



**Ixodicide activity of methanolic extracts of *Acacia farnesiana* and *Acacia cornigera* (Fabaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) larvae**

**Actividad ixodidica de extractos metanólicos de *Acacia farnesiana* y *Acacia cornigera* (Fabaceae) contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae)**

Julia Guadalupe Grajales-Ruiz<sup>1</sup>, Carlos Enrique Ibarra-Martínez<sup>2</sup>, Benigno Ruiz-Sesma<sup>2</sup>, Gerardo Uriel Bautista-Trijillo<sup>2</sup>, Maria Angela Oliva-Llaven<sup>2</sup>, Paula Mendoza-Nazar<sup>2</sup>, Carlos Tejeda-Cruz<sup>2</sup> Herbey Ruiz-Sesma<sup>2</sup> Jose Carlos Ibarra-Puon<sup>2</sup> Ana Lilia Ruiz-Jiménez<sup>3</sup>, Marcela Gamboa-Ángulo<sup>3</sup>, Federico Gutiérrez-Miceli<sup>4</sup>, Esaú Ruiz-Sánchez<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>MCPAT, DES Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Chiapas, Chiapas, Mexico,

<sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas. Chiapas, Mexico,

<sup>3</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán. Mexico.

<sup>4</sup>Tecnológico Nacional de México, Campus Tuxtla Gutiérrez, Km 29020, Carr. Panamericana 1080, Boulevares, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, C.P. 29050, Mexico.

<sup>5</sup>Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal, Avenida Tecnológico s/n, Conkal, Yucatán, C.P. 97345, Mexico.

\*Corresponding author

E-mail address: [esau.ruiz@itconkal.edu.mx](mailto:esau.ruiz@itconkal.edu.mx) (E. Ruiz-Sánchez)

Article history:

Received: 10 July 2020 / Received in revised form: 22 September 2020 / Accepted: / 23 September 2020 / Published online: 1 October 2020.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2020.5.4.49>

## ABSTRACT

The *in vitro* activity of methanolic extracts of plant organs of *Acacia farnesiana* and *Acacia cornigera* (Fabaceae) on the mortality of *Rhipicephalus microplus* larvae was conducted by the larval immersion technique. In addition, the fractionation of the methanolic root extract of *A. cornigera* was performed and the chromatographic profile of the most active fraction was determined. The experiment was established under a

completely randomized design with five replicates, each replicate consisted of a group of 20 larvae. Extracts that produced > 90 % mortality of larvae were considered highly effective. Ethanolic extracts of *A. farnesiana* (stem) and *A. cornigera* (stem and root) had high effectiveness. The analysis of dose-response for the most effective extracts showed that *A. cornigera* (root) had the lowest values of CL<sub>50</sub> (2.12 mg/mL). From this methanolic extract, five fractions were generated. Fraction M2b1 (1 mg/mL) was the most active and caused 88 % mortality of larvae. The chromatographic profile of this fraction showed that the most abundant components were sacarose, quercitrine and two unidentified compounds. These results highlight the potencial of the ethanolic extract of *A. cornigera* (root) as a promising source of natural product against *Rhipicephalus microplus* larvae.

**Keywords:** *Acacia* spp., botanical ixodicide, plant extract, cattle tick larva, ectoparasite management.

## RESUMEN

Se evaluó *in vitro* la actividad ixodocida de extractos metanólicos de diferentes órganos de *Acacia farnesiana* y *Acacia cornigera* (Fabaceae) sobre la mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* mediante la técnica de inmersión de larvas. Además, se fraccionó el extracto metanólico de raíz de *A. cornigera* y se determinó su perfil cromatográfico. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones, cada repetición consistió de un grupo de 20 larvas. Se consideraron altamente efectivos los extractos que produjeron mortalidad > 90 %. Los extractos metanólicos de *A. farnesiana* (tallos) y *A. cornigera* (tallos y raíz) tuvieron alta efectividad. El análisis de dosis-respuesta de los extractos metanólicos más activos mostró que el de *A. cornigera* (raíz) tuvo los valores más bajos de CL<sub>50</sub> (2.12 mg/mL). De este extracto metanólico se generaron cinco fracciones, donde la fracción M2b1 (1 mg/mL) fue la más activa, misma que causó 88 % de mortalidad de larvas. El perfil cromatográfico de esta fracción mostró como componentes mayoritarios sacarosa, quercitrina y dos componentes no identificados. Estos resultados muestran el potencial ixodocida del extracto metanólico de *A. cornigera* (raíz), como fuente promisoría para el desarrollo de productos naturales contra larvas de *Rhipicephalus microplus*.

**Palabras claves:** *Acacia* spp., ixodocida botánico, extracto vegetal, larva de garrapata, manejo de ectoparásitos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es el principal ectoparásito del ganado bovino en zonas tropicales debido a su enorme impacto en la producción ganadera por los daños fisiológicos ocasionados por las picaduras, succión de sangre y transmisión de patógenos, como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2004). El control de garrapatas en México se ha realizado principalmente mediante el uso de productos químicos sintéticos y semisintéticos, como son los organofosforados, amidinas, piretroides y lactonas

macrocíclicas (Aguilar-Tipacamú & Rodríguez-Vivas, 2003; Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso continuo e irracional de estos productos ha ocasionado la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes, en particular a organofosforados, piretroides, amitraz, fipronil e ivermectina (Soberanes *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2012).

Ante esta problemática, a nivel mundial se ha planteado el uso de nuevas alternativas para el manejo sustentable de garrapatas, especialmente a través del uso de derivados vegetales, extractos y aceites esenciales, la ventaja de estos productos es que han demostrado efectividad, son considerados de bajo impacto al ambiente, representan bajo riesgo de resistencia y baja toxicidad a humanos (Chagas, *et al.*, 2003; Olivo, *et al.*, 2009; Borges, *et al.*, 2011). En este contexto, se han evaluado más de 60 especies de plantas pertenecientes a 26 familias contra *R. microplus* (Banumathi *et al.*, 2017).

El género *Acacia* es el segundo más grande de la familia Fabaceae, con distribución pantropical y representa recursos invaluable para el desarrollo de productos con actividad biológica para diversos fines (Maslin *et al.*, 2003; Malviya *et al.*, 2011; Nguyen, *et al.*, 2015; Subhan *et al.*, 2018; Jaeger *et al.*, 2019). Varios tipos de extractos vegetales de este género han sido reportados por poseer actividad insecticida, Pérez-Pacheco *et al.*, (2004) reportaron alta actividad insecticida de *Acacia farnesiana* (L.) Wild. contra larvas de *Culex quinquefasciatus*. Pangnakorn & Chuenhooklin (2018) observaron 100 % de mortalidad del coleóptero *Sitophilus zeamais* por efecto de los aceites esenciales de *A. farnesiana*. Chaubal *et al.*, (2005) encontraron alta actividad insecticida de extractos de *A. nilotica* contra a *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*. Sin embargo, la actividad acaricida de este género ha sido poco estudiado, un par de estudios reportan buena actividad de los extractos etanólicos de las hojas de *A. farnesiana*, *A. harmandiana* (Pierre) Gagnep. y *A. pennatula* (Schltdl. & Cham.) Benth (Chungsamarnyart *et al.*, 1991; Fernandez-Salas *et al.*, 2011).

Con base en lo anterior, y considerado la necesidad de integrar diferentes opciones de manejo de *R. microplus*, así como la necesidad de disminuir el uso de acaricidas sintéticos y promover el uso de extractos vegetales y sus derivados como prácticas sustentables en la producción pecuaria, el objetivo del presente estudio fue evaluar bajo condiciones de laboratorio la actividad de extractos metanólicos de diferentes órganos de *A. farnesiana* y *Acacia cornigera* contra larvas de *R. microplus* (Acari:Ixodidae), considerando como hipótesis que la acción de los extractos metanólicos obtenidos de estas especies tienen efecto ixodicida contra larvas de *R. microplus*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Ubicación del experimento y obtención de garrapatas

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNACH, en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Las garrapatas se obtuvieron de explotaciones comerciales ubicadas en el Municipio de Villaflores, Chiapas, México (16°20'39.8" N; 93°19'30.4" W). La recolecta fue en áreas que tuvieran un período mínimo de 45 días sin tratamiento con acaricidas químicos, se recolectaron hembras adultas ingurgitadas (teleoginas) en horas de la mañana y de forma manual, como lo describe el protocolo sugerido por la FAO (2004).

Las garrapatas se almacenaron en envases de plástico limpios, con orificios de ventilación y gasa húmeda en el fondo. Para obtener los huevos, las teleoginas se depositaron en cajas Petri. Éstas permanecieron en el laboratorio a  $27 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$  y 85-86 % de humedad relativa. Los huevos obtenidos se transfirieron a viales de cristal de 10 mL con tapa de algodón y fueron incubados bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad al que estuvieron las teleoginas durante la oviposición. Para los bioensayos se utilizaron larvas de 7-14 días de edad (Soberanes *et al.*, 2002).

## 2.2. Selección y obtención del material vegetal

La recolecta de plantas se llevó a cabo en los municipios de Cintalapa de Figueroa ( $16^{\circ} 32' 3.97''$  N;  $93^{\circ} 50' 51.55''$  W), Villaflores ( $16^{\circ} 20' 39.8''$  N;  $93^{\circ} 19' 30.4''$  W) y Tuxtla Gutiérrez ( $16^{\circ} 41' 35.38''$  N;  $93^{\circ} 11' 41.98''$  W), Chiapas. Las plantas seleccionadas para el estudio fueron *A. farnesiana* y *A. cornigera*. La identificación taxonómica se llevó a cabo en el laboratorio de botánica de la Escuela de Biología de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Campus Tuxtla Gutiérrez.

Las muestras se tomaron de plantas adultas. En laboratorio se separaron los diferentes órganos de las plantas (raíz, tallo, hojas, corteza, fruto), y se procedió a deshidratar el material en una estufa marca Imperial III® a temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Posteriormente el material vegetal se molió en molino (Ika Werker®) en partículas pequeñas para la elaboración de los extractos. El material obtenido de cada planta fue empacado en bolsa de nylon, etiquetado y almacenado a temperatura ambiente hasta su uso.

## 2.3. Preparación de extractos

Para preparar los extractos metanólicos, se siguió la metodología propuesta por Rosado-Aguilar *et al.* (2010), con modificación en el tiempo de reposo durante la extracción. Se tomó una muestra de 50 g de material vegetal molido, se adicionaron 300 mL de metanol y se dejó reposar durante 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se filtró a través de papel filtro Whatman #1 (Merck, Alemania). La evaporación del metanol se hizo través de un rotavapor (Büchi R300®, BÜCHI Latinoamérica, México) a baja presión y temperatura de  $45^{\circ}\text{C}$ . El material obtenido (pasta) se almacenó a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para los bioensayos se tomó el equivalente a 1 g de la pasta obtenida del rotavapor y se disolvió en 100 mL de una suspensión de agua destilada combinado con el emulsionante/solubilizante Tween 20 (ThermoFisher Scientific, México) en concentración 98:2 (v/v). La mezcla obtenida (concentración de 10 mg/mL) se usó en la primera ronda de evaluación. Para los bioensayos de dosis-respuesta se usaron las siguientes concentraciones: 10, 7.5, 5 y 2.5 mg/mL. Estas concentraciones están dentro de los rangos inferiores usados en otros estudios (Ferreira-Borges *et al.*, 2011).

## 2.4. Fraccionamiento del extracto metanólico de *Acacia cornigera*

Para el fraccionamiento del extracto metanólico, el procedimiento usado permitió obtener fracciones de diferente polaridad. El extracto metanólico (3.2 g) de raíz de *A. cornigera* se maceró con acetonitrilo (100 mL) a temperatura ambiente (dos veces por

24 h en cada ocasión). Posteriormente, para eliminar grasas la fracción de acetonitrilo se mezcló con hexano y se pasó en un embudo de separación, dos veces (1:1, v/v). Como resultado se obtuvieron las fracciones de baja polaridad (M2a, 0.11 g), de polaridad media-alta (M2b, 1 g) y un precipitado de polaridad alta (M2c, 2.07 g). El disolvente se eliminó a presión reducida, en un rotavapor (Ika®, IKA, Alemania) equipado con baño María a 40 °C, hasta sequedad total. Las tres fracciones se mantuvieron a 4°C en la oscuridad.

La fracción M2b fue sub-fraccionada mediante una columna de cromatografía líquida al vacío (5 cm de diámetro y 5 cm de altura) empacada con gel de sílice (60 GF<sub>254</sub>, Merck, Alemania). Se eluyó con una mezcla de disolventes (acetato de etilo, acetona, metanol y agua) en polaridad ascendente, obteniendo cinco fracciones nombradas M2b1, M2b2, M2b3, M2b4 y M2b5.

El extracto y las fracciones se analizaron por cromatografía de capa delgada (CCD), empleando placas cromatográficas con soporte de aluminio, impregnadas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> de 0.20 mm de espesor (Merck, Alemania). La fase móvil consistió de los siguientes sistemas: Hx/Acetona 8:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt 8:2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2, y AcOEt/Acetona/MeOH/H<sub>2</sub>O 4:4:1.5:0.5 y 4:5:1.5:0.5. Este último sistema se usó para fraccionar y analizar. Los componentes separados por CCD se visualizaron bajo luz UV de onda corta (254 nm) y larga (365nm), usando como revelador ácido fosfomolibdico y calor de aproximadamente 120 °C, para visualizar los componentes presentes.

## **2.5. Análisis de fracción por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)**

La sub-fracción más activa M2b1 se analizó en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución siguiendo el sistema previamente descrito por Martin *et al.*, (2014). Los cromatogramas y los espectros de masas se obtuvieron en un equipo Agilent 1200 acoplado a un detector masas Bruker maXis HR-QTOF (Bruker, USA). La muestra (2 µL al 1 %, v/v) se inyectó en una columna Zorbax SB-C8 de 2.1 × 30 mm (Agilent Technologies, Alemania), a una temperatura de 40 °C y un flujo de 300 µL/min. Para obtener los espectros de masas, la ionización del disolvente eluido se obtuvo utilizando una fuente estándar maxis ESI ajustado a un flujo de gas 11 L/min a 200 °C y un nebulizador de presión a 40 psig. Los espectros de masas se obtuvieron desde 150 *m/z* a 2000 *m/z* en modo positivo. Los espectros de masas de los componentes se compararon con las bases de datos MEDINA y el DNP de Chapman & Hall Dictionary v25.1.

## **2.6. Bioensayos**

Los bioensayos de mortalidad de las larvas de garrapata de *R. microplus* se llevaron a cabo por la técnica de inmersión larval modificada (Soberanes, *et al.*, 2002). Para tales efectos los extractos se resuspendieron en agua destilada y emulsionante/solubilizante Tween 20 al 2 % (ThermoFisher Scientific, México). Alícuotas de 3 mL de cada extracto se depositaron en cajas Petri de vidrio que contenían dos secciones circulares de papel filtro Whatman #1 (Merck, Alemania). Posteriormente, 100 larvas de garrapatas de 7-14 días de edad se depositaron por 10 minutos entre las dos secciones de papel filtro. Después de la exposición, las garrapatas tratadas se transfirieron en grupos de 20 a

sobres de papel filtro. Cada sobre de 20 larvas representó una repetición. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones, incluyendo el control negativo (agua destilada y emulsionante/solubilizante Tween 20 al 2 % (ThermoFisher Scientific, México) y el control positivo amitraz (Bovitraz 12.5, Bayer de México). Los paquetes se incubaron durante 48 h bajo condiciones de laboratorio a una temperatura de  $27 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$  y 85 %-86 % de humedad relativa. El porcentaje de mortalidad se determinó contando las larvas muertas y vivas aplicando la siguiente fórmula: mortalidad (%) = (número de garrapatas vivas – número de garrapatas muertas) / número de garrapatas vivas) x 100. Para el cálculo de las concentraciones letales medias ( $CL_{50}$ ), la mortalidad se corrigió mediante la fórmula sugerida por Abbott (1925) y recomendada por la FAO (2004),  $MC = (\% \text{ mortalidad Tratamiento} - \% \text{ mortalidad control}) / (100 - \% \text{ mortalidad control}) \times 100$ .

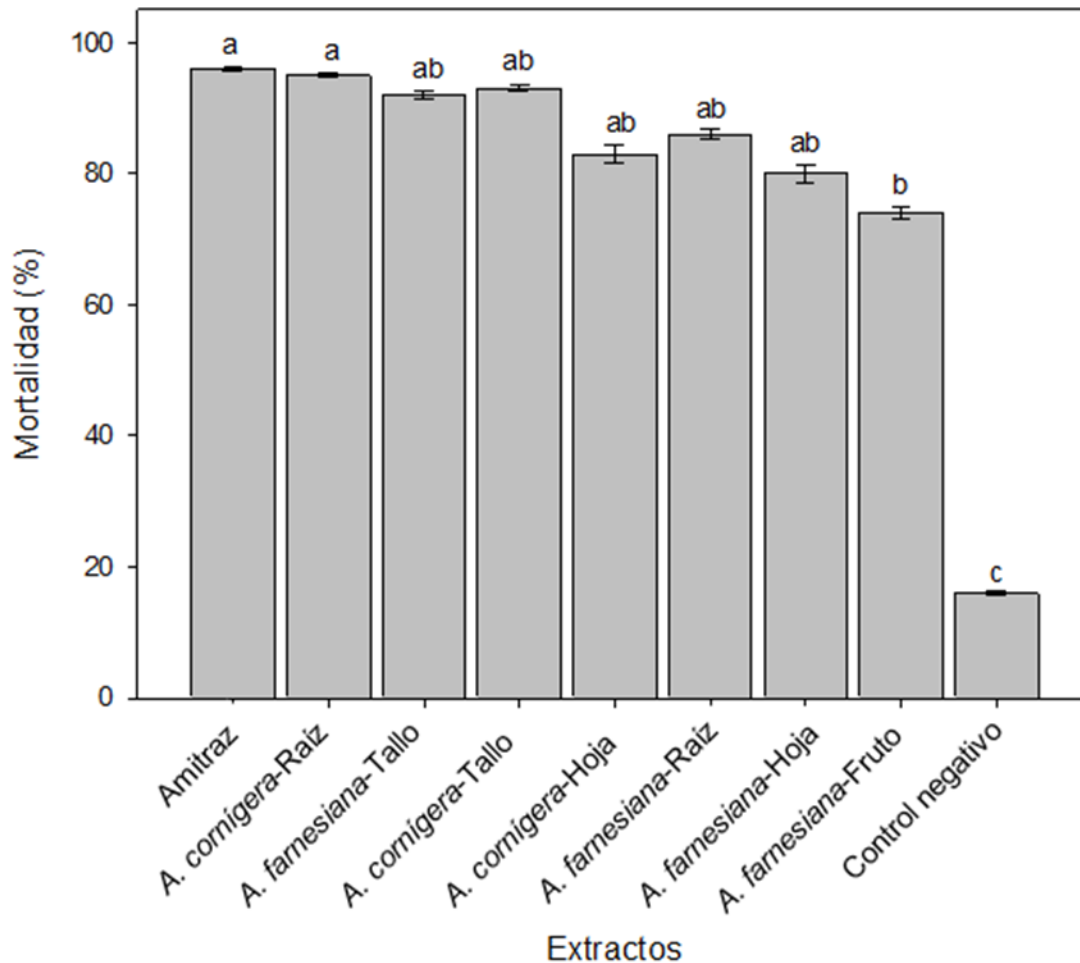
## **2.7. Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar. Previo al análisis los datos se evaluaron por homocedasticidad y normalidad. El análisis de datos fue mediante ANOVA, la comparación múltiple de medias se hizo mediante la prueba de Tukey y la concentración letal ( $CL_{50}$ ) fue calculada mediante análisis Probit. Los análisis se llevaron a cabo en el software SAS versión 9.0 para Windows.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Actividad de extractos metanólicos**

Un total de siete extractos metanólicos obtenidos de diferentes órganos de dos especies de *Acacia* se evaluaron contra las larvas de *R. microplus*. Todos los extractos produjeron mortalidad significativa ( $P < 0.05$ ) en las larvas. La mortalidad producida por los extractos estuvo en el rango de 74 a 96 % (Fig. 1). Los extractos de *A. cornígera* (raíz y tallo) y *A. franesiana* (tallo) produjeron más de 90 % de mortalidad. Estos extractos fueron considerados altamente efectivos.



**Fig 1. Means  $\pm$  standard error of the percent mortality of *R. microplus* larvae treated with methanol extracts (10 mg/mL) of *Acacia farnesiana* and *Acacia cornigera* at 48 h after exposure. Bars with the same letters are not significantly different (Tukey test; N = 5, P > 0.05).**

**Fig 1. Medias  $\pm$  error estándar del porcentaje de mortalidad de larvas de *R. microplus* tratadas con los extractos metanólicos (10 mg/mL) de *Acacia farnesiana* y *Acacia cornigera* a las 48 h de exposición. Barras con las mismas letras no presentan diferencias significativas (Prueba de Tukey; N = 5, P > 0.05).**

El cálculo de las concentraciones letales medias de los extractos metanólicos más activos mostró que los de *A. cornigera*-Raíz y *A. cornigera*-Tallo fueron los más tóxicos con una CL<sub>50</sub> de 2.1 mg/mL y 4.1 mg/mL, respectivamente (Tabla 1).

**Table 1. Medium lethal concentration (LC<sub>50</sub>; mg/mL) of methanol extracts of *Acacia farnesiana* and *Acacia cornigera* on *Rhipicephalus microplus* larvae after 48 h of exposure.**

**Tabla 1. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>; mg/mL) de extractos metanólicos de *Acacia farnesiana* y *Acacia cornigera* sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* después de 48 h de exposición.**

Extracto	Pendiente	CL <sub>50</sub> (Intervalo de confianza)	P
<i>A. farnesiana</i> -Tallo	1.09	10.5 (6.1-14.7) <sup>a</sup>	<0.01
<i>A. cornigera</i> -Tallo	1.43	4.1 (2.15 – 7.8) <sup>b</sup>	<0.01
<i>A. cornigera</i> -Raíz	1.04	2.12 (0.87 -5.2) <sup>b</sup>	<0.01

Valores de CL<sub>50</sub> seguidos por la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes con base en los traslapes de los valores de intervalos de confianza (IC). N = 5 grupos de 20 individuos.

### 3.2. Comparación de efectividad de fracciones de *A. cornigera*

De acuerdo al mayor porcentaje de mortalidad y la CL<sub>50</sub> se seleccionó el extracto metanólico de raíz de *A. cornigera* para continuar con el fraccionamiento biodirigido. Entre las tres fracciones obtenidas del extracto metanólico, únicamente la fracción M2b mostró actividad contra larvas. Esta fracción se fraccionó nuevamente en gel de sílice y se obtuvieron cinco fracciones nuevas: M2b1, M2b2, M2b3, M2b4 y M2b5 (Tabla 2).

**Table 2. Mean ( $\pm$  standard error) of the percent mortality of *R. microplus* larvae treated with fractions of the methanol extract of *A. cornigera*-Root.**

**Tabla 2. Media ( $\pm$  error estándar) del porcentaje de mortalidad de larvas de *R. microplus* tratadas con fracciones del extracto metanólico de *A. cornigera*-Raíz.**

Fracción / Tratamiento	Mortalidad de larvas	
	5 mg/mL	1 mg/mL
M2b1	97.1 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>	88.3 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>
Amitraz	93.0 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	90.0 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>
M2b5	90.7 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	55.0 $\pm$ 10.4 <sup>bc</sup>
M2b4	90 $\pm$ 5.12 <sup>a</sup>	59.0 $\pm$ 9.3 <sup>abc</sup>
M2b3	82.9 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	NE
M2b2	78.6 $\pm$ 6.1 <sup>a</sup>	NE
Control negativo	35.0 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>	34.0 $\pm$ 6.2 <sup>c</sup>

Medias con letras repetidas en la misma columna no son significativamente diferentes (Prueba de Tukey; P > 0.05); NE: No evaluado. Control negativo: Agua destilada/tween 20 (98/2 v:v).

La mayor actividad a concentración de 5 mg/mL se observó en la primera fracción (M2b1), la cual produjo 97 % de mortalidad en larvas de *R. microplus*, seguida de las



fracciones M2b4 y M2b5, las cuales causaron entre 90 a 93 % de mortalidad (Tabla 2). A concentración de 1 mg/mL, la fracción M2b1 causó significativamente mayor mortalidad (88 %) que el resto de las fracciones (Tabla 2).

### 3.3. Perfil cromatográfico de la fracción M2b1

El cromatograma de líquidos de la fracción M2b1 mostró claramente un pico mayoritario a un tiempo de retención ( $T_R$ ) de 0.49 min, con un ion molecular a  $m/z$  342.1163 de fórmula molecular  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (calculado para  $C_{12}H_{23}O_{11}^+$ , 343.1236), identificado por su espectro de masas como sacarosa. En menor proporción se observó un pico a un  $T_R$  de 1.62 min, con ion molecular a  $m/z$  448.1006 correspondiente a una mezcla, donde se detectó un flavonoide glicosilado denominado ramnósido de O-quercetina (calculado para  $C_{21}H_{21}O_{11}$ , 449.1079), conocido como quercitrina. Así como dos componentes no identificados de fórmula molecular  $C_{24}H_{45}NO_7$  y  $C_{18}H_{38}O_7$  (Tabla 3).

**Table 3. Metabolites detected in the fraction M2b1 of the extract *A. cornigera*-Root by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry.**  
**Tabla 3. Metabolitos detectados en la fracción M2b1 del extracto *A. cornigera*-Raíz mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.**

$T_R$ min	Peso molecular $[M + H]^+$ ( $m/z$ )		Fórmula molecular	Compuesto
	Experimental	Teórico		
0.49	343.1236	343.2890	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sacarosa
1.62	449.1079	449.3707	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Quercitrina
2.46	460.3270	460.5937	$C_{24}H_{45}NO_7$	NI
2.77	367.2694	367.4719	$C_{18}H_{38}O_7$	NI

$T_R$ : Tiempo de retención. NI: No identificado.

## 4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó que los extractos metanólicos de *A. farnesiana* y *A. cornigera* tienen diferentes grados de toxicidad sobre larvas de *R. microplus*. En particular sobresalió el efecto del extracto metanólico de *A. cornigera*-Raíz. El análisis de concentración letal media de los extractos más activos mostró que el extracto metanólico de *A. cornigera*-Raíz tuvo un valor de  $CL_{50}$  de 2.12 mg/mL en larvas de *R. microplus*. Lo anterior resalta los efectos particulares del extracto metanólico de *A. cornigera*-Raíz sobre *R. microplus*. En otros estudios los extractos orgánicos de especies de *Acacia* han mostrado efectos variados. Chungsamarnyart *et al.* (1991) observó que los extractos etanólicos de las hojas de *A. farnesiana* y *A. harmandiana* no tuvieron actividad (9.3 y 2.4 %, respectivamente) contra larvas de *R. microplus*. Por el contrario, Fernández-Salas *et al.* (2011) observaron que los extractos de hoja de *A. pennatula* causaron 54 % de mortalidad en larvas de garrapata. La actividad acaricida de extractos de raíz de *A. cornigera* no ha sido reportada previamente. Sin embargo, con base en los resultados del presente estudio, se considera que este extracto tiene alta toxicidad si se compara con extractos metanólicos de otras especies vegetales,

donde se ha reportado alta toxicidad. Usando concentraciones más altas que las usadas en este trabajo, Godara *et al.* (2018) reportaron ente 45 a 88 % de mortalidad de *R. microplus* por efecto de extracto metanólico de frutos de *Piper longum* a concentraciones de 25 a 50 mg/mL. Rosado-Aguilar *et al.* (2010) observaron que el extracto metanólico de hojas y raíces de *Allium sativum* and *Cannabis sativa* causó 100 % de mortalidad pero a concentraciones de 20 y 40 mg/mL. Otros estudios, muestran alta actividad de algunos extractos metanólicos usando un rango de concentraciones similares a las usadas en el presente estudio. Por ejemplo, observaron 100 % de mortalidad de *R. microplus* por efecto de extractos metanólicos de *Acmella oleracea* a concentraciones de 3.1 a 12.5 mg/mL. Marchesini *et al.* (2020) observaron que todas las fracciones derivadas de extractos metanólicos de hojas y tallos de *Acmella oleracea* (Asteraceae) causaron 100 % de mortalidad en larvas de *R. microplus* a concentraciones de 3.1 mg/mL. Con base en los datos de mortalidad de *R. microplus* y las concentraciones usadas en otros estudios, se considera que en el presente trabajo, los extractos metanólicos de *A. cornigera*-Raíz estarían posicionados como un extracto de alta actividad a concentraciones relativamente bajas.

El fraccionamiento del extracto de *A. cornigera*-Raíz reveló que los metabolitos activos se encuentran en la fracción M2b1, que a concentración de 1 mg/mL causó la más alta mortalidad en larvas, lo que sugiere que en esa fracción se encuentran los compuestos con mayor actividad acaricida. Otros estudios usando fracciones y subfracciones de extractos orgánicos muestran actividad en concentraciones más altas (5 a 50 mg mL<sup>-1</sup>), como lo indica Souza *et al.* (2017) con fracciones de extractos orgánicos de *Ocotea aciphylla* y Dantas *et al.*, (2016) con extracto orgánico de *Amburana cearensis*.

En el presente estudio, el fraccionamiento guiado permitió detectar a la fracción M2b1 como la de mayor actividad, la cual presenta en su cromatograma de líquidos solo cuatro componentes a una longitud de onda de 210 nm. Los componentes identificados correspondieron a la sacarosa y la quercitrina. En literatura no se ha reportado la actividad de estos compuestos contra *R. microplus*. La quercitrina es un metabolito secundario encontrado en varios órganos de especies del género *Acacia*, incluyendo flores y brotes de *A. confusa* (Tung *et al.*, 2011), hojas de *A. mearnsii* (MacKenzie, 1969) y hojas y corteza de *A. saligna* (El Sissi & El Sherbeiny, 1967). La quercitrina también se encuentra como metabolito secundario en especies de otras familias botánicas, donde se ha registrado su actividad nematicida (Abdel Bar *et al.*, 2018). Es importante mencionar que la aglicona de la quercitrina exhibe amplio rango de propiedades biológicas, incluyendo inhibición de enzimas y actividad antimicrobiana (Li *et al.*, 2016). Por otra parte, los componentes no identificados presentes en la fracción M2b1, con fórmula molecular sugerida de C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub> y C<sub>24</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>7</sub>, indican que estos compuestos polares poseen grupos hidroxilados. El segundo compuesto enlistado es de tipo alcaloidal.

Hasta el momento no existe un estudio detallado sobre la actividad acaricida de los metabolitos de raíz de *A. cornigera*. Diversos estudios del género *Acacia* señalan que las especies de este género producen una amplia gama de metabolitos secundarios, dentro de los que se encuentran los flavonoides, terpenoides, fitoesteroles, glicósidos cianogénicos, taninos condensados y gomas polisacáridas; en menor proporción se han reportado aminas, alcaloides, ciclitoles, ácidos grasos y aminoácidos no proteícos (Seigler, 2003; Subhan *et al.*, 2018; Jaeger *et al.*, 2019).

La mayor actividad del extracto completo comparado con la actividad producida por las fracciones, sugieren un efecto sinergista para M2b4 y M2b5 con otros componentes minoritarios o mayoritarios. Se requieren futuras investigaciones para aislar e identificar otros metabolitos con propiedades ixodícidas producidos por *A. cornigera*.

En conclusión, los extractos metanólicos de *A. farnesiana* y *A. cornigera* causaron diferentes grados de toxicidad en larvas de garrapatas *R. microplus*. Los extractos metanólicos de tallo y raíz de *A. cornigera* y tallo de *A. farnesiana* mostraron la más alta actividad ixodícida. Del extracto metanólico de raíz de *A. cornigera* se obtuvo la fracción M2b1, misma que tuvo alta actividad y presencia de varios metabolitos, entre ellos sacarosa y quercitrina. La quercitrina podría ser uno de los metabolitos responsables del efecto de los extractos metanólicos de la raíz de *A. cornigera* en larvas de *R. microplus*. Este es el primer reporte de la actividad larvicida del extracto y las fracciones de *A. cornigera* (raíz), por lo que representa una línea promisoriosa de estudio para el desarrollo de productos naturales para el manejo sustentable de la garrapata *R. microplus* en su etapa larval.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico en el proceso de fraccionamiento cromatográfico a I. L. Medina Baizabal (CICY) y la asistencia en los LC-HRMS a J. Martín (Fundación MEDINA).

Se hace un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero durante los estudios del programa de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical (MCPAT- UNACH).

## REFERENCIAS

Abdel Bar, F. M., Ibrahim, D. S., Gedara, S. R., Abdel-Raziq, M. S., & Zaghloul, A. M. 2018. Nematicidal compounds from the leaves of *Schinus terebinthifolius* against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting tomato. *Natural Product Sciences*. 24(4): 272-283. <https://doi.org/10.20307/nps.2018.24.4.272>

Aguilar-Tipacamú G. & Rodríguez-Vivas R.I. 2003. Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina. Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 111: 211-216. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00355-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00355-2)

Banumathi B., Vaseeharan B., Rajasekar P., Prabhu N.M., Ramasamy P., Murugan K., Canale A. & Benelli G. 2017. Exploitation of chemical, herbal and nano formulated acaricides to control cattle ticks. *Veterinary Parasitology*. 244: 102-110. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.021>

Borges L.M. F., Sousa L.A.D., & Barbosa C.S. 2011. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria. 20(2): 89–96. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612011000200001>

Chagas A.C.S., Leite R.C., Furlong J.P., Hélio T. & Passos W.M. 2003. Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. Ciência Rural. 33(1): 109-114. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000100017>

Chaubal R., Pawar P.V., Hebbalkar G.D., Tungikar V.B., Puranik V.G., Deshpande V.H. & Deshpande N.R. 2005. Larvicidal activity of *Acacia nilotica* extracts and isolation of D-Pinitol a bioactive carbohydrate. Chemistry & Biodiversity. 2(5): 648-688. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200590044>

Chungsamarnyart N., Jiwajinda S. & Jansawan W. (1991). Acaricidal effect of plant crude extracts on tropical cattle ticks (*Boophilus microplus*). Kasetsart Journal (Nature Science Supplement), 25: 90-100

Cruz P.B., Barbosa A.F., Zeringóta V., Melo D., Novato T., Fidelis Q.C., Fabri R.L., de Carvalho M.G., Oliveira Sabaa-Srur A.U., Daemon E. & Monteiro C.M.O. 2016. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology. 228: 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.026>

Dantas A.C.S., Araujo A.C., Pacheco A.G.M., Branco A., Sangioni L.A., Almeida J.R.G., & Horta M.C. 2016. Acaricidal activity of *Amburana cearensis* on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ciência Rural. 46(3): 536-54. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150334>

El Sissi H.I., & El Sherbeiny A.E.A. 1967. The flavanoid components of the leaves of *Acacia saligna*. Plant Food Human Nutrition. 14(3): 257-266. <https://doi.org/10.1007/BF02419928>

FAO. 2004. Module 1. Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. In: Guideline resistance management and integrated parasite control in ruminants. Animal Production and Health Division. Agriculture Department. Roma, Italia pp 25-77. Disponible en, <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf>. (Consultado Mayo 31, 2020)

Fernández-Salas A., Alonso-Díaz M.A., Acosta-Rodríguez R., Torres-Acosta J.F., Sandoval-Castro C.A. & Rodríguez-Vivas R.I. 2011. *In vitro* acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology. 175 (1-2): 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.016>

Ferreira-Borges L.M., Dias de Sousa L.A., da Silva Barbosa C. 2011. Perspectives for the use of plant extracts to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. The Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 20(2): 89-96.

Godara R., Verma M.K., Katoch R. Yadav A., Dutt P., Satti N.K. Katoch M. 2018. *In vitro* acaricidal activity of *Piper nigrum* and *Piper longum* fruit extracts and their active components against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. Experimental and Applied Acarology. 75: 333–343. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0268-53>

Jæger D., O’Leary M.C., Weinstein P., Møller B.L., & Semple S.J. 2019. Phytochemistry and bioactivity of *Acacia sensu stricto* (Fabaceae: Mimosoideae). Phytochemistry Reviews. 18(1): 129-172 <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9583-z>

Li Y., Yao J., Han C., Yang J., Chaudhry M.T., Wang S., Liu H., & Yin Y. 2016. Quercetin, Inflammation and Immunity. Nutrients. 8(3): 167. <https://doi.org/10.3390/nu8030167>

Marchesinia P., Barbosa P.F., Gomes-Sanches M.N., Moreira do Nascimento R., Vale F.L., Fabri R.L., Maturano R., Geraldo de Carvalhod M., Monteiro C. 2020. Acaricidal activity of *Acmella oleracea* (Asteraceae) extract against *Rhipicephalus microplus*: What is the influence of spilanthol? Veterinary Parasitology. 283: 109170

MacKenzie A.M. 1969. The flavonoids of the leaves of *Acacia mearnsii*. Phytochemistry. 8(9): 1813-1815. [doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85974-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85974-9)

Malviya S., Rawat S., Kharia A. & Verma M. 2011. Medicinal attributes of *Acacia nilotica* Linn. A comprehensive review on ethnopharmacological claims. International Journal of Pharmacy & Life Sciences. 2: 830-837. Disponible en <http://www.ijplsjournal.com/issues%20PDF%20files/june%202011/9.pdf>

Martín J., Crespo G., González-Menéndez V., Pérez-Moreno G., Sánchez-Carrasco P. & Pérez-Victoria I., Ruiz-Pérez L. M., González-Packanowska D., Vicente F., Genilloud O., Bills G. F., & Reyes F. 2014. MDN-0104, an antiplasmodial betaine lipid from *Heterospora chenopodii*. Journal of Natural Products. 77(9):, 2118-2123 <https://doi.org/10.1021/np500577v>

Maslin B.R., Miller J.T. & Seigler D.S. 2003. Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). Australian Systematic Botany. 16(1): 1-18. <http://dx.doi.org/10.1071/SB02008>

Miller R.J., Almazán C., Ortiz-Estrada M., Davey R.B., George J.E. & De León A.P. 2012. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of Mexico. Veterinary Parasitology. 191(1-2): 97-101 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.011>

Nguyen B.C.Q., Chompoo J. & Tawata S. 2015. Insecticidal and Nematicidal Activities of Novel Mimosine. Molecules. 20: 16741-16756. Disponible en <http://dx.doi.org/10.3390/molecules200916741>

Olivo C.J., Heimerdinger A., Ziech M.F., Agnolin C.A., Meinerz G.R., Both F. & Charao P.S. 2009. Extrato acuoso de fumo em corda no controle do garrapato de bovinos. *Ciência Rural*. 39(4): 1131-1135. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009000400026>

Pangnakorn U. & Chuenchooklin S. 2018. Evaluation of essential oils against *Sitophilus zeamais* (Motshulsky) (Coleoptera: Curculionidae). *Advancement in Medicinal Plant Research*. 6(2): 19–25. <https://doi.org/10.30918/AMPR.62.18.013>

Pérez-Pacheco R., Rodríguez-Hernández C., Lara-Reyna J., Montes-Belmont R. & Ramírez-Valverde G. 2004. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta zoológica mexicana*. 20(1): 141-152. Recuperado en 31 de mayo de 2020, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0065-17372004000100012&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372004000100012&lng=es&tlng=es).

Perez-Cogollo L.C., Rodriguez-Vivas R.I., Ramirez-Cruz G.T., & Miller R.J. 2010. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology*. 168(1-2): 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.021>

Ribeiro S.V.L., Toigo E., Bordignon S.A.L., Gonçalves K. & Von Poser G. 2007. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*. 147(1-2): 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.027>

Rodríguez-Vivas R.I., Mata-Mendez Y., Pérez-Gutierrez E. & Wagner G. 2004. The Effect of Management Factors on the Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican Tropics. *Tropical Animal Health and Production*. 36: 135–143. <https://doi.org/10.1023/B:TROP.0000012105.19518.80>

Rodríguez-Vivas R.I., Rivas A.L., Chowell G., Fragoso S.H., Rosario C.R., García Z., Smith S.D., Williams J.J., & Schwager S.J. 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Veterinary parasitology*. 146(1-2): 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.01.016>

Rodríguez-Vivas R.I., Arieta-Román R.J., Pérez-Cogollo L.C., Rosado-Aguilar J.A., Ramírez-Cruz G.T. & Basto-Estrella G. 2010. Use of macrocyclic lactones to control the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 42(3): 115-123. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000300002>

Rosado-Aguilar J.A., Aguilar-Caballero A.J., Rodríguez-Vivas R.I., Borges-Argaez R., García-Vázquez Z. & Méndez-González M. 2010. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology*. 168(3-4): 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.022>

Seigler D.S. 2003. Phytochemistry of *Acacia*-sensu lato. *Biochemical Systematic and Ecology*. 31(8): 845–873. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00082-6](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00082-6)

Soberanes C.N., Santamaría V.M., Fragoso S.H. & García V.Z. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Técnica Pecuaria en México*. 40(1):81-92. [fecha de Consulta 31 de Mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=613/61340106>

Souza Conceição R., de A Carneiro M.M., Alves Reis I.M., Branco A., Curcino Vieira I. J., Braz-Filho R., & Borges Botura M. 2017. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 8(2): 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.013>

Subhan N., Burrows G.E., Kerr P., & Obied H.K. 2018. Chapter 9: Phytochemistry, Ethnomedicine, and Pharmacology of *Acacia*. In Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. 57: 247-326. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00009-0>.

Tung Y.T., Chang W.C., Chen P.S., Chang T.C., & Chang S.T. 2011. Ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Acacia confusa* flowers and buds. *Journal of Separation Science*. 34(7): 844–851. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000820>

Zahir A.A., Rahuman A.A., Kamaraj C., Bagavan A., Elango G., Sangaran A. & Kumar B.S. 2009. Laboratory determination of efficacy of indigenous plant extracts for parasites control. *Parasitology Research*. 105(2): 453–461. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1405-1>

Zhang X., Zhang K., Wang Y. & Ma R. 2020. “Effects of Myricitrin and Relevant Molecular Mechanisms”, *Current Stem Cell Research & Therapy*. 15: 11. <https://doi.org/10.2174/1574888X14666181126103338>