossRef](#)]
47. Molan, A.L.; Faraj, A.M. The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Folia Parasitol.* **2010**, *57*, 62–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Mansfield, L.S.; Gamble, H.R.; Fetterer, R.H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*—I. Structural components. *Comp. Biochem. Physiol.* **1992**, *103*, 681–686. [[CrossRef](#)]
49. Thompson, D.P.; Geary, T.G. The structure and function of helminth surfaces. *Biochem. Mol. Biol. Parasites* **1995**, 203–232.
50. Sommerville, R.I.; Rogers, W.P. The nature and action of host signals. *Adv. Parasitol.* **1987**, *26*, 239–293.
51. Rogers, W.P.; Brooks, F. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* **1977**, *7*, 61–65. [[CrossRef](#)]
52. Vargas-Magaña, J.J.; Torres-Acosta, J.F.J.; Aguilar-Caballero, A.J.; Sandoval-Castro, C.A.; Hoste, H.; Chan-Pérez, J.I. Anthelmintic activity of acetone–water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Vet. Parasitol.* **2014**, *206*, 322–327. [[CrossRef](#)]
53. Molan, A.L.; Meagher, L.P.; SpenCer, P.A.; Si vakumaran, S. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* **2003**, *33*, 1691–1698. [[CrossRef](#)]
54. Lakshmi, V.; Joseph, S.K.; Srivastava, S.; Verma, S.K.; Sahoo, M.K.; Dube, V.; Murthy, P.K. Antifilarial activity in vitro and in vivo of some flavonoids tested against *Brugia malayi*. *Acta Trop.* **2010**, *116*, 127–133. [[PubMed](#)]
55. Barrau, E.; Fabre, N.; Fouraste, I.; Hoste, H. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: Role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* **2005**, *131*, 531–538. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Klongsiriwet, C.; Quijada, J.; Williams, A.R.; Mueller-Harvey, I.; Williamson, E.M.; Hoste, H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *Int. J. Parasitol. Drugs* **2015**, *5*, 127–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Castelli, F.; Uccella, N.; Trombetta, D.; Saija, A. Differences between coumaric and cinnamic acids in membrane permeation as evidenced by time-dependent calorimetry. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 991–995. [[CrossRef](#)]
58. Van Dijk, C.; Driessen, A.J.; Recourt, K. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1593–1600. [[CrossRef](#)]

59. Oteiza, P.I.; Erlejman, A.G.; Verstraeten, S.V.; Keen, C.L.; Fraga, C.G. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clin. Dev. Immunol.* **2005**, *12*, 19–25. [[CrossRef](#)]
60. Engström, M.T.; Karonen, M.; Ahern, J.R.; Baert, N.; Payré, B.; Hoste, H.; Salminen, J.-P. Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their in vitro activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* Nematodes. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 840–851. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).