



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICARERO

---

---

**ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DE *Acacia bilimekii* (FABACEAE)  
MACBRIDE SOBRE *Haemonchus contortus* Rudolphi**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

**EDUARDO ARMENTA ESTEFANÍA**

Director de Tesis:

**DR. DAVID OSVALDO SALINAS SÁNCHEZ**

Codirector:

**DR. JORGE ALBERTO CORTES MORALES**



JOJUTLA, MORELOS

JUNIO.2024

| <b>ÍNDICE</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| AGRADECIMIENTOS  | 1             |
| INTRODUCCIÓN   | 2             |
| ANTECEDENTES   | 4             |
| <b>Capítulo 1. Ganadería de pequeños rumiantes</b>   | <b>4</b>      |
| 1.1 Producción pecuaria ovina  | 4             |
| <b>Capítulo 2. Nematodos gastrointestinales y sus afecciones en pequeños rumiantes</b>               | <b>5</b>      |
| 2.1 Biología de los nemátodos gastrointestinales   | 5             |
| 2.2 Helmintiasis en pequeños rumiantes   | 6             |
| 2.2.1 <i>Haemonchus contortus</i>  | 7             |
| 2.2.1.1 Ciclo infeccioso   | 7             |
| 2.2.1.2 Principales enfermedades causadas por <i>H. contortus</i>                                    | 8             |
| <b>Capítulo 3. Actividad antihelmíntica</b>  | <b>9</b>      |
| 3.1 Antihelmínticos sintéticos   | 9             |
| 3.2 Resistencia antihelmíntica   | 9             |
| <b>Capítulo 4. Uso de las plantas medicinales como alternativa para el control de la parasitosis</b> | <b>10</b>     |
| 4.1 Plantas usadas para el control de parásitos  | 10            |
| <b>Capítulo 5. Fabáceas y el género <i>Acacia</i></b>  | <b>11</b>     |
| 5.1 El Bosque Tropical Caducifolio   | 11            |
| 5.2 Fabáceas   | 12            |
| 5.2.1 Fabáceas con actividad antihelmíntica  | 12            |
| 5.2.1.1 <i>Gliricidia sepium</i>   | 12            |
| 5.2.1.2 <i>Sarothamnus scoparius</i>   | 13            |
| 5.2.1.3 <i>Prosopis laevigata</i>  | 13            |
| 5.3 El Género <i>Acacia</i>  | 14            |
| 5.3.1 Acacias con actividad antihelmíntica   | 14            |
| 5.3.1.1 <i>Acacia pennatula</i>  | 14            |
| 5.3.1.2 <i>Acacia cochliacantha</i>  | 15            |
| 5.3.1.3 <i>Acacia farnesiana</i>   | 15            |
| <b>Capítulo 6. <i>Acacia bilimekii</i></b>   | <b>16</b>     |
| 6.1 Descripción botánica de <i>Acacia bilimekii</i>  | 16            |
| 6.2 Usos generales de <i>A. bilimekii</i>  | 17            |
| 6.3 Biorremediación  | 18            |
| JUSTIFICACIÓN  | 19            |
| PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN  | 19            |
| HIPÓTESIS  | 19            |
| OBJETIVOS  | 20            |
| Objetivo general   | 20            |
| Objetivos particulares   | 20            |
| METODOLOGÍA  | 21            |
| Material vegetal   | 21            |

|  |         |
|--|---------|
| Obtención de extractos   | .....21 |
| Fraccionamiento químico de AbFAcOEt obtenido de <i>A. bilimekii</i>  | .....21 |
| Análisis HPLC  | .....34 |
| Material biológico   | .....34 |
| Obtención de huevos  | .....35 |
| Ensayo de la inhibición de la eclosión de huevos (IEH)   | .....35 |
| Análisis estadístico   | .....36 |
| RESULTADOS   | .....37 |
| Obtención de extractos orgánicos de la especie vegetal <i>A. bilimekii</i> .   | .....37 |
| Identificación del tipo de compuestos presentes en las fracciones de mayor actividad   | .....39 |
| Identificación de los compuestos presentes en las subfracciones bioactivas por HPLC  | .....40 |
| Evaluación del efecto inhibitorio de los extractos obtenidos de <i>A. bilimekii</i> en la eclosión de huevos de <i>H. contortus in vitro</i> | .....41 |
| Evaluación de la fracción acuosa y de acetato de Etilo (AcOEt) en el ensayo IEH  | .....42 |
| Evaluación de las fracciones bioactivas en el ensayo IEH   | .....43 |
| Concentraciones letales del extracto Ab-HA y subfracciones   | .....44 |
| DISCUSIÓN  | .....46 |
| CONCLUSIÓN   | .....48 |
| REFERENCIAS  | .....49 |
| ANEXOS   | .....59 |

## **AGRADECIMIENTOS**

Existen muchos motivos para agradecer y cuento con bastantes que un simple gracias parece no bastar. Hay tantas personas a las que les debo tanto y sé que algunas palabras no serán suficientes para demostrar mi gratitud, a pesar de ello este es mi intento.

Es de mi orgullo agradecer a todas las personas que me brindaron su apoyo y sin las cuáles no habría podido realizar este trabajo, a todos aquellos que me dieron una palabra, una motivación, a los que fueron guías e inspiraciones, a los que fueron soportes y consuelos, gracias por estar conmigo.

Agradezco especialmente al Dr. David, al Dr. Jorge y al Dr. Agustín, gracias por toda su paciencia, por guiarme en este arduo camino y por enseñarme no solo la labor de un científico y de investigador, sino el esfuerzo que conlleva el trabajo y los valores y aptitudes para realizarlo.

Gracias a mis padres, José y Marina, personas amorosas y firmes, imperfectas como todas y cariñosas como ninguna, gracias por preocuparse por mí desde el inicio de mi vida, por vestirme y alimentarme, por enseñarme lecciones de vida y darme recuerdos que mantendré siempre en mi mente, gracias por otorgarme la oportunidad de tener una educación y por darme su amor y apoyo.

Gracias a las personas que han estado para mí, a todos aquellos que puedo llamar amigos y que he hecho y conservado desde hace algún tiempo, son personas que me han marcado, que tienen un lugar en mi vida y con las que comparto un lazo, sin importar tiempos o distancias, gracias a Lesly, Aline y Basilio por ayudarme a mejorar como estudiante y como persona, gracias a Valeria, Leida, Mario y Gaby por incentivarme a desafiarme y superarme cada día, por ser compañeros de estudio y amigos leales, gracias a Paulina, Andrey, Saira, Daniel, Érika, Franceli, Oscar, Andrea y Samia, amigos que me acompañaron en este camino, que fueron soporte moral y académico y que estuvieron conmigo en momentos de júbilo y angustia.

Por último, quisiera agradecer al profesor Orlando, quien fue un guía en mi historia académica, y una fuente de sabiduría y consejo.

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones por helmintiasis son la principal causa de enfermedades en pequeños rumiantes, representando una gran pérdida en la producción ovina, agravada a su vez por la resistencia que presentan a los antihelmínticos sintéticos (Niciura, *et al.*, 2019). En México se estiman pérdidas de alrededor de 445.1 millones de dólares. Además, existe una problemática desprendida del daño que ocasiona el uso de estos fármacos al medio ambiente. Se han notado efectos negativos especialmente en las poblaciones de insectos benéficos asociados al estiércol, principalmente en sus formas larvarias (Márquez., 2003). Debido a la desmedida resistencia antihelmíntica actual, se ha impulsado la investigación de principios activos obtenidos de plantas medicinales, como alternativa para el control de la helmintiasis. Se ha reportado que especies de la familia Fabaceae han mostrado actividad antihelmíntica contra nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes (Oliveira, *et al.*, 2019). Las fabáceas se consideran de alto nivel nutricional para el ganado pues mejoran su crecimiento y desarrollo (Hernández, *et al.*, 2015). Por lo tanto, la presencia de fabáceas arbóreas y arbustivas en la zona de pastoreo de rumiantes favorece su nutrición, pero también pueden representar una opción para el control de la helmintiasis. Además, son empleadas como fitorremediadores de suelos. *Acacia cochliacantha* y *Acacia farnesiana* son dos ejemplos de especies de fabáceas de las que se han obtenido resultados importantes, mostrando actividad ovicida e inhibición de la migración larval respectivamente, actividades atribuidas a compuestos como cafeoil y cumaroil y a la presencia de taninos. El género *Acacia* es el segundo más grande de la familia Fabaceae, por tal abundancia y aunado a los múltiples compuestos activos hallados en especies de este género, representa una alternativa viable para el tratamiento de la helmintiasis con una producción de bajo costo. *Acacia bilimekii* es una fabácea característica de la Cuenca del Río Balsas, restringida a la Cuenca Alta, usada en la medicina tradicional para lavar heridas y como forraje para las cabras (Rico Arce, 2001). Tiene una alta capacidad de rebrote, debido a su eficiencia para conservar el agua, lo que le permite tener follaje todo el año; es decir, que se comporta como una especie perennifolia a pesar de pertenecer a una vegetación de selva baja caducifolia. Esta especie tiene un amplio estudio a nivel taxonómico, pero ha

sido escasamente investigada a nivel fitoquímico y farmacológico, sin embargo, se sabe que produce compuestos con alto potencial antihelmíntico como son los taninos y las saponinas (Sotelo, *et al.*, 1999). Por lo anterior, este proyecto pretende evaluar la actividad antihelmíntica de extractos y fracciones de *A. bilimekii* sobre el nematodo hematófago *Haemonchus contortus*.

## **ANTECEDENTES**

### **1. GANADERÍA DE PEQUEÑOS RUMIANTES**

#### **1.1 Producción pecuaria ovina**

La ovinocultura es una actividad pecuaria consistente en la crianza de ganado ovino con propósitos comerciales y es de gran relevancia en la industria ganadera alrededor del mundo. Representa importantes ingresos económicos, alimento y sustentabilidad para una gran parte de la población, especialmente en sectores marginales, pues en muchos de los casos esta actividad pecuaria es su medio de vida.

Por lo general la ganadería de pequeños rumiantes como los ovinos, en México y el resto del mundo emplean sistemas de pastoreo en praderas y traspatio, lo que favorece la producción reduciendo costos y mejorando las cualidades organolépticas de la carne al aprovechar los recursos forrajeros disponibles (Partida et al., 2013).

De acuerdo con Cuevas Padilla (2019) una de las desventajas de estos sistemas de crianza es que la rentabilidad del negocio se vuelve dependiente de múltiples factores que afectan la productividad de los hatos o rebaños ovinos, como son: la cantidad, calidad y tipo de vegetación accesible para los rumiantes, condiciones climáticas de la región de pastoreo, la presencia o ausencia de depredadores naturales, y la prevalencia de patógenos en la zona, entre otros.

En 2019 se llevó a cabo la Reunión Ordinaria del Comité Estatal Sistema Producto Ovinos de Morelos, en donde varios productores trataron temas acerca de cómo impulsar la cadena productiva del sector ovino debido a que se vio afectado por el descenso en las ventas de cordero en pie.

En México en el año 2019, se produjeron 122, 464 toneladas en pie de ganado ovino, siendo los principales productores el estado de México, con 17,548 toneladas, Hidalgo, 13,536 toneladas Veracruz 9,069 toneladas y Morelos apporto 1, 278.0 toneladas del registro nacional. (Delegación SADER Morelos)

Los pequeños rumiantes pueden verse afectados por diversos factores y esto influye en su producción pecuaria, una de las principales causas de las pérdidas

de ejemplares y por consiguiente económicas en la ovinocultura son las infecciones parasitarias del ganado.

Los hatos ganaderos se ven afectados principalmente por endoparásitos que se alojan en el tracto gastrointestinal de los rumiantes, especialmente aquellos que habitan regiones tropicales y subtropicales con climas cálidos o templados. (Rodríguez Vivas et al., 2017; González et al., 2011). *H. contortus* es el nemátodo con mayor incidencia y supone enormes pérdidas económicas a nivel mundial

En México se estiman pérdidas millonarias que oscilan en los \$445.1 millones de dólares (Rodríguez Vivas *et al.*, 2017).

## **2. NEMÁTODOS GASTROINTESTINALES Y SUS AFECCIONES EN PEQUEÑOS RUMIANTES**

### **2.1 Biología de los nemátodos gastrointestinales**

Los nematodos son un grupo de organismos vermiformes que se encuentran entre los más numerosos de la tierra siendo el segundo filo más diverso del reino con 25,043 especies descritas hasta 2013. (Zhang, 2013).

Los nematodos son considerados metazoarios pseudo-celomados, segmentados y taxonómicamente incluidos dentro del filo Nematoda. Sin embargo, su apariencia vermiforme los hace ser considerados dentro del grupo de los Helmintos (Cuevas Padilla, 2019).

Según Cuevas Padilla (2019), es común diferenciarlos de acuerdo a su hábitat: en marinos y terrestres; aunque estos últimos en realidad pueden clasificarse como organismos acuáticos debido a que tienen la necesidad de un entorno húmedo para subsistir, por lo que pueden encontrarse en ambientes semiacuáticos o embebidos en películas de agua entre el suelo.

Gunn y Pitt (2012) describen a los nematodos como *organismos de forma* cilíndrica, alargada y delgada y con ambos extremos convergentes.

Los nematodos gastrointestinales (NGI) presentan ciclos de vida directos, debido a que su estado infestante se desarrolla en el medio externo. En mamíferos como los humanos o el ganado, la mayoría de los NGI parasitan el abomaso y el intestino delgado y algunos cuantos el intestino grueso (Angulo Cubillán, 2005).

Los adultos copulan en su sitio infectante y la hembra expulsa los huevos en estado de mórula; sin embargo, en géneros como el *Strongyloides* únicamente la hembra es parásita y se reproduce partenogenéticamente. La gran mayoría de los géneros son transmitidos por vía oral (*Ostertagia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*) y en algunos casos por vía percutánea (*Bunostomum* y *Strongyloide*) (Angulo Cubillán, 2005).

## **2.2 Helmintiasis en pequeños rumiantes**

El término helmintos como grupo o clasificación es mayormente usado en parasitología para describir a organismos vermiformes que por lo general parasitan a vertebrados como el humano, rumiantes, etc. (Mujica Ruiz, 2009). Y conforman una clasificación médica complementaria (no taxonómica) debido a que no constituye un grupo monofilético. Sin embargo, el término es ampliamente utilizado entre la comunidad científica (Cuevas Padilla, 2019).

La helmintiasis alude a la infección que causa este tipo de organismos parásitos en un organismo vivo. En el caso de los pequeños rumiantes refiere a las afecciones del ganado Ovino y Caprino.

La patogenicidad de algunos helmintos puede ser muy severa en especial los que se consideran endoparásitos, pues son mayormente prevalentes en latitudes templadas, tropicales y subtropicales (Rodríguez Vivas *et al.*, 2017; González *et al.*, 2011).

Los helmintos que ocasiona un mayor daño parasitan el tracto gastrointestinal de los rumiantes, representando un riesgo para la salud pública, la producción zootécnica y el medio ambiente. Frecuentemente las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) sobrepasan los daños de rentabilidad y terminan con la muerte de los individuos infectados. (Ángulo Cubillán, *et al.*, 2007; Cuevas Padilla, 2019)

Según Torgerson y Macpherson (2011) las estimaciones de la población afectada llegan hasta el 80% a nivel mundial. Esto significa grandes pérdidas económicas y pone en riesgo el sustento de la actividad pecuaria.

De acuerdo con Partida y colaboradores (2013), *Haemonchus contortus* es el parásito causante de mayores pérdidas económicas en los ovinos y mencionan

que su potencial biótico es magnificado en regiones con zonas de clima cálido o durante la temporada calurosa de zonas de climas moderados. Aunque, en zonas semiáridas, también son responsables de importantes pérdidas

### **2.2.1 *Haemonchus contortus***

El género *Haemonchus* tuvo un aparente *surgimiento* en África con una inicial colonización y diversificación en antílopes, con el paso del tiempo se generaron nuevas cepas y estas colonizaron a otros rumiantes salvajes, debido a la domesticación y a las migraciones el género logro desarrollarse en rumiantes domésticos y propagarse en otros continentes. (Hober *et al.*, 2004).

*Haemonchus contortus* es una de las dos especies pertenecientes a este género, siendo la otra *Haemonchus placei*, es un nematodo gastrointestinal de comportamiento hematófago.

Infecta bovinos, ovinos, caprinos y otros rumiantes. Es el nemátodo con más incidencia a nivel mundial y por lo tanto el más frecuente en los hatos ganaderos. Ocasionalmente puede presentarse en infecciones mixtas en conjunto con otros NGI (*Cooperia* spp., *Ostertagia* spp., *Trichostrongylus* spp.), sobre todo si se tiene rebaños en pastoreo. La enfermedad ocasionada por la infección de este nematodo es llamada hemonquiasis, sin embargo, también se puede referir como hemoncosis o hemonchosis (Angulo Cubillán, *et al.*, 2007).

En su fase adulta se localizan en el abomaso, son de color rojizo y miden de 1 a 3 cm de longitud. En las hembras los ovarios son de color blanco enrollados en forma de espiral alrededor del intestino, el cual está lleno de sangre lo que le da el estriado característico de las hembras. La cavidad bucal tiene una lanceta dorsal que sirve para perforar la mucosa gástrica y succionar la sangre. La bolsa copuladora de los machos tiene un lóbulo dorsal asimétrico y las espículas terminan en forma de espolón, en las hembras normalmente la vulva está cubierta por la solapa bulbar (Jacquiet, *et al.*, 1997).

#### **2.2.1.1 Ciclo infeccioso**

El proceso de su ciclo infeccioso o su ciclo de vida es directo, lo que quiere decir que no pasa por un intermediario (hospedero temporal). Pasa por una fase exógena y una endógena, la primera comprende desde el huevo hasta el estadio

$L_3$  y la segunda desde la ingesta del  $L_3$ , el desarrollo del adulto, la cópula y la producción de huevos.

Los huevos son expulsados del hospedero a través de las heces y por lo general se desarrollan en sus estadios  $L_1$  y  $L_2$  alimentándose de bacterias y detritus presentes en las heces, al llegar a la  $L_3$  están cubiertos por una cutícula lo que les impide alimentarse y dependen únicamente de sus reservas. Este estadio se queda en el pasto de las praderas hasta que un hospedero llega y adquiere la infección al ingerirlo. (Angulo Cubillán, 2007; Onyiah y Arslan. 2005).

Según Cuevas Padilla (2019) la fase que compone la excreción de los huevos junto con las heces se denomina pre-parasítica. Los huevos tienen una forma ovoide con extremos de curvaturas y polos dispares, en promedio su tamaño es de 70-79  $\mu\text{m}$  en su eje longitudinal y de 45-49  $\mu\text{m}$  en el transversal.

En condiciones de humedad (80 a 100%) y temperatura (18 a 35 °C) se suele favorecer el desarrollo de los estadios libres del nematodo (Vázquez *et al.*, 2004; González, 2007; Liébano, 2011).

### **2.2.1.2 Principales enfermedades causadas por *H. contortus***

La infección por sí misma ocasiona Hemoncrosis, lo que da lugar a varios síntomas y demás padecimientos a causa de la parasitosis. Genera diversas manifestaciones clínicas como diarreas persistentes, desnutrición y anemia (Cuevas Padilla, 2019).

La virulencia del parásito y la respuesta del hospedero son los factores más importantes por destacar en el desarrollo de la enfermedad. Debido al comportamiento hematófago del parásito genera lesiones en la mucosa gástrica y hemorragias internas, además de alterar los parámetros sanguíneos disminuyendo significativamente el volumen celular aglomerado (VCA) y disminuye la capacidad de absorber nutrientes a nivel intestinal. (Castillo Mitre, 2018).

Los daños y la inflamación provocados por las larvas y los adultos en la mucosa gástrica pueden generar gastritis. Un parásito adulto puede ingerir hasta 0.05ml de sangre por día y eventualmente ocasionar anemia (Williamson *et al.*, 2003).

En infecciones crónicas también provocan hígado graso, hipoproteinemia y emaciación. En infecciones agudas puede ocasionar muertes repentinas sobre todo en corderos y cabritos jóvenes, también provoca edema abdominal, torácico y submandibular (cuello de botella), anemia por deficiencia de hierro, caída progresiva de lana o pelo, falta de apetito, pérdida de peso y muerte (Fox y Jacobs 1991; Rowe *et al.*, 1988.).

### **3. ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA**

#### **3.1 Antihelmínticos sintéticos**

De acuerdo con Castillo Mitre (2018), es a partir de la década de los 60's cuando se desarrollan el primer antihelmíntico comercial, el tiabendazol, un fármaco con buena eficacia, de amplio espectro y baja toxicidad, lo que marcó la pauta para el comienzo de una era de control de los NGI. La aceptación de los benzimidazoles y su uso frecuente revolucionó la química moderna para el tratamiento de los helmintos que consistió en el empleo únicamente de antihelmínticos sintéticos, pero con una técnica de diagnóstico inadecuada.

La amplia gama de antihelmínticos comerciales comprende cinco grupos: benzimidazoles, imidazotiazoles, salicilanílicos, nitrofenoles y lactonas macrocíclicas. De estos grupos, los benzimidazoles y las lactonas macrocíclicas son los antiparasitarios más empleados en ovinos (Cuéllar, 2009).

#### **3.2 Resistencia antihelmíntica**

El uso constante e indiscriminado de antihelmínticos sintéticos, ha causado un efecto contraproducente para los productores de pequeños rumiantes. Debido al inadecuado empleo de estos fármacos se ha generado una resistencia generalizada a los mismos (Delgado-Nuñez, 2020; Moya y Escudero, 2015).

La efectividad de los antihelmínticos eventualmente ha disminuido debido a causas antropogénicas, al realizar una selección artificial (de manera accidental) de parásitos, exponiéndolos a un único principio activo por un periodo de tiempo definido. Incluso, se han determinado especies parásitas de NGI que muestran multi resistencia; es decir, resistencia a dos o más activos antihelmínticos (Kotze y Prichard, 2016; Herrera-Manzanilla *et al.*, 2017).

La resistencia antihelmíntica (RA) ha sido un factor de gran relevancia para los ingresos de la industria productora de pequeños rumiantes. Se ha convertido en un problema de talla mundial y de una amplia incidencia, significando grandes pérdidas económicas, a causa de los altos costos de los fármacos y por la asesoría profesional que en un supuesto debería realizarse. Sin embargo, muchos productores con motivos de disminuir los costos tienden a prescindir de un diagnóstico profesional y realizarlo ellos mismos, esto conlleva un diagnóstico errónea o sesgada y una elección de los fármacos equivocada además de una muy posible subdosificación, por consecuencia se reduce la efectividad del fármaco (Torres Vásquez, 2007; Cuellar Ordaz, 2009).

El desarrollo de la resistencia está influenciado por factores del clima, malas prácticas de manejo, edad de los animales y peso corporal de los animales que son tratados. (Torres Vásquez, 2007).

#### **4. USO DE LAS PLANTAS MEDICINALES COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LA PARASITOSIS**

##### **4.1 Plantas usadas para el control de parásitos**

La farmacorresistencia que se ha generado a raíz del empleo constante de productos químicos para el control de los NGI, durante las últimas décadas ha sido motivo de la búsqueda de nuevas alternativas, y es con base en que diversas especies de plantas son usadas de manera tradicional como tratamiento antiparasitario, que estas representan una opción ideal para la búsqueda de compuestos activos con potencial antihelmíntico.

Especies como *Allium sativum* (Amaryllidaceae), *Artemisia absinthium* (Asteraceae) y *Chenopodium ambrosioides* (Amaranthaceae), han presentado una alta eficiencia como antihelmíntico (Moya y Escudero, 2015), y de acuerdo con García *et al.*, (2005), extractos de *Morera alba* también presentaron propiedades antihelmínticas contra los géneros *Trichostrongylus* y *Haemonchus*. Por su parte, Cortes-Morales *et al.* (2019) demostraron la actividad ovicida del flavonoide isokaempferido, obtenido de la planta *Baccharis conferta* (Asteraceae).

Existen varias familias que presentan compuestos activos eficaces contra los NGI; sin embargo, la familia Fabaceae comprende un grupo de plantas que son conocidas por ser productoras de metabolitos secundarios con diversas propiedades medicinales (Olmedo Juárez *et al.*, 2014; Sibaja Hernández *et al.*, 2015). Por lo que investigadores se han centrado en la búsqueda de metabolitos secundarios presentes en diversas especies de fabáceas arbóreas que han demostrado propiedades antihelmínticas (von Son-de Fermex *et al.*, 2012; Olmedo-Juárez *et al.*, 2014). De acuerdo con Williams *et al.* (2014) dentro de estos metabolitos se encuentran los taninos condensados (TC), terpenos, saponinas y flavonoides.

## **5. FABÁCEAS Y EL GÉNERO ACACIA**

### **5.1 Bosque Tropical Caducifolio**

El Bosque tropical Caducifolio (BTC) o Selva Baja caducifolia es un tipo de vegetación en México propio de los climas cálidos y según Pennington y Sarukhán (2012) actúa como un límite hídrico de las vegetaciones de las zonas cálido-húmedas.

Según datos de las CONABIO (2020) el BTC ocupa aproximadamente el 11.7% de la superficie nacional y su distribución se extiende en la vertiente del Pacífico de México desde el sur de Sonora y suroeste de Chihuahua hasta Chiapas continuando hasta Centroamérica. Existen pequeñas porciones en el extremo sur de la Península de Baja California y en el norte de la Península de Yucatán. Su presencia destaca en la zona de la Cuenca del Río Balsas el cual atraviesa ocho estados de la República: Morelos en su totalidad y parcialmente los estados de Tlaxcala (75%), Puebla (55%), el Estado de México (36%), Oaxaca (9%), Guerrero (63%), Michoacán (62%) y Jalisco (4%) (INECC, 2007).

Fisionómicamente este tipo de vegetación se caracteriza por su pérdida de follaje en la mayoría de sus especies características durante la época de secas teniendo un gran contraste con la temporada de lluvias además de que una gran parte de las especies leñosas tiene una capacidad de rebrote, generando chupones a partir de tocones cortados. Sus componentes arbóreos mantienen una corta altura, por lo general de 4 a 10 metros. Gran parte de las especies

presentes exudan sustancias resinosas o laticíferas y su follaje desprende un olor fragante o resinoso al ser estrujadas (Contreras Hinojosa *et al*, 2014).

Contreras Hinojosa *et al* (2014) establece que este tipo de vegetación se presenta en zonas con promedio de temperaturas anuales superiores a 20 °C y precipitaciones anuales de 1,200 mm como máximo, aunque lo más común es que sean del orden de 800 mm, con una temporada seca que puede durar de 7 u 8 meses y que es muy severa.

El BTC posee una gran riqueza biológica pues este tipo de bosques se caracterizan por su alta diversidad florística (Beltrán Rodríguez, 2018).

En relación tanto con la cantidad de especies como con el número de individuos destaca la familia Fabaceae, y una alta cantidad de especies del género *Bursera*.

## **5.2 Fabáceas**

Las fabáceas son una familia de angiospermas que habitan en diversos ambientes; zonas pluviales, húmedas y con restricciones de temperatura y humedad como el Bosque Tropical Caducifolio (Contreras Hinojosa *et al.*, 2014). Cuenta con registro de aproximadamente 19.500 especies divididas en seis subfamilias (Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae, y Papilionoideae) (LPWG, 2017).

Su empleo como planta forrajera es de gran importancia económica debido a su uso en varias culturas, ya que es una fuente ideal de proteínas lo que complementa la dieta de los ganados que se basa generalmente en cereales. (da Silva Gomes, 2019; Flores, 1983).

### **5.2.1 Fabáceas con actividad antihelmíntica**

#### **5.2.1.1 *Gliricidia sepium***

*G. sepium* es una fabácea conocida comúnmente como “madre de cacao” o “matarratón”, es un árbol sin espinas de tamaño pequeño a mediano que suele alcanzar una altura de 10-12 m, su ramificación es frecuentemente desde la base con diámetros basales que alcanzan los 50-70 cm y la corteza es lisa, pero puede variar en color desde un gris blanquecino hasta un marrón rojizo intenso. (Simons y Stewart, 2007)

Se distribuye principalmente en México, Centroamérica y regiones tropicales de Sudamérica y Asia. Es utilizado con propósitos medicinales y como planta forrajera (Pérez Pérez, 2014).

El extracto de *G. sepium* ha mostrado previamente propiedades antihelmínticas contra *Haemonchus contortus* (Von Son-de Fernex *et al.*, 2012; Wabo *et al.*, 2011). Además, su actividad ovicida podría relacionarse con compuestos reportados previamente en las hojas, como son saponinas y taninos, los cuales han mostrado ser activos contra huevos de NGI (Pérez Pérez, 2014).

#### **5.2.1.2 *Sarothamnus scoparius***

Conocida también como “retama negra” o “escoba negra”. Es un arbusto de 0.5-2 m con ramas marcadas por cinco costillas en forma de v, posee hojas unifoliadas o trifoliadas que pueden perder a lo largo de la primavera (Gómez-Serranillos, 2017).

De manera tradicional, los pobladores preparan una infusión con una cuchara de hojas y tallos en una taza de agua hirviendo, después de 10 minutos lo cuelean y lo beben en ayunas para eliminar parásitos (Salazar, 2008).

De acuerdo con la investigación de Salazar (2008), los extractos acuosos de *S. scoparius* contienen alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos, compuestos polares que han demostrado una considerable eficacia sobre los helmintos denominados oxiuros.

#### **5.2.1.3 *Prosopis laevigata***

También llamado mezquite, se caracteriza por la producción de vainas con semillas. Además de ser un género ampliamente distribuido en zonas áridas y semiáridas de México, también se le encuentra cerca del nivel del mar (Palacios, 2006; Carrillo-Parra *et al.*, 2010). Miden desde 20cm hasta 40 m y se adaptan a cualquier condición climática (Ríos-Saucedo *et al.*, 2013; Aguilar-Rodríguez *et al.*, 2007).

El tronco mide por lo general de 30 a 60 cm hasta de 1 m de diámetro; su corteza es gruesa de color café-negruzco parcialmente fisurada. La raíz es profunda y el tallo ramifica a baja altura, algunas veces a nivel del suelo (Rosales *et al.*, 2011).

De acuerdo con el estudio realizado por Delgado-Nuñez et al. (2020), las hojas de *P. laevigata* presentan compuestos activos contra larvas infectivas de *H. contortus*. El compuesto identificado como responsable de la actividad larvicida y ovicida fue el flavonol denominado isoramnetina.

### **5.3 El género *Acacia***

El término acacia deriva del griego y significa punta, espina (Allen y Allen, 1981), es un género perteneciente a la familia Fabaceae. Presenta una estructura espinosa en la mayoría de las especies que pertenecientes (Contreras Hinojosa et al, 2014).

Este género es el segundo más grande de la familia después de *Astragalus* y cuenta aproximadamente con 1200 especies distribuidas ampliamente en los trópicos del mundo.

Algunas especies del género *Acacia* pueden presentar variabilidad morfológica en algunos de sus caracteres taxonómicos lo que hace más difícil su identificación (Rico Arce, 2001).

Las especies de *Acacia* son de gran importancia en algunos ecosistemas; sin embargo, existen otros en los que puede considerarse una especie invasora y deben tomarse acciones para ser erradicada y mitigar los daños (Sánchez Blanco et al., 2012).

Se sabe que las especies de *Acacia* pueden emplearse para distintos fines, como plantas medicinales, usos en la industria y construcción (alimentos, forraje para ganado, perfumería, estabilizante de tintas, para la diarrea, etc.) (Sánchez Blanco et al., 2012; Delgado-Nuñez, 2020).

#### **5.3.1 Acacias con actividad antihelmíntica**

##### **5.3.1.1 *Acacia pennatula***

Es una especie arbórea de tamaño pequeño a mediano, de 6 a 12 m de altura con tronco de un diámetro de 20 a 60 cm a la altura del pecho.

Sus ramas son extendidas, y tanto estas como el tallo poseen espinas rígidas y cortas. Sus hojas son compuestas de 8 a 20 cm, sus flores diminutas, de un color

amarillo anaranjado y su fruto son vainas indehiscentes (Mendoza y Perez, 2011).

Varios estudios han denotado la actividad antihelmíntica de esta especie y de acuerdo con la investigación realizada por Ortiz Ocampo, *et al.* (2016), esta se atribuye a la presencia de taninos, puesto que en las evaluaciones de los extractos de *A. pennatula* con inclusión de polivinilpolipirrolidona (un inhibidor de taninos) su actividad antihelmíntica fue bloqueada casi en su totalidad.

#### **5.3.1.2 *Acacia cochliacantha***

Son arbustos de hasta 4 metros de altura. Ramas y tallos estrigulosos. Hojas 12-15 cm de largo; estípulas de hasta 4 cm de largo, transformadas en espinas, cimbiformes y generalmente rojizas, persistentes. Inflorescencias axilares, en fascículos de 2 a 5 cabezuelas; pedúnculos 0.5-10 cm de largo, flores amarillas, bráctea floral 1.5 mm de largo. Sus espinas cimbiformes son rojizas cuando jóvenes y se vuelven pardas al madurar. El tamaño de sus espinas varía y pueden ser inconspícuas.

En México se distribuye en Baja California, de Sonora a Chiapas, Durango, Estado de México, Morelos, Oaxaca, Puebla y Veracruz (Rico Arce, 2001).

Varias especies de *Acacia* (incluida *A. cochliacantha*), han sido consideradas tradicionalmente como plantas antiparasitarias, y se ha demostrado que las crías de cabras alimentadas con hojas de esta muestran mayor protección contra infecciones de *H. contortus* (Castillo Mitre, *et al.*, 2017).

Según Castillo Mitre, *et al.* (2017) el extracto hidroalcohólico de *A. cochliacantha* contiene compuestos con alta actividad ovicida *in vitro* contra *H. contortus*, tales como derivados de cafeoil y cumaroilo; además de quercetina.

#### **5.3.1.3 *Acacia farnesiana***

Son arbustos de hasta 3 m de altura. Ramas y tallos de glabros a hispídulos, hojas de 2-9 cm de largo. Presentan inflorescencias cabezuelas solitarias o axilares en grupos de 2-5 pedúnculos; flores amarillas, bráctea floral claviforme.

*A. farnesiana* destaca por sus espinas estipulares blanquecinas y sus flores amarillas y aromáticas, además, posee un fruto glabro y casi negro.

Se localiza ampliamente en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo, en América se distribuye en el sureste de Estados Unidos, de México hasta Argentina y el Caribe. En algunas regiones es cultivada debido a su valor económico (Rico Arce, 2001).

Las especies de *Acacia* se destacan por su alto contenido de metabolitos secundarios, especialmente taninos (Seigler, 2002), y de acuerdo con Moreno, *et al.* (2010), *A. farnesiana* es una de las especies que presentan actividad contra *H. contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, mostrando gran inhibición de la migración larval.

## **6. *Acacia bilimekii***

### **6.1 Descripción botánica de *Acacia bilimekii***

*A. bilimekii* (Figura 1) es una especie arbórea arbustiva característica del BTC, y comúnmente llamada Tehuixtle, Tehuistle o Espino. Su altura llega hasta los 6 metros y posee ramas y tallos hispídulos. Hojas de 1 a 3 cm de largo; estipulas hasta 2.5 cm de largo, transformadas en espinas, persistentes; peciolo hasta 1 mm de largo; pinnas un par de hasta 8 mm de largo, foliolos 1(-2) pares por pinna de 0.6 a 2.5 cm de largo; (0.4) 0.6-2.0 cm de ancho, oblongo-elípticos, la base truncada, el ápice agudo, algunas veces mucronatos, esparcidamente hispídulos en ambas superficies, venación reticulada, vena principal subcentral. Posee flores amarillas; bráctea floral de 1mm de largo, claviforme, estrigulosa y cáliz campanulado (Rico Arce, 2001).



**Figura 1.** Árbol de *Acacia bilimekii*

*A. bilimekii* destaca por presentar un solo par de folíolos por pinna y un fruto linear cilíndrico, constricto y sedoso. Se restringe a la cuenca del Río Balsas y es una de las pocas especies que presentan flores estaminadas y hermafroditas en la misma inflorescencia. Es endémica de esta Cuenca y por lo tanto está presente en los estados de México, Morelos, Guerrero, Puebla y Oaxaca.

Habita en vegetación de BTC y en palmares de *Brahea*, florece de septiembre a marzo y fructifica de febrero a junio (Rico Arce, 2001).

## **6.2 Usos generales de *Acacia bilimekii***

La vegetación de BTC posee un ecosistema con una organización definida, en el que el intercambio de materiales entre factores bióticos y abióticos es indispensable y ocasionalmente esta organización puede ser alterada por factores naturales y antropogénicos. Estos últimos resultan en alteraciones a causa del uso de la vegetación residente, especialmente el de varias fabáceas y en este contexto específico el de *A. bilimekii* (Sutton y Harmon, 1981; Southwick, 1972, Contreras Hinojosa, 2014).

Su empleo por las comunidades está destinado a diversos propósitos. En la medicina tradicional, su corteza se usa para lavar heridas evitando así posibles infecciones. También es empleada en procesos de curtiduría debido a la presencia de taninos (Rico Arce, 2001).

Algunas personas lo utilizan como recurso para construcción, pues es clasificada junto a *A. farnesiana* y *Prosopis juliflora* como una madera dura, lo que la hace ideal para obtener vigas, además, *A. bilimekii* tiene la propiedad de secretar una sustancia resinosa cuando es cortada lo que hace que pueda funcionar como una mecha y por ende también es empleada como combustible. (Sánchez Blanco, 2012; Contreras Hinojosa, 2014)

*A. bilimekii* también es utilizada como forraje para el ganado ovino y caprino. Debido a la práctica de pastoreo extensivo en el BTC, el aprovechamiento de agostaderos se realiza en la época de lluvias y disminuye en la época de secas. Existen pocas especies que mantienen su follaje durante este periodo (Contreras Hinojosa, *et al.*, 2014), razón por la cual *A. bilimekii* es una excelente alternativa en ambas épocas.

Particularmente *A. bilimekii* ha mostrado en sus semillas un elevado contenido proteico (35.5%) y en la vaina un contenido significativo. Esto la hace una buena fuente de este nutriente y la convierte en un suplemento atractivo para los cereales como el sorgo y la avena en la alimentación del ganado. También muestra un alto contenido de Saponinas en la vaina en comparación con las semillas (Sotelo, 1999).

### **6.3 Biorremediación**

En 2014 el INIFAP estableció que es posible utilizar especímenes de *A. bilimekii* con fines de biorremediación de los suelos con el propósito de restaurar el Bosque Tropical Caducifolio además de crear un Banco de proteína.

## **JUSTIFICACIÓN**

*Haemonchus contortus* es uno de los nematodos gastrointestinales (NGIs) con mayor incidencia y mortalidad en pequeños rumiantes. Las enfermedades causadas por este nematodo significan grandes pérdidas económicas a nivel mundial en la producción ovina y caprina, impactando principalmente a pequeños productores, dependientes de esta actividad pecuaria. El uso indiscriminado de antihelmínticos sintéticos resulta altamente costoso; además, provoca una resistencia antihelmíntica generalizada. Fabaceae, es una familia de plantas que ha mostrado poseer compuestos activos contra nematodos gastrointestinales, por lo cual este proyecto pretende evaluar la actividad antihelmíntica de *A. bilimekii* contra *H. contortus* e identificar el tipo de compuestos bioactivos.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué tipo de compuestos químicos son los responsables de la actividad antihelmíntica de *A. bilimekii* contra *H. contortus*?

## **HIPÓTESIS**

*Acacia bilimekii* presentará compuestos químicos con actividad antihelmíntica contra *Haemonchus contortus*

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad antihelmíntica de extractos y fracciones de *Acacia bilimekii*, contra *Haemonchus contortus* e identificar el tipo de compuestos activos.

### **Objetivos particulares**

Obtener tres extractos orgánicos de la especie vegetal *A. bilimekii*.

Evaluar el efecto inhibitorio de los extractos obtenidos de *A. bilimekii* en la eclosión de huevos de *H. contortus in vitro*.

Fraccionar el o los extractos de *A. bilimekii* con mayor actividad ovicida.

Evaluar las fracciones y/o compuestos en el ensayo de la inhibición de eclosión de huevos (IEH) de *H. contortus*.

Identificar el tipo de compuestos presentes en las fracciones con mayor actividad ovicida.

## **METODOLOGÍA**

### **Material vegetal**

La colecta de las partes aéreas de *A. bilimekii* (11 Kg) se realizó en Carretera Grutas de Cacahuamilpa-Alpuyeca, Santa Cruz Milpillas, Morelos, México (18° 46' 41" N y 99° 17' 38" O a 1114 m.s.n.m.) en el mes de octubre de 2020. Un espécimen fue enviado al herbario (HUMO) del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y fue identificado taxonómicamente por el M. en C. Gabriel Flores Franco con número de herbario 39818 (Anexo 1).

### **Obtención de extractos**

El material vegetal se secó bajo condiciones de sombra a temperatura ambiente hasta peso constante (1.9 kg) y fue triturado en molino industrial para reducir el tamaño de partícula entre 4 y 6 mm. Para el proceso de extracción se utilizaron 1.8 Kg de material seco y se realizaron maceraciones exhaustivas con disolventes de polaridad ascendente (*n*-hexano, acetato de etilo y una solución de agua-metanol 70:30) en una relación planta disolvente 1:5 por 24h. Los extractos líquidos se filtraron y concentraron por destilación a baja presión (210 mbar, 40° C), con ayuda de un rotaevaporador marca BUCHI 215, se liofilizaron y una vez secos se obtuvieron 23 g del extracto hexánico (AbEH), 29 g del extracto de acetato de etilo (AbAcOEt) y 266 g del extracto hidroalcohólico (AbHA). 100 g de AbHA se sometieron a una bipartición líquido-líquido con agua y acetato de etilo (AcOEt) en proporción 1:1 para obtener dos fracciones, una acuosa (78 g) y una orgánica de acetato de etilo (22 g). Finalmente se almacenaron a 4 °C, para posteriormente, ser evaluados en el ensayo de la inhibición de la eclosión de huevos (IEH) de *H. contortus*.

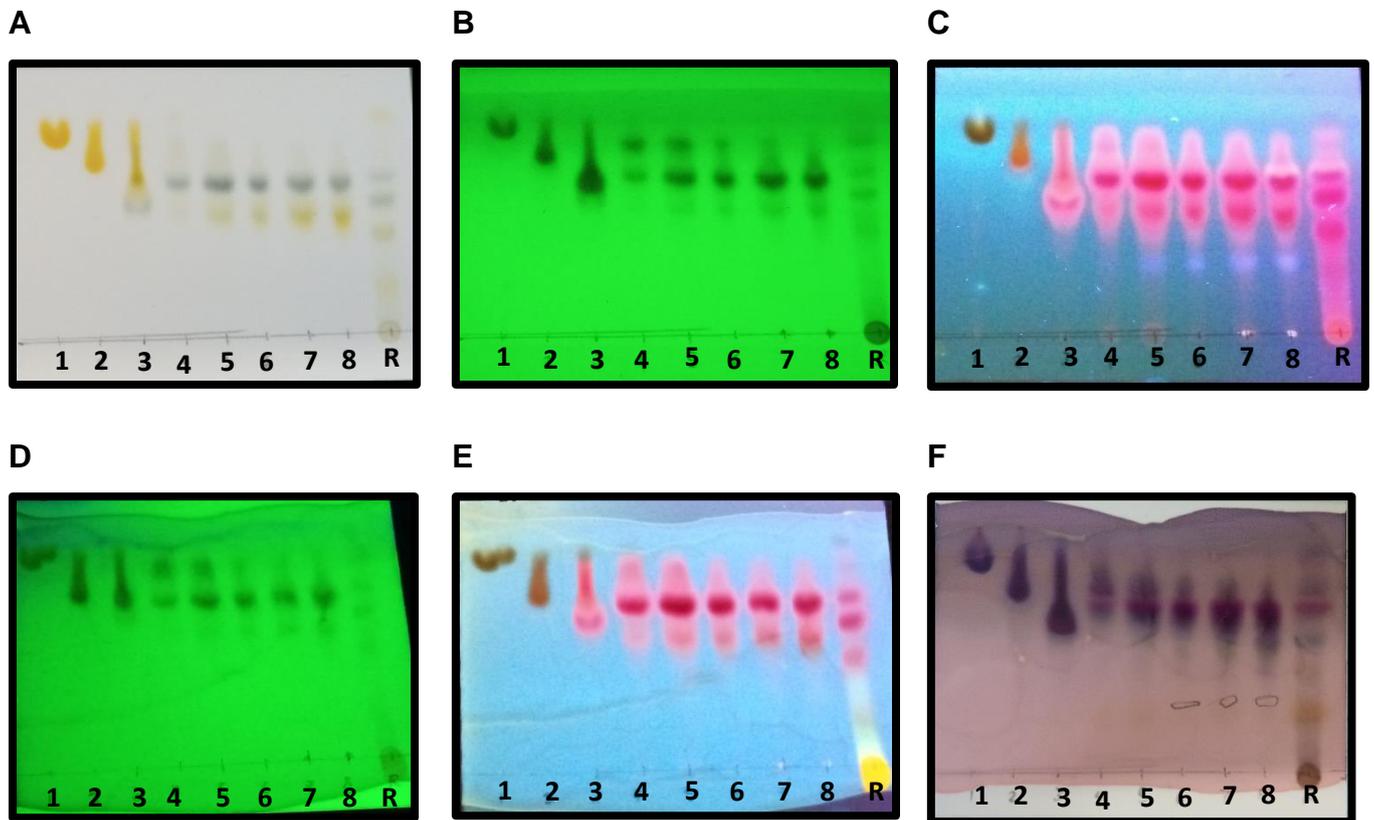
### **Fraccionamiento químico de AbFAcOEt obtenido de *A. bilimekii***

Se absorbieron 21 g de AbFAcOEt en 35 g de sílica gel 60 fase normal (malla 0.04-0.06, Merk Germany). La fracción se separó mediante cromatografía en columna abierta empacada con 120 g de gel de sílice y se activó con diclorometano (100%). La columna se eluyó con un sistema en gradiente con diclorometano y acetona como fase móvil. La elución se comenzó con 100% de

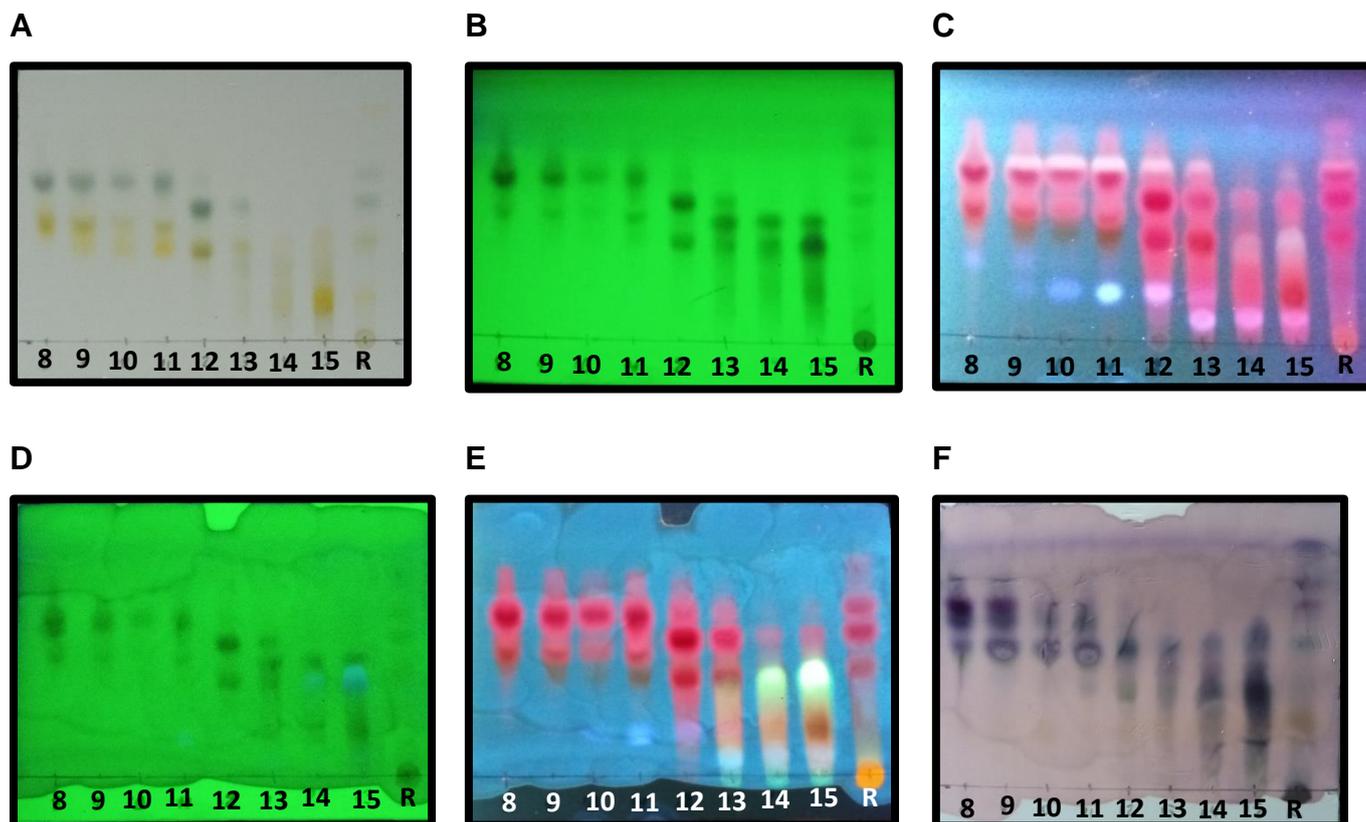
diclorometano y se fue aumentando la concentración de acetona en porcentajes de 5% hasta llegar una relación 50:50. Posteriormente, la columna fue lavada con metanol (100%). Se colectaron fracciones de alrededor de 50 mL, las cuales fueron concentradas por destilación a presión reducida con ayuda de un rotaevaporador BUCHI R-215 y almacenadas en viales de 15 mL. Se obtuvieron un total de 70 fracciones, de las cuales se realizaron placas cromatográficas en capa fina para identificar similitudes en su composición química. La identificación de grupo de compuestos se llevó a cabo mediante reveladores químicos y luz de onda corta (254 nm) y onda larga (360 nm). De este modo, las 70 fracciones fueron reunidas en 18 subfracciones (Cuadro 1) y fueron almacenadas hasta su posterior evaluación en el ensayo de inhibición de la eclosión de huevos (IEH).

**Cuadro 1.** Fraccionamiento químico de AbFAcOEt

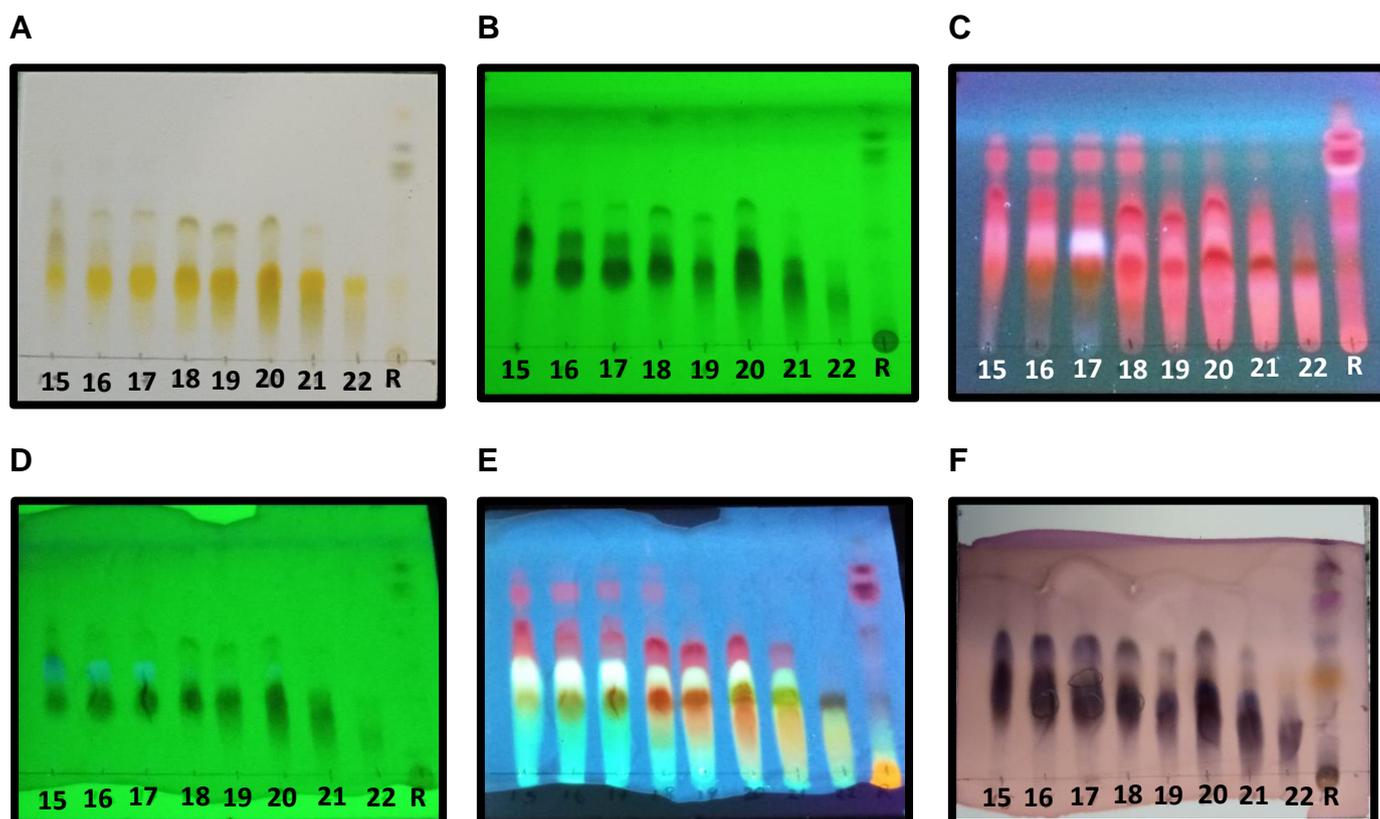
| Polaridad del sistema | Fracciones | Reuniones       | Cantidad (mg)  |
|-----------------------|------------|-----------------|----------------|
| Diclorometano (100%)  | 1-8        | 1-2             | AbC1R1<br>1900 |
| DCM/Ac (95:5)         | 9-15       | 3               | AbC1R2<br>1500 |
| DCM/Ac (90:10)        | 16-22      | 4-5             | AbC1R3<br>750  |
| DCM/Ac (85:15)        | 23-29      | 6-8             | AbC1R4<br>680  |
| DCM/Ac (80:20)        | 30-36      | 9-11            | AbC1R5<br>130  |
| DCM/Ac (75:25)        | 37-42      | 12              | AbC1R6<br>540  |
| DCM/Ac (70:30)        | 43-47      | 13              | AbC1R7<br>310  |
| DCM/Ac (65:45)        | 48-52      | 14-17           | AbC1R8<br>180  |
| DCM/Ac (60:40)        | 53-57      | 18-21           | AbC1R9<br>220  |
| DCM/Ac (55:45)        | 58-62      | 22-24           | AbC1R10<br>90  |
| DCM/Ac (50:50)        | 63-67      | 25-28           | AbC1R11<br>120 |
| MeOH (100%)           | 68-70      | 29-31           | AbC1R12<br>190 |
|                       |            | 32-40           | AbC1R13<br>900 |
|                       |            | 41-48           | AbC1R14<br>800 |
|                       |            | 49-54           | AbC1R15<br>350 |
|                       |            | 55-61           | AbC1R16<br>370 |
|                       |            | 62-68           | AbC1R17<br>340 |
|                       | 69-70      | AbC1R18<br>3500 |                |



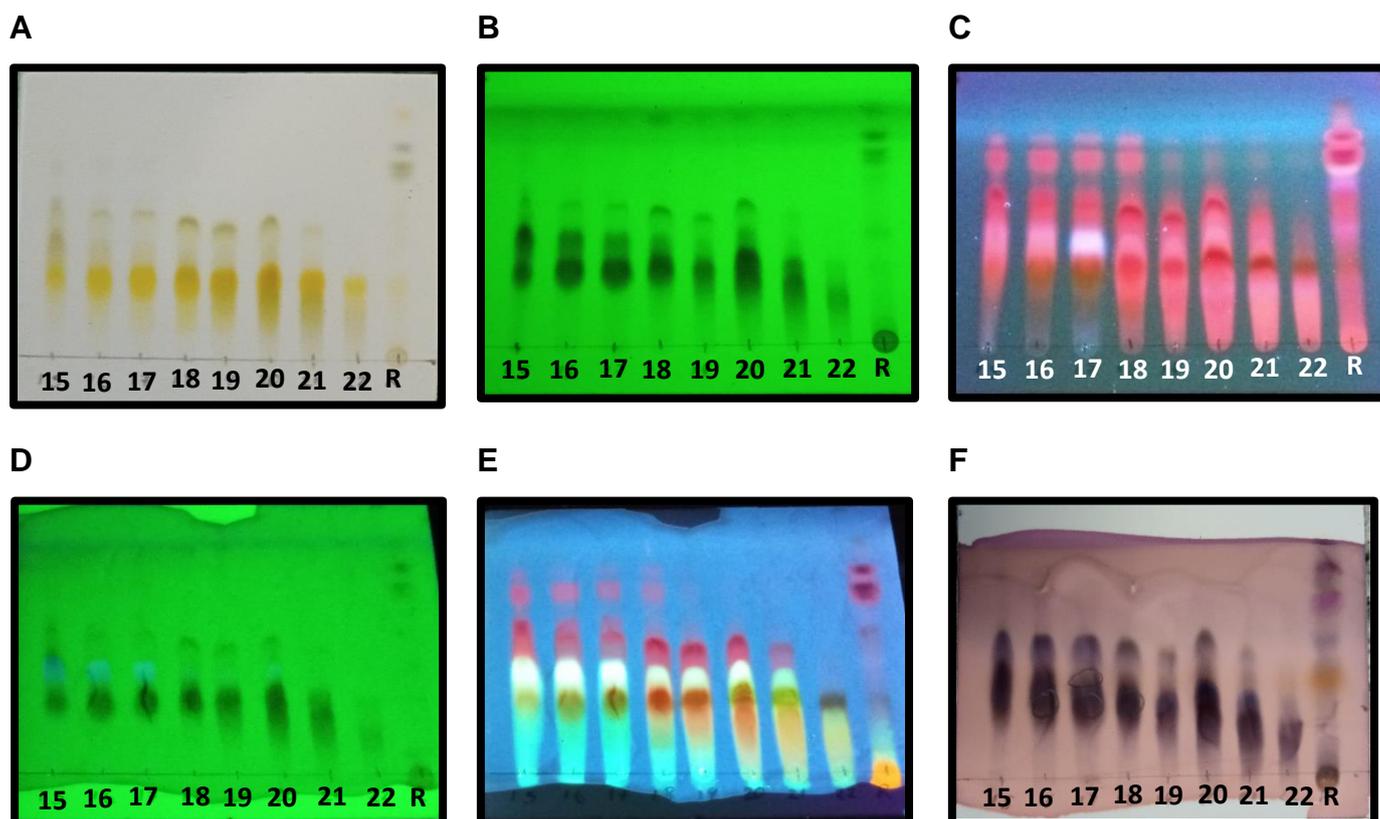
**Figura 2.** Cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones (1-8) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>



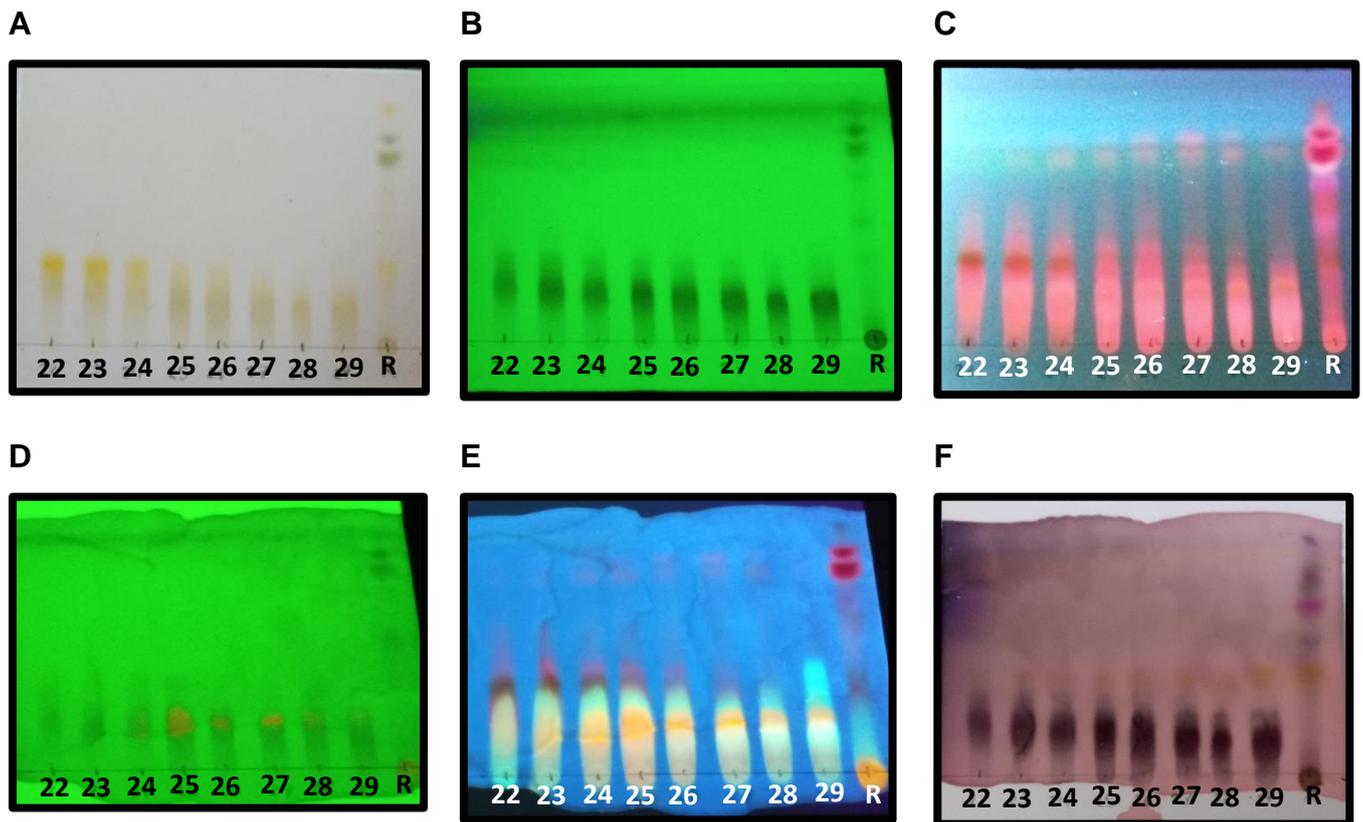
**Figura 3.** Cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones (8-15) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>



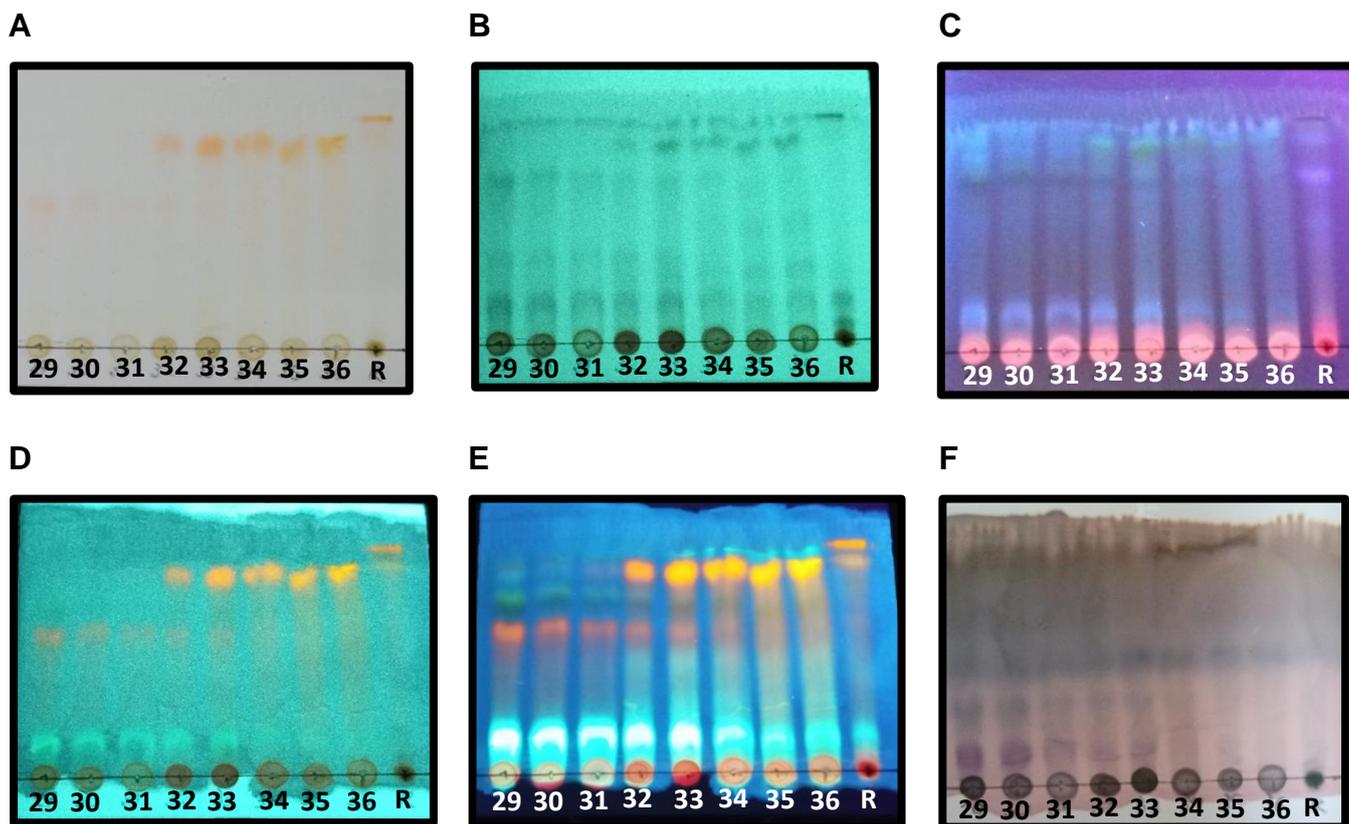
**Figura 4.** Cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones (15-22) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>



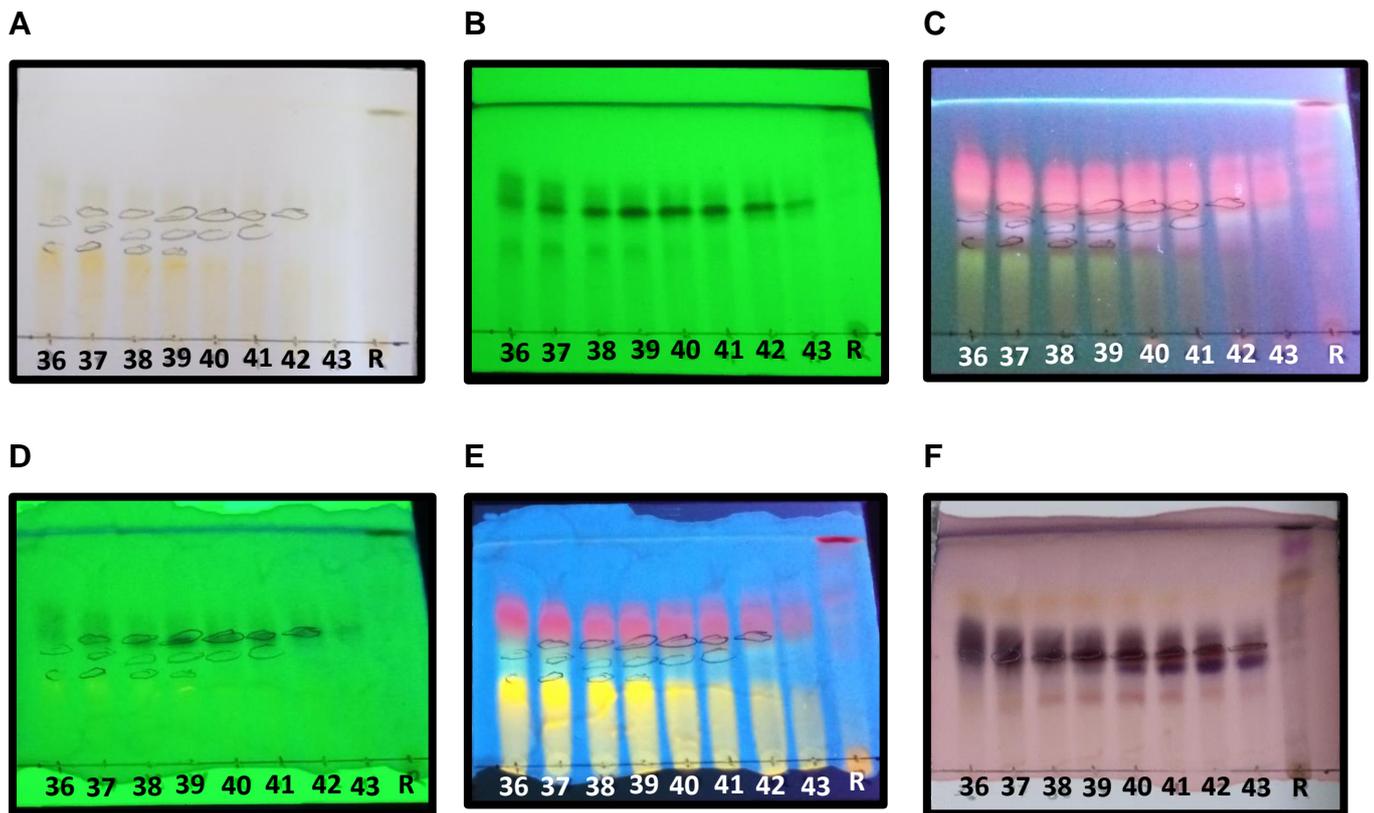
**Figura 4.** Cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones (15-22) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehído<sup>F</sup>



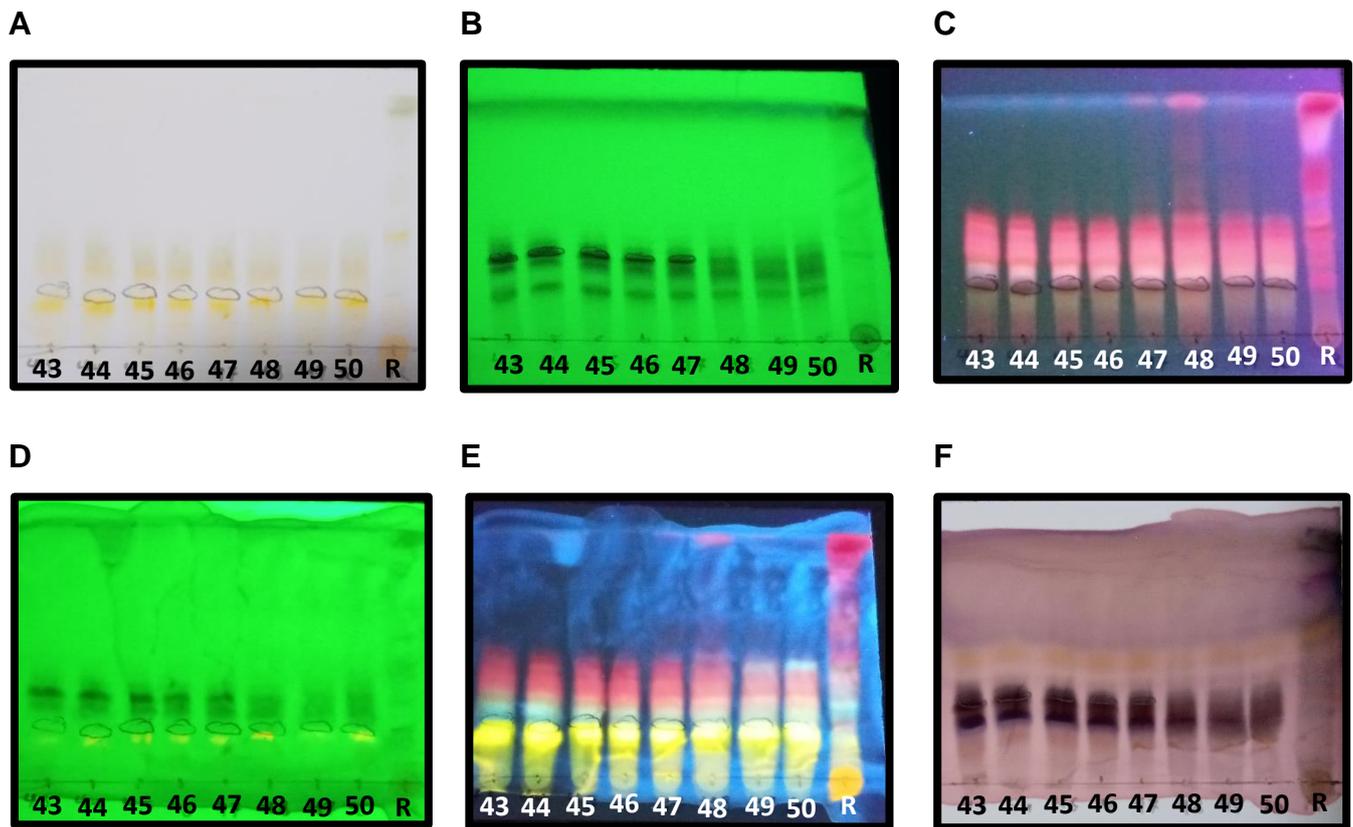
**Figura 5.** Cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones (22-29) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>



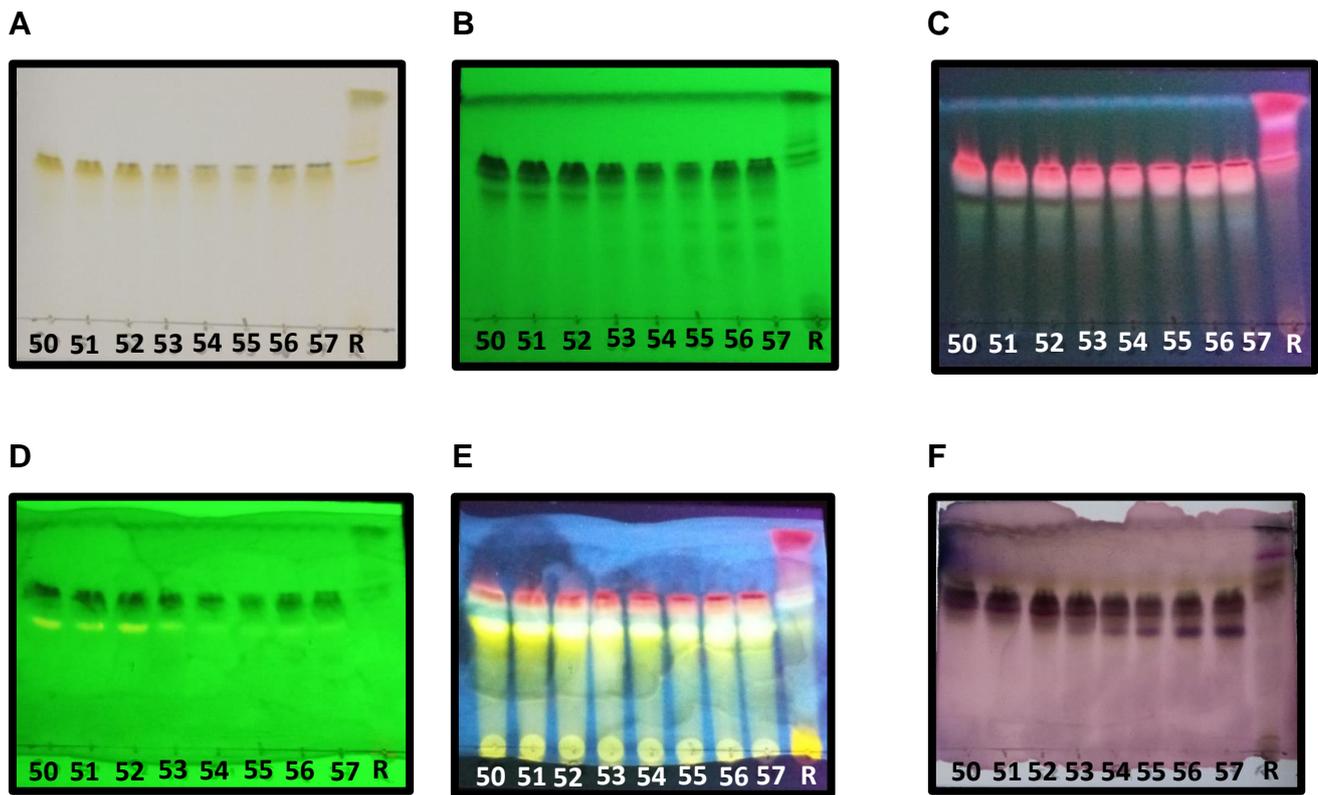
**Figura 6.** Cromatografía en capa fina fase reversa de las fracciones (29-36) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>



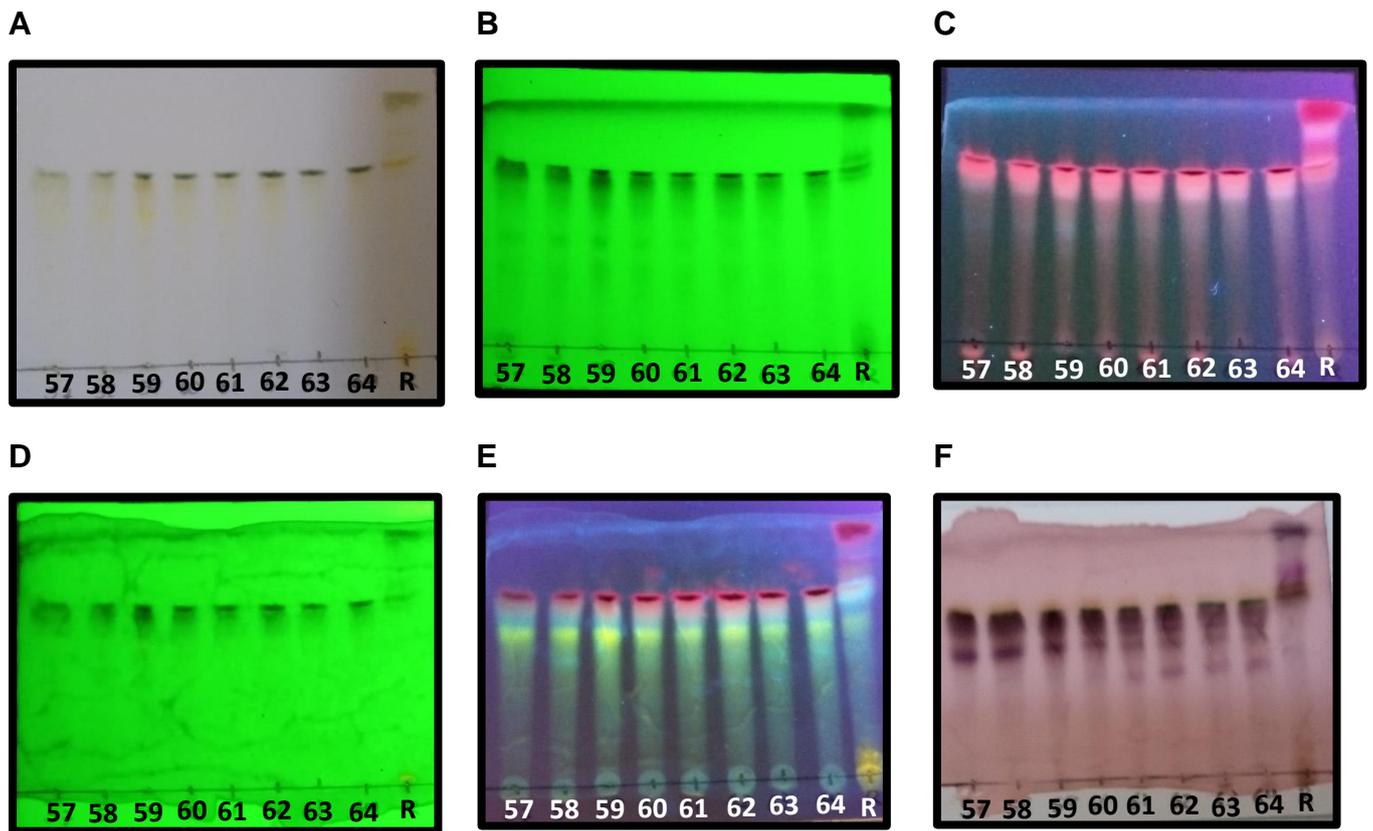
**Figura 7.** Cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones (36-43) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>



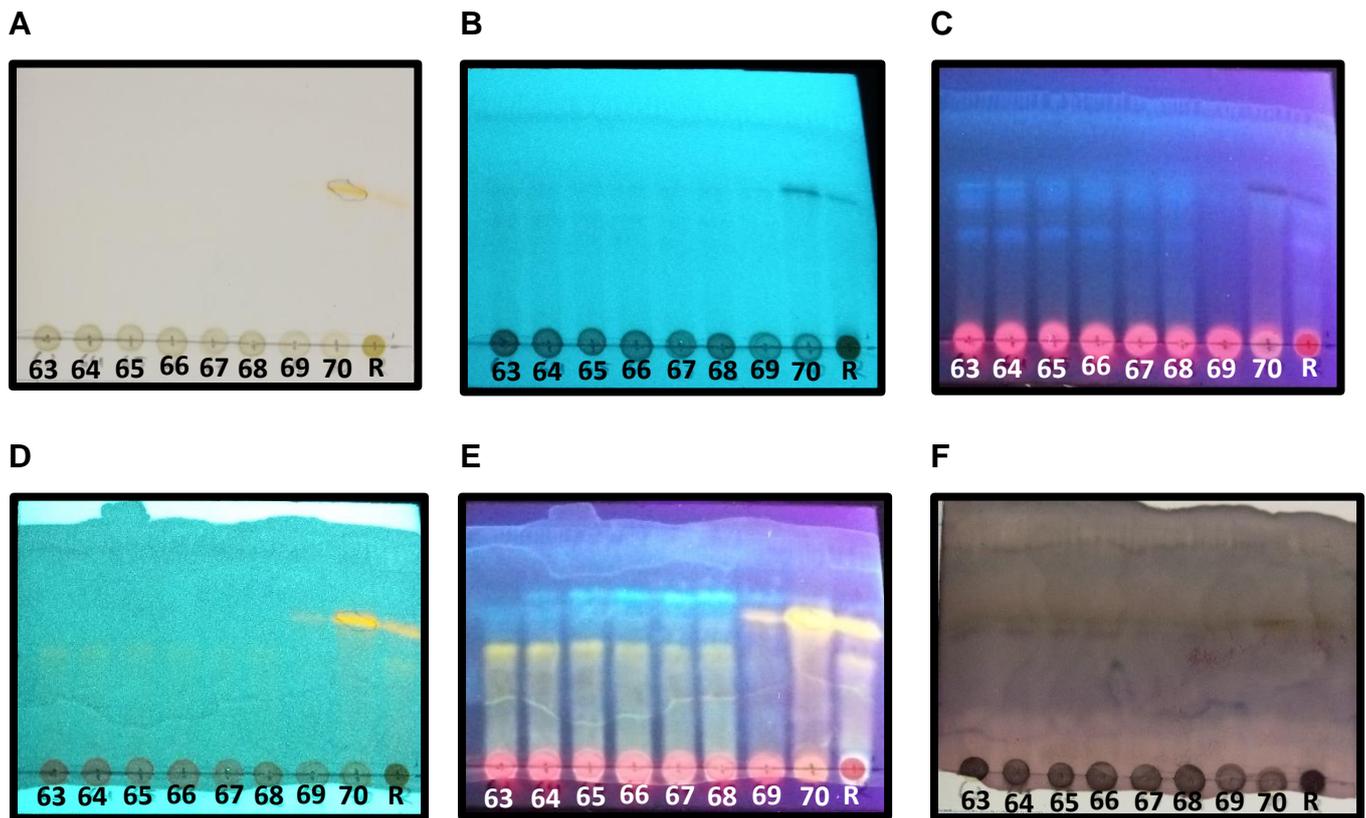
**Figura 8.** Cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones (43-50) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>



**Figura 9.** Cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones (50-57) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>



**Figura 10.** Cromatografía en capa fina fase normal de las fracciones (57-64) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>



**Figura 11.** Cromatografía en capa fina fase reversa de las fracciones (63-70) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda corta<sup>B</sup>, luz de onda larga<sup>C</sup>, luz de onda corta<sup>D</sup> y onda larga<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido<sup>F</sup>

## **Análisis HPLC**

El análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó en el Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS). Se utilizó un sistema Delta Prep 4000 (Waters, Milford, MA, EE. UU.) equipado con un módulo de separación Waters 2695, detector de matriz de fotodiodos (Waters 996) y software Pro Empower (Waters). Para la separación química, se conectó una columna Supelcosil LC-F de fase inversa (250 mm x 4 mm, tamaño de partícula de 5 µm) (Merck, Darmstadt, Alemania) a una precolumna. Como fase móvil se utilizó agua acidificada con TFA al 0,5% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). El sistema de gradiente fue el siguiente: 0–1 min, 0% B; 2–3 min, 5% B, 4–20 min, 30% B; 21–23 min, 50% B 14–15 min; 24–25 min, 80% B; 26–27 100% B; 28–30 min, 0% B. El volumen de inyección de la muestra fue de 10 µL y la velocidad de flujo se mantuvo en 0,9 mL min<sup>-1</sup>. La absorbancia se midió a 330 nm para identificar derivados del ácido hidroxicinámico y a 360 nm para identificar derivados de flavonoides (García-Hernández et al., 2019). Los compuestos ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico se identificaron por comparación con los datos de compuestos estándar registrados en la base de datos del CIBIS.

## **Material biológico**

Los huevos de *H. contortus* se obtuvieron a partir de heces colectadas de un ovino previamente sometido a una infección mono-específica (350 larvas infecciosas/kg de peso vivo, cepa INIFAP, México). La recuperación de huevos se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Coles et al. (1992) con menores modificaciones.

Para realizar el conteo de huevos por gramo de heces (HPG), se empleó la técnica de McMaster. Se pesaron 2 gramos de heces y se colocaron en un tubo de plástico, se maceraron agregando 28 mL de solución salina, se agitó y se usó una gasa para evitar el paso de la materia orgánica a la superficie. Esta técnica permite separar los huevos por flotación. Con una pipeta de plástico se extrajeron muestras del macerado y se colocaron en placas McMaster la cual posteriormente se llevó al microscopio. Para realizar el conteo se utilizó la siguiente fórmula:

$$HPG = \frac{\text{Huevos en cámara 1} + \text{huevos en cámara 2}}{2} * 100$$

### **Obtención de huevos**

Una vez estimado el porcentaje de HPG se pesaron 30 g de heces y se maceraron en un mortero con 240 mL de agua de grifo. El material fecal se separó en 8 tubos Falcón de 50 mL, agregando 30 mL en cada uno, posteriormente se aforaron a 45 mL, se taparon, agitaron y fueron llevados a una centrifugadora (Thermo Scientific Sorvall ST8) a 3500 rpm por 5 minutos para separar la mayor parte de materia orgánica posible. El sobrenadante se filtró a través de dos tamices (malla 75 y 32  $\mu\text{m}$ ) consecutivamente con agua del grifo. Los huevos fueron retenidos en el tamiz de 32  $\mu\text{m}$ , y la suspensión se colectó con una pipeta Pasteur para colocarla posteriormente en un tubo Falcon de 15 mL. El tubo se centrifugó nuevamente en un equipo ELMI SkyLine CM-6MT a 3500 rpm por 5 minutos. Se formó un pellet de color blanquecino y con una pipeta Pasteur se retiró los restos de materia orgánica. Finalmente se realizó un conteo en microscopio para obtener el número de huevos por mililitro y se realizó el ajuste para tener un promedio de 100 huevos por cada 50  $\mu\text{L}$  de solución.

### **Ensayo de la inhibición de la eclosión de huevos (IEH)**

El ensayo de la inhibición de la eclosión de huevos se realizó en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP. Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos con 4 repeticiones para cada concentración del tratamiento, los bioensayos se hicieron por triplicado para dar un total de 12 datos. Las concentraciones probadas para los extractos fueron 20, 10, 5 y 2.5  $\text{mg mL}^{-1}$ . Mientras que, las fracciones acuosa y orgánica se evaluaron a 3, 1.5, 0.75 y 0.375. Se utilizó Agua destilada y Metanol 2% como controles negativos y Tiabendazol disuelto en DMSO 1% como control positivo.

Se agregaron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de los extractos, fracciones y controles. Se depositaron 50  $\mu\text{L}$  de una suspensión acuosa que contenía un promedio de 100 huevos de *H. contortus* en cada pozo. Posteriormente las placas se incubaron a temperatura controlada durante 48 horas. El proceso de eclosión de huevos se detuvo utilizando una solución de Lugol. Los criterios para estimar la inhibición

de la eclosión de huevos incluyeron contar los huevos presentes y larvas eclosionadas con ayuda de un microscopio óptico. Como parámetros para definir los huevos y larvas se consideró lo siguiente: se contaron como huevos, aquellos que contenían mórula o larva en su interior, las larvas ya eclosionadas y huevos con una porción del cuerpo de la larva que hubiese roto la cutícula se consideraron larvas. El porcentaje IEH se estimó para cada tratamiento usando la fórmula siguiente.

$$IEH = \frac{\text{número de huevos}}{\text{número de larvas} + \text{número de huevos}} \times 100$$

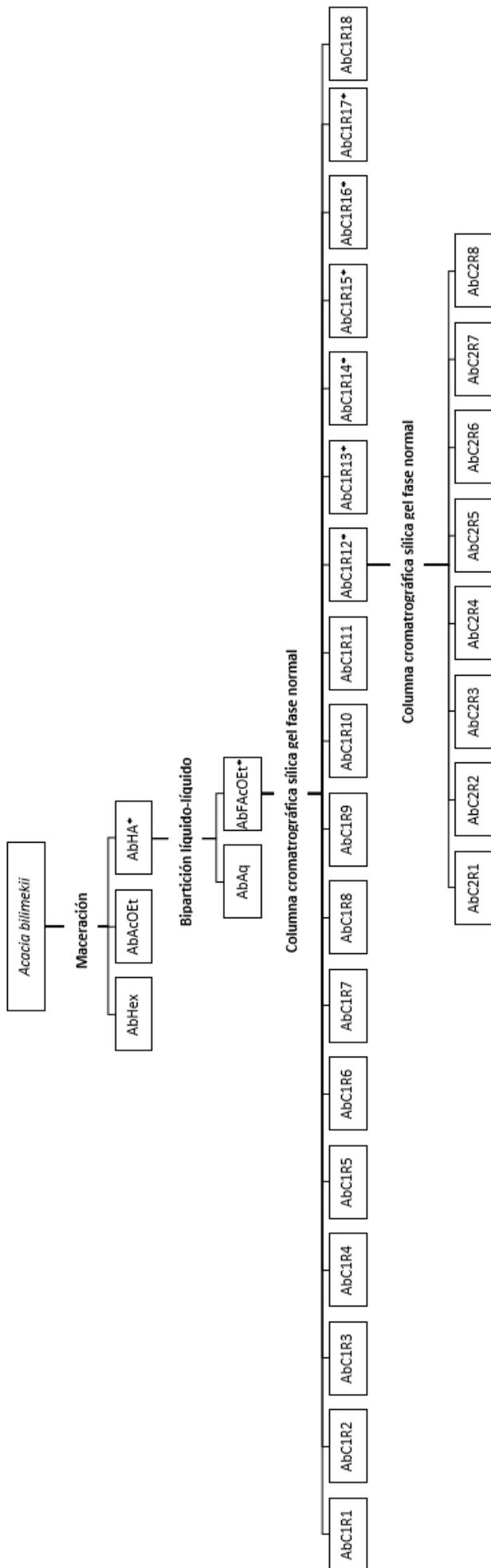
### **Análisis estadístico**

Los datos del porcentaje de IEH fueron normalizados mediante transformación de raíz cuadrada y analizados con un diseño completamente al azar mediante análisis ANOVA utilizando el Modelo Lineal General del programa SAS (SAS Institute, 2006). Se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos mediante la comparación múltiple de Tukey ( $P < 0,05$ ). Para calcular las concentraciones letales ( $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ ), se realizó un análisis Probit en SAS 9.0.

## **RESULTADOS**

### **Obtención de extractos orgánicos de la especie vegetal *A. bilimekii*.**

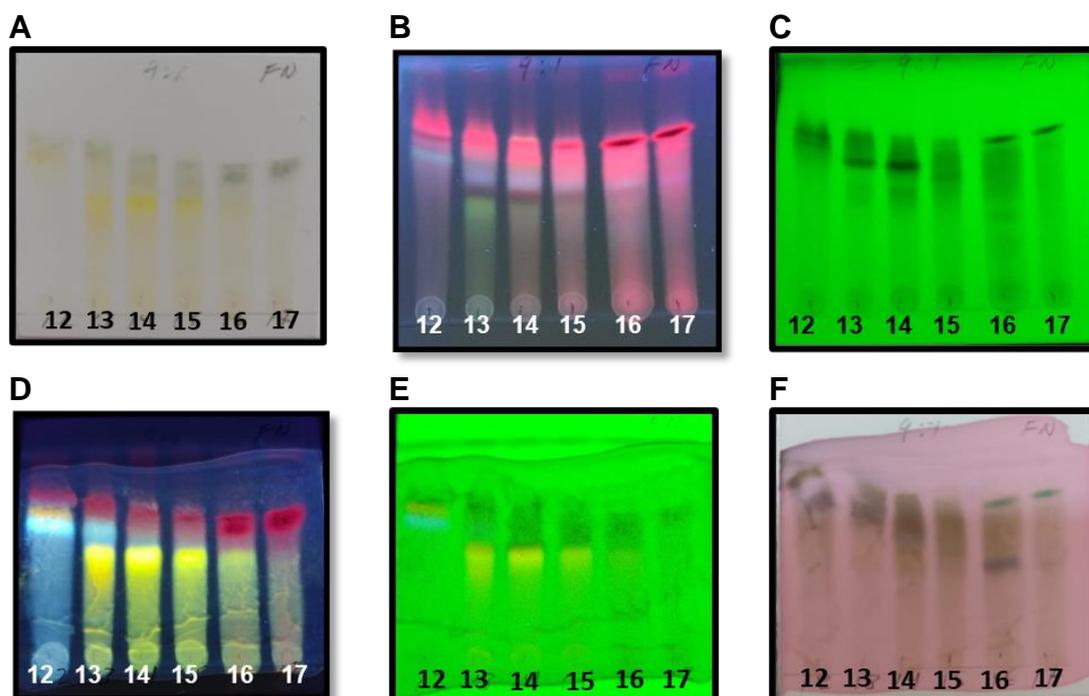
Los rendimientos de cada uno de los extractos se obtuvieron con respecto del peso seco del material vegetal. El extracto hexánico (AbEH) tuvo un rendimiento del 1.21 %, el extracto de acetato de etilo (AbFAcOEt) tuvo un rendimiento del 1.5% y finalmente el extracto hidroalcohólico (AbEHA) tuvo un rendimiento del 14%. Después de la bipartición de 100 g del extracto hidroalcohólico, la fracción acuosa (AbAq) tuvo un rendimiento del 78% y la fracción de acetato de etilo (AbFAcOEt) fue del 22%.



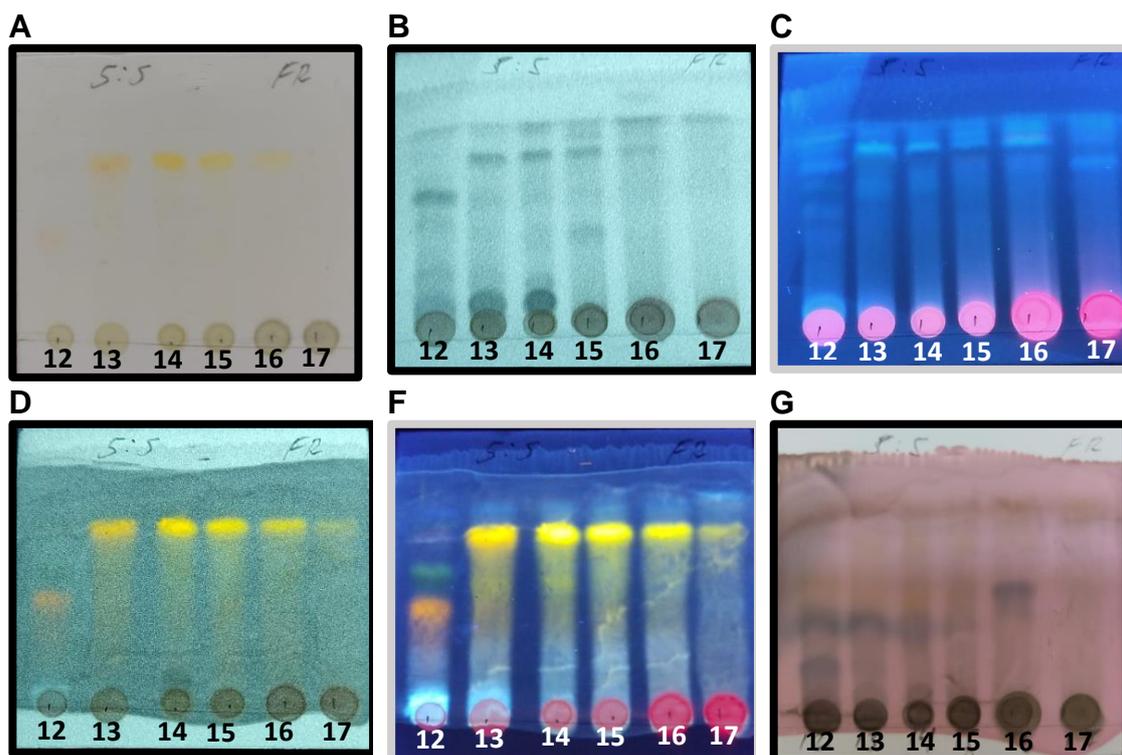
**Nota:** \*extractos y fracciones con mayor actividad antihelmíntica contra *H. contortus*

## Identificación del tipo de compuestos presentes en las fracciones de mayor actividad

El análisis por cromatografía en capa fina de las subfracciones activas mostró la presencia de flavonoides al ser revelados con el reactivo NP-PEG dando bandas con fluorescencia en color amarillo, verde y naranja. También se observaron bandas en color azul que denotaban la presencia de ácidos hidroxicinámicos y cumarinas. Mientras que, con el revelador de KOM, se observó la presencia de terpenos (Figura 12, 13).



**Figura 12.** Cromatografía en capa fina fase normal de las subfracciones activas (12-17) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda larga<sup>B</sup>, luz de onda corta<sup>C</sup>, luz de onda larga<sup>D</sup> y onda corta<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato (NP-PEG) y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehido (reactivo de KOM)<sup>F</sup>.



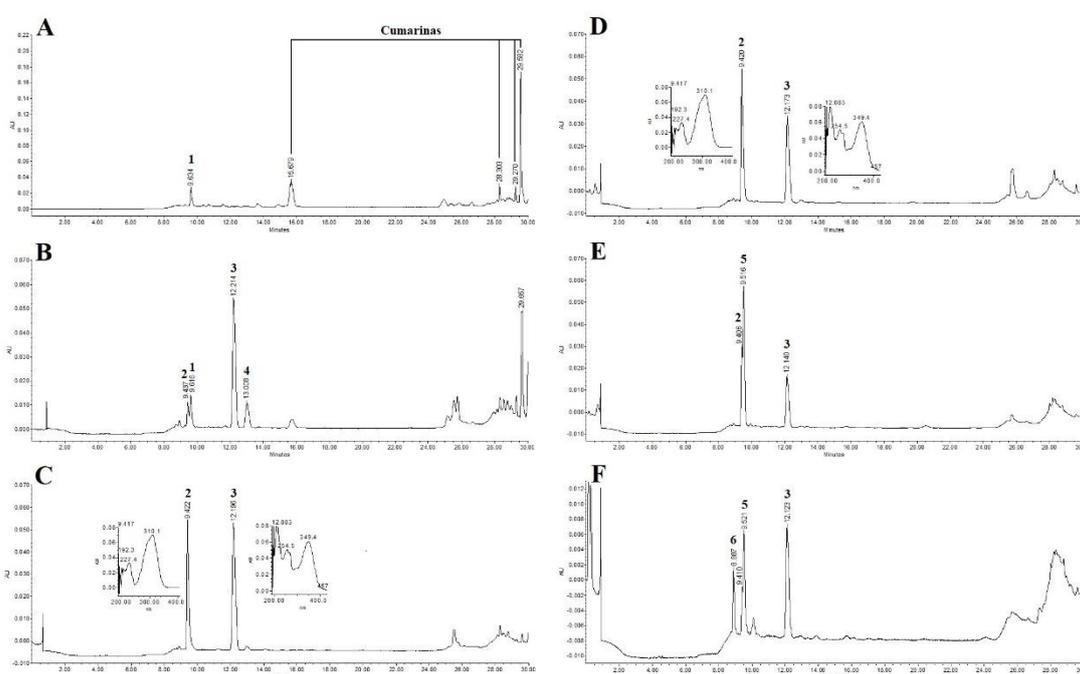
**Figura 13.** Cromatografía en capa fina fase reversa de las subfracciones activas (12-17) de la columna 1, visto bajo luz visible revelada con 2-aminoetildifenilborinato<sup>A</sup>, luz de onda larga<sup>B</sup>, luz de onda corta<sup>C</sup>, luz de onda larga<sup>D</sup> y onda corta<sup>E</sup> revelada con 2-aminoetildifenilborinato y luz visible revelada con 4-hidroxibenzaldehído (reactivo de KOM)<sup>F</sup>.

### Identificación de los compuestos presentes en las subfracciones bioactivas por HPLC

El análisis mediante HPLC-PDA del extracto hidroalcohólico (Ab-EHA) y la fracción de acetato de etilo (AbFACOEt) (Anexos 2, 3). El análisis de los espectros de absorción UV mostró la presencia de ácidos hidroxicinámicos tal como el ácido cumárico y el ácido ferúlico, flavonoides tal como flavonas (luteolina), flavonoles y flavanonas, cumarinas y compuestos terpénicos.

El cromatograma de la fracción AbR12 (Figura 14A) mostró cinco picos principales. El análisis de sus espectros UV indicó la presencia de ácido ferúlico a Tr= 9,6 min ( $\lambda_{nm}$  239 y 324), una cumarina a Tr= 15,6 min ( $\lambda_{nm}$  225, 285 y 336) y tres cumarinas más a Tr= 28,3, 29,2 y 29,6 min ( $\lambda_{nm}$  197, 243 y 325). La fracción AbR13 mostró cinco picos principales (Figura 14B). Sus espectros de absorción UV indicaron la presencia de ácido *p*-cumárico a Tr= 9,4 min ( $\lambda_{nm}$  227 y 310), ácido ferúlico (Tr= 9,6 min), flavona luteolina a Tr= 12,2 min ( $\lambda_{nm}$  208, 254 y 349), un flavonol derivado de quercetina a Tr= 13 min ( $\lambda_{nm}$  207, 253 y 255)

y una cumarina a Tr= 29,6 min ( $\lambda_{nm}$  197, 243 y 325). Las fracciones AbR14, AbR15 y AbR16 mostraron la presencia de ácido p-cumárico (Tr= 9,4 min,  $\lambda_{nm}$  227 y 310) y luteolina (Tr= 12,2 min,  $\lambda_{nm}$  208, 254 y 349) como compuestos principales (Figura 14C, D, E). Sin embargo, en la fracción AbR16 (Figura 14E), comenzó a aparecer un pico a Tr= 9,5 min con un espectro UV característico de un derivado de cinamoilo ( $\lambda_{nm}$  213 y 295). Finalmente, el cromatograma de la fracción AbR17 (Figura 14F) mostró la presencia de ácido cafeico (Tr= 8,8 min,  $\lambda_{nm}$  241 y 324), un derivado de cinamoilo (Tr= 9,5 min,  $\lambda_{nm}$  213 y 295) y luteolina (Tr= 12,2 min).



**Figura 14.** Cromatogramas de HPLC de subfracciones bioactivas de *A. bilimekii* registradas a 330 nm. A) AbR12, B) AbR13, C) AbR14, D) AbR15, E) AbR16 y F) AbR17.

### **Evaluación del efecto inhibitorio de los extractos obtenidos de *A. bilimekii* en la eclosión de huevos de *H. contortus in vitro*.**

La evaluación del efecto ovicida se llevó a cabo a una concentración inicial de 50 mg y se realizó una dilución en cascada para obtener 4 concentraciones. Los extractos Ab-Hex y Ab-AcOEt no mostraron actividad ovicida. Sin embargo, el extracto hidroalcohólico mostró una actividad del 90% a una concentración de

20 mg mL<sup>-1</sup> (Cuadro 2), esta actividad disminuyó de acuerdo con la concentración hasta 8% a 2.5 mg mL<sup>-1</sup> lo cual demostró que el extracto posee un efecto concentración dependiente. Debido a este resultado se hizo una bipartición líquido-líquido con acetato de etilo y agua destilada.

**Cuadro 2.** Porcentaje de la inhibición de la eclosión del extracto hidroalcohólico de *A. bilimekii* y las fracciones de acetato de etilo y acuosa sobre huevos de *H. contortus* después de un periodo de incubación de 48 h.

| Tratamientos                           | IEH (% ± D.E.)          |
|--|-------------------------|
| Agua destilada                         | 0.55±0.59 <sup>g</sup>  |
| Metanol 2%                             | 0.75±0.75 <sup>g</sup>  |
| Tiabendazol (0.1 mg mL <sup>-1</sup> ) | 99.46±0.65 <sup>a</sup> |
| Ab-EHA (mg mL <sup>-1</sup> )          |                         |
| 20                                     | 90.48±2.46 <sup>b</sup> |
| 10                                     | 42.49±1.83 <sup>c</sup> |
| 5                                      | 16.72±1.59 <sup>e</sup> |
| 2.5                                    | 8.03±3.23 <sup>f</sup>  |
| Ab-FAq (mg mL <sup>-1</sup> )          |                         |
| 20                                     | No bioactivo            |
| Ab-FAcOEt (mg mL <sup>-1</sup> )       |                         |
| 5                                      | 98.95±1.06 <sup>a</sup> |
| 2.5                                    | 98.95±0.04 <sup>a</sup> |
| 1.25                                   | 32.73±3.27 <sup>d</sup> |
| 0.63                                   | 4.29±1.61 <sup>fg</sup> |
| Coeficiente de variación               | 4.12                    |
| R2                                     | 0.99                    |

Medias con diferente letra en la misma columna representan diferencias estadísticamente significativas con  $P < 0.05$ . D.E.= Desviación Estándar.

### **Evaluación de la fracción acuosa y de acetato de Etilo (AcOEt) en el ensayo IEH**

Posterior a la bipartición se obtuvo una fracción orgánica y una acuosa que fueron probadas en el ensayo IEH. La fracción acuosa (Ab-Aq) no mostró actividad ovicida, por otro lado, la fracción orgánica (AbFAcOEt) mostró una actividad inhibitoria destacable. Inicialmente, la fracción AbFAcOEt se evaluó a concentraciones de 10, 5, 2.5 y 1.25 mg mL<sup>-1</sup>; sin embargo, los resultados

obtenidos en todas las concentraciones fueron cercanos a 100% por lo que se optó por disminuir la concentración a 5 mg mL<sup>-1</sup> para encontrar un efecto concentración dependiente. De este modo, la fracción AbFACOEt mostró una inhibición del 98.9% a 5 mg mL<sup>-1</sup>, que disminuyó hasta 4.2% a 0.63 mg mL<sup>-1</sup> (Cuadro 2)

### Evaluación de las fracciones bioactivas en el ensayo IEH

Las subfracciones fueron probadas a concentraciones de 1.5, 0.75, 0.38 y 0.19 mg mL<sup>-1</sup> de las cuales AbC1R12, AbC1R13, AbC1R14, AbC1R15, AbC1R16 y AbC1R17 demostraron poseer una actividad ovicida significativa, todas con más del 93% de inhibición a 1.5 mg mL<sup>-1</sup>. La subfracción AbC1R15 fue la que mostró mayor actividad con un 98.7% de inhibición a 0.75 mg mL<sup>-1</sup> y 5.6% de inhibición a la menor concentración (0.19 mg mL<sup>-1</sup>). Todas las subfracciones mostraron un efecto concentración dependiente. (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Porcentaje de la inhibición de la eclosión de las subfracciones bioactivas obtenidas de la fracción de acetato de etilo de *A. bilimekii* sobre huevos de *H. contortus* después de un periodo de incubación de 48 h.

| Tratamientos                           | EHI (% ± D.E.)           |
|--|--------------------------|
| Agua destilada                         | 0.18±0.32 <sup>h</sup>   |
| Metanol 2%                             | 1.37±1.19 <sup>h</sup>   |
| Tiabendazol (0.1 mg mL <sup>-1</sup> ) | 99.17±0.35 <sup>a</sup>  |
| AbC1R12 (mg/mL)                        |                          |
| 1.5                                    | 98.63±0.55 <sup>a</sup>  |
| 0.75                                   | 67.35±3.19 <sup>b</sup>  |
| 0.38                                   | 12.00±0.76 <sup>ef</sup> |
| 0.19                                   | 5.11±2.14 <sup>gh</sup>  |
| AbC1R13 (mg mL <sup>-1</sup> )         |                          |
| 1.5                                    | 99.34±1.14 <sup>a</sup>  |
| 0.75                                   | 65.37±5.11 <sup>b</sup>  |
| 0.38                                   | 12.22±4.73 <sup>e</sup>  |
| 0.19                                   | 8.84±2.59 <sup>efg</sup> |
| AbC1R14 (mg mL <sup>-1</sup> )         |                          |
| 1.5                                    | 97.69±0.54 <sup>a</sup>  |
| 0.75                                   | 14.80±1.01 <sup>e</sup>  |
| 0.38                                   | 1.70±0.59 <sup>h</sup>   |
| 0.19                                   | 0.64±0.55 <sup>h</sup>   |

|                                |                          |
|--------------------------------|--------------------------|
| AbC1R15 (mg mL <sup>-1</sup> ) |                          |
| 1.5                            | 97.82±1.12 <sup>a</sup>  |
| 0.75                           | 98.72±0.47 <sup>a</sup>  |
| 0.38                           | 62.63±2.46 <sup>b</sup>  |
| 0.19                           | 5.60±1.26 <sup>fgh</sup> |
| AbC1R16 (mg mL <sup>-1</sup> ) |                          |
| 1.5                            | 98.66±0.62 <sup>a</sup>  |
| 0.75                           | 34.05±4.37 <sup>c</sup>  |
| 0.38                           | 4.91±1.13 <sup>gh</sup>  |
| 0.19                           | 0.63±0.55 <sup>h</sup>   |
| AbC1R17 (mg mL <sup>-1</sup> ) |                          |
| 1.5                            | 93.42±0.62 <sup>a</sup>  |
| 0.75                           | 21.45±2.86 <sup>d</sup>  |
| 0.38                           | 1.55±0.53 <sup>h</sup>   |
| 0.19                           | 0.64±0.55 <sup>h</sup>   |
| Coeficiente de variación       | 0.99                     |
| R2                             | 5.05                     |

Medias con diferente letra en la misma columna representan diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0.05$ . D.E.= Desviación Estándar

### Concentraciones letales del extracto Ab-HA y subfracciones

El cuadro 4 muestra las concentraciones letales 50 y 90 (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>) del extracto y fracciones bioactivas. La CL<sub>50</sub> y la CL<sub>90</sub> del extracto Ab-EHA fueron 9.2 y 29.8 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras tanto, para la fracción Ab-FAcOEt fueron 1.3 y 2.2 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Las mejores subfracciones bioactivas fueron AbR15 (CL<sub>50</sub> = 0.35 mg mL<sup>-1</sup>), AbR12 (CL<sub>50</sub> = 0.64 mg mL<sup>-1</sup>) y AbR13 (CL<sub>50</sub> = 0.65 mg mL<sup>-1</sup>).

**Cuadro 4.** Concentraciones letales requeridas para inhibir el 50 y 90 % (CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>) de la eclosión de huevos de *H. contortus* después de un periodo de incubación de 48 h con el extracto hidroalcohólico y subfracciones de *A. bilimekii* (mg mL<sup>-1</sup>)

| Tratamientos | CL <sub>50</sub> | Limites IC 95% |          | CL <sub>90</sub> | Limites IC 95% |          |
|--------------|------------------|----------------|----------|------------------|----------------|----------|
|              |                  | Inferior       | Superior |                  | Inferior       | Superior |
| Ab-EHA       | 9.26             | 8.34           | 10.16    | 29.87            | 26.05          | 35.46    |
| Ab-FAcOEt    | 1.31             | 1.23           | 1.38     | 2.29             | 2.16           | 2.46     |
| AbC1R12      | 0.64             | 0.61           | 0.67     | 1.11             | 1.05           | 1.19     |
| AbC1R13      | 0.65             | 0.62           | 0.68     | 1.07             | 1.01           | 1.14     |

|         |      |      |      |      |      |      |
|---------|------|------|------|------|------|------|
| AbC1R14 | 0.97 | 0.93 | 1.01 | 1.29 | 1.23 | 1.35 |
| AbC1R15 | 0.35 | 0.33 | 0.36 | 0.67 | 0.63 | 0.71 |
| AbC1R16 | 0.85 | 0.82 | 0.88 | 1.20 | 1.14 | 1.29 |
| AbC1R17 | 0.97 | 0.94 | 1.00 | 1.41 | 1.35 | 1.49 |

---

IC= Intervalo de Confianza

CL= Concentración Letal

## DISCUSIÓN

La nematodiasis en el ganado ha surgido como un problema económicamente activo, representando pérdidas de este tipo y emergiendo como una de las principales afecciones de este mercado, aunque, es necesario aclarar que el problema no es nuevo. La elucidación de las causas de estas pérdidas se esclarece en términos de un decrecimiento en la producción de proteínas, leche y pieles, además de los altos costos de tratamiento para el control de NGI (Rashid, *et al*, 2018). Se ha demostrado que la mayoría de las fabáceas poseen metabolitos secundarios en partes aéreas como las hojas, y se han aislado para explorar sus propiedades medicinales dentro de las cuales se encuentra la actividad nematocida (González-Cortazar, *et al*, 2017).

En este estudio se evidencia el efecto ovicida del extracto hidroalcohólico, así como de sus fracciones y subfracciones obtenidas de la fabácea *Acacia bilimekii* contra el nematodo gastrointestinal *Haemonchus contortus*.

El extracto AbAcOEt no mostró actividad ovicida; sin embargo, la fracción de acetato de etilo obtenida de la bipartición del extracto AbHA demostró una alta actividad. Es posible que los compuestos responsables de la actividad biológica se encuentren en el extracto de AbAcOEt; sin embargo, al encontrarse en conjunto con otra gran diversidad de compuestos que no aportan a la actividad biológica, la concentración de estos metabolitos bioactivos se ve aminorada significativamente, lo que impide evidenciar la actividad ovicida del extracto integro. El hecho de que la actividad ovicida se haya mantenido en la fracción de acetato de etilo y no así en la fracción acuosa, sugiere que los compuestos responsables de la actividad son de polaridad media.

En el bioensayo IEH, el extracto de Ab-EHA mostró una inhibición del 8.8% a 2.5 mg mL<sup>-1</sup>, alcanzando el 91.6% a 20 mg mL<sup>-1</sup>, demostrando un efecto concentración dependiente (Cuadro 2). Además, el análisis Probit mostró que la concentración efectiva para inhibir el 50 % de la eclosión (CL<sub>50</sub>) fue de 9.2 mg mL<sup>-1</sup> (Cuadro 4). Sin embargo, el fraccionamiento líquido-líquido con agua y acetato de etilo permitió obtener una fracción acuosa que no mostró inhibición, y una fracción orgánica (Ab-FAcOEt) con un efecto inhibitor siete veces más potente que el del extracto Ab-HA, mostrando un 98,9 % de inhibición a 2.5 mg

mL<sup>-1</sup> con una CL<sub>50</sub>= 1.3 mg mL<sup>-1</sup> (Cuadros 2 y 4). Este es el primer estudio que reporta la actividad ovicida de las partes aéreas de *A. bilimekii*. Con base en sus tiempos de retención y espectros de absorción UV, el análisis por HPLC permitió identificar compuestos polifenólicos como ácidos hidroxicinámicos (derivados cafeoilo, cumaroilo y feruloilo), flavonoides (flavona, flavanona y derivados de flavonol) y derivados cumarínicos principalmente.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por González-Cortazar et al. (2018) en el estudio de la fabácea *Lysiloma acapulcensis*, pues la fracción de acetato de etilo (AcOEt) de esta especie mostró una inhibición del 100% a 12.5 mg mL<sup>-1</sup>. Sin embargo, en este estudio se logró obtener un 90 % de inhibición de la eclosión con una concentración 2.5 veces menor. Además, hay similitud con lo reportado para las especies *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Baccharis conferta* (Asteraceae), *Acacia farnesiana* (Fabaceae) y *Caesalpinia coriaria* (Fabaceae), de las cuales se obtuvieron fracciones acuosas y de acetato de etilo mediante fraccionamiento líquido-líquido. Contrastando con este estudio, las fracciones orgánicas mostraron una mayor inhibición contra huevos de *H. contortus* (CL<sub>50</sub>= 21,32 mg mL<sup>-1</sup>, CL<sub>50</sub> = 770 mg mL<sup>-1</sup>, CL<sub>50</sub> = 510 mg mL<sup>-1</sup> y CL<sub>50</sub> = 160 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) que su respectivo extracto integro y fracción acuosa (Iqbal et al., 2012; Cortes-Morales et al., 2019; García-Hernandez et al., 2019; Zarza-Albarran et al., 2020).

El fraccionamiento de Ab-FAcOEt dio como resultado la obtención de seis fracciones con una inhibición más potente que la fracción original. Con base en las CL<sub>50</sub> (Cuadro 4), las fracciones AbR12 (CL<sub>50</sub> = 640 mg mL<sup>-1</sup>) y AbR13 (CL<sub>50</sub> = 650 mg mL<sup>-1</sup>) mostraron una inhibición similar y fueron dos veces más efectivas que Ab-FAcOEt. El análisis por HPLC-PDA de la fracción AbR12 permitió la identificación de ácido ferúlico y una cumarina como compuestos principales (Figura 14A). Mientras que, en la fracción AbR13 se identificaron ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, luteolina y una cumarina (Figura 14B). Las fracciones AbR14 (CL<sub>50</sub>= 970 mg mL<sup>-1</sup>) y AbR15 (CL<sub>50</sub>= 350 mg mL<sup>-1</sup>) mostraron una inhibición 1.3 y 3.8 veces más efectivas que Ab-FAcOEt. El análisis HPLC-PDA de ambas fracciones mostró sólo dos picos principales pertenecientes al ácido *p*-cumárico y la flavona luteolina. Las fracciones AbR16 (CL<sub>50</sub>= 850 mg mL<sup>-1</sup>) y AbR17 (CL<sub>50</sub>= 970 mg mL<sup>-1</sup>) mostraron una inhibición 1.5 y 1.3 veces mayor que su fracción

original. El análisis químico mostró que en la fracción AbR16 comenzó a aparecer un pico con un espectro de absorción UV característico de un derivado de cinamoilo, se identificó ácido *p*-cumárico en menor proporción que en la fracción anterior y continuó apareciendo luteolina. Finalmente, en la fracción AbR17 ya no se detectó ácido *p*-cumárico, sino solo el derivado cinamoilo, se identificó ácido cafeico y se continuó observando la presencia de luteolina. Este es el primer trabajo científico que describe la identificación del ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y la flavona luteolina para la especie *A. bilimekii*.

En un estudio realizado por Klongsiriwet et al. (2015), los autores demostraron el efecto sinérgico entre los taninos condensados (prodelfinidinas) y la luteolina contra larvas infectantes de *H. contortus*. Sin embargo, estudios previos realizados por este grupo de trabajo, han demostrado que la flavona luteolina aislada de *Prosopis laevigata* (Fabaceae) y *Brongniartia montalvoana* (Fabaceae) no presenta actividad ovicida contra *H. contortus* (Delgado-Núñez et al., 2020; Cortes-Morales et al., 2022). De hecho, la actividad ovicida observada por Cortes-Morales et al. (2022) se atribuyó a los derivados cumarínicos y a los ácidos hidroxicinámicos tal como el ácido ferúlico y el ácido *p*-cumárico.

## CONCLUSIÓN

En conclusión, el extracto hidroalcohólico y fracción de acetato de etilo obtenido de partes aéreas de *A. bilimekii* contiene ácidos hidroxicinámicos con capacidad de interrumpir el ciclo de vida del parásito hematófago *H. contortus* a nivel de inhibición de la eclosión de huevos. El ácido *p*-cumárico fue el principal compuesto en las fracciones con mayor actividad ovicida. Serán necesarios futuros estudios para explorar la actividad larvicida *in vitro* y la actividad antihelmíntica *in vivo* del extracto hidroalcohólico, fracciones y compuestos aislados de *A. bilimekii*.

## REFERENCIAS:

- 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.
- Allen, O.N. & E.K. Allen. (1981). The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation. The University of Wisconsin Press. *Madison.* 806 p.
- Angulo Cubillán F. J., García Coiradas L., Cuquerella M., Fuente C., Alunda J. M. (2007). *Haemonchus contortus*- SHEEP RELATIONSHIP: A REVIEW. *Revista Científica.* Vol. XVII. 6. 577-587.
- Angulo-Cubillán F. J. (2005). Nematodosis Gastrointestinales. *Manual de Ganadería Doble Propósito.* 377-383.
- Beltrán-Rodríguez L., Valdez-Hernández J. I., Luna-Cavazos M., Romero-Manzanares A., Pineda-Herrera E., Maldonado-Almanza B., Borja-de la Rosa A., Blancas-Vázquez J., (2018). Estructura y diversidad arbórea de bosques tropicales caducifolios secundarios en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla, Morelos. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 89(1): 108-122. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.1.2004>
- Carrillo-Parra A., Hapla, F., C. Mai, 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.
- Castillo-Mitre G.F. (2018). Efecto antihelmíntico del extracto hidroalcohólico de hojas de *Acacia cochliacantha* sobre el parásito nematodo *Haemonchus contortus* (Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma del Estado de México)
- Castillo-Mitre G.F., Olmedo-Juárez A., Rojo-Rubio R., Cortázar-González M., Mendoza-de Gives P., Hernández-Beteta E.E., Reyes- Guerrero D.E., López-Arellano M.E., Vázquez- Armijo J.F., Ramírez-Vargas G., Zamilpa A. (2017). Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology.* 204: 125–131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.010>

- Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 44: 35-44. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-U)
- CONABIO. (2020). Selvas Secas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Biodiversidad Mexicana. [https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/selvaSeca\\*](https://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/selvaSeca*)
- Contreras-Hinojosa. J.R., M. Gómez-Cárdenas., F. Barbosa- Moreno y E. Cruz-Cruz. (2014). El Tehuixtle (*Acacia bilimekii*), especie para la restauración de la Selva Baja Caducifolia. INIFAP. CIRPAS. Campo Experimental Valles Centrales de Oaxaca. *Folleto para productores* Número 14. Santo Domingo Barrio Bajo, Etlá, Oaxaca, México. 30 p.
- Cortes-Morales, J.A., Olmedo-Juárez, A., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., López-Arellano, M.A., Ble-González, E.A., Tapia-Maruri, D., Flores-Franco, G., Salinas-Sánchez, D.O., (2022). *In vitro* ovicidal activity of *Brongniartia montalvoana* against Small Ruminant Gastrointestinal Nematodes. *Experimental Parasitology*. 240, 108336. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108336>
- Cortes-Morales J.A., Olmedo-Juárez A., Trejo-Tapia G., González-Cortázar M., Domínguez-Mendoza B. E., Mendoza-de Gives P., Zamilpa A. (2019). *In vitro* ovicidal activity of *Baccharis conferta* Kunth against *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*. 197: 20–28.
- Cuéllar, O. J. A. (2009). Nuevas opciones para el control de parásitos en la ovinocultura tropical. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México. 21p.
- Cuevas-Padilla E.J. (2019), *Evaluación in vitro de extractos crudos de Pleurotus sp., y la participación de sus proteínas contra Haemonchus contortus*, [Tesis de Maestría, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB)] México, 66p. RIAA UAEM. <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/905>

- Da Silva-Gomes G., Sousa da Silva G., dos Santos-Silva D.L., Verás-Araujo M.F., Rodrigues-Oliveira R., Costa-Gaspar J., Pereira-Martins P.R., Ferreira-Oliveira R., da Conceição-Mendes G. (2019). Fabaceae: Biodiversity and Taxonomy for the Northeast Region of Brazil. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*. 6: 95-110.
- Delgado-Núñez, E.J., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Olmedo-Juárez, A., Cardoso-Taketa, A., Sánchez-Mendoza, E., Tapia-Maruri, D., David Osvaldo Salinas-Sánchez, D.O., Mendoza-de Gives, P., 2020. Isorhamnetin: a nematocidal flavonoid from *Prosopis laevigata* leaves against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Biomolecules* 10(5): 773. <https://doi.org/10.3390/biom10050773>
- Flores M. J.A. (1983). Bromatología Animal. Editorial LIMUSA. México. 1096 p.
- Fox M T. & Jacobs D. E. (1991). Blood gastrin and pepsinogen responses of native village goats in Malaysia to infection with *Haemonchus contortus*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 85: 263-267.
- García-Hernández, C., Rojo-Rubio, R., Olmedo-Juárez, A., Zamilpa, A., Mendoza de Gives, P., Antonio-Romo, I.A., Aguilar-Marcelino, L., Arece-García J., Tapia-Maruri D., González-Cortazar, M., (2019). Galloyl derivatives from *Caesalpinia coriaria* exhibit in vitro ovicidal activity against cattle gastrointestinal parasitic nematodes. *Experimental Parasitology*. 200: 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.03.012>
- García D. E., Soca M., G.-Medina M. (2005). Acción antihelmíntica de seis extractos de morera en la viabilidad de larvas infestantes (L3) de nemátodos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes*. 28(4): 319-328.
- Gómez-Serranillos-Cuadrado M. P. (2017). “Flipped Learning” y Web App de Plantas Medicinales: Nuevas estrategias educativas aplicadas al ámbito de la enseñanza en la asignatura de Farmacognosia y Fitoterapia. [Proyecto de Innovación No.249. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia]. Docta Complutense. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/20223>

- González-Cortazar M., Zamilpa A., López-Arellano M. E., Aguilar-Marcelino L., Reyes-Guerrero D. E., Olazarán-Jenkins S., Ramirez-Vargas G., Olmedo-Juárez A., Mendoza-de-Gives P. (2017), *Lysiloma acapulcensis* leaves contain anthelmintic metabolites that reduce the gastrointestinal nematode egg population in sheep faeces. *Comparative Clinical Pathology*. 27:189–197.
- González R. J. L. (2007). *Caracterización fenotípica de corderos Pelibuey resistentes y susceptibles a Haemonchus contortus bajo condiciones naturales*. [Tesis de pregrado. Benemérita Universidad de Puebla, Puebla, México].
- González-Garduño R., Córdova-Pérez C., Torres-Hernández. G., Mendoza de Gives P., Arece García J. (2011). Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *Veterinaria México*, 42(2): 125-135.
- Gunn A. y Pitt S. J. (2012). *Parasitology: an integrated approach*. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd. 431p.
- Hernández-Hernández J., Villarreal-Espinobarros O., Camacho-Ronquillo J., Romero-Castañón S., de Jesús-Castillo A. Lucio-Hernández J. (2015). Valor nutricional de seis plantas arbóreo-arbustivas consumidas por cabras en la Mixteca Poblana, México. *Ciencia y Tecnología* 8: 19-23. <http://dx.doi.org/10.18779/cyt.v8n1>.
- Herrera-Manzanilla F. A., Ojeda-Robertos N. F., González-Garduño R., Cámara-Sarmiento R., y Torres-Acosta J. F. J. (2017). Gastrointestinal nematode populations with multiple anthelmintic resistance in sheep farms from the hot humid tropics of Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 9: 29-33. Doi: 10.1016/j.vprsr.2017.04.007
- Hober E., Lichtenfels J., Gibbons L. (2004). Phylogeny for species of the genus *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): Considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). *Journal of Parasitology*. 90 (5): 1085-1102. <https://doi.org/10.1645/GE-3309>
- INECC. (2007). La cuenca del Rio Balsas, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. SEMARNAT.

- Iqbal, Z., Babar, W., Sindhu, Z.U.D., Abbas, R.Z., Sajid, M.S. (2012). Evaluation of Anthelmintic Activity of Different Fractions of *Azadirachta indica* A. Juss Seed Extract. *Pakistan Veterinary Journal*. 32(4): 579-583.
- Jacquiet PH., Cabaret J., Cheikh D., Thiam E. (1997). Identification of *Haemonchus* species in domestic ruminants base don morphometrics of spicules. *Parasitology Research*. 83: 82-86.  
<https://doi.org/10.1007/s004360050213>
- Klongsiriwet C, Quijada J, Williams AR, Mueller-Harvey I, Williamson EM, Hoste H. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 3;5(3):127-34. doi: 10.1016/j.ijpddr.2015.06.001. PMID: 26199861; PMCID: PMC4506970.
- Kotze A. C., y Prichard R. K. (2016). *Anthelmintic Resistance in Haemonchus contortus*. *Advances in Parasitology*, 397–428. 10.1016/bs.apar.2016.02.012
- Liébano-Hernández E. (2011). Capítulo 16: Ecología de larvas de nematodos gastrointestinales de bovinos, ovinos y caprinos. En H. Quiroz, J. A. Figueroa, F. Ibarra y M. E. López (Eds.), *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos* (1 ed.) (pp. 254-272). D. F., México.
- LPWG. Legume Phylogeny Working Group. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*. 66: 44–77.  
<https://doi.org/10.12705/661.3>
- Márquez L. D. (2003). Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 4: 55-71.
- Mendoza-Cruz J.I. y Perez-Rodríguez O.J. (2011). Efecto del ganado bovino en la depredación pre-dispersiva de las semillas de guácimo, (*Guazuma ulmifolia* Lam) y carbón, (*Acacia pennatula* Benth). [Tesis de licenciatura, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA].  
<http://repositorio.unan.edu.ni/id/eprint/1885>

- Moreno F. C., Gordon I. J., Wright A. D., Benvenuti M. A., Samuell C. A. (2010). Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria* 42: 155-163.
- Moya M. A. y Escudero V. G. (2015). Las plantas medicinales en el control de nemátodos gastrointestinales en cabras: potencial de las plantas que crecen en la región de Coquimbo, Chile. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 17(3): 480-494.
- Mujica-Ruiz E. y Caspeta-Mandujano J.M. (2009). Helmintos parásitos de *Astyanax aeneus* del río Cuautla. *Narraciones de la Ciencia*. México 57-60
- Niciura S.C.M., Cruvinel G.G., Moraes C.V., Chagas A.C.S., *et al.* (2019). In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. *Journal of Helminthology*. 1–5. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000221>
- Oliveira Santos F., Ponce Morais Cerqueira A., Branco A., Moreira Batatinha M.J., Borges Botura M. (2019). Anthelmintic activity of plants against gastrointestinal nematodes of goats: a review. *Parasitology*. 1–47.
- Olmedo-Juárez, A, Rojo-Rubio, R., Arece, G.J., Mohamed, A. Z. S., Kholif, E. A., Morales, A.E. (2014). In vitro of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Italian Journal of Animal Science*. 13: 303-307.
- Onyiah L. C. y Arslan O. (2005). Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. *Journal of Thermal Biology*. 30: 203-211.
- Ortiz-Ocampo G. I., Chan-Pérez J. I., Covarrubias-Cárdenas A.G., Santos-Ricalde R. H., Sandoval-Castro C. A., Hoste H., Capetillo-Leal C. M., González-Pech P. G., Torres-Acosta J. F. J. (2016). Efecto antihelmíntico *in vitro* e *in vivo* de residuos de *Coffea arabica* sobre un aislado de *haemonchus contortus* con baja susceptibilidad a taninos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 19: 41 -50.

- Palacios R.A. (2006). Los Mezquites Mexicanos: Biodiversidad y Distribución Geográfica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 41 (1-2): 99 – 121.
- Partida, D.-L.-P. J. A., Braña, V. D., Jiménez, S. H., Ríos, R. F. G., & Buendía, R. G. (2013). *Manual de producción de carne ovina (libro técnico No. 5)*. Colón, México: CENID-FyMA/ INIFAP.
- Pennington-Terrence D. y Sarukhán J. (2005). Árboles Tropicales de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México. 511 p.
- Pérez-Pérez C., Hernández-Villegas M. M., de la Cruz-Burelo P., Hernández-Bolio G. I., Bolio-López G. I. (2014). Efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gastrointestinales de ovinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17: 105 – 111.
- Rashid S., Irshadullah M. (2018). Epidemiology and seasonal dynamics of adult *Haemonchus contortus* in goats of Aligarh, Uttar Pradesh, India. *Small Ruminant Research*. 161:63–67. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.01.018>.
- Rico-Arce M. L. (2001). El género *Acacia* (Fabaceae, Mimosoideae) en el estado de Oaxaca, México. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 58(2): 251 -275.
- 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 nortecentro de México. SAGARPA-INIFAP. Libro Técnico 8: 1-195.
- Rodríguez-Vivas R. I., Grisi L., Pérez de León A. A., Silva-Villela H., Torres-Acosta J. F. D.-J., Fragoso-Sánchez H., Romero-Salas D., Rosario-Cruz R., Saldierna F., García Carrasco D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 8(1), 61-74. Doi: 10.22319/rmcp.v8i1.4305

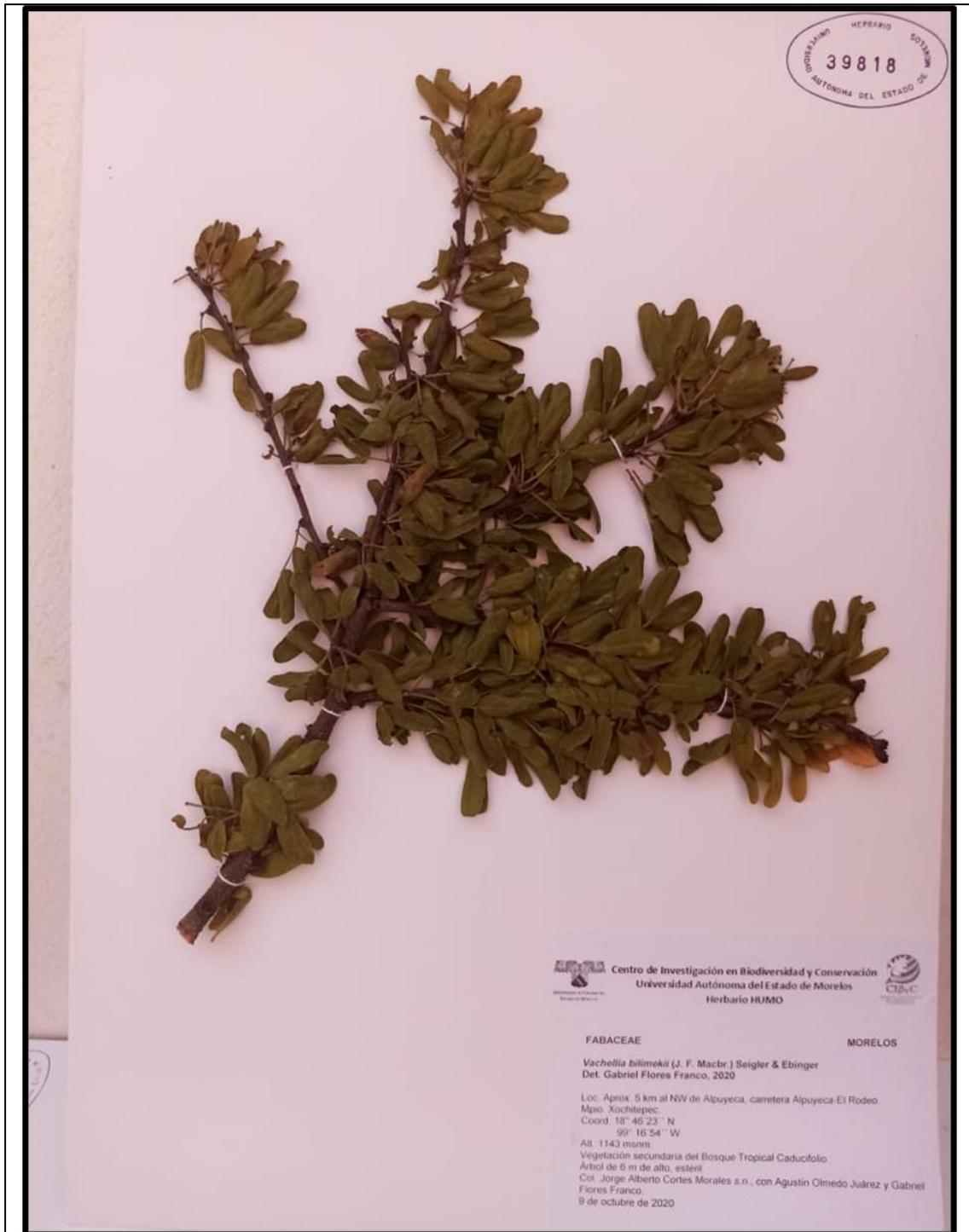
- Rosales S.R., Valenzuela N.L.M., Ríos S.J.C., Jiménez O.R., Ibarra F.J.M. (2011). Diversidad genética en poblaciones naturales de mezquite del norte-centro de México. *En: Importancia de las poblaciones de mezquite en el Norte-Centro de México. Libro técnico No.25. INIFAP. CENID-RASPA. Gómez Palacio, Durango. 3-19 pp.*
- Rowe J.B., Nolan J. V., Teleni E., (1988). The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. *British Journal of Nutrition.* 59, 125-139 pp
- SADER. (2019). Sesiona el Comité Estatal Sistema Producto Ovinos de Morelos. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura%7Cmorelos/articulos/sesiona-el-comite-estatal-sistema-producto-ovinos-de-morelos-225780>
- Salazar W., Cárdenas J., Villafuerte S., Fernández I., Villegas L., Pacheco L., Untiveros G. (2008). Estudio fitoquímico y de la actividad antihelmíntica de los extractos de *Sarothamnus scoparius* y *Lupinus ballianus*. *Revista de la Sociedad Química del Perú.* 74(2): 100-107.
- Sánchez-Blanco J., Sánchez-Blanco C., Sousa-S. M., Espinosa-García F.J. (2012). Assessing introduced *Leguminosae* in México to identify potentially high -impact invasive species. *Acta Botánica Mexicana* 100: 41-77.
- Seigler D. S. (2002). Economic potential from Western Australian *Acacia* species: secondary plant products. *Conservation Science Western Australia* 4:109-116.
- Sibaja-Hernández R., Román-Guerrero A., Sepúlveda-Jiménez G., Rodríguez-Monroy M. (2015). Physicochemical, shear flow behaviour and emulsifying properties of *Acacia cochliacantha* and *Acacia farnesiana* gums. *Industrial crops and Products.* 67: 161–168.
- Simons A.J. & Stewart J.L. (1994). Forage tree legumes in tropical agricultura. *En: Gliricidia sepium - a multipurpose forage tree legume.* CAB International. UK. 30-48 pp.
- Sotelo A., Migliaro P., Toledo A., Contreras J. (1999). Chemical composition, digestibility and antinutritional factors content of two wild

- legumes: *Styphonolobium burseroides* and *Acacia bilimekii*. *Plant Foods for Human Nutrition* 54: 59–65.
- Southwick C.H. (1972). *Ecology and the Quality of Our Environment*. D. Van Nostrand Company. New York. 319 p.
  - Sutton D.B. y N.P. Harmon. (1981). *Fundamentos de Ecología*. Editorial Limusa. México. 293 p.
  - Torgerson P. R. y Macpherson-Calum N. L. (2011). The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Veterinary Parasitology*, 182(1), 79-95. Doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.017
  - Torres-Vásquez P., Prada-Sanmiguel G. A., Márquez-Lara D. (2007). Resistencia antihelmíntica en los Nemátodos Gastrointestinales del bovino. *Revista de Medicina Veterinaria* 13: 59-76.
  - Vázquez-Prats V. M., Flores-Crespo J., Santiago-Valencia C., Herrera-Rodríguez D., Palacios-Franquez. A., Liébano-Hernández E., Pelcastre-Ortega A. (2004). Frecuencia de nematodos gastroentéricos en bovinos de tres áreas de clima subtropical húmedo de México. *Técnica Pecuaria en México*. 42(2), 237-245.
  - von Son-de Fernex E., Alonso D. M. A., Valles M. B., Capetillo, L. C. M. (2012). *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*. 131: 413-418.
  - Wabo P. J., Kenne T. F., Mpoame M., Pamo T. E., Bilong B. C. F. (2011). *In vitro* activities of acetonic extracts from leaves of three forage legumes (*Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena diversifolia*) on *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 125-128.
  - Williams A.R., Ropiak H.M., Frygnas C., Desrues O., Mueller-Harvey I., Thamsborg S.M. (2014). Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasitology Vectors*. 7: 518-527.

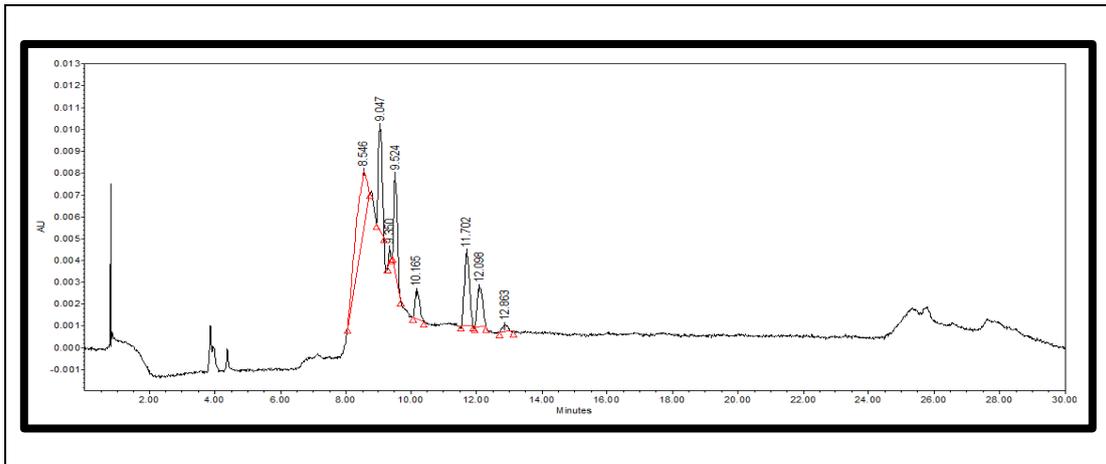
- Williamson A. L., Brindley P. J., Knox D. P., Hotez P. J., Loukas A. (2003). Digestive proteases of blood feeding nematodes. *Trends Parasitology*. 19 (9): 417-423. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00189-2)
- Zarza-Albarrán, M.A., Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Mendoza-de Gives, P., González-Cortazar, M., Tapia-Maruri, D., Mondragon-Ancelmo, J., García-Hernández, C., Blé-González, E.A., Zamilpa, A., (2020). Galloyl flavonoids from *Acacia farnesiana* pods possess potent anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. *Journal of Ethnopharmacology*. 249. 112402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112402>
- Zhang Z.-Q. (2013). Animal biodiversity: an update of classification and diversity in 2013. En Z.-Q., Zhang (Ed.), *Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (Addenda 2013)*. *Zootaxa*. 3703(1): 5-11. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3703.1.3>

## ANEXOS

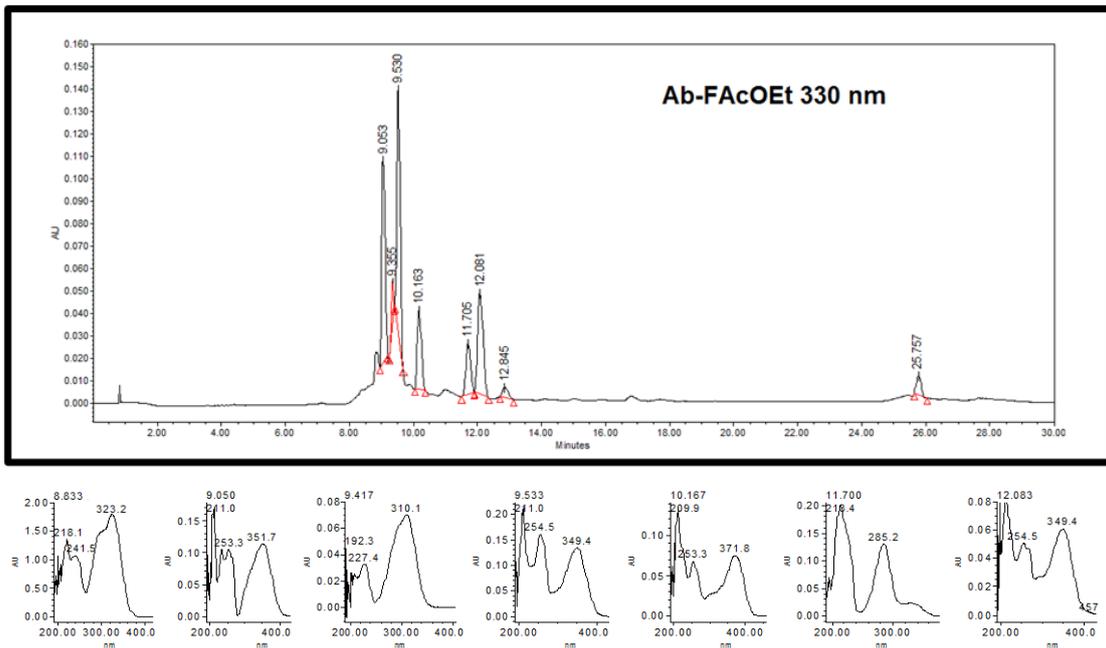
### Anexo 1. Ejemplar colectado (*Acacia bilimekii*) con número de herbario 39818



**Anexo 2.** Cromatograma de HPLC del extracto hidroalcohólico (AbHA) a 350 nm



**Anexo 3.** Cromatograma de HPLC de la fracción de acetato de etilo (AbFAcOEt) a 330 nm y sus espectros de absorción UV







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



Escuela de Estudios Superiores del Jicarero

Dirección

El Jicarero, Jojutla, Morelos, 04 de junio del 2024

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE  
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES  
PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento que presenta el Pasante de Licenciado en Biología: **C. Eduardo Armenta Estefanía, matrícula: 10018331** con la modalidad **Tesis Profesional por Etapas (ART. 26°)** con el título del trabajo: **ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DE *Acacia bilimekii* (FABACEAE) MACBRIDE SOBRE *Haemonchus contortus* Rudolphi.**

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

Voto a favor: \_\_\_\_\_  \_\_\_\_\_

Voto en contra: \_\_\_\_\_

Necesita arreglar o eliminar algo: \_\_\_\_\_

Comentarios: \_\_\_\_\_

**Firma**

Dra. Ofelia Sotelo Caro  
M. en C. Humberto Flores Bustamante  
Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez  
Biól. Cinthia Lizbeth Segura Márquez  
Ing. Jorge Aurelio Manzo Espín  
Dr. Manasés González Cortázar  
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

**CINTHIA LIZBETH SEGURA MARQUEZ | Fecha:2024-06-04 20:56:32 | FIRMANTE**

SIHnS28GyRbRyGnvO3cdWL0119gMPdGi6db3x5PRTIs8JOjTfd5HJZ2bu8XYISpIgmCxYwB8ylY8nZCsf8SKCjy9PscUeB4hkprxfhQ20MnN6r2wllW/k3oiW6GLix/OVUGdgcgBq4  
OOfBHqca6NpGhf+pVj1KaRW4N/qVsB296+N6HT8T91j2B+TQFHO8e+1wMwC/EVP45G1XbTxunMwKQT89fXUq5xhA2o4uwmP6BhOzLIHTVUP7W59+vVDiQ7bNuFYOP+ZY2  
8osILT1wdxVSwaxDR2IHT2CuaYcNqGCeHvINNa8gzNa9n5FJYEyNVrYJ+G1osl2/WgWCBgVRjg==

**DAVID OSVALDO SALINAS SANCHEZ | Fecha:2024-06-04 21:10:15 | FIRMANTE**

TVgHTaCif7taa1aGwvwxFEqIN6bm6OvQQkIM8KJ6+90ztZoQHapUzM5Jw9xU8xBPMJ2cQwCkgINt0j6m4AbjFa9k08tvmohd2dh7SQguvaJNexazYUw92Dgiw6pKedOw7Rk7/fEV  
GiqRoOnZFbTNgz1mmCoxz2bcLLB71NA14XtkGrH9SQ0nmDGD873LCCYr1w2U+aBTrQgYkx/E6JNAVxqxyt4MO5RQyY2Cp4GO7PEcYvtHBPcSCLqnvX+2B4HdcDIO7kOx8j  
IPV6cSnoev+FZ5MSxj/FXtama93jhY6q5YY0bpWJ1HnwfJWfPzfiGUckOYfLIZELouA5YVW2A==

**HUMBERTO FLORES BUSTAMANTE | Fecha:2024-06-04 21:48:07 | FIRMANTE**

pmM5cRrmy1MVjot1twyWpJuGH+nFtaRXm8AAAnKibYG47vfM2H87hcaMhSkYtoU1m8tfn4MwIMAm79d1C77nEXoW0LkF2k+07prCBLPa78eKhm17WNNeVGB0EDYmRE9XJd  
1jCo5ytJUoFxA/0J2R8YePxnGA97tgV6CFipHIBmRD78n0/ql0rLBkptDykhHjUNZ0n8oBLTD283TZq8llys+kbXAwjE5kO/Z4lqe7bylV4JQUalYekst9byPtPdZMEggz8N/WcbEZ  
w5m82HM4uEvhprlHh8XeY9Ql5rZUPMkWsziYNJj8QppKvseAGv+8up3wmhVHYvQiv4xfu9w==

**OFELIA SOTELO CARO | Fecha:2024-06-05 08:56:29 | FIRMANTE**

YSncaG2S9+7OZFU3hKieynfleZ1QjHsyIEQ2Mw6SFQOWaLjqlE/molZZ8Grg7Wwi2ViCHigaPjKfkqaWeMnosq/qni1JpODpJBY1FAQRsuXwIucbyloBOXHIQFDBFhY1QfOzMyt  
ckngwmhMHYf24VMLmpCUwQrgKgb6e6oWskDrb3JkB3hjijMrL2m+XKVxzoT544n03N9z/ArAPU716mfp7yJsjsgneCWqekyCw8AgYT32R/FdcPX9XipigEWYGRAS5PvhGD/Ow  
3k8zLe7w5/KTWAjRmJnfTbKRaHABT6s0nX+haizjRCcmeVs3p21Cge5dSXU6p0bfFXo0A==

**JORGE AURELIO MANZO ESPIN | Fecha:2024-06-05 10:47:38 | FIRMANTE**

DRDroWoSjnl1ssyp6RZD3YUX1R09GQJqgrfTgBhFkoCnul7c1kEKvG0iN3xQ4blfZ9w/qmpzGqmN9RvRNi3rZ9eXaakiCAYVe5NI+kcZqi2lwm38s1UeNnZ57VvPKnIHW0RtQ3v  
5RE7BDYRnkj3L95hUy+Op71NEoTYNkb08NjJM81rz6lpxyPrY/fGsHCxoMTeO3HQmLuqS4dlgwEL0vIiHNAAIpez4OVCWZwq39BuVDH0891DCvC9G45tpNHwqPNP7f9CVM  
3xdmXJ/9BwxT4x4KPjBSd31y8XK3jmW6jwJE4zgcPCUNll46Y7gciZCPesPOeibflwPheTGCa==

**AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ | Fecha:2024-06-05 11:43:00 | FIRMANTE**

PzaaRw7hVz9UbnHaDCVYCHERwOGC5Oh1wL89izv7J9Nk4vybn5iD71ev/B7WfFjnt+JwShomHZYmflkWiAoK+8BL+kKUGkZw3hLEjwsKV/8gQJ86p0ZIaesBug3/FPdfr0LJ  
xr/yca8Vqg71gnd0f3JAPcj/PT2krzf7YzsluLuCIAAnVR7h/vRnAJPINz4SX/UgQd4y+74dlG7vdZRud167nhFewZESWlVdaCKjuw9TddyM2UgU9QvGX+3UhJ9IKp+yQssrKdcdPWzw  
0k3FnXCZU8diJ0/LcOzKTJqstv5+F824BSgBEVVxtiavuf5qgG4cTI5FKnY+Ysl6Sg==

**MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha:2024-06-05 12:52:59 | FIRMANTE**

uEVppT2Qc5sKrGmEWuchSxwJGV/71xU6qyTwSzH0WA3jmTrRpujheQqkTwC3rQcj8Kn2w7DwvTE6B7AtPGds2k1UvMxZLy+JumqL7drmfGLH9hIKea5K7TZjvna4sqe9m8xCQu  
3DZQa7oL7LGk8yUFKDYjeAAC5Ctyl25av6pAo3Tqtc3R5BMMWR5DEvPDZC1G+b40ldFJ4Isa+evABnQNV9Cqv+saEjx2yvt0JGbiqPNIPJbBRhnbMywftuRrWtTtDv+etNzuZz+h  
PeAHRgZSpBQn+paN+5xptnCSNe+be3VsxUGchAy1ocsUzjr/r1v3ETAmitaMmZ9hPaNUg==

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



1vk2Oqlkc

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/I4Tn9QvBURqQZOKnFKwwQnsHEtb55Lzu>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029