

Evaluación *in vitro* de la actividad antihelmíntica de extractos metanólicos de *Guazuma ulmifolia* frente a nematodos *Cyathostominae*

In vitro evaluation of the anthelmintic activity of methanolic extracts of *Guazuma ulmifolia* against *Cyathostominae* nematodes

Paula Andrea Castro Martínez¹, Jorge Alexander León González^{1*},
Danny Wilson Sanjuanelo Corredor²

RESUMEN

El estudio evaluó el efecto anti-eclosión de extractos metanólicos de corteza y hoja de *Guazuma ulmifolia* mediante la prueba *in vitro* de Inhibición de la Eclosión de huevos de nematodos. Se evaluaron las concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/ml de cada extracto, un control negativo (Dimetil sulfóxido) y dos controles positivos (Fenbendazol y Lugol) contra nematodos de la subfamilia *Cyathostominae* como modelo biológico. Las tres concentraciones de los dos extractos, así como los dos controles positivos presentaron resultados estadísticamente similares, pero diferentes frente al control negativo. La inhibición media de la eclosión de huevos usando corteza y hoja fue de 49.73 y 45.22%, respectivamente, en la concentración de 1000 µg/ml, de 61.93 y 59.20% en la concentración de 500 µg/ml y de 75.60 y 75.82% en la concentración de 250 µg/ml. Los extractos metanólicos de corteza y hoja de *Guazuma ulmifolia* mostraron un efecto anti-eclosión contra nematodos *Cyathostominae* en las concentraciones evaluadas.

Palabras clave: antinematodos, Strongyloidea, extractos vegetales

¹ Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Facultad Ciencias Agropecuarias, Bogotá D.C., Colombia

² Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Facultad Ciencias Básicas, Bogotá D.C., Colombia

* E-mail: jorgleon@udca.edu.co

Recibido: 18 de mayo de 2022

Aceptado para publicación: 31 de diciembre de 2022

Publicado: 27 de febrero de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The study evaluated the anti-hatching effect of methanolic extracts from the bark and leaf of *Guazuma ulmifolia* using the *in vitro* Nematode Egg Hatching Inhibition test. Concentrations of 1000, 500 and 250 µg/ml of each extract, a negative control (Dimethyl sulfoxide) and two positive controls (Fenbendazole and Lugol) were evaluated against nematodes of the Cyathostominae subfamily as a biological model. The three concentrations of the two extracts, as well as the two positive controls showed statistically similar results, but different compared to the negative control. The mean inhibition of egg hatching using bark and leaf was 49.73 and 45.22%, respectively, at the 1000 µg/ml concentration, 61.93 and 59.20% at the 500 µg/ml concentration, and 75.60 and 75.82% at the concentration of 250 µg/ml. The methanolic extracts of the bark and leaf of *Guazuma ulmifolia* showed an anti-hatching effect against Cyathostominae nematodes at the concentrations tested.

Key words: anti-nematodal agents, Strongyloidea, plant extracts

INTRODUCCIÓN

Los nematodos gastrointestinales tienen una alta frecuencia de presentación en los animales, afectando su bienestar y productividad. Por ello, su control es indispensable y conduce a la utilización continua de fármacos con actividad antiparasitaria como benzimidazoles, tetrahidropirimidinas y lactonas macrocíclicas, entre otros (Gokbulut y McKellar, 2018). Sin embargo, esta estrategia, si bien logró controlar el parasitismo gastrointestinal, es de enfoque reduccionista y contribuye a la aparición de problemas asociados a esta estrategia, tales como: resistencia antihelmíntica, residualidad química y el incremento de los costos para el control eficiente (Chaparro-Gutiérrez *et al.*, 2018).

Frente a esta situación, surgen abordajes holísticos para el control antihelmíntico como: vacunas, selección de animales resistentes, manejo rotativo de potreros, utilización de enemigos naturales, utilización de nuevos principios activos y disminución de la exposición parasitaria (Hoste *et al.*, 2012). Todas estas medidas buscan la protección contra las infecciones y reinfecciones parasitarias (Hernández Malagón *et al.*, 2015).

Dentro de las alternativas de control se destaca la utilización de fitoquímicos obtenidos de la vegetación nativa local, los cuales pueden presentar potencial para su empleo en el entorno de los animales susceptibles a infestaciones parasitarias. Las plantas utilizadas para el control antiparasitario surgen de información procedente de la tradición oral, y consolidada a través de técnicas de ensayo y error realizadas por ganaderos en campo, sin condiciones controladas. Esto genera cuestionamientos acerca de su efectividad (Ramírez Poloche, 2012). Por tal razón, se considera indispensable evaluar metódicamente las propiedades antihelmínticas que cada planta posee para generar información contrastable, que a su vez permita incrementar la confianza en su beneficio (Moreno *et al.*, 2010).

La viabilidad de esta búsqueda de compuestos fitoquímicos en América Latina es alta, gracias a las condiciones edafológicas y climáticas que permiten la existencia de una abundante y diversa flora. No obstante, en muchos de estos casos se desconoce sus fitocompuestos y su actividad específica. Ante esto, han surgido metodologías para estudios en plantas con potencial antihelmíntico empleando nematodos como modelos biológicos

(García *et al.*, 2005; Hernández-Alvarado *et al.*, 2018; Matulevich Pelaez y García Rodríguez, 2016; Molano *et al.*, 2016; Quesada Romero *et al.*, 2009).

En este contexto se planteó el presente estudio para evaluar la actividad antihelmíntica de los extractos de corteza y hoja del árbol *Guazuma ulmifolia*. Este árbol se emplea en regiones tropicales como planta comestible y se le atribuyen diferentes bioactividades de uso médico (Pereira *et al.*, 2019; Velázquez *et al.*, 2013). Incluso, existen reportes de presencia de compuestos con potencial antihelmíntico (Hernández-Alvarado *et al.*, 2018). No obstante, faltan evidencias que documenten la magnitud del efecto biocida a distintas concentraciones de los extractos contra un modelo biológico como el de los nematodos estrombilidos de la subfamilia Cyathostominae, que son los que afectan con mayor frecuencia a los équidos en distintas partes del mundo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio *in vitro* de la acción inhibitoria de la eclosión de huevos de nematodos Cyathostominae por efecto de los extractos metanólicos de la hoja y corteza de *G. ulmifolia*. Para esto se empleó la prueba de inhibición de la eclosión de huevos de nematodos recomendada por la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria, utilizada también por Torres Acosta *et al.* (2015) para el diagnóstico de la resistencia hacia los antihelmínticos.

Extractos Vegetales

Se colectaron 5 kg de tallos y 5 kg de hojas maduras y tiernas de árboles mayores de cinco años de *G. ulmifolia*, durante octubre de 2020 (temporada lluviosa), en el Municipio de Quebrada Negra, Cundinamarca, Colombia (4° 35' 56.57" N, 74° 04' 51.30" O). La zona se encuentra a una altitud promedio de 1233 msnm y presenta una temperatura

media de 24 °C, y un régimen de lluvias de tipo bimodal.

Los tallos fueron descortezados y luego la corteza y hojas se secaron por exposición solar a temperatura ambiente. Posteriormente, cada material se fragmentó en una trituradora de mandíbulas hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm. El material se empacó por separado en bolsas plásticas de cierre hermético para su almacenamiento a temperatura ambiente hasta la elaboración de los extractos.

El material fragmentado, tanto de corteza como de hoja, se sometió por separado a un proceso de extracción sólido-líquido continua. Esta se basó en maceración con metanol como disolvente, en una solución con proporción de 1:10 (20 g de material vegetal y 200 ml de metanol absoluto), durante 24 h, agitando mecánicamente la solución cada 6 h. Luego se filtró el macerado por gravedad, empleando papel de filtro Whatman® con poro de 5-10 µm. Para eliminar el disolvente, se realizó evaporación al vacío empleando el rotoevaporador Heidolph HeiVap Advantage. Finalmente, el extracto se acabó de secar en una estufa eléctrica.

Con el extracto seco de corteza y el de hoja, se preparó por separado la respectiva solución madre con una concentración de 80 mg/ml disolviendo el material respectivo en dimetil sulfóxido (DMSO). A partir de las soluciones madre de cada extracto crudo se prepararon diluciones en agua destilada con concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/ml, para determinar la concentración media inhibitoria y la concentración con máxima inhibición de cada extracto.

Huevos de Nematodos

Se colectaron 1000 g de materia fecal de equinos naturalmente infectados con nematodos de la subfamilia Cyathostominae. Los huevos de nematodos se concentraron mediante la prueba de sedimentación lenta,

seguida de la prueba de flotación con solución azucarada. Los huevos fueron cuantificados usando la cámara de McMaster. Finalmente, se preparó una solución de huevos en agua destilada con una concentración de 200 huevos/ml.

Prueba de Inhibición de la Eclosión

Se ejecutó la prueba de inhibición de la eclosión empleando las concentraciones de 1000, 500 y 250 $\mu\text{g/ml}$ de cada extracto metanólico obtenido de hojas y corteza de la *G. ulmifolia*, un control negativo (DMSO) y dos controles positivos (Febendazol y Lugol). Estas pruebas siguieron el protocolo desarrollado por Torres Acosta *et al.* (2015) utilizando placas de cultivo de 24 pozos. Se emplearon dos pozos para cada control positivo, dos pozos para el control negativo y tres pozos para cada extracto y concentración evaluada. En cada pozo de 2 ml se depositó 10 μl de la concentración o control a evaluar, 1 ml de solución de huevos (200 huevos/ml) y 990 μl de agua destilada. De cada extracto se efectuaron 12 réplicas para cada concentración de los extractos de corteza y hoja.

Cada placa se incubó a una temperatura de 28 °C durante 48 h. La reacción se detuvo agregando una gota de lugol en cada pozo. Se tomó una muestra de cada pozo y la cantidad de huevos y larvas presentes se cuantificó en la cámara de MacMaster. Con estos datos se calculó el porcentaje de inhibición de la eclosión (PIE%) empleando la fórmula: $\text{PIE}\% = 100 - (\text{larvas/huevos} + \text{larvas}) * 100$.

Análisis Estadístico

Los resultados de inhibición de la eclosión obtenidos en la fase experimental fueron organizados en una hoja de cálculo de MS Excel y analizados en el software R v. 3.6.3 (R Core Team, 2020) con la interfaz RStudio (RStudio Team 2020). Se verificó el cumplimiento de los supuestos básicos de homogeneidad y distribución normal de los datos a través de las pruebas de Shapiro-Wilk

y Levene. Luego se compararon las medias de inhibición a través del análisis de varianza y se realizó comparación múltiple de medias con la prueba de Duncan.

RESULTADOS

El efecto inhibitorio de los extractos de corteza y de hoja de *G. ulmifolia* varió entre 45 y 75%, aumentando el error estándar de los datos a medida que aumentaba la concentración del extracto. El análisis de varianza, tras la verificación del cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de los datos encontró similitud entre las medias analizadas (Figura 1) de las tres concentraciones de los extractos y de los controles positivos, siendo significativamente diferentes del control negativo. Sin embargo, se halló que las concentraciones de 250 μg en ambas estructuras de la planta tuvieron las respuestas más estables frente a la inhibición de la eclosión (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos indican que tanto los extractos de corteza como los de hoja de *G. ulmifolia*, en sus diferentes concentraciones, presentan acción inhibitoria sobre la eclosión de huevos de nematodos Cyathostominae. Los hallazgos de este estudio son comparables con los realizados por Antonio-Irriño *et al.* (2021), quienes evaluando el efecto inhibitorio de extractos acuosos de hoja de *G. ulmifolia*, empleando como modelo biológico nematodos presentes en ovinos, obtuvieron porcentajes de inhibición de la eclosión mayores al 59.8%.

El efecto antieclosión encontrado en los extractos de corteza y hoja de *G. ulmifolia*, probablemente se asocia a la presencia, en ambas partes, de compuestos como los taninos condensados, ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales son abundantes en plantas de la familia Malvaceae (Zirintunda

Cuadro 1. Porcentaje promedio de inhibición de la eclosión de huevos de nematodos (subfamilia Cyathostominae) utilizando tres concentraciones de extractos metanólicos de hoja y corteza de *Guazuma ulmifolia* (12 réplicas por concentración)

Solución	Concentración (µg /ml)	Inhibición de la eclosión ± error estándar (%)
Corteza	250	75.60 ± 8.15
	500	61.93 ± 10.62
	1,000	49.73 ± 11.66
Hoja	250	75.82 ± 5.74
	500	59.20 ± 11.05
	1,000	45.22 ± 12.42
Control negativo (DMSO)	N/A	13.73 ± 0.69
Control positivo (Lugol)	N/A	98.58 ± 0.61
Control positivo (Fenbendazol)	250,000 ¹	83.33 ± 6.80

¹ 200 huevos/ml

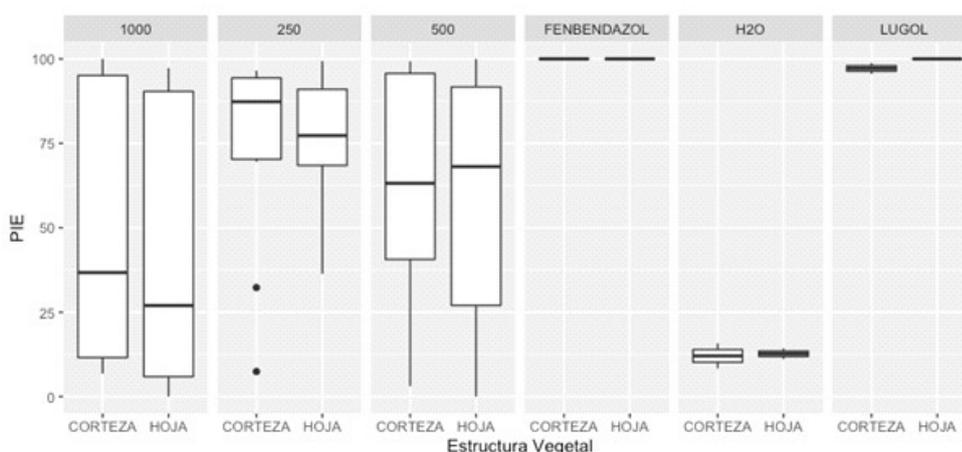


Figura 1. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de nematodos (subfamilia Cyathostominae) utilizando tres concentraciones de extractos metanólicos de hojas y corteza de *Guazuma ulmifolia*

et al., 2022), familia a la que pertenece *G. ulmifolia*. Es importante indicar que la corteza es la parte de la planta con mayor concentración de compuestos fenólicos totales, pero con relación a los compuestos flavonoides totales tienen una concentración simi-

lar al de las hojas (Pereira *et al.*, 2019). Las proantocianidinas (taninos condensados) predominan en la corteza, mientras que en las hojas predominan los ácidos fenólicos, al igual que los compuestos cianogénicos (Pereira *et al.*, 2019).

Dentro de los compuestos presentes en las distintas partes de la planta *G. ulmifolia*, se encuentra que los ácidos fenólicos tienen un importante potencial citotóxico sobre líneas celulares de mamíferos y frente a protozoos como *Leishmania* y *Trypanosoma* (Calixto *et al.*, 2016). Estos autores en *G. ulmifolia* detectaron ácidos fenólicos como el ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido rosmarínico, así como los flavonoides rutina, luteolina, apigenina y quercitina, compuestos con potente actividad citotóxica con efecto leishmanicida y trypanocida. Asimismo, otros trabajos demuestran que los ácidos fenólicos tienen efectos sobre vías de señalización y de expresión genética que conducen a la muerte de formas larvianas o adultas de helmintos (Zirintunda *et al.*, 2022).

Por otra parte, los taninos condensados presentes en *G. ulmifolia* se asocian a parálisis y muerte de formas adultas de helmintos (Zirintunda *et al.*, 2022). En cuanto al efecto sobre la viabilidad de los huevos, las principales hipótesis sobre el mecanismo de acción de los taninos condensados son: a) desestabilización de la membrana y, por ende, el incremento de la permeabilidad a los demás compuestos presentes en los extractos, los cuales actuarían sobre las proteínas intracelulares del huevo, inhibiendo tanto su crecimiento como su eclosión; b) Inhibición de la reacción enzimática que permite la formación larvaria al afectar la mórula directamente; o c) Inhibición de la actividad enzimática requerida en la membrana del huevo para favorecer la eclosión (Antonio-Irineo *et al.*, 2021).

Con respecto a los compuestos hallados en la corteza y hoja de *G. ulmifolia*, diversos estudios han verificado su presencia en plantas de las familias Fabaceae, Sapindaceae, Solanaceae, Myrtaceae y Santalaceae (Payne *et al.*, 2013). De esta forma, se reporta que los extractos de hoja y flores de siete plantas australianas de estas familias tenían efecto inhibitorio en la eclo-

sión de huevos de ciatostominos procedentes de equinos. Igualmente, extractos de la corteza de *Diospyros anisandra* de la familia Ebenaceae presente un porcentaje de inhibición de la eclosión de 50 y 99% contra ciatostominos en concentraciones de 11.3 y 38.1 µg/ml, respectivamente (Flota-Burgos *et al.*, 2020). Por otro lado, Zurita *et al.* (2016) encontraron que los extractos de hoja de *Albizia lophantha* presentaron porcentajes de inhibición de la eclosión de 11 y 43% para las concentraciones de 80 y 120 µg/ml, respectivamente, nematodos gastrointestinales de equinos (*Strongylus* spp, *Trichostrongylus axei*, *Strongyloides westeri* y *Parascaris equorum*).

En todos los trabajos se buscó determinar la concentración media inhibitoria y la concentración con máxima inhibición para establecer una relación dosis/respuesta. En este estudio al intentar establecer la relación dosis-respuesta para determinar la dosis de mayor eficacia, se encontró carencia de diferencias significativas en los porcentajes de inhibición de eclosión entre las diferentes concentraciones evaluadas, aunque la estabilidad de los efectos fue mejor en las concentraciones más bajas que se evaluaron en cada extracto. Probablemente estos hallazgos se asocian a que los metabolitos secundarios responsables del efecto inhibitorio, tales como los taninos condensados e hidrolizables, alcaloides y terpenos entre otros, pueden tener efectos variables dependiendo de su proporción, pasando de terapéuticos a tóxicos en mayores proporciones (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Además, se encuentra que la concentración de metabolitos con actividad anti-eclosión, se relaciona estrechamente con los solventes empleados para la extracción. Los extractos acuosos permiten extraer bio-compuestos como antocianinas, terpenoides, saponinas y taninos en concentraciones inferiores a las obtenidas con solventes alcohólicos como el metanol, en tanto que con solventes alcohólicos se reporta mayor índice

de extracción sobre compuestos como flavonoides y polifenoles (Zurita *et al.*, 2016; Flota-Burgos *et al.*, 2017; Esteban-Ballesteros *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2019; Antonio-Irinea *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

- Los extractos metanólicos de corteza y hoja de *Guazuma ulmifolia* en las concentraciones de 1000, 500 y 250 µg presentaron efecto anti-eclosión frente a los huevos de ciatostominidos de equinos.
- Las tres concentraciones, tanto de hoja como de corteza, tuvieron un comportamiento semejante; sin embargo, la concentración de 250 µg en ambos extractos presentó mayor estabilidad en las distintas mediciones.

LITERATURA CITADA

1. **Antonio-Irinea N, Flota-Bañuelos C, Hernández-Marín A, Arreola-Enríquez J, Fraire-Cordero S. 2021.** Estudio preliminar sobre la inhibición *in vitro* de nematodos gastrointestinales de ovinos con extractos acuosos de plantas forrajeras. *Abanico Vet* 11: 1-15. doi: 10.21929/abavet2021.10
2. **Ávalos García A, Pérez-Urria Carril E. 2009.** Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal* 2: 119-145.
3. **Calixto Júnior JT, de Morais SM, Gomez CV, Molas CC, Rolon M, Boligon AA, Athayde ML, et al. 2016.** Phenolic composition and antiparasitic activity of plants from the Brazilian Northeast «Cerrado». *Saudi J Biol Sci* 23: 434-440. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.10.009
4. **Chaparro-Gutiérrez JJ, Ramírez-Vásquez NF, Piedrahita D, Strauch A, Sánchez A, Tobón J, Olivera-Angel M, et al. 2018.** Prevalencia de parásitos gastrointestinales en equinos y factores de riesgo asociados en varias zonas de Antioquia, Colombia. *CES Med Vet Zootec* 13: 7-16. doi: 10.21615/cesmvz.13.1.1
5. **Chicaiza-Tisalema E, Barros-Rodríguez M, Zurita-Vásquez H, Mera-Andrade R, Velástegui-Espín G, Muñoz-Espinoza M, Espinoza-Vaca S, et al. 2016.** Efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto de *Albizia lophantha* sobre nematodos gastrointestinales de caballos. *Rev Inv Vet Perú* 27: 556-560. doi: 10.15381/rivep.v27i3.12007
6. **Esteban-Ballesteros M, Sanchis J, Gutiérrez-Corbo C, Balaña-Fouce R, Rojo-Vázquez FA, González-Lanza C, Martínez-Valladares M. 2019.** *In vitro* anthelmintic activity and safety of different plant species against the ovine gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Res Vet Sci* 123: 153-158. doi: 10.1016/j.rvsc.2019.01.004
7. **Flota-Burgos GJ, Rosado-Aguilar JA, Rodríguez-Vivas RI, Arjona-Cambranes KA. 2017.** Anthelmintic activity of methanol extracts of *Diospyros anisandra* and *Petiveria alliacea* on cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) larval development and egg hatching. *Vet Parasitol* 248: 74-79. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.10.016
8. **Flota-Burgos GJ, Rosado-Aguilar JA, Rodríguez-Vivas RI, Borges-Argáez R, Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Gamboa-Angulo M. 2020.** Anthelmintic activity of extracts and active compounds from *Diospyros anisandra* on *Ancylostoma caninum*, *Haemonchus placei* and *Cyathostomins*. *Front Vet Sci* 7: 565103. doi: 10.3389/fvets.2020.565103
9. **García DE, Soca M, Medina MG. 2005.** Acción antihelmíntica de seis extractos de morera en la viabilidad de larvas infestantes (L3) de nematodos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes* 28: 319-328.

10. **Gokbulut C, McKellar QA. 2018.** Anthelmintic drugs used in equine species. *Vet Parasitol* 261: 27-52. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.08.002
11. **Hernández Malagón JA, Arroyo Balán FL, Bonilla Quintero R, Sanchez-Andrade Fernandez R, Arias Vázquez MS. 2015.** Control biológico de parásitos en la ganadería. *Rev Zootecnia* 2: 3-11.
12. **Hernández-Alvarado J, Zaragoza-Bastida A, López-Rodríguez G, Peláez-Acero A, Olmedo-Juárez A, Rivero-Perez N. 2018.** Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico Vet* 8: 14-27. doi: 10.21929/abavet2018.81.1
13. **Hoste H, Martinez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta JF, et al. 2012.** Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet Parasitol* 186: 18-27. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.11.042
14. **Matulevich Pelaez J, Garcia Rodríguez J. 2016.** Composición química del aceite esencial de hojas de *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae). *Sci Tech* 21: 269-272. doi: 10.22517/23447214.13061
15. **Molano CER, Reatiga YC, Lara DFG. 2016.** *In vitro* effect of extract of *Lotus corniculatus* L on bovine gastrointestinal nematodes. *Rev Cub Plantas Med* 21: 145-156.
16. **Moreno FC, Gordon IJ, Wright AD, Benvenuti MA, Saumell CA. 2010.** Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de ruminantes. *Arch Med Vet* 3: 155-163. doi: 10.4067/S0301-732X2010000300006
17. **Payne SE, Kotze AC, Durmic Z, Vercoe PE. 2013.** Australian plants show anthelmintic activity toward equine cyathostomins *in vitro*. *Vet Parasitol* 196: 153-160. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.01.012
18. **Pereira GA, Peixoto Araujo NA, Arruda HS, Farias D, Molina G, Pastore GM. 2019.** Phytochemicals and biological activities of mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam): a review. *Food Res Int* 126: 108713. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108713
19. **Quesada Romero LF, Castaño Osorio JC, Bilbao M. 2009.** Efecto antiparasitario de los extractos etanólicos y etéreos de *Ficus obtusifolia* Kunth (Moraceae), frente a parásitos de clase nematodos (*Toxocara cati* y *Toxocara canis*). *Infectio* 13: 259-267. doi: 10.1016/s0123-9392(09)70157-2
20. **R Core Team. 2020.** R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
21. **Ramírez Poloche N. 2012.** La importancia de la tradición oral: El grupo Coyaima - Colombia. *Rev Cient Guillermo de Ockham* 10: 129-143.
22. **RStudio Team. 2020.** RStudio: integrated development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
23. **Torres Acosta F, Rosado Aguilar JA, Soberanes N. 2015.** Diagnóstico de resistencia a los antiparasitarios en ruminantes. En: Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. México: AMPAVE. p 355-403.
24. **Velázquez MM, Ayala MMA, Barragán GH, Hernández MO. 2013.** Los taninos como antioxidantes naturales en la carne. *Rev Agroproductividad* 2'13: 2-9.
25. **Zirintunda G, Biryomumaisho S, Kasozi KI, Batiha GE, Kateregga J, Vudriko P, Nalule S, et al. 2022.** Emerging anthelmintic resistance in poultry: can ethnopharmacological approaches offer a solution? *Front*

- Pharmacol 12: 774896. doi: 10.3389/fphar.2021.774896
26. **Zurita H, Mera R, Velástegui G, Muñoz M, Espinoza S, Ortiz P, Ibarra E. 2016.** Efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto de *Albizia lophantha* sobre nematodos gastrointestinales de caballos. Rev Inv Vet Perú 27: 556-560. doi: 10.15381/rivep.v27i3.12007