



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

EVALUACIÓN *in vitro* DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE CUATRO
PLANTAS CONTRA HUEVOS, LARVAS INFECTANTES E
HISTIOTRÓPICAS DE *Haemonchus contortus*

GABRIELA JASSO DÍAZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017


CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe GABRIELA JASSO DÍAZ, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partcipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor GLAFIRO TORRES HERNÁNDEZ, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

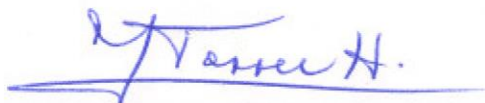
EVALUACIÓN IN VITRO DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE CUATRO PLANTAS CONTRA HUEVOS, LARVAS INFECTANTES E HISTIOTRÓPICAS DE HAEMONCHUS CONTORTUS

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 13 de JULIO de 2017



Firma del
Alumno (a)

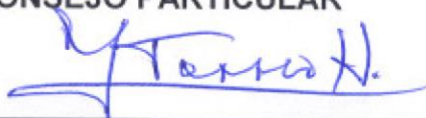


Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: “Evaluación *in vitro* de extractos orgánicos de cuatro plantas contra huevos y larvas infectantes e histiotrópicas de *Haemonchus contortus*”, realizada por la alumna **Gabriela Jasso Díaz**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD GANADERÍA
CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO



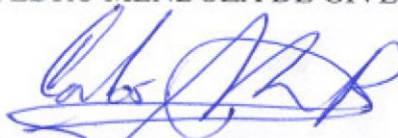
DR. GLAFIRO TORRES HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS



DR. PEDRO MENDOZA DE GIVES

ASESOR



DR. CARLOS MIGUEL BECERRIL PÉREZ

ASESOR



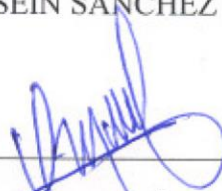
DR. J. EFRÉN RAMÍREZ BRIBIEZCA

ASESOR



DR. HUSSEIN SÁNCHEZ ARROYO

ASESOR



DR. OMAR HERNÁNDEZ MENDO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio 2017

EVALUACIÓN *in vitro* DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE CUATRO PLANTAS CONTRA HUEVOS, LARVAS INFECTANTES E HISTIOTRÓPICAS DE *Haemonchus contortus*

GABRIELA JASSO DÍAZ, Dra.
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2017

RESUMEN

La finalidad de la presente investigación fue evaluar la actividad nematocida *in vitro* de extractos acuosos y metanólicos de *Argemone mexicana* (Chicalote), *Taraxacum officinale* (Diente de león), *Tagetes filifolia* (Anís) y *Ruta chalepensis* (Ruda) contra larvas infectantes y huevos del nematodo *Haemonchus contortus*. Las plantas se colectaron en época de floración y fueron identificadas por género y especie. El material vegetal seco y molido se sometió a extracción de sus componentes metabólicos mediante maceración en metanol seguida de maceración en agua destilada. Los extractos se concentraron en un evaporador rotatorio a 50 y 46°C, 90 rpm y vacío constante, posteriormente se liofilizaron y almacenaron a -20°C. Los productos liofilizados se evaluaron *in vitro* contra huevos, larvas infectantes e histiotrópicos de *Haemonchus contortus*. En el primer experimento, los resultados mostraron que el extracto metanólico de *Tagetes filifolia* provoca el 89% de mortalidad de larvas infectantes a 200 mg/mL e inhibe el 100% la eclosión de larvas con 10 mg/mL. Se realizó un fraccionamiento biodirigido, ensayos de cromatografía líquida de alta resolución y resonancia magnética nuclear de la fracción activa, en estos estudios se logró identificar al ácido clogénico como la molécula responsable de la actividad contra huevos y larvas del nematodo con una CL50 de 400 µg/mL.

En el segundo experimento, el extracto acuoso de *Ruta chalepensis* provocó la muerte al 74% de larvas infectantes con 200 mg/mL y 100% de inhibición de la eclosión con 10 y 20 mg/mL. Se realizó una partición con acetato de etilo y se evaluaron cada una de las fases obtenidas, la fase acuosa mostró una actividad inversa a la concentración, causando solamente un 20% de inhibición de la eclosión con 20 mg/mL. Por el contrario la fase de acetato de etilo inhibió 100% de la eclosión en todas las concentraciones de 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/mL. La fase de acetato de etilo se sometió

a fraccionamiento en columna cromatográfica de sílica gel, se evaluaron 5 fracciones, de las cuales AEC1F4 y AEC1F5 inhibieron la eclosión en un 100% en todas las concentraciones de 2000, 1000, 500 y 250 µg/mL, dados los resultados obtenidos en las placas cromatograficas, se cree que los metabolitos presentes en las fracciones activas, pertenecen al grupo de las cumarinas. Es necesario analizar las muestras mediante de gases masas para identificar las moléculas presentes cada una de las fracciones y responsables de la actividad antihelmíntica.

En el tercer ensayo realizado, se evaluaron los extractos metanólicos de las cuatro plantas bajo estudio contra larvas histiotrópicas de *Haemonchus contortus*. Los extractos metanólicos de *Tagetes filifolia* y *Ruta chalepensis* causaron 82 y 88% de mortalidad de larvas histiotrópicas respectivamente, utilizando 200 mg/mL y tras 48 h de confrontación. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos de plantas poseen propiedades antihelmínticas, particularmente el extracto metanólico de *Tagetes filifolia* en el cual se identificó la presencia ácido clorogénico, como principal responsable de la actividad antihelmíntica. La partición de acetato de etilo (AcO) del extracto acuoso de *Ruta chalepensis* presenta dos fracciones con actividad nematocida. Es importante realizar estudios para identificar a las moléculas responsables de la actividad y evaluar los metabolitos en mamíferos para descartar la posibilidad de presentar efectos secundarios debido al consumo de dichos productos.

Palabras clave: *Haemonchus contortus*, larvas infectantes, larvas histiotrópicas, extractos orgánicos, fraccionamiento biodirigido

ASSESSING THE IN VITRO ACTIVITY OF FOUR PLANT ORGANIC EXTRACTS AGAINST HAEMONCHUS CONTORTUS EGGS AND INFECTIVE AND HISTIOTROPHIC LARVAE

GABRIELA JASSO DÍAZ
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2017

ABSTRACT

This research was aimed to assess the in vitro nematocidal activity of aqueous and methanolic extracts of the plants *Argemone mexicana* (Chicalote), *Taraxacum officinale* (Diente de Leon), *Tagetes filifolia* (Anís) and *Ruta chalepensis* (Ruda) against *Haemonchus contortus* eggs and infective and histotrophic larvae. Plants were collected during flowering and they were identified to obtain their genera and species. Plant material was dried and grinded and the extracts were obtained through the methanolic maceration process followed by maceration in distilled water. The extracts were concentrated using a rotatory evaporator at 50 and 46°C, 90 rpm and continuous vacuum and eventually lyophilized and kept at -20°C. Lyophilized extracts were in vitro evaluated against *H. contortus* eggs as well as against infective and histotrophic larvae. In a first experiment, the results showed that *T. filifolia* methanolic extract caused 89% mortality of infective larvae at 200 mg/mL. Likewise, this extract caused 100% egg hatching inhibition (EHI) at 10 mg/mL. Derived from these results, a bio-directed fractioning was performed were the high performance liquid chromatography and the nuclear magnetic resonance of the active fraction revealed the presence of chlorogenic acid as the molecule responsible of the nematocidal activity against eggs of the nematode with a $CL_{50}=400 \mu\text{g/mL}$.

In a second experiment, the *Ruta chalepensis* aqueous extract caused 74% larval mortality at 200 mg/mL; meanwhile, at 10 and 20 mg/mL caused 100% EHI. Based on these results, an Ethyl acetate partition was performed and each of the phases obtained were evaluated; where the aqueous phase showed a nematocidal activity inversely proportional to the concentration and only 20% EHI was obtained at 20 mg/mL. In contrast, the Ethyl acetate phase caused 100% EHI at all assessed concentrations

(1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/mL). From this experiment, The Ethyl acetate phase was fractioned using a silica gel column chromatography where five fractions were evaluated. From these fractions, AEC1F4 and AEC1F5 fractions caused 100% EHI at the whole assessed concentrations (2000, 1000, 500 and 250 µg/mL). From the results observed in the thin layer chromatography about the active fractions is thinking that, the active molecule corresponds to a group of the coumarins, it is necessary to analyze the samples to by Gas chromatography and mass spectrometry to identify the molecules present in each of the fractions responsible for the nematocidal activity.

In the third assay, the methanolic extracts of the four plants were assessed against histotrophic larvae of the parasite. The *T. filifolia* and *R. chalepensis* methanolic extracts caused 82 and 88% larval mortality, respectively at 200 mg/mL after 48 hours confrontation. The secondary metabolites present in the plant extracts possess nematocidal properties, particularly the *T. filifolia* methanolic extract in which chlorogenic acid was identified as the main compound responsible of the nematocidal activity. The Ethyl acetate partition of the *R. chalepensis* aqueous extract possesses two nematocidal fractions. These fractions will be considered for future studies focussed to identify the bioactive compounds present in each of them and evaluate if can cause secondary effects in mammals.

Keywords: *Haemonchus contortus*, infective larvae, histotrophic larvae, organic extracts, bio-directed fractioning

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirme con salud para alcanzar mis metas.

Al CONACyT por la beca (N° 335545) otorgada para realizar los estudios de doctorado

A mi director de Tesis el Dr. Pedro Mendoza de Gives por su apoyo para la realización de mi trabajo de investigación y la escritura de documentos.

A mi consejero el Dr. Glafiro Torres Hernández por su apoyo para mi formación académica y trámites administrativos.

A todo mi consejo particular: Dr. Carlos Becerril Pérez, Efrén Ramírez Bribiesca, Husein Sánchez Arroyo y Omar Hernández Mendo, por sus consejos para mi formación doctoral.

Al CENID Parasitología-Veterinaria, INIFAP, por abrirme sus puertas para la realización de mi trabajo de investigación y en especial a la Doctora María Eugenia López Arellano. Al biólogo Gabriel Vargas.

Al CIBIS IMSS Xochitepec, especialmente al Dr. Manases Gonzales Cortazar y al Dr. Alejandro Zamilpa por su apoyo durante el desarrollo de la investigación.

DEDICATORIA

A mi hijo Luis Ángel Hernández Jasso, que es mi motor para ser mejor cada día.

A mis padres la Sra. M^a de los Ángeles Díaz Díaz y el Sr. Rubén Jasso Jasso por ser los mejores padres y por apoyarme en todas mis decisiones.

A todos mis hermanos Viky, Rosy, Toño, Luis, Martín, Elisa, Rita, Norma, Beto, Rubén y M^a de los Ángeles, los amo muchísimo, gracias por ser mi familia.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	viii
DEDICATORIA	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE CUADROS.....	xv
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La ovinocultura en México.....	2
1.2 Principales razas ovinas en México.....	3
1.3. Principales problemas de la producción ovina.....	3
1.3.1 Nematodos gastrointestinales.....	3
1.4 Características de los nematodos gastrointestinales.....	3
1.4.1 Familia Trichostrongylidae.....	3
1.4.2 <i>Haemonchus contortus</i> (Posición Taxonómica).....	4
1.4.3 Patogénesis.....	5
1.4.4 Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales.....	7
1.5 Impacto económico de las parasitosis gastrointestinales en la producción ovina.....	9
1.6 Métodos de control de las parasitosis gastrointestinales.....	9
1.6.1 Quimioterapia.....	9
1.7 Consecuencias del mal uso de productos químicos para el control de NGI.....	10
1.7.1 Resistencia parasitaria a los antihelmínticos.....	10
1.7.2 Daños al ambiente.....	11
1.8 Nuevas tendencias para el control de NGI.....	12
1.8.1 Selección genética de animales resistentes a NGI.....	12
1.8.2 Vacunas e inmunización con larvas infectantes.....	14
1.8.3 Control biológico.....	14
1.8.4 Suplementación proteínica.....	16
1.8.5 Herbolaria.....	16
1.10 <i>Argemone mexicana</i> (Chicalote).....	23

1.11 <i>Taraxacum officinale</i>	23
1.12 <i>Tagetes filifolia</i>	24
1.13 <i>Ruta chalepensis L.</i>	25
OBJETIVO GENERAL	28
HIPOTESIS GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
CAPITULO II	30
<i>In vitro</i> assessment of <i>Argemone mexicana</i> , <i>Taraxacum officinale</i> , <i>Ruta chalepensis</i> and <i>Tagetes filifolia</i> against <i>Haemonchus contortus</i> nematode eggs and infective (L ₃) larvae.....	30
Graphical Abstract.....	31
ABSTRACT	32
RESUMEN	33
2 INTRODUCTION	34
2.1 MATERIALS AND METHODS	35
2.1.1 Location.....	35
2.1.2 Plant material	35
2.1.3 Extraction procedure.....	35
2.1.4 Selection of the extract with the highest anthelmintic bioactivity	35
2.1.5 Bio-guided fractionation of the methanol extract from <i>T. filifolia</i>	36
2.1.6 Phytochemical identification	36
2.1.7. Thin layer chromatography analysis of fractions obtained.....	36
2.1.8 High Performance Liquid Chromatography analysis of fractions	37
2.1.9 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy analysis	37
2.1.10 Parasitological techniques	37
2.1.11 <i>Haemonchus contortus</i> infective larvae (L ₃) and eggs obtaining.....	37
2.1.12 Assessing lethal activity of methanolic extract of plants against <i>H. contortus</i> infective larvae (L ₃).....	37
2.1.13 Egg hatching inhibition assay	38
2.2 Statistical analysis	38

2.3 RESULTS	39
2.3.1 Methanol plant extracts yield and <i>Haemonchus contortus</i> larval mortality by effect of organic extracts	39
2.3.2 Egg hatching inhibition test	39
2.3.3 <i>Tagetes filifolia</i> fractions activity against <i>Haemonchus contortus</i> (L3) and egg hatching inhibition.	39
2.3.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses	40
2.3.5 <i>Haemonchus contortus</i> egg hatching inhibition attributed to quercetagitrin, methyl-chlorogenate and chlorogenic acid (sigma®)	40
2.3.6 Chemical characterization of metabolites obtained from <i>Tagetes filifolia</i> methanolic extract	40
2.3.7. Quercetagitrin	40
2.3.8 Methyl-chlorogenate	41
2.4 DISCUSSION	41
2.5 CONCLUSIONS	42
CAPITULO III	54
ABSTRACT	55
RESUMEN	56
3.1 INTRODUCCIÓN	57
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.2.1 Localización	58
3.2.2 Material vegetal	58
3.2.3 Método de extracción	58
3.2.4 Partición fitoquímica del extracto acuoso usando Acetato de Etilo	58
3.2.5 Cromatografía en capa fina	59
3.2.6 Técnicas Parasitológicas	59
3.2.6.1 Obtención de larvas infectantes y huevos de <i>Haemonchus contortus</i>	59
3.2.6.2 Actividad letal del extracto acuoso integro de <i>R. chalepensis</i> contra larvas infectantes (L3) de <i>H. contortus</i>	60

3.2.6.3 Inhibición de la eclosión provocada por el extracto íntegro, la fase acuosa y orgánica de <i>R. chalepensis</i>	60
3.3. Análisis estadístico	61
3.4 RESULTADOS.....	61
3.5 DISCUSIÓN	63
3.6 CONCLUSIÓN	64
CAPITULO IV	65
Actividad Nematicida <i>in vitro</i> de extractos metanólicos de plantas Mexicanas contra larvas del cuarto estadio de <i>Haemonchus contortus</i>	65
ABSTRACT	66
RESUMEN	67
4.1 INTRODUCCIÓN	68
4.2 MATERIALES Y METODOS.....	69
4.2.1 Localización	69
4.2.2 Material vegetal	69
4.2.3 Método de extracción	69
4.2.4 Obtención de larvas histiotrópicas de <i>H. contortus</i>	70
4.2.5 Evaluación de la actividad letal del extracto metanólico de plantas contra huevos y larvas infectantes (L ₃) de <i>H. contortus</i>	70
4.3 RESULTADOS.....	71
4.4 DISCUSIÓN	71
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN	74
LITERATURA CITADA.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Distribución de ganado ovino en México (SIAP, 2012)	2
Figura 2- Fotografía de un abomaso con gusanos adultos de <i>Haemonchus contortus</i> , tomada de (Alunda et al., 2013).	6
Figura 3. Fotografías de los caracteres fenotípicos de la hembra (A) y el macho (B) de <i>Haemonchus contortus</i> , (tomada de Saminathan et al., 2015).....	6
Figura 4.- Ciclo de vida de los nematodos gastrointestinales.....	8
Figura 5 Escarabajo pelotero, degradador de materia orgánica afectado por residuos de antihelmínticos químicos, tomada de https://www.ecured.cu/Escarabajo_pelotero	13
Figura 6. Ovejas Blackbelly una de las razas más resistentes a parásitos gastrointestinales.....	13
Figura 7. Larva de nematodo atrapada por los anillos adhesivos de <i>Arthrobotrys</i> sp. Tomada de Mendoza de Gives, (2011).	15
Figura 8 (a-e) <i>Lasioseius penicilliger</i> depredando larvas infectantes de <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> , tomado de Aguilar-Marcelino, (2012).....	16
Figura 9 9a) <i>Argemone mexicana</i> , 9b) <i>Taraxacum officinale</i> , 9c) <i>Tagetes filifolia</i> , 9d) <i>Ruta chalepensis</i>	27
Figura 10. HPLC Chromatogram of methanolic extract of <i>Tagetes filifolia</i> (ME) ,fraction TF10, fraction Tf11, Quercetagitrin (1), Chlorogenic acid mix: Chlorogenic acid, Methyl-chlorogenate (C2F6) and chlorogenic acid (3) (sigma®).....	52
Figura 11. Molecular structure of <i>Tagetes filifolia</i> methanolic extract compounds: Figure 11A corresponds to Quercetagitrin (Compound 1); Figure 11B corresponds to Chlorogenic acid (Compound 2). Note: When R= COOH, means that is a chlorogenate acid molecule; when R= COOCH ₃ means that the molecule is a Methyl-chlorogenate (Compound 3).	53
Figura 12 Procedimiento para el desarrollo larvario de L ₃ a L ₄	71

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Nematodos gastrointestinales que afectan al ganado ovino y su localización dentro del huésped.	4
Cuadro 2 Plantas evaluadas para probar su actividad antihelmíntica contra parásitos de interés en la ganadería.	18
Cuadro 3 Name, origin, data of collection and voucher code reference of four plants used to obtain methanolic extracts/fractions with potential nematicidal activity against <i>Haemonchus contortus</i> eggs and infective larvae	46
Cuadro 4 <i>In vitro</i> mortality (mean \pm SE, %) of <i>Haemonchus contortus</i> (L ₃) exposed to methanolic extracts obtained from aerial parts of four selected plants.....	47
Cuadro 5 Egg hatching inhibition of <i>Haemonchus contortus</i> , exposed to the action of methanol extracts to four selected plants at different concentrations expressed as means \pm standard error and percentages	48
Cuadro 6 Ovicidal activity of four fractions from the <i>Tagetes filifolia</i> methanolic extract after 48 hours of interaction expressed as means \pm standard error and percentage.	49
Cuadro 7 Ovicidal activity of chlorogenic acid, quercetagitrin and methyl-chlorogenate, compounds obtained from a <i>Tagetes filifolia</i> methanolic extract and ivermectin at different concentrations after 48 hours incubation expressed as means \pm standard error and percentages.....	50
Cuadro 8 ¹ H and ¹³ C NMR date of Quercetagitrin (1, 300 and 75 MHz, CD ₃ OD).....	51
Cuadro 9. Mortalidad larval causada por el extracto acuoso íntegro de <i>Ruta chalepensis</i> (media \pm error estándar, %)	61
Cuadro 10. Inhibición de la eclosión causado por el extracto acuoso íntegro de <i>R. chalepensis</i> (media \pm error estándar, %)	62
Cuadro 11. Inhibición de la eclosión causado por la fase acuosa y orgánica de <i>R. chalepensis</i> (media \pm error estándar, %)	62
Cuadro 12 Mortalidad de larvas histiotrópicas (mean \pm EE, %) de <i>Haemonchus contortus</i> (L ₄) expuestas a extractos metanólicos obtenidos de tallos y hojas de cuatro plantas seleccionadas a las 48 horas de exposición.....	73

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Los pequeños rumiantes contribuyen a la economía de las familias rurales de México, ya que de esta actividad obtienen ingresos, por la venta de leche, carne y lana. La mayor parte del ganado ovino se produce en pastoreo, donde mantiene una relación directa con el medio ambiente (Medina et al., 2014), este tipo de producción facilita la infección por nematodos gastrointestinales (NGI) en los animales jóvenes (Dey et al., 2015), causándoles retraso en el crecimiento, bajas en la producción y muerte de los animales con cargas parasitarias altas (Martínez et al., 2010). El control de los NGI se ha realizado desde la década de los 50's con antihelmínticos químicos, los cuales en sus inicios fueron muy eficaces; sin embargo, pronto comenzaron a observarse problemas debido al uso excesivo de estos productos, como la muerte de microorganismos benéficos como escarabajos degradadores de materia orgánica, y aceleración de selección de individuos resistentes a sus fórmulas activas, en todos los géneros de NGI. El primer reporte de resistencia antihelmíntica en México fue el realizado por Campos et al. (1990). La resistencia antihelmíntica ha sido motivo de muchas investigaciones, todos con el objetivo de disminuir el uso de fármacos. Para lograr esto, se han propuesto diferentes de estrategias de control como vacunas (Alunda et al., 2013), selección genética (Castels, 2010), manejo del pastoreo (Hoste y Torres-Acosta, 2011), agujas de óxido de cobre (Vatta et al., 2012), desparasitación selectiva (técnica FAMACHA) (FAO, 2013), antagonistas naturales (Medina et al., 2014), y el uso de extractos de plantas con potencial antihelmíntico (Dey et al., 2015). Los extractos de plantas son una excelente posibilidad para identificar sustancias activas contra NGI (Alemán et al., 2011), pues se sabe que las plantas producen metabolitos secundarios, entre los que podemos encontrar flavonoides, flavonas, etc, que las protegen de enemigos naturales y a su vez pueden ser aprovechados para el control de nematodos que afectan al ganado (Mendoza de Gives et al., 2012).

1.1 La ovinocultura en México.

El consumo de carne de ovino ocupa el cuarto lugar en México, antecedido por la carne bovina, porcina y de ave y representa el 5% del consumo de cárnicos en el mundo (Carrera-Chávez, 2008). En el año 2011 México contaba con un inventario de 8,219,386 ovinos, ocupando el lugar 37 a nivel mundial. La producción ovina se concentra principalmente en el centro y sur del territorio nacional, siendo el estado de México el primer lugar en producción (Figura 1) (SIAP, 2012). El consumo de carne de ovino, se localiza principalmente en el centro del país (Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Querétaro y Morelos), donde se concentra aproximadamente el 85% del total de carne producida (y consumida) y el resto se produce en los demás estados de la república. Así mismo, se estima que el 90% de la producción total, se consume en forma de barbacoa y sólo el 10% se prepara de otra manera como cordero al pastor, cordero al ataúd, mixiotes, birria de borrego, cordero lechal y cordero como sustituto de cabrito, así como en cortes finos de cordero (Partida et al., 2013).

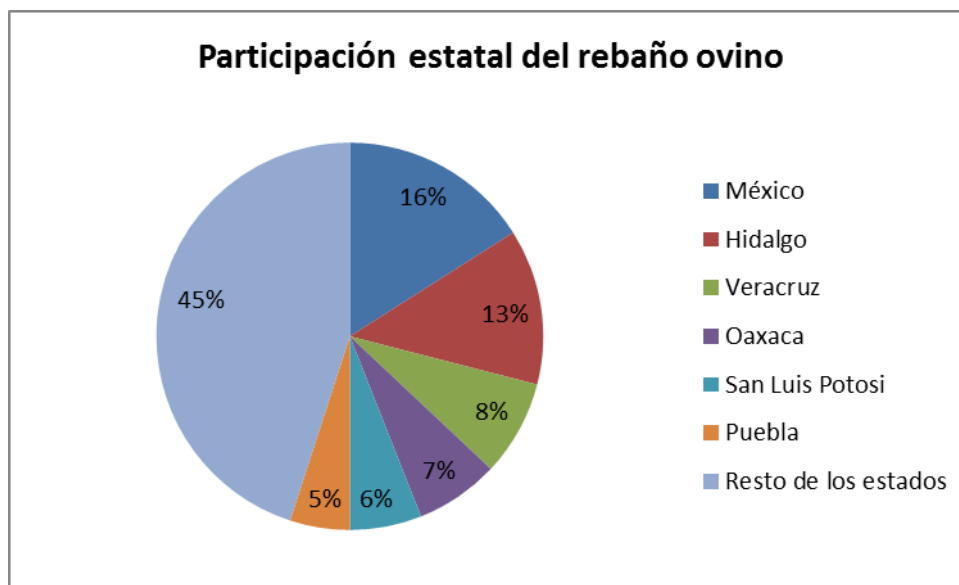


Figura 1.- Distribución de ganado ovino en México (SIAP, 2012)

1.2 Principales razas ovinas en México

De acuerdo con la Unión Nacional de Ovinocultores (UNO), en México se producen ocho razas en forma intensiva (Suffolk, Hampshire, Rambouillet, BlackBelly, Dorset, Dorper, Katahdin y Pelibuey) que componen prácticamente el total de inventario ovino mexicano, pero además existen pequeños núcleos de Saint Croix, Romanov, Texel, East Friesian, Damara, Charollais, Ile de France, Polypay, Columbia y el ovino criollo común (Partida et al., 2013).

1.3. Principales problemas de la producción ovina

1.3.1 Nematodos gastrointestinales

Existen varios géneros y especies de nematodos que afectan a pequeños rumiantes (Cuadro 1) (Morales y Pino, 2001; Sherrill et al., 2006 y Soca et al., 2005) de los cuales *Haemonchus*, *Cooperia*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus* y *Oesophagostomum* son considerados los más importantes desde el punto de vista patológico y epidemiológico por estar distribuidos en diversas regiones geo-ecológicas del planeta (Soca-Pérez, 1998) y afectar principalmente a ovinos jóvenes en desarrollo, causando retraso en su crecimiento (Cuellar-Ordaz, 2009). Las alteraciones pato-fisiológicas que ocasionan los NGI como trastornos en el consumo de alimento, deficiente digestión, síndrome de mala absorción y secreción de metabolitos; dependen del grado de infestación, inmunidad y edad del hospedero, géneros involucrados y el medio ambiente (Medina et al., 2014).

1.4 Características de los nematodos gastrointestinales

Los nematodos son gusanos simétricos bilateralmente, casi de tamaño microscópico con una organización muy compleja que poseen todos los sistemas fisiológicos principales de los animales superiores, excepto el circulatorio y respiratorio.

1.4.1 Familia Trichostrongylidae

Las especies pertenecientes a la familia *Trichostrongylidae* son gusanos redondos, cuyas fases adultas miden entre 3 a 30 mm de longitud. Se localizan en el tracto digestivo de rumiantes, equinos y otros vertebrados. La principal característica que los diferencia es la bolsa copuladora bien desarrollada que presentan los machos con dos lóbulos laterales y un lóbulo dorsal más pequeño. Los géneros más importantes son *Trichostrongylus*, *Ostertagia* (*Teladorsagia*), *Cooperia*, *Nematodirus*, *Haemonchus* y *Mecistocirrus* (Angulo-Cubillán, 2007).

Cuadro 1 Nematodos gastrointestinales que afectan al ganado ovino y su localización dentro del huésped.

Orden	Familia	Género y especie	Localización
Strongylida	Trichostrongylidae	<i>Haemonchus contortus</i>	Abomaso
		<i>Teladorsagia trifurcata</i>	
		<i>Teladorsagia circumcincta</i>	
		<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	
		<i>Trichostrongylus capricola</i>	
		<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	
		<i>Nematodirus battus</i>	
		<i>Nematodirus spathinger</i>	
		<i>Nematodirus fillicolis</i>	
		<i>Cooperia curticei</i>	
Strongylida	Ancylostomatidae	<i>Bunostomum trigonocephalum</i>	Intestino delgado
		<i>Gaigeria pachicelis</i>	
		<i>Oesophagostomum venulosum</i>	
Strongylida	Chabertiidae	<i>Chabertia ovis</i>	Colon
Rhabditida	Strongyloididea	<i>Strongyloides papillosus</i>	Intestino delgado

1.4.2 *Haemonchus contortus* (Posición Taxonómica)

Reyno: Animalia; Phylum: Nematelminthos; Clase: Nematoda; Orden: Strongylida; Suborden: Trichostrongylina; Superfamilia: Trichostrongyloidea; Familia: Haemonchidae; Subfamilia: Haemonchinae; Genero: *Haemonchus*; Especie: *contortus* (Angulo-Cubillán et al., 2007).

El género *Haemonchus* está presente en más del 80% de las infecciones parasitarias en ovejas, cabras, y bovinos. Los parásitos pertenecientes a este género se localizan en el abomaso de los rumiantes (Figura 2) y son considerados de gran importancia clínica y económica por su alta prevalencia, prolificidad y hábitos hematófagos (Saminathan et al., 2015). Los gusanos adultos y la larva cuatro (L₄) son hematófagos, su movimiento causa la secreción de anticoagulantes que provocan hemorragias de la pared del abomaso, después de que el parásito se alimenta, resultando en anemia severa y reducida productividad en la fase aguda, en esta fase los animales pueden morir sin presentar signos clínicos, en cambio, en una infestación crónica, los animales muestran palidez de la conjuntiva y membranas mucosas, diarrea, letargo, debilidad muscular y edema en la región submandibular y eventualmente extendido hacia el abdomen; el diagnóstico de la haemonchosis usualmente se basa en los signos clínicos y el conteo fecal de huevos (HPG) (Saminathan et al., 2015). Los adultos miden entre 10 y 30 mm, el macho presenta una bolsa copuladora grande con un característico lóbulo dorsal pequeño y asimétrico. En las hembras la vulva suele estar protegida por una solapa o lengüeta (Figura 3) (Hernández, 2011). Los huevos miden 70-85 por 41-48 µm. En la cavidad bucal tiene una lanceta que le permite la erosión de la mucosa abomasal. La hembra tiene aspecto de palo de barbería dado por el intestino repleto de sangre envuelto por los ovarios blancos rellenos de huevos (Llinas-Cervantes, 2012).

1.4.3 Patogénesis

La fisiología del tracto gastrointestinal es modificada cuando los gusanos adultos se unen a la mucosa abomasal y se alimentan de sangre. Los parásitos adultos

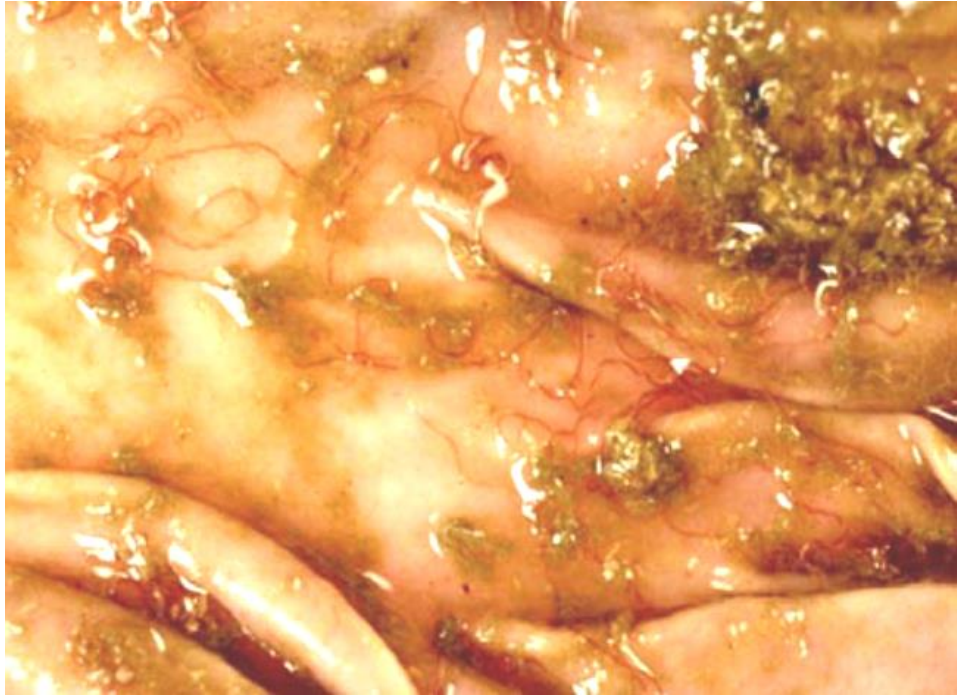


Figura 2- Fotografía de un abomaso con gusanos adultos de *Haemonchus contortus*, tomada de (Alunda et al., 2013).



Figura 3. Fotografías de los caracteres fenotípicos de la hembra (A) y el macho (B) de *Haemonchus contortus*, (tomada de Saminathan et al., 2015).

presentes en el abomaso y el intestino del huésped provocan cambios estructurales importantes en las mucosas. Causan gastritis, ulceración de la pared gástrica. En el

caso de *H. contortus*, este posee una lanceta con la que lacera la pared de la mucosa para alimentarse, esto produce modificaciones en las glándulas gástricas y aumento en el pH. Las células parietales (productoras de ácidos gástricos) y cimógenas (productoras de pepsina) son reemplazadas por células no funcionales, esto provoca alteración en el proceso digestivo, se pierde el efecto bacteriostático del pH bajo, aumentando el número de bacterias causantes de diarrea (Lope-Haumán, 2016).

1.4.4 Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales

La mayoría de los nematodos tienen un ciclo biológico directo (Figura 4), es decir, no necesitan un huésped intermediario para completar su ciclo evolutivo y se comprende de dos fases: endógena y exógena. La fase exógena inicia cuando el animal expulsa los huevos con las heces; en condiciones favorables de oxigenación, temperatura ($\approx 20^{\circ}\text{C}$) y humedad ($\approx 80\%$), en un periodo de 2 a 3 días eclosionan, dando origen a larvas en estadio uno (L_1) y dentro del medio en 1 a 2 días mudan a L_2 , en este estadio acumulan suficientes reservas de energía y se proveen de una cutícula y se convierten en L_3 o larvas en estadio infectante, durante esta fase la larva no se alimenta, entra en letargo hasta que es ingerida por el huésped.

La L_3 migra hacia las hojas y tallos de los pastos para ser ingeridos por los animales junto con los alimentos (Aguilar-Caballero et al., 2011), durante el día las larvas bajan de los pastos para protegerse de la desecación provocada por el sol (Soca et al., 2005). La fase endógena, comienza tras la ingestión de L_3 , el pH ácido del rumen ocasionado por la enzima leucinoamino-peptidasa ayuda a la larva a perder la vaina que la cubre, esto ocurre entre los 10 y 20 minutos después de ser ingerida. La L_3 desenvainada penetra la mucosa del abomaso donde se alimenta de sangre y tejido para mudar a L_4 , en un periodo de 10 a 14 días sufre otra muda a L_5 y pocos días después aparece el parásito adulto, por lo general el ciclo se completa en 3 semanas. Sin embargo, en algunos casos las L_4 entran en un periodo de letargo o hipobiosis dentro de la mucosa abomasal que se puede prolongar por varios meses, las causas

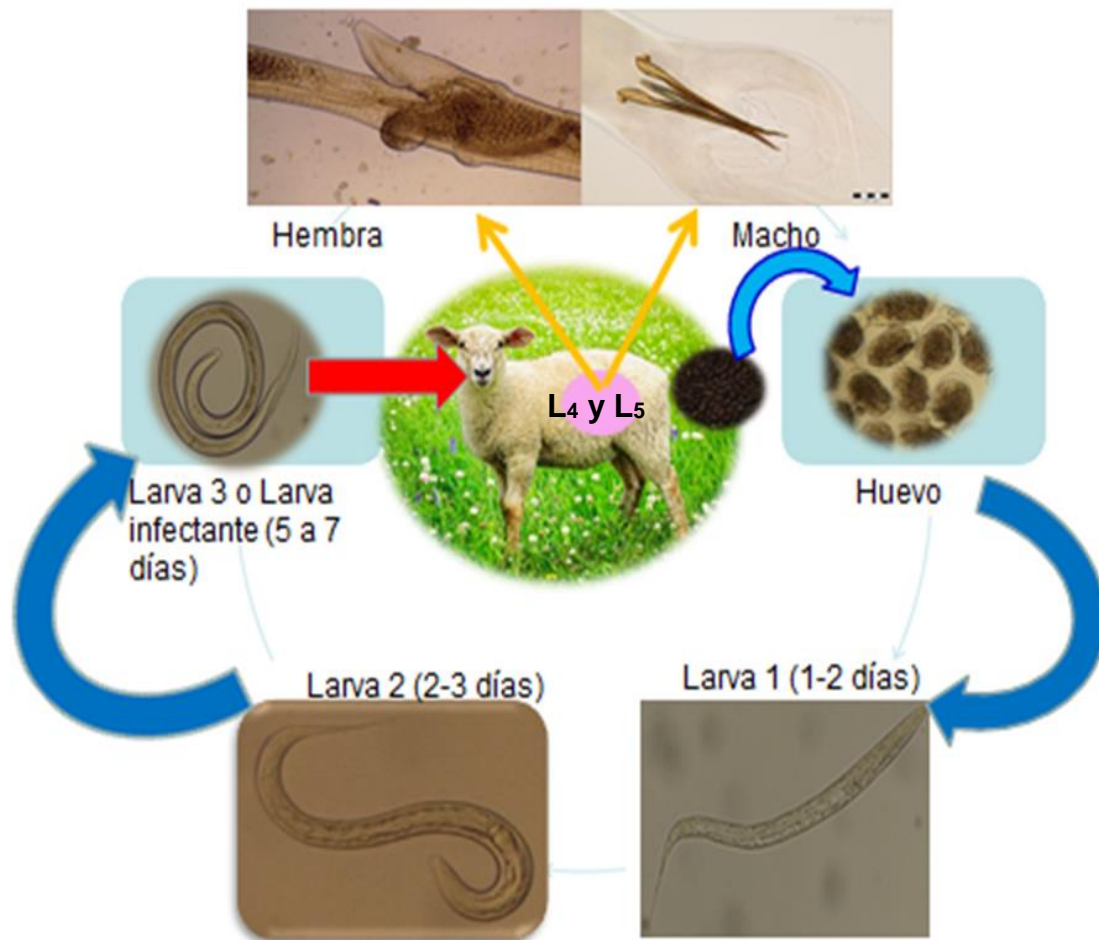


Figura 4.- Ciclo de vida de los nematodos gastrointestinales

de la inhibición de L₄ son las condiciones de salud y nutrición del hospedero y del ambiente externo (Aguilar-Caballero et al., 2011). Hasta el momento no se conocen con exactitud los mecanismos de desenquistamiento de las larvas, solo se ha notificado que los niveles hormonales repercuten en este proceso (Llinas-Cervantes, 2012), pero desde el punto de vista patológico es un proceso muy importante, ya que una desinhibición sincrónica de una gran número de larvas hipobióticas puede causar procesos graves. Finalmente, la hembra y el macho adultos copulan y posteriormente las hembras comienzan la oviposición y los huevos son expulsados con las heces para dar inicio a un nuevo ciclo (Soca et al., 2005).

1.5 Impacto económico de las parasitosis gastrointestinales en la producción ovina

Las infecciones por NGI en pequeños rumiantes traen consigo pérdidas económicas ocasionadas por los costos de profilaxis, tratamiento y en casos graves la muerte de los animales (Miller y Horohov, 2006). Un estudio realizado en Uruguay por Bonino y Mederos (2003), reveló que las pérdidas en la producción ovina causadas por NGI es del 23.6% en pérdida de peso vivo, 29.4% en peso del vellón y hasta un 50% por mortalidad de animales con infección subclínica, estimándose pérdidas por 41 millones de dólares anuales. En Australia se calculó que los costos de control de parásitos y las pérdidas en la producción de lana son de alrededor de 500 millones de dólares anuales (Emery et al., 1993), en este mismo sentido, en Kenia se han percibido pérdidas causadas por *H. contortus*, que sobrepasan los 26 millones de dólares anuales (Waller, 2004), y en nueva Zelanda se reporta pérdidas económicas directas por tratamiento y muerte de los animales infectados por \$ 45 millones de dólares anuales (Adamu et al., 2013).

En la búsqueda de la literatura no se identificó algún trabajo que evaluara la pérdida provocada por nematodos en México. Sin embargo, el elevado costo de los tratamientos antihelmínticos y la alta frecuencia de los mismos indica que el problema parasitario en el país alcanza magnitudes muy elevadas (FAO, 2003), además, de la alta mortalidad que se presenta en animales parasitados y la baja productividad en el rebaño son indicadores innegables del alto costo que se paga por la presencia de NGI y otros parásitos (López y Mendoza de Gives, 2011).

1.6 Métodos de control de las parasitosis gastrointestinales

1.6.1 Quimioterapia

Desde la década de los 60's se han manejado tres familias de antihelmínticos de amplio espectro para el control de nematodos en pequeños rumiantes (Sherrill *et al.*, 2006), y se dividen en cinco grupos según su mecanismo de acción: Grupo I se encuentran los bencimidazoles y probenzimidazoles los cuales son efectivos contra nematodos adultos y larvas (dosis más elevadas). Grupo II, incluye al morantel, pirantel y levamisol; estos fármacos producen parálisis en los parásitos, facilitando su

expulsión junto con las heces. Grupo III, son las lactonas macrocíclicas las cuales son una modificación química del producto de fermentación de la bacteria *Streptomyces avermitilis* y se dividen en dos subclases: 1) Avermectinas como Ivermectina (IVM), abamectina (ABA), doramectina (DOR), eprinomectina (EPR) y salamectina (SEL), los cuales son usados en el control de nematodos y algunos ectoparásitos; 2) Milbemicinas, ejemplo de ellas son: moxidectina (MOX) y Milbemycin Oxime (MO) usadas en animales de granja y de compañía (Godoy et al., 2016). Grupo IV se compone por los organofosforados como el triclorfon y naftalofos, estos productos son de actividad limitada y presentan alta toxicidad aun en niveles cercanos a los recomendados, por lo que su uso no es muy recomendado. Grupo V se encuentran salicilanilidas (closantel y raxofanide) el closantel protege contra la infección por *Haemonchus* spp durante más de 50 días; solo si se administra en dosis más altas a las recomendadas debido a que se mantiene ligado a proteínas plasmáticas (Romero y Boero, 2001). Actualmente, el método de control más eficaz que se utiliza para parásitos en rumiantes son los fármacos antihelmínticos. Sin embargo, presentan como desventaja, los altos costos, toxicidad para el ambiente y residuos en carne y leche (Beserra de Oliveira et al., 2011) además, de que se acelera la selección de cepas de NGI resistentes a los antihelmínticos (Mendoza de Gives, 2002, Saddiqui et al., 2010).

1.7 Consecuencias del mal uso de productos químicos para el control de NGI

1.7.1 Resistencia parasitaria a los antihelmínticos

En sus inicios el uso de antihelmínticos fue una práctica altamente efectiva en las diferentes especies de animales domésticos. Sin embargo, pocos años después de su descubrimiento se observó la presencia de un fenómeno llamado resistencia antihelmíntica (RA) (Papadopoulos, 2008). La resistencia antihelmíntica es la disminución de la efectividad de los desparasitantes contra una población objetivo y se atribuye a su uso desmedido (González-Garduño et al., 2012), y como consecuencia se da una modificación genética o un incremento en la frecuencia de expresión de un carácter hereditario, pero en ambos casos los individuos que sobreviven al tratamiento transmiten estos alelos de resistencia a su progenie (Anziani

y Fiel., 2015). Para detectar la resistencia antihelmíntica se emplean dos métodos, pruebas *in vitro* y de campo. La prueba de campo se puede aplicar a cualquier AH, mide la reducción del HPG y es capaz de detectar resistencia cuando la frecuencia de genes de resistencia supera el 25%. Cuando el número de animales no permite determinar la RA, se puede calcular la efectividad de las drogas AH mediante los conteos fecales antes y después del tratamiento (González-Garduño et al., 2012).

La presencia de cepas resistentes, en las praderas es un problema en constante crecimiento debido al hacinamiento en el que son mantenidos los rebaños en muchos países del mundo (Godoy et al., 2016) y como consecuencia de la sobrepoblación, mal manejo de praderas y drogas antihelmínticas han aparecido cepas de nematodos gastrointestinales (NGI), con resistencia múltiple a las diferentes familias de antihelmínticos (Esteban-Andrés et al., 2013).

Los primeros reportes que hablan de este problema son los realizados en Sud-África, Australia, Nueva Zelanda, Malasia, España, Francia, Dinamarca, Brasil y Estados Unidos (Sherrill et al., 2006). En Australia, se detectó un grave problema de resistencia parasitaria múltiple hacia bencimidazoles, levamisol, morantel y lactonas macrocíclicas (Márquez et al., 2008), y se ha documentado resistencia en los nematodos pertenecientes a la familia *Trichostrongylidae* contra bencimidazol, levamisol, morantel e ivermectina (Anziani y Fiel, 2015). Según reportes de Torres-Acosta et al. (2012) el primer país de América latina en informar sobre RA a los benzimidazoles fue Brasil. En México se identificó resistencia a los bencimidazoles en 1990, inicialmente en Puebla y más tarde Morelos, Veracruz, Yucatán y Tlaxcala donde se ha reportado resistencia a ivermectina (Montalvo et al., 2006).

1.7.2 Daños al ambiente

Los residuos de sustancia químicas usadas para el control de plagas afectan indirectamente la armonía del ambiente, al ser excretadas través de las heces y orina y la eliminación inadecuada de frascos vacíos. La ivermectina por ejemplo, conserva su formula activa durante un largo periodo despues de ser eliminada por los animales tratados y se ha demostrado que colonias enteras de microorganismos mueren por consumir excremento de animales tratados hasta cuarenta días antes. Dentro de los

efectos dañinos se encuentra, daño a: **insectos coprófagos** (Figura 5), como coleopteros, dípteros coprófagos y lombrices. Entre los dípteros afectados se encuentran insectos polinizadores y las moscas que se encargan de la descomposición de animales muertos. **El ecosistema del pastizal** es otra de las áreas afectadas ya que depende del reciclaje de materia orgánica y de los elementos disponibles en el excremento, si no se da la degradación se inmoviliza la materia orgánica y los elementos minerales, provocando que la estructura del suelo se compacte y pierde la capacidad para retener el agua necesaria para el desarrollo de la vegetación. Al no haber insectos degradadores de materia orgánica, la composición química del suelo cambia ya que se disminuye el nitrógeno disponible y no es suficiente para el crecimiento y desarrollo de nuevas plantas (Aparicio-Medina et al., 2011).

1.8 Nuevas tendencias para el control de NGI

1.8.1 Selección genética de animales resistentes a NGI

La resistencia genética a nematodos incluye la iniciación y mantenimiento de la respuesta del hospedero, que previene, reduce o elimina la infección parasitaria (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013). La variación genética en respuesta a la infección por NGI ha sido documentada principalmente en razas como Red Maasai, Saint Croix, Florida Native, y Blackbelly (Figura 6) (Vanimisetti *et al.*, 2004) por mencionar algunas. Los animales que presentan resistencia a infecciones por nematodos gastrointestinales disminuyen la muda de L₄ a L₅ así como de L₅ a adultos, y si el parásito adulto logra establecer la infección, el sistema inmune del animal se encarga de eliminarlo o bien afectar la capacidad de postura por parte de la hembra (Castells, 2010). El cruzamiento selectivo para resistencia a NGI usando el HPG como indicador fenotípico se ha realizado en algunas razas ovinas. Sin embargo, es un proceso a largo plazo y costoso por lo que se ha considerado más eficiente la selección genética basándose en estimadores indirectos generados por marcadores moleculares (Atlija et al., 2016) actualmente se sabe que los QTL (Quantitative Trait Locus) para resistencia a nematodos en ovinos se encuentra en el cromosoma 3, el gen localizado en esta región codifica para interferón gama (IFNG), y es considerado



Figura 5 Escarabajo pelotero, degradador de materia orgánica afectado por residuos de antihelmínticos químicos, tomada de https://www.ecured.cu/Escarabajo_pelotero



Figura 6. Ovejas Blackbelly una de las razas más resistentes a parásitos gastrointestinales

un gen candidato para resistencia a nematodos (Diez-Tascon et al., 2002) y por otro lado el gen DRB perteneciente al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II también se ha visto que induce respuesta inmune ante infecciones extracelulares, además de que existe un gran número de QTLs para resistencia a NGI (Charon, 2004).

1.8.2 Vacunas e inmunización con larvas infectantes

Los avances más significativos en torno a la producción de vacunas antihelmínticas son el descubrimiento y caracterización de antígenos que confieren inmunidad, como es el caso del antígeno H-11, utilizado para producir una vacuna contra *H. contortus* (Martínez et al., 2010). En este mismo sentido Cachat et al. (2010) probaron la efectividad de un coctel de proteasas recombinantes derivadas del antígeno protector H-gal-GP, así como la forma silvestre del antígeno H-gal-GP; sin embargo, solo se observó protección en los animales que recibieron la forma silvestre. En otra investigación realizada en la Universidad Complutense de Madrid, lograron producir la primer vacuna recombinante contra el nematodo *Haemonchus contortus* con el antígeno Hc23, la inmunización con rHc23 (Hc23 recombinante) provocó una protección significativa, con reducciones del 70 y 85% del número de helmintos en el estómago y 57-79% de reducción en la eliminación de huevos en las heces, de acuerdo con los resultados de protección adquiridos, esta es la primera vacuna recombinante contra la haemonchosis en el mundo (Alunda et al., 2013).

Se sabe que el contacto repetido con los nematodos conduce a la maduración del sistema inmune de los ovinos, es por ello que se ha utilizado como un método de control alternativo, en un trabajo realizado por Rodríguez et al. (2011) inocularon 3700 Larvas infectantes de *H. contortus* a corderos, obteniendo como resultado una reducción en el HPG, aunque no hubo mejora de la ganancia de peso.

1.8.3 Control biológico

Hongos nematofagos: Como medida de control también se han utilizado hongos saprófitos capaces de capturar nematodos por medio de trampas adherentes que luego de capturar la larva del nematodo, el hongo penetra en ella perforándola y provocándole la muerte (Figura 7); entre los hongos más comúnmente utilizados

encontramos, *Arthrobotrys oligospora* contra larvas de *Cooperia oncophora*, *Ostertagia ostertagi*, *Arthrobotrys tortor*, *Dactilaria candida* y *Candelabrella musiformis* contra larvas de *Teladorsagia circumcincta* y *Haemonchus contortus* y más recientemente se ha utilizado *Duddingtonia flagrans* contra larvas infectantes de *H. contortus* (Morales y Pino, 2001; Mendoza de Gives et al., 2006).

Ácaros: Existen especies de ácaros que han sido considerados enemigos naturales de los nematodos, a estos ácaros se les encuentra viviendo de forma libre en el suelo y dentro de su dieta normal incluyen diversos organismos como nematodos. Entre los ácaros que se han utilizado con éxito en control biológico de nematodos parásitos de plantas se encuentra a los pertenecientes a la familia Macrochelidae y algunos otros pertenecientes al género *Lasioseius* sp (Figura 8) (Aguilar-Marcelino, 2012).



Figura 7. Larva de nematodo atrapada por los anillos adhesivos de *Arthrobotrys* sp.
Tomada de Mendoza de Gives, (2011).

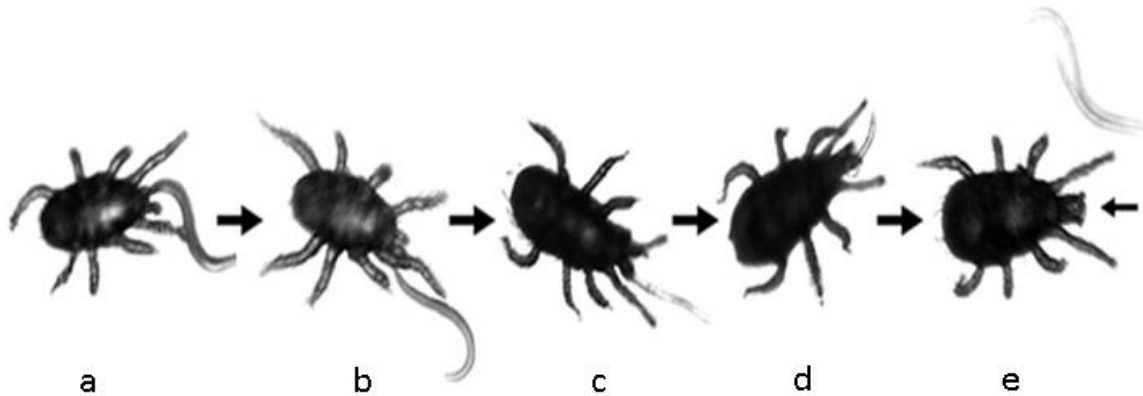


Figura 8 (a-e) *Lasioseius penicilliger* depredando larvas infectantes de *Haemonchus contortus*, tomado de Aguilar-Marcelino, (2012).

Bacterias: Algunas bacterias como *Bacillus thuringiensis* y *Pasteuria penetrans* han sido analizadas como posibles antagonistas de NGI de rumiantes. *Pasteuria penetrans* es una bacteria Gram⁺ identificada como hiperparásita formadora de endosporas, que se encuentran adheridas a la cutícula del nematodo parásito de plantas *Meloidogyne* spp y se estima que unos 300 géneros de nematodos más, incluyendo *Tylenchyda*, *Dorylaimida*, *Araeolaymida*, *Chromadoridae*, *Enoplidae* y *Plectidae* (Aguilar-Marcelino, 2012).

1.8.4 Suplementación proteínica

De antemano se sabe que un animal con buena condición nutricional posee un sistema inmunológico capaz de enfrentarse a infecciones por cualquier tipo de patógeno y se ha sugerido a la suplementación alimenticia como un mecanismo para reducir el número de huevos en el tracto gastrointestinal por gramo de heces, Torres-Acosta et al. (2012) reportaron que ovinos que recibieron suplementación proteínica, tuvieron una reducción en los HPG y una mayor ganancia de peso en relación a los animales no suplementados.

1.8.5 Herbolaria

La herbolaria tradicional ha sido utilizada por las comunidades indígenas de América Latina como una práctica milenaria y actualmente se realizan numerosos estudios en

el mundo con un concepto etnobotánico (Medina et al., 2014). En la etnoveterinaria se han estudiado diversas plantas con la finalidad de controlar los parásitos gastrointestinales que afectan a la ganadería en el mundo (Cuadro 2).

1.8.5.1 Metabolitos secundarios de plantas para el control parasitario

Las plantas ha sido utilizadas por la industria farmacéutica como fuente de sustancias activas contra bacterias, hongos, virus, etc (Drago-Serrano et al., 2006), desde los 60's se han utilizado infusiones, decocciones, cataplasmas y otras presentaciones de plantas que de manera empírica han sido identificadas con propiedades antihelmínticas (Alemán et al., 2011 y Mendoza de Gives et al., 2012), como el epazote (Gómez-Castellano, 2008), y algunas leguminosas forrajeras (Beserra de Olivera et al., 2011)

Las plantas en general tienen dos tipos de metabolismo, el primero: **Metabolismo primario**: es el conjunto de reacciones químicas en las que el carbono, nitrógeno y energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento, como son aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos (Ávalos y Pérez, 2009), en segundo lugar está el **Metabolismo secundario**: es una fase metabólica que ayuda a las plantas a protegerse de sus enemigos naturales mediante la producción de compuestos (Moreno et al., 2012) que pueden ser divididos en tres grupos principales: terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos (Hussain et al., 2012) en esos grupos podemos encontrar fenoles simples, fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, lignanos, ligninas, taninos (Porrás y López, 2009), los cuales están involucrados en su protección contra enfermedades y plagas, además, que poseen actividad contra ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos (Pérez-Pacheco et al., 2004). Los fenoles son definidos químicamente, como sustancias que poseen un anillo aromático que porta uno o más grupos hidroxilo. La mayoría de los compuestos fenólicos son polifenoles y están categorizados en 5 grupos: fenoles simples y fenoles ácidos, fenilpropanoides, flavonoides, taninos y quinonas (Ohri et al., 2010).

Cuadro 2 Plantas evaluadas para probar su actividad antihelmíntica contra parásitos de interés en la ganadería.

Planta	Tipo de Solvente	Parásito	Concentración y % de actividad	Referencia
<i>Allium cepa</i> y <i>Cocos nucifera</i>	Cloroformo	Parásitos adultos <i>Echinostoma caproni</i> , <i>Fasciola hepática</i>	500 y 1000 mg	Abdel-Ghaffar et al. (2011).
<i>Rhizophora mangle</i> L.	Agua	<i>Trichostrongylus</i> spp	50 mg/ml	Alemán et al. (2011)
<i>Heteromorpha trifoliata</i> , <i>Maesa lanceolata</i> y <i>Leucosidea sericea</i>	Acetona	Inhiben la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i>	Las CL ₅₀ son 0.62, 0.72 y 1.08 mg, respectivamente	Adamu et al. (2013)
<i>Accacia pennatula</i> , <i>Leucaena Leucocephala</i> y <i>Lisyloma latisiliquum</i>	Acetona-Agua 70:30	L ₃ <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Inhibición de la migración larvaria	Alonso-Díaz et al. (2008)
<i>Acacia gaumeri</i> , <i>Brosimum alicastrum</i> , <i>Havardia albicans</i>	Acetona-Agua	<i>H. contortus</i>	Inhibición de la migración y eclosión larvaria	Alonso-Díaz et al. (2011)
<i>Artemisa vulgaris</i>	Etanol-Agua 50:50	<i>Meloidogyne megadora</i>	Inhibición de la eclosión	Costa et al. (2003)
<i>Azadirachta indica</i> , <i>Momordica charantia</i>	Metanol y Agua	<i>H. contortus</i>	Actividad larvicida y adulticida	Dey et al. (2015)
<i>Criticalia argétea</i> , <i>Criticalia varanera</i> , <i>Gliricidia sepicum</i>	Acetona-Agua 70:30	<i>H. contortus</i>	Migración larvarias a 1200 µg/ml	Von Son de Fernex et al. (2012)
<i>Artemisia vestita</i> , <i>Artemisia marítima</i>	Metanol	<i>H. contortus</i>	100 mg/ml	Irum et al. (2015)
<i>Andrograpis paniculata</i>	Acetato de etilo, acetona y metanol	<i>H. contortus</i>	2.9 mg/ml inhibe el desarrollo larvario	Lans et al. (2010)

1.8.5.2 Compuestos fenólicos

Algunos fenoles sintéticos se han reportado como antihelmínticos; por ejemplo, niclosamida, oxyclozanide y bithionol que interfieren con la generación de energía en los helmintos parásitos por un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Otro posible mecanismo de acción de los taninos es que pueden enlazar proteínas libres del hospedero o glicoproteínas sobre el parásito en el tracto gastrointestinal y pueden causarle la muerte (Gupta et al., 2015). Los taninos se consideran un método alternativo en el control de nematodos gastrointestinales (Von Son-de Ferdex et al., 2012), y se han realizado numerosos estudios en diferentes países con la finalidad de probar su actividad antihelmíntica (Bhattacharjee et al., 2006), en los que su efecto antihelmíntico se asocia a la formación de complejos con las proteínas de los parásitos, afectando su motilidad, deposición de huevos y el desarrollo larvario (Alonso-Díaz et al. 2011).

Se ha observado que el látex de papaya (*Carica papaya*), contiene cisteína proteínasa, proteína que ha mostrado tener actividad contra gusanos gastrointestinales, ya que las proteínas de la cutícula de los parásitos, al interactuar con la cisteína se da la formación de ampollas y liberación de tejidos internos que conducen a la muerte del parásito; en roedores estudiados *in vivo* se observó una ligera toxicidad (Stepek et al., 2007). Buttle et al. (2011) observaron que la cisteína posee actividad antihelmíntica contra *H. contortus*, aunque no es suficiente una sola dosis por la dilución que sufre en el rumen, además de que las enzimas requieren un largo periodo de tiempo en contacto con el nematodo para dañarlo. En este estudio no se observaron signos de toxicidad. En los años 90 se realizó un estudio en Nueva Zelanda, en el cual se comparó la carga parasitaria de ovinos en pastoreo y ramoneo con plantas que presentan taninos condensados y se observó una disminución significativa del parasitismo gastrointestinal. Estos resultados han sido reportados también en cabras en pastoreo además de que presentan menos daños de mucosas (Saumell y Fernández, 2002).

1.10 *Argemone mexicana* (Chicalote)

Es una especie endémica en México perteneciente a la familia *Papaveraceae* conocida como Prickly poppy (Figura 9a), (Bhattacharjee et al., 2006), crece en lugares perturbados como potreros y caminos (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2000), En la India se usa la salvia amarilla para retener líquidos en los músculos y para algunas enfermedades como ictericia, oftalmia, sarna y afecciones cutáneas. El aceite de las semillas se emplea para la disentería, úlceras, asma y otras afecciones intestinales (Brahmachari et al., 2013) y como antídoto para el veneno de víbora (Bhattacharjee et al., 2006). Además se usa en infestaciones por el gusano de Guinea, y como diurético, purgante y en enfermedades de la piel como lepra y prurito. Dentro de su composición química podemos encontrar alcaloides como la berberina y sanguinarina, flavonoides, taninos, esteroides y terpenos.

Brahmachari et al, (2013) identificaron los alcaloides dehydrocorydalmina y oxiberberina que presentan actividad anti-fúngica contra *Helminthosporium* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria cajani*, *Bipolaris* sp. y *Fusarium udum*. Además Dehydrocorydalmina que inhibe la germinación de las esporas de todas las especies estudiadas. Se ha reportado que el extracto de las hojas de *A. mexicana* tiene actividad antiinflamatoria y los constituyentes químicos como isorhamnetin-3-O- β -D-glucopyranoside, β -amyrin, cisteína y fenilalanina podrían ser los responsables de dicha actividad (Brahmachari et al., 2013). Shaukat et al., 2002 observaron que suprime el desarrollo del hongo *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani* en frutos de jitomate con polvos y extractos acuosos. Masood y Ranja (1991) Reportaron que el extracto acuoso de *A. mexicana* inhibe el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus*. También se reporta acción antimicrobiana de extractos metanólicos de las hojas y semillas sobre *Saphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Bhattacharjee et al., 2006), además Shaukat et al, (2002) reportan actividad contra el fitonemátodo *Meloidogyne javanica*.

1.11 *Taraxacum officinale*

Es una planta perenne pertenece a la familia Asteraceae (Figura 9b), es de procedencia europea y se encuentra fácilmente como maleza en jardines o en cultivos

de poca o cero labranza y a orillas de los caminos (Herbotecnia.com). También es conocida como Diente de león y es usada como diurético, estimulante digestivo, anticancerígeno y además se ha identificado que sus hojas son ricas en fibra, potasio, hierro, calcio y vitaminas (Ghaima et al., 2013) ha sido usada en la medicina tradicional en el tratamiento de desórdenes hepáticos, inflamación y cáncer de pecho y útero. Dentro de sus componentes posee flavonoides como ácido caféico, ácido clorogénico, luteolina y 7-glucosido (Mir et al., 2013). En un estudio realizado por Aydinli y Mennan, (2014) reportaron una actividad ovicida moderada contra el fitonemátodo *Meloidogyne arenaria* bajo condiciones *in vitro*.

1.12 *Tagetes filifolia*

Esta planta pertenece a la familia Asteraceae (Figura 9c), género *Tagetes*. Dentro del género *Tagetes* se han descrito 26 especies, de las cuales 24 se encuentran en México en altitudes de 600 a 2600 msnm en diferentes climas y suelos. Se distribuye en forma silvestre desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina (Serrato et al., 2008). *Tagetes* L. comúnmente conocida como miragold es un género herbolario nativo de centro y Sud-América y naturalizado en climas tropicales y subtropicales. Especies como *T. erecta*, *T. patula* y *T. tenuifolia* son cultivadas como plantas ornamentales en algunos países. Las flores de plantas de este género producen flavonoides que actúan como radicales libres, carotenoides principalmente, luteína y esteroides de luteína, usados en preparaciones farmacológicas, como aditivos alimenticios, colorantes de alimentos y también conocidos por sus efectos anticancerígenos. Sus propiedades biológicas afectan a bacterias, virus, hongos nematodos, ácaros, insectos, inclusive otras especies de plantas (Barajas et al., 2011). También se ha reportado que la raíz produce tiofenos, estos poseen actividad alelopática, insecticida, nematicida, antimicóticos, germicida y citotóxica. El α -tertienilo es un tiofeno con actividad nematicida (Maroti et al., 2010). Los compuestos químicos del grupo de los fenilpropanoides, anetol (33 a 68%) y alilanol (13 a 61%) constituyen la mayor parte del aceite esencial de *T. filifolia*. El anetol produce diferentes efectos biológicos como repelente, insecticida, fungicida, nematicida y

bactericida. (Serrato et al., 2008). Romagnoli et al. (2005) reportaron que *Tagetes filifolia* posee acción inhibitoria sobre hongos fitopatógenos *Botrytis cinérea* Pers y *Penicillium digitatum*.

1.13 *Ruta chalepensis* L.

La ruda (*Ruta chalepensis*) (Figura 9d) es una planta perenne, perteneciente a la familia Rutaceae originaria del Norte de África y ampliamente distribuida a través de la región del mediterráneo y en países de clima templado y tropical, El aceite esencial y los extractos obtenidos de esta planta han mostrado actividad repelente, e insecticida y las hojas y tallos jóvenes de *R. chalepensis* contienen alcaloides, flavonoides, fenoles, aminoácidos, furocumarinas, saponinas (Akkari et al., 2015). Se han reportado diferentes actividades biológicas de los extractos obtenidos de *R. chalepensis* como son vermífuga, antihelmíntica, laxante y nematocida (según la clasificación realizada por Moya y Escudero, 2015) *R. chalepensis* presenta un potencial medio para ser evaluada como nematocida de acuerdo a los componentes reportados y a los usos que se le han dado en la medicina tradicional a lo largo de los años. Tampe et al. (2016) identificaron como principales constituyentes del aceite esencia de *R. chalepensis* a dos cetonas alifáticas, 2-nonanona (41.7%) y 2-undecanona (40.1%) y observaron un efecto repelente del aceite esencial de *R. chalepensis* contra insectos del género *Aegorhinus superciliosus*, una importante plaga de los cultivos de arándano.

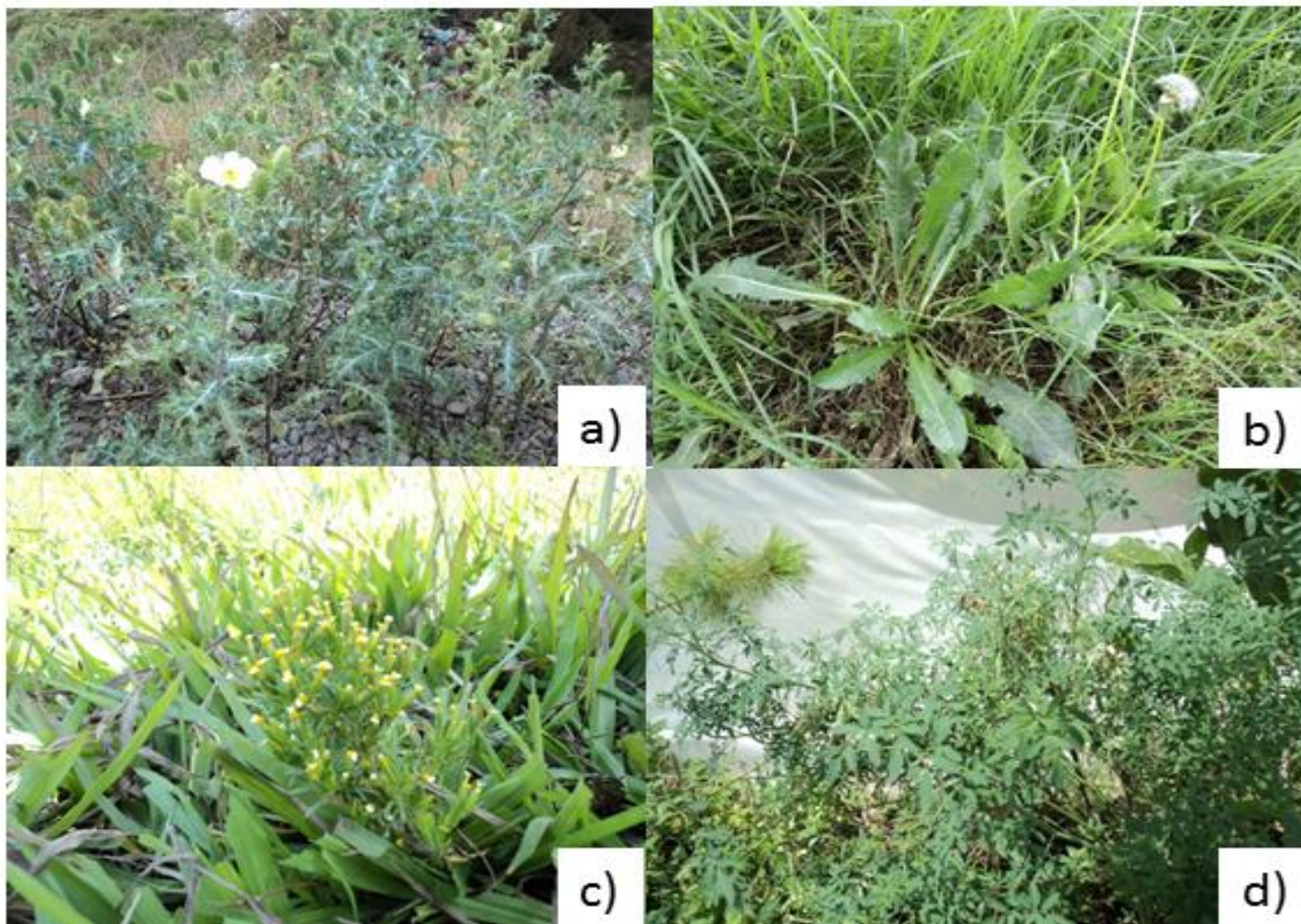


Figura 9 9a) *Argemone mexicana*, 9b) *Taraxacum officinale*, 9c) *Tagetes filifolia*, 9d) *Ruta chalepensis*

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad nematocida *in vitro* de extractos orgánicos de *Tagetes filifolia*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* y *Argemone mexicana* contra huevos y larvas infectantes y larvas histiotrópicas de *Haemonchus contortus*.

HIPOTESIS GENERAL

Los extractos orgánicos de *T. filifolia*, *T. officinale*, *R. chalepensis* y *A. mexicana* producen metabolitos secundarios con actividad nematocida *in vitro* en contra de huevos y larvas infectantes (L₃) e histiotrópicas (L₄) de *H. contortus*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Evaluar la actividad nematocida *in vitro* de extractos orgánicos de: *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Tagetes filifolia* y *Ruta chalepensis* contra huevos y larvas infectantes de *H. contortus*.
- 2.- Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico que mostró el mayor efecto letal contra larvas infectantes y huevos del nematodo *Haemonchus contortus*
- 3.- Fraccionamiento biodirigido del extracto acuoso para la identificación de compuestos activos en la fracción de mayor actividad contra huevos y larvas infectantes del nematodo *H. contortus*.
- 4.- Evaluar la actividad nematocida *in vitro* de los extractos metanólicos de las plantas seleccionadas contra larvas histiotrópicas (L₄) del nematodo *Haemonchus contortus*.

CAPITULO II

***In vitro* assessment of *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* and *Tagetes filifolia* against *Haemonchus contortus* nematode eggs and infective (L₃) larvae**

Gabriela Jasso-Díaz^a, Glafiro Torres Hernández^a, Alejandro Zamilpa^c, Carlos Miguel Becerril Pérez^a, J. Efrén Ramírez Bribiesca^a, Omar Hernández Mendo^a, Hussein Sánchez Arroyo^a, Manasés González-Cortazar^{c*}, Pedro Mendoza de Gives^{b*}

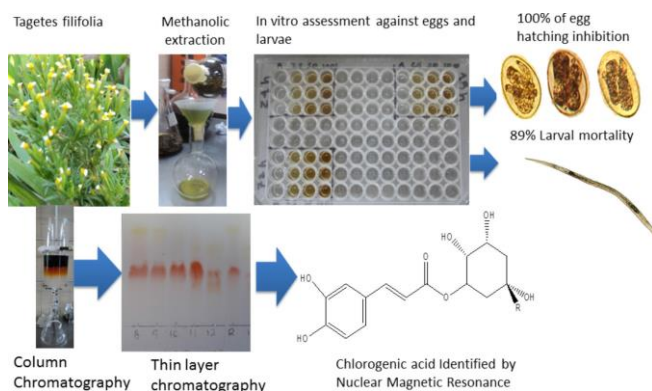
^a Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. México. CP 56230. Miss Gabriela Jasso-Díaz, gabydiaz_86@hotmail.com; Dr. Glafiro Torres Hernández, glatohe@colpos.mx; Dr Efrén Ramírez Bribiesca, efrenrb@colpos.mx; Dr Carlos Miguel Becerril Pérez, color@colpos.mx; Dr Omar Hernández Mendo, ohmendo@colpos.mx; Dr Hussein Sánchez Arroyo, husein@colpos.mx

^b Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP, Km 11 Carretera Federal Cuernavaca-Cuatla, No. 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos, CP 62550, México. Dr Pedro Mendoza de Gives, pedromdgives@yahoo.com

^c Centro de Investigación Biomédica del Sur, CIBIS-IMSS. Argentina 1, Col. Centro Xochitepec, Morelos, México. CP 62790. Dr Manasés González Cortázar, gmanases@hotmail.com; Dr Alejandro Zamilpa, azamilpa_2000@yahoo.com.mx

* Authors for corresponding: Dr Pedro Mendoza de Gives, Tel 52777319 28 50 ext. 124, e-mail: pedromdgives@yahoo.com; Dr Manasés González Cortázar, Tel. 52 7773612155, e-mail: gmanases@hotmail.com

Graphical Abstract



Highlights

- Methanolic extracts from four selected plants were assessed
- *Tagetes filifolia* extract was active vs *Haemonchus contortus* either eggs and larvae
- *Taraxacum officinale*, *Argemone mexicana* and *Ruta chalepensis* did not show activity
- One *T. filifolia* fraction showed 76% egg hatching inhibition at 4 mg per ml
- Chlorogenic acid was the responsible compound that inhibited 100 % of egg hatching.

ABSTRACT

Argemone mexicana, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* and *Tagetes filifolia* are plants with deworming potential. The purpose of this study was to evaluate methanolic extracts of aerial parts of these plants against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae (L₃) and identify compounds responsible for the anthelmintic activity. *In vitro* probes were performed to identify the anthelmintic activity of plant extracts: egg hatching inhibition (EHI) and larvae mortality. Open column Chromatography was used to bio-guided fractionation of the extract, which shows the best anthelmintic effect. The lethal concentration to inhibit 50% of *H. contortus* egg hatching or larvae mortality (LC₅₀) was calculated using a Probit analysis. Bio-guided procedure led to the recognition of an active fraction (TF11) mainly composed by 1) quercetagitrin, 2) methyl chlorogenate and chlorogenic acid. Quercetagitrin (**1**) and methyl chlorogenate (**2**) did not show an important EHI activity (3 to 14%) ($p < 0.05$); however, chlorogenic acid (**3**) showed 100% of EHI (LC₅₀ 248 µg/mL) ($p < 0.05$). Chlorogenic acid is responsible of the ovicidal activity and it seems that, this compound is reported for the first time with anthelmintic activity against a parasite of importance in sheep industry.

Key words: *Haemonchus contortus*, plant extracts, secondary metabolites, chlorogenic acid

RESUMEN

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* del extracto metanólico de las partes aéreas de *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* y *Tagetes filifolia* contra larvas infectantes (L₃) y huevos de *Haemonchus contortus* y además identificar los compuestos responsables de la actividad antihelmíntica. Se realizaron dos pruebas *in vitro* para identificar la actividad antihelmíntica de los extractos de las plantas: inhibición de la eclosión (EHI) y mortalidad larvaria. La concentración letal (CL₅₀) para inhibir la eclosión del 50% de los huevos confrontados fue de 1.5 mg/mL. La mayor mortalidad de larvas infectantes (89%) se observó con el extracto de *T. filifolia* a 200 mg/mL y la LC₅₀=116 mg/mL. La Resonancia Magnética Nuclear (NMR) mostró que la fracción activa (TF11) está constituida principalmente por tres compuestos polifenólicos identificados como quercetagitrin (Compuesto 1), ácido clorogénico (compuesto 2) y metil-clorogenato (Compuesto 3). Los compuestos 1 y 3 no mostraron actividad inhibitoria de la eclosión, sin embargo, el compuesto 2 mostró un CL₅₀ de 248 µg/mL. En este estudio se concluye que el ácido clorogénico es el responsable de la actividad ovicida de TF11 del extracto metanólico de *Tagetes filifolia* y por primera vez se reporta la actividad antihelmíntica de este compuesto contra parásitos de importancia económica en la industria ovina.

Palabras clave: *Haemonchus contortus*, extractos de plantas, metabolitos secundarios, ácido clorogénico

2 INTRODUCTION

Haemonchus contortus is an abomasum parasitic nematode affecting small ruminants worldwide. This nematode is considered as one of the most pathogenic parasites due to its hematophagous habits, high prolificacy [1] and high prevalence [2]. The haemonchosis provokes important economic losses; since, diminish the productive potential of flocks and it can cause the death of young animals [3]. The most common control method of this disease is the intensive use of anthelmintic chemical drugs; such as macrocyclic lactones, benzimidazole and fenbendazole [4]. Broad-spectrum anthelmintics are a suitable tools for the control of gastro-intestinal nematodes (GIN); raising the production costs and anthelmintic resistant populations [5]. The increasing presence of *H. contortus* strains resistant to chemical products supports the development of novel technologies to control GIN; for example, the use of copper particles [6], vaccination [7], grazing rotation [8], natural antagonists [9], nutrition supplementation [10], and genetic selection of animals that have shown to be resistant to this parasite [11]. Another strategy is the use of bioactive plants with anthelmintic activity [12]. *Argemone mexicana* has shown important biological activities i.e., anti-malaria [13], anti-microbial, anti-fungi [14] and anti-phytoparasitic nematodes [15]. Similarly members of the Asteraceae family i.e., *Tagetes filifolia* and *Taraxacum officinale* contain active metabolites against bacteria, virus, fungi, mites, insects and phyto-parasitic nematodes [16, 17]. Additionally, some anti-bacterial and anti-oxidant activities have been reported in *T. officinale* [18]. Moreover, *Ruta chalepensis* has shown possessing other important bio-active compounds which have a variety of activities including digestive disorders, anti-rheumatism, anti-hypertension, antiseptic, repellent [19] and as a bio-pesticide against phytonematodes [20]. In an extensive literature revision, it was not found any reference about anthelmintic activity of methanolic extracts of these plants against the ovine abomasal parasite *H. contortus*. This research was aimed to assess the *in vitro* anthelmintic activity of *A. mexicana*, *T. officinale*, *R. chalepensis* and *T. filifolia* methanolic extracts against both *H. contortus* infective larvae (L3) and eggs as well as to identify the chemical compounds associated with the anthelmintic activity.

2.1 MATERIALS AND METHODS

2.1.1 Location

This research was carried out at the Laboratory of Helminthology from Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), belonging to the Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), in Jiutepec Municipality, Morelos State, Mexico. Plant extractions and elucidation of compounds were performed at Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS) in Xochitepec municipality, Morelos State, Mexico.

2.1.2 Plant material

All plants were collected during flowering period. One plant of each genus/specie was deposited at the Ethno-botanical Garden and Traditional Medicine Herbolgy Museum from Cuernavaca city, Morelos State, Mexico, and identified by the Biologist Margarita Aviles. The plants, origin, date of collection and voucher code reference are shown in (Cuadro 3).

2.1.3 Extraction procedure

The aerial parts of the plants were washed and dried 60°C for 72 h and ground to obtain small particles (1 mm). Air-dried powdered material was placed into four L Erlenmeyer flasks and two liters of methanol were added for maceration where remained for 72 h. After this period, the extract was separated from the solid material using filter paper (Whatman® number four). The extracts were concentrated using a rotary evaporator (Heidolph Laborota 4000, Germany) at 46°C and at 90 rpm rotation under continuous vacuum until totally evaporation of the solvent. Once the whole solvent was evaporated, extracts were lyophilized using a Heto spywinner lyophilizer.

2.1.4 Selection of the extract with the highest anthelmintic bioactivity

The extracts of the four plants were *in vitro* evaluated to identify the one with the highest activity. The *T. filifolia* extract was selected due to its high bioactivity against *H. contortus* eggs and larvae. So, from this point and until the end of the experiment, this research was focused to fractioning and identifying the bio-compounds present in the *T. filifolia* extract.

2.1.5 Bio-guided fractionation of the methanol extract from *T. filifolia*

The *T. filifolia* methanolic extract was fractionated using a silica gel column (100X400 mm, 300 g, 70-230 mesh, Merck, Germany) eluted with dichloromethane and methanol with 10% ascending polarity. Aliquots of 200 mL were collected and samples with a similar TLC profile were integrated in 11 fractions (from TF1- TF11). Due to the differences in terms of their chromatographic pattern bands between fractions, TF5, TF7, TF10 and TF11 fractions, were *in vitro* assessed to identify their egg hatching inhibition and larvicidal activity. The highest ovicidal value was obtained with TF11 and due to its chemical similarity with TF10 both fractions were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to explain the variation between them. Fractions TF11 (1 g) and C2F11 (100 mg) were separated through reverse phase silica gel column (15 g, polygoprep[®] 60-50 C₁₈, Macherey-Nagel, Germany), using water and acetonitrile as eluent and 10% polarity increasing. Aliquots of 50 mL were recovered when TF11 was fractionated, resulted in 15 fractions (from C2F1 to C2F15). When C2F11 was fractionated, aliquots of 5 mL were recovered; from these aliquots, 10 fractions (from C3F1 to C3F10) were obtained. Finally, two fractions (C2F6; 22 mg and C3F2; 18 mg) were selected and these were analysed by ¹H and ¹³C NMR.

2.1.6 Phytochemical identification

2.1.7. Thin layer chromatography analysis of fractions obtained

A qualitative phytochemical screening of *T. filifolia* fractions was performed in silica gel 60 F₂₅₄- pre-coated thin layer chromatography plates using capillary tubes, and run in a TLC chamber using different eluents depending on the kind of compounds we were searching. After the TLC plates were run, the plates were dried and observed under ultraviolet light at both 254 nm and 365 nm wavelengths. Plates were soaked in developers for flavonoids or terpenoids (Ceric Sulphate). Finally, the plates were dried on a hot stirrer in order to visualize the coloured bands corresponding to the obtained compounds. Bands were identified by comparison with their corresponding colorimetric controls [21].

2.1.8 High Performance Liquid Chromatography analysis of fractions

The high performance liquid chromatography analysis was set on a Waters liquid chromatography system, equipped with a separation module system (Waters 2695) on a photodiode array detector (Water 2996), employing Empower Pro software. Separation was carrying out using a reverse phase column RP-18 supelcosil (SUPELCO, 250 x 4.6 mm; 5 µm). Mobile phase (flow rate 0.9 mL/min) consisted on a mixture of trifluoroacetic acid solution (0.5% solvent A) and acetonitrile (solvent B) with the following ratios: 0-1 min, 0% B; 2-3 min 5% B; 4-20 min 30% B; 21-23 min, 50% B; 24-25 min, 80% B; 26-27 min, 100% B and 28-30 min 0% B. The chromatography time was 30 min. The detection wavelength was scanned at 190-600 nm and the flavonoid analysis was carrying out at 350 nm.

2.1.9 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy analysis

NMR spectra of the compounds was analysed using a Bruker Fourier 300 MHz for ¹H and ¹³C. Chemical compound shifts were recorded in parts per million (ppm) using tetramethylsilane (TMS) as an internal control and using different deuterated solvents (CD₃OD, D₂O).

2.1.10 Parasitological techniques

2.1.11 *Haemonchus contortus* infective larvae (L₃) and eggs obtaining

Infective larvae (L₃) were obtained from a Pelibuey sheep egg-donor with a mono-specific infection, which was housed followed by the care/welfare and non-unnecessary suffering standard regulations of the Mexican Official Rule NOM-051-ZOO-1995. Faeces were collected into a plastic bowl and were processed to elaborate faecal cultures [22]. Larvae were recovered by Baermann funnel technique [23] and parasite eggs recovery by distillate weather washes [24].

2.1.12 Assessing lethal activity of methanolic extract of plants against *H. contortus* infective larvae (L₃)

The assay was performed using a 96 well micro-titration plate. Two hundred *H. contortus* L₃ contained into 10 µL of water and 90 µL of solubilized extract (in PBS, pH 7.4) were deposited into each well (100 µL final volume) (n=3). From the crude extract, 6 concentrations (30, 60, 90, 120, 150 and 200 mg/mL) and 2 concentrations of each

fraction (15 and 30 mg/mL) were tested. Plates were kept at 22 °C for 72 h into a wet chamber. After confrontation period, live and dead larvae were counted into ten-5 µL aliquot-drops.

2.1.13 Egg hatching inhibition assay

Five concentrations of crude extracts (1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg/mL) (n=4) and five concentrations corresponding to the selected fractions (4000, 2000, 1000, 500 and 250 µg/mL) were evaluated. Plates were maintained at 22 °C for 48 h in a wet chamber. After the incubation period, 5 µL of Lugol were added to each well to stop the egg hatching. Both, first stage larvae (L₁) and eggs were counted into each well. Each assay considered distilled water as a negative control.

2.2 Statistical analysis

Anthelmintic variables, mortality and hatching larvae were analyzed as the index [25]:

$$\text{Mortality/hatching inhibition} = \frac{\bar{Y}_{\text{Control}} - \bar{Y}_{\text{Treated}}}{\bar{Y}_{\text{Control}}} \times 100$$

Were:

\bar{Y}_{Control} = Mean of alive larvae (L₃) or larvae that succeed in hatching process in Control group.

\bar{Y}_{Treated} = Mean of alive larvae (L₃) or larvae that succeed in hatching process in Treated group.

A completely randomized design with factorial arrangement 4x6 (4 plants and 6 concentrations) was used to assess larvae mortality and with only 5 concentrations to assess the egg hatching inhibition. The LC₅₀ values were calculated using a PROBIT procedure determining the concentration of plant extracts resulting in 50% larvae mortality or egg hatching inhibition, compared with an untreated group. Data were analysed using the PROC GLM of SAS [26]. A normality test indicated lack of normality of data including mortality and egg hatching inhibition parameters. So, the $\arcsin(\sqrt{X_{ij}})$ transformation was performed. A multiple mean comparison of Tukey was performed.

2.3 RESULTS

2.3.1 Methanol plant extracts yield and *Haemonchus contortus* larval mortality by effect of organic extracts

Plant extract yields were 21.3, 7.0, 10.6 and 10.0% to *T. filifolia*, *A. mexicana*, *T. officinale* and *R. chalepensis*, respectively.

The *in vitro* mortality of *H. contortus* infective larvae caused by methanolic extracts of the four assessed plants is shown in Cuadro 4. *Argemone mexicana*, *T. officinale*, and *R. chalepensis* (30, 60, 90, 120, 150 y 200 mg) extracts, showed a moderate activity against *H. contortus* infective larvae, regardless the concentration tested ($p < 0.05$). However *T. filifolia* showed the highest lethal effect (89%) at 200 mg/mL ($p < 0.05$). The statistical analysis revealed that plant species and concentration; as well as the interaction between them had a significant effect in the larvae mortality assay ($p < 0.05$).

2.3.2 Egg hatching inhibition test

The activities of the four methanolic extracts against eggs of the parasite are shown in Cuadro 5. *Argemone mexicana* and *T. officinale* did not show any important lethal activity against eggs. The activity of *T. filifolia* had dose dependent activity showed a 99% of mortality at 10 mg/mL, similarly high egg hatching inhibition effect was observed with *R. chalepensis* extract from 90 at 100% in all the evaluated concentrations.

Both *T. filifolia* and *R. chalepensis* extracts showed a high effect in the egg hatching inhibition assay. However, *R. chalepensis* showed a low larvicidal activity in all the concentrations. In contrast, *T. filifolia* extract showed not only an important activity against eggs, but also showed a high larvicidal activity (84-89% mortality). So, based on these results, authors decided to continue the study focused to identify the bioactive compounds from this extract.

2.3.3 *Tagetes filifolia* fractions activity against *Haemonchus contortus* (L3) and egg hatching inhibition.

The *T. filifolia* fractions did not have any important lethal activity against *H. contortus* (L₃) at 15 and 30 mg/mL ($p > 0.05$).

Effects of *T. filifolia* fractions (TF5, TF7, TF10 and TF11) on the egg hatching inhibition are shown in Cuadro 6. TF11 fraction was found most active, showing 79% egg hatching inhibition and it also shown to be dose dependent.

2.3.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analyses

The HPLC fingerprints of chromatograms from the *T. filifolia* methanolic fractions, TF10 and TF11 fractions and compounds 1, 2 and 3 are shown in Figura 10. TF10 and TF11 fractions showed the presence of quercetagitrin (1, 9.02 min). Additionally, methyl-chlorogenate (3, 8.9 min), chlorogenic acid (2, 8.8 min) and another (non-identified) chlorogenic acid analogue, were found in the same fraction.

2.3.5 *Haemonchus contortus* egg hatching inhibition attributed to quercetagitrin, methyl-chlorogenate and chlorogenic acid (sigma®)

Results of the evaluation of the *H. contortus* egg hatching inhibition using quercetagitrin, chlorogenic acid and methyl-chlorogenate are shown in Cuadro 7.

2.3.6 Chemical characterization of metabolites obtained from *Tagetes filifolia* methanolic extract

2.3.7. Quercetagitrin

The C2F6 sub-fraction obtained from TF11 fraction through reverse phase chromatographic fractioning appeared as a yellow precipitate and after being revalled with reagents specific for flavonoids it turned orange. In the UV-vis spectroscopy showed λ_{max} : 214, 260 and 357 nm. On the other hand, the ¹H NMR spectrum showed two spin systems for aromatic rings, an ABX [δ 7.73 (d, $J = 2.1$ Hz), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz) and 7.63 (dd $J = 8.7, 2.1$)] assigned to an H-2', H-5' and H-6', respectively. Also an A penta system substituted in δ 6.88 (s) assigned to an H-8, which indicated the presence of three hydroxyls in this ring; additionally a doublet signal δ 5.02 with a constant attachment in 6.9 Hz which is assigned to a H1'' from an anomeric hydrogen from an hexose sugar that is attached to a double/double signal in δ 3.42 with $J = 6.9$ and 9 Hz. This procedure is used for determining every one of values, which are shown in Cuadro 8. Compared with data in the literature reports this compound corresponds to a flavonol glucose attached at seventh position (Figura 11A) which is

called quercetagitrin (**1**), this metabolite has been previously reported in other species i.e., *T. mendocina* [27] and *T. maxima* [28].

2.3.8 Methyl-chlorogenate

This compound was identified due to the presence of a signal at δ 54.65 carbon which is assigned to OCH₃. After comparing the data from ¹H and ¹³C NMR obtained with those described in the literature, this molecule corresponds to methyl-chlorogenate (Figura 11B) (**3**) [29]. Additionally the ¹H NMR spectrum analyses showed the presence of signals of an ABX aromatic spin system: a double bond in δ 6.26 and 7.55 with a J= 15.9 Hz for transposition united to the aromatic ring. The analysis detected the presence of caffeic acid and quinic acid (esterified compounds).

2.4 DISCUSSION

In this study there is evidence about the *T. filifolia* methanolic extract obtained from aerial parts of this plant possesses bio-active compounds against *H. contortus* either eggs or infective larvae. From the assessed fractions of *T. filifolia* three important metabolites were identified as quercetagitrin, methyl-chlorogenate and chlorogenic acid. When these compounds were evaluated as pure molecules, only chlorogenic acid showed a high activity against *H. contortus* eggs. Such compound has been identified in the plant *Xantium strumarium* and an important anti-microbial activity has been reported [30]. This compound belongs to the group of polyphenols, which together with other compounds i.e. curcumin, caffeic acid, and ferulic acid possesses a mice skin cancer tumor inhibitory effect [31]. In some studies about secondary metabolites produced by plant roots, polyphenol compounds have been identified which include chlorogenic acid, dicaffeoylquinic acid and caffeic acid [32]. The chlorogenic acid, identified in *T. filifolia* in the present study, has also been found in other plants i.e., *Achyranthes aspera* that has been reported with in vitro nematocidal activity against the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* [33]. Chlorogenic acid has been associated to certain kind of plant resistance against phyto-parasitic nematodes affecting the root system of several resistant crops [34, 35]. The chlorogenic acid evaluated in the present study showed a high egg-hatching inhibitory

activity against *H. contortus*, but there are not scientific information regarding a nematicidal activity of this compound against none parasite affecting animals. So, this could be the first record of nematicidal activity of this compound against *H. contortus*. It is important to establish if this compound is non-harmful for animals and also if does not have any negative effect against non-blank beneficial microorganisms in the soil.

Regarding the methanolic extract of *R. chalepensis*, the larval mortality was also moderate (28.5%, $p < 0.05$); however, when the egg hatching inhibitory effect was tested a very high activity (close to 100%) was recorded. This result encourages the study of this extract, and it is possible that secondary metabolites obtained from this plant could have a potential activity as an ovicidal product. On the other hand, the *A. mexicana* methanolic extract from aerial parts of the plant possesses a moderate *in vitro* larvicidal activity (36.6%) against *H. contortus* (L₃) after 72 h at the highest concentration used. It is important to remark that the extract used in this study was only a crude extract; it could be possible that the obtention of bio-compounds using other extraction methods; as well as other organic solvents or even other parts of the plant; result in fractions with a higher nematicidal activity.

The lowest effect against eggs or larvae of the parasite was recorded with *T. officinale* methanolic extract. There are so far, no reports about the possible nematocidal activity of *T. officinale* against animal parasitic nematodes; and the only nematocidal activity of this plant has been reported against phytoparasitic nematodes. A discrete activity against nematodes of importance in agricultural crops in tomato plants affected by *Meloidogyne arenaria* has been observed, showed a range between 14-30% egg hatching inhibition using water extracts [36].

This study showed evidence about a high nematicidal activity of chlorogenic acid against *H. contortus* and might establish the basis for further studies focused to search for an alternative method of control of gastro-intestinal parasitic nematodes of economic importance in ruminants.

2.5 CONCLUSIONS

The mortality activity showed by the *T. filifolia* methanolic extract (89%) was the key of interest to deeply explore about the responsible compound of the activity, and on this

way, was possible identified the chlorogenic acid. Chlorogenic acid (**3**) obtained from *T. filifolia* methanolic extract resulted with 100% *H. contortus* *in vitro* egg hatching inhibition effect. Other two compounds, quercetagitrin (**1**) and methyl-chlorogenate (**2**) without anthelmintic activities were identified in the same fraction. The present research shown an important effect of the chlorogenic acid obtained from *T. filifolia* with a high *in vitro* ovicidal activity against *H. contortus*.

2.6 REFERENCES

- [1] M. Saminathan, A. Gopalakrishnan, A. Latchumikanthan, A.A.P. Milton, M. Aravind, K. Dhama, R. Singh, Histopathological and Parasitological Study of Blood-Sucking *Haemonchus contortus* Infection in Sheep. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3 (2015) 99-108.
- [2] G.R. González, P.C. Córdova, H.G. Torres, G.P. Mendoza, G.J. Arece, Prevalencia de Parásitos Gastrointestinales en Ovinos Sacrificados en un Rastro de Tabasco, México. *Rev. Vet. Méx*, 42 (2011) 125-135.
- [3] M.F. Qamar, A. Maqbool, N. Ahmad, Economic losses due to *Haemonchus contortus* in sheep and goats. *Sci. Int. Lahore*, 23(2011) 321-324.
- [4] O.S. Anziani, C.A. Fiel, Resistencia a los antihelmínticos en nematodos que parasitan a los rumiantes en la Argentina; *RIA*. 41(2015) 34-46.
- [5] S. Irum, H. Ahmed, M. Mukhtar, M. Mushtaq, B. Mirza, K. Donskow-Lysoniewska, M. Qayyum, S. Simsek, Anthelmintic activity of *Artemisia vestita* Wall ex DC. and *Artemisia maritime* L. against *Haemonchus contortus* from sheep. *J Vet Parasitol*, 212(2015) 451-455.
- [6] A.J. Galindo-Barboza, J.F.J. Torres-Acosta, R. Cámara-Sarmiento, C.A. Sandoval-Castro, A.J. Aguilar-Caballero, N.F. Ojeda-Robertos, R. Reyes-Ramírez, E. España-España, Persistence of the efficacy of Copper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol*, 176(2011) 201-207.
- [7] J.M. Alunda, M. Cuquerella, F.E. Mohamed, Primera vacuna recombinante frente a la haemoncosis ovina. Oficina de transferencia de resultados de investigación- Universidad Complutense de Madrid. C/ Donoso Cortés, 65 (2013). 28015 Madrid. www.ucm.es/info/otri.
- [8] P. Medina, F. Guevara, M. La O, N. Ojeda, E. Reyes, Resistencia antihelmíntica en ovinos: una revisión de informes del sureste de México y alternativas disponibles para el control de nematodos gastrointestinales. *Rev. Pastos y Forrajes*, 37 (2014) 257-263.
- [9] M.E. Da-Silva, B.F. Ribeiro, P. Mendoza de Gives, M.A.M. Uriostegui, M. Reyes, S.F.E. de Freitas, M.L. de Carvalho, B.F. Rodríguez, J.V. de Araújo, Efficacy of *Clonostachys rosea* and *Duddingtonia flagrans* in reducing the *Haemonchus contortus* infective larvae, *BoiMed Res Int*, Vol 2015 (2015) <http://dx.doi.org/10.1155/2015/474879>.
- [10] P.A. Bricarello, A.F.T., Amarante, R.A. Rocha, S.L. Cabral-Filho, J.F. Huntley, J.G.M. Houldijk, A.L. Abdalla, S.M. Gennari, Influence of dietary protein supply

- on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines Lambs. *Vet Parasitol* 134(2005) 99-109.
- [11] M. Atlija, J.J. Arranz, M. Martínez-Valladares, B. Gutiérrez-Gil, Detection and replication of QTL underlying resistance to gastrointestinal nematodes in adult sheep using the ovine 50K SNP array. *Genet. Sel. Evol.*, 48 (2016) 4. DOI 10.1186/s 12711-016-0182-4.
- [12] A.R. Dey, S. Akther, S. Hossain, T.R. Dey, N. Begum, *In vitro* Anthelmintic Effect of some Medicinal Plants against *Haemonchus contortus*. *J. Anim. Sci. Adv.*,5(2015) 1162-1170. DOI: 10.5455/jasa.20141230103624.
- [13] G. Brahmachari, D. Gorai, R. Roy. *Argemone Mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Brazilian J. Pharm.* 23(2013) 559-575.
- [14] Y. Bais, S.B. Chaudhari, S. Belani, A.R. Umkar, Evaluation of antimicrobial activity of plant leaf *Argemone mexicana*. *J. Pharm. Bio. Sci.*, 3 (2013) 41-45.
- [15] S.S. Shaukat, I.A. Siddiqui, H.G. Khan, M.J. Zaki, Nematicidal and allelopathic potential of *Argemone mexicana*, a tropical weed. *Plant Soil*, 245 (2002) 239-247.
- [16] I. Marotti, M. Marotti, R. Piccaglia, A. Nastri, S. Grandi, G. Dinelli, Thiophene occurrence in different *Tagetes* species: agricultural biomasses as sources of biocidal substances. *J. Sci. Food Agric.*, 90 (2010) 1210-1217.
- [17] P.J.S. Barajas, B.R. Montes, A.F. Castrejón, M.H.E. Flores M.A. Serrato-Cruz, Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Rev. Mex. Micol.*, 34 (2011) 85-91.
- [18] K.K. Ghaima, N.M. Hashim, A.S. Ali Hashim, Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *J. applied Pharm. Sci.*, 3 (2013) 096-099.
- [19] A.C. Grigorjev, N.Y. Brizuela, Efectos de *Ruda* spp sobre la actividad del músculo liso gastrointestinal aislado de rata. *Rev. Fac. Cien. Méd.*, 67 (2010) 73-76. <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/med>.
- [20] O. Quevedo, R. Crozzoli, G. Perichi, Uso de los extractos acuosos de las plantas para el control de *Meloidogyne enterolobii* (nematoda: Tylenchida). *Fitopatol. Venez.*, 23 (2010) 45-53.
- [21] E. von Son-de Fernex, M.A. Alonso-Díaz, P. Mendoza-de Gives, B. Valles-de la Mora, M. Gonzáles-Cortazar, A. Zamilpa. C.G. Epigmenio, Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generate to eggs of *Cooperia* spp. *Vet. Parasitol.*, (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.005>.
- [22] J. Palacios-Landín, P. Mendoza de Gives, D.O. Salinas-Sánchez, M.E. López-Arellano, E. Liebano-Hernández, V.M. Hernández-Velázquez, M.G. Valladares-Cisneros. *In vitro* and *in vivo* Nematicidal Activity of *Allium sativum* and *Tagetes erecta* extracts against *Haemonchus contortus*. *Türkiye Parazitoloji Dernegi*, 39 (2015) 260-264.
- [23] FAO. Evaluación de los recursos forestales mundiales, Informe principal www.fao.org/docrep/013/i1757s/i1757s; 2010 [accessed 14.05.14]-

- [24] M. Adamu, V. Naido, J.N. Eloft, Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in Ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *Vet. Res.*, 9 (2013) 38.
- [25] L. Aguilar-Marcelino, Microorganismos con uso potencial contra el nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis doctoral, Colegio de Postgraduados, Campus montecillo, Texcoco, Estado de México, México 2012.
- [26] SAS Institute. The SAS System for Windows. Version 9.1. SAS Institute. Inc. Cary, N. C. USA. 1999.
- [27] G. Schmeda-Hirschmann, T.A. Tapia, C. Theoduloz, J. Rodríguez, S. López, F.G. Egly, Free Radical Scavengers and Antioxidants from *Tagetes mendocina*. *Free Radic. Res.* 56 (2004) 227-232.
- [28] I. Parejo, J. Bastida, F. Viladomat, C. Codina, Acylated quercetagenin glycosides with antioxidant activity from *Tagetes maxima*. *J. Phytochem.*, 66 (2005) 2356-2362.
- [29] O. Demirkiran, M.A. Mesaik, H. Beynek, A. Abbaskan, M.I. Choudhary Immunosuppressive phenolic constituents from *Hypericum montbretii* spach. *Rec. Nat. Prod.*, 7 (2013) 201-219.
- [30] R. Scherer, H.T. Godoy. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. *Rev. Bras. Pi. Med.*, Campinas, 16 (2014) 41-46.
- [31] M.T. Huang, C.R. Smart, C.Q. Wong, H.A. Conney. Inhibitory Effect of Curcumin, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Ferulic Acid on Tumor Promotion in Mouse Skin by 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, 48 (1988) 5941-5946.
- [32] A.A. Bacetty, M.E. Snook, A.E. Glenn, J.P. Noe, N. Hill, A. Culbreath, P. Timper, P. Nagabhyru, C.W. Bacon, Toxicity of Endophyte-Infected Tall Fescue Alkaloids and Grass Metabolites on *Pratylenchus scribneri*. *J. Phytopathol.*, 99 (2009) 1336-1345.
- [33] R. Ndhlala, A. Ghebrehiwot, M.H. Ncube, B. Aremu, O.A. Gruz, J. Subrtova, et al. Antimicrobial, anthelmintic activities and characterisation of functional phenolic acids of *Achyranthes aspera* Linn. A Medicinal plant used for the treatment of wounds and ringworm in East Africa. *Front. Pharmacol.*, 6 (2015) 274.
- [34] N. Wuys, G. Lognay, M. Verscheure, M. Marlier, D. De Waele, R. Swennen, Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* In roots of susceptible and resistance banana (*Musa* spp.) *Plant Pathol.*, 56 (2007) 878- 890.
- [35] K. Davies, Y. Spiegel, Biological control of plant-parasitic nematodes: Building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms, Springer Science & Business Media, 11 (2011) DOI: 10.1007/978-1-4020-9648-8.
- [36] G. Aydinli, S. Mennan, Effect of some plant extracts on *Meloidogyne arenaria* Neal, 1889 (Tylenchida: Meloidogynidae) and tomato. *Türk. Entomol. Derg*, 38 (2014) 323-332.

Cuadro 3 Name, origin, data of collection and voucher code reference of four plants used to obtain methanolic extracts/fractions with potential nematicidal activity against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae

Plant	Origin	Date of collection	Voucher code
<i>Argemone mexicana</i>	Texcoco Municipality, State of Mexico, Mexico	October, 2013	(2055)
<i>Taraxacum officinale</i>	Texcoco Municipality State of Mexico, Mexico	October, 2013	(2057)
<i>Tagetes filifolia</i>	Chamilpa Municipality, Cuernavaca City, State of Morelos, Mexico	October, 2013	(2056)
<i>Ruta chalepensis</i>	Villa García Municipality, State of Zacatecas, Mexico	January, 2014	(2076)

Cuadro 4 *In vitro* mortality (mean \pm SE, %) of *Haemonchus contortus* (L₃) exposed to methanolic extracts obtained from aerial parts of four selected plants

Plant	Concentration mg/mL											
	30		60		90		120		150		200	
	Mean	Mortality	Mean	Mortality	Mean	Mortality	Mean	Mortality	Mean	Mortality	Mean	Mortality
<i>A. mexicana</i>	4 \pm 1	2 ^a	4 \pm 1	2 ^a	18 \pm 4	11 ^a	44 \pm 5	17 ^a	58 \pm 11	26 ^a	80 \pm 4	36 ^{ab}
<i>T. officinale</i>	1 \pm 1	0 ^a	4 \pm 2	1 ^a	13 \pm 3	5 ^a	27 \pm 2	12 ^a	38 \pm 4	19 ^a	59 \pm 12	23 ^a
<i>T. filifolia</i>	3 \pm 2	2 ^a	14 \pm 2	8 ^a	54 \pm 9	29 ^{bc}	83 \pm 9	48 ^b	132 \pm 17	84 ^b	124 \pm 5	89 ^c
<i>R. chalepensis</i>	43 \pm 4	17 ^b	44 \pm 10	17 ^{ab}	60 \pm 5	19 ^{ab}	52 \pm 11	23 ^a	57 \pm 3	22 ^a	76 \pm 5	28 ^a
Plant												<0.0001
Concentration												<0.0001
Plant*Concentration												<0.0001

Different letters in column, indicate the existence of statistical difference ($p < 0.05$)

Cuadro 5 Egg hatching inhibition of *Haemonchus contortus*, exposed to the action of methanol extracts to four selected plants at different concentrations expressed as means \pm standard error and percentages

Plant	Concentration (mg/mL)									
	1.25		2.5		5		10		20	
	Mean	Egg Inhibition	Mean	Egg Inhibition	Mean	Egg Inhibition	Mean	Egg Inhibition	Mean	Egg Inhibition
<i>A. mexicana</i>	16 \pm 3	5 ^a	10 \pm 2	2 ^a	20 \pm 2	9 ^a	14 \pm 1	4 ^a	28 \pm 1	13 ^a
<i>T. officinale</i>	12 \pm 5	5 ^a	23 \pm 12	19 ^a	56 \pm 27	41 ^a	58 \pm 9	36 ^a	28 \pm 5	17 ^a
<i>T. filifolia</i>	40 \pm 6	27 ^a	52 \pm 7	38 ^{ab}	84 \pm 4	72 ^{ab}	109 \pm 2	99 ^b	140 \pm 7	99 ^b
<i>R. halepensis</i>	80 \pm 4	90 ^b	104 \pm 14	97 ^c	144 \pm 10	97 ^{bc}	154 \pm 4	100 ^b	141 \pm 10	100 ^b
Plant	<0.0001									
Concentration	<0.0001									
Plant*Concentration	<0.0001									

* Different letters in column, indicate the existence of statistical difference ($p < 0.05$)

Cuadro 6 Ovicidal activity of four fractions from the *Tagetes filifolia* methanolic extract after 48 hours of interaction expressed as means \pm standard error and percentage.

Fraction	concentration $\mu\text{g/mL}$									
	250		500		1000		2000		4000	
	Mean	egg inhibition	Mean	egg inhibition	Mean	egg inhibition	Mean	egg inhibition	Mean	egg inhibition
TF5	69 \pm 5	28 ^a	79 \pm 4	29 ^a	76 \pm 8	23 ^a	59 \pm 9	25 ^a	86 \pm 2	30 ^a
TF7	80 \pm 20	23 ^a	83 \pm 15	26 ^a	97 \pm 21	28 ^a	129 \pm 10	39 ^a	99 \pm 10	26 ^a
TF10	73 \pm 8	23 ^a	72 \pm 6	24 ^a	81 \pm 7	27 ^a	104 \pm 18	37 ^a	65 \pm 12	27 ^a
TF11	87 \pm 10	26 ^a	85 \pm 27	28 ^a	160 \pm 50	48 ^{ab}	162 \pm 22	57 ^{ab}	258 \pm 16	76 ^b
Fraction	<0.0001									
Concentration	<0.0001									
Fraction*concentration	<0.0001									

Different letters in column, indicate the existence of statistical difference ($p < 0.05$)

Cuadro 7 Ovicidal activity of chlorogenic acid, quercetagitrin and methyl-chlorogenate, compounds obtained from a *Tagetes filifolia* methanolic extract and ivermectin at different concentrations after 48 hours incubation expressed as means \pm standard error and percentages

Compound	Concentration $\mu\text{g/mL}$									
	125		250		500		1000		2000	
	Mean	egg inhibition	Mean	egg inhibition	Mean	egg inhibition	Mean	egg inhibition	Mean	egg inhibition
Chlorogenic acid	8 \pm 2	4 ^a	23 \pm 2	22 ^b	81 \pm 23	100 ^b	102 \pm 3	100 ^c	131 \pm 22	100 ^b
Methyl-chlorogenate	8 \pm 1	3 ^a	11 \pm 3	5 ^a	11 \pm 2.5	5 ^a	17 \pm 4	10 ^a	18 \pm 8	8 ^a
Quercetagitrin	26 \pm 4	14 ^{ab}	24 \pm 3	10 ^a	24 \pm 1	14 ^a	25 \pm 3	14 ^a	18 \pm 1	8 ^a
Compound	<0.0001									
Concentration	<0.0001									
Compound*concentration	<0.0001									

Different letters in column, indicate the existence of statistical difference ($p < 0.05$)

Cuadro 8 ^1H and ^{13}C NMR data of Quercetagitrin (1, 300 and 75 MHz, CD_3OD)

Position	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
2	7.73 d (2.1)	150.28
3	—	130.28
4	—	177.47
5	6.85 d (8.7)	146.73
6	7.63 dd (8.7, 2.1)	137.19
7	—	152.81
8	6.90 s	95.27
9	—	148.89
10	—	106.58
1'	—	124.08
2'	—	116.19
3'	—	146.17
4'	—	148.89
5'	—	116.19
6'	—	121.9
Glucopiranos		
1	5.02 d (6.9)	102.61
2	3.58 dd (6.9, 9)	74.68
3	3.42 dd (8.7, 8.7)	77.44
4	3.57 m	71.36
5	3.57 m	78.5
6a	3.96 dd (12, 1.5)	62.48
b	3.72 dd (12, 6)	

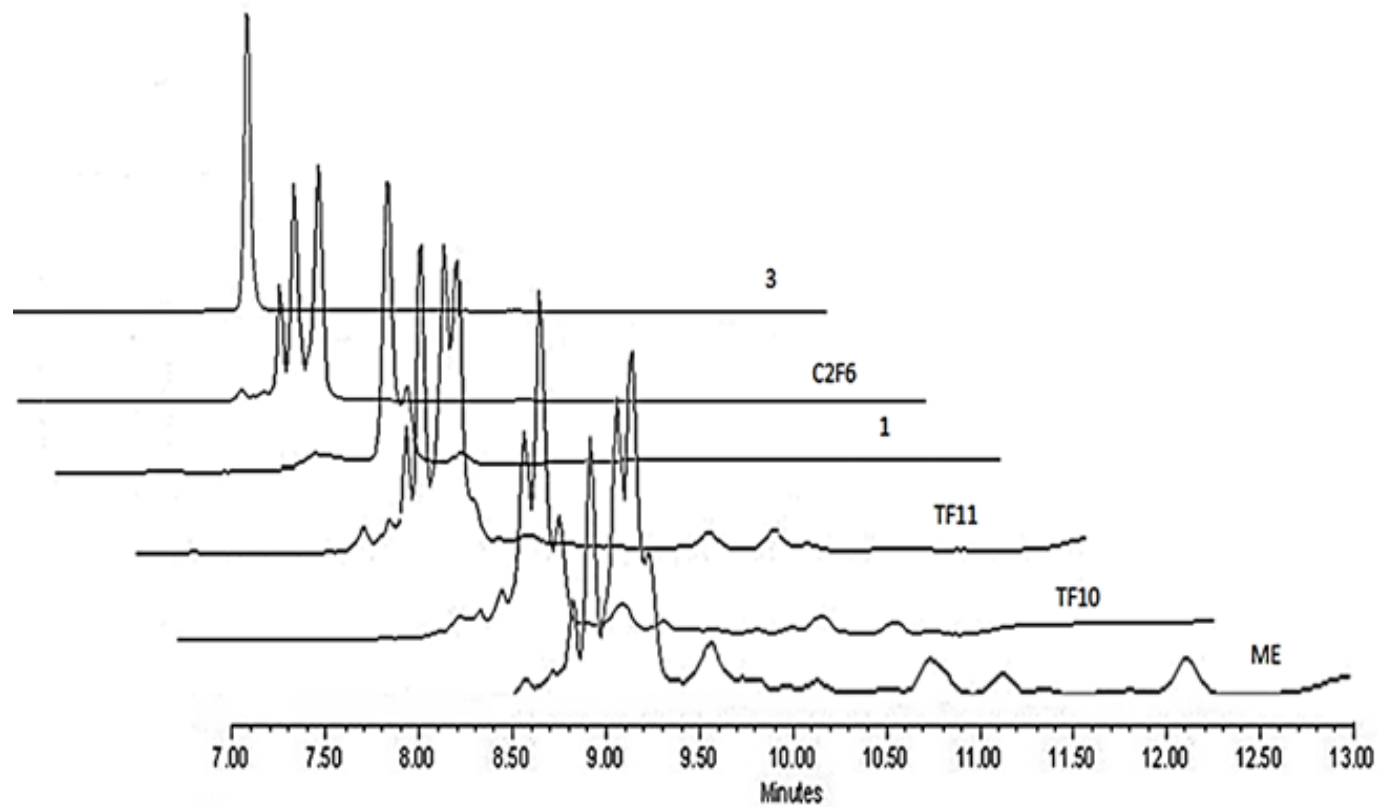


Figura 10. HPLC Chromatogram of methanolic extract of *Tagetes filifolia* (ME), fraction TF10, fraction Tf11, Quercetagitrin (1), Chlorogenic acid mix: Chlorogenic acid, Methyl-chlorogenate (C2F6) and chlorogenic acid (3) (sigma®).

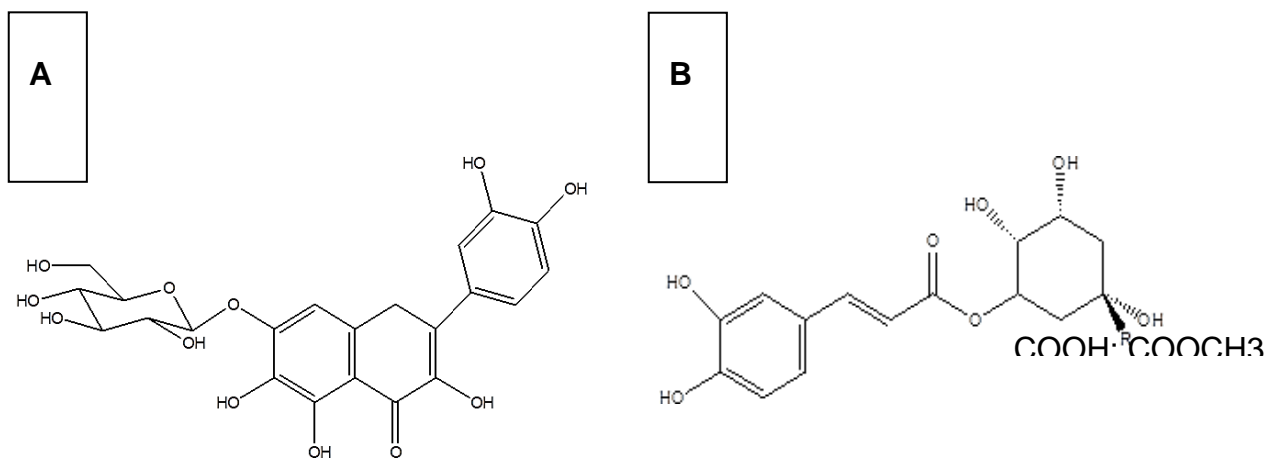


Figura 11. Molecular structure of *Tagetes filifolia* methanolic extract compounds: Figure 11A corresponds to Quercetagitrin (Compound 1); Figure 11B corresponds to Chlorogenic acid (Compound 2). Note: When R= COOH, means that is a chlorogenate acid molecule; when R= COOCH3 means that the molecule is a Methyl-chlorogenate (Compound 3).

CAPITULO III

Evaluación de la actividad larvica y ovica de las fases acuosa y orgánica de tallos y hojas de *Ruta chalepensis* contra *Haemonchus contortus*

Assessing the larvicidal and ovicidal activity of the aqueous and organic phases obtained from *R. chalepensis* leaves and stems

ABSTRACT

Haemonchus contortus is one of the most pathogenic parasites affecting sheep and it is considered as the widest spreading nematode either in sheep and goats all over the world. The most common method of control of this parasite is the regular administration of chemical anthelmintic drugs in the flocks; although, the inappropriate use of these drugs and the rapid genetic adaptation of the parasites to overcome the lethal effect of such compounds has triggered an imminent presence of anthelmintic resistance (AR). The traditional medicine is a widely spread practice in Mexico where, since ancient times and it has being used to treat a number of diseases including gastrointestinal parasitosis. The plant *Ruta chalepensis* possesses compounds with different bio-activities such as repellent, insecticide, nematicide among others. The objective of this research was to assess the larvicidal and ovicidal activity of the aqueous and organic phases obtained from *R. chalepensis* leaves and stems. The whole plant extract was assessed against *H. contortus* eggs (at 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 mg/mL) and against larvae (at 30, 60, 90, 120, 150 and 200 mg/mL) at 28°C for 48 and 72 h respectively. After that the aqueous extract was partitioned using Ethyl acetate. Both the aqueous and the organic phases were assessed using an egg hatching inhibition tests (EHIT) at 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 mg/mL at 28°C for 48 h. The assessment criterion was based on the larval mortality percentage after 72 h post-confrontation and the EHIT was assessed at 48 h post-confrontation.

A completely random design with a general lineal model (PROC GLM) and a Tukey means comparison test was used. The whole plant extract caused 74% larval mortality at 200 mg/mL ($p < 0.05$) and 96 and 100% EHIT at 10 and 20 mg/mL; respectively. The aqueous partition showed a dose reverse activity; the highest EHIT percentage was 78.5% at 2.5 mg/mL. The organic phase caused 100% EHIT at most of the assessed concentrations. The results indicate that the *R. chalepensis* aqueous extract possess compounds with anthelmintic activity. Also, most of compounds are concentrated in the organic phase, which it confers ovicidal activities even in low concentrations.

RESUMEN

Haemonchus contortus es el parásito de ovinos más patógeno y de mayor distribución en los rebaños ovinos y caprinos del mundo. El método de control más difundido ha sido el uso de antihelmínticos químicos; sin embargo, el uso irracional ha generado cepas de nematodos resistentes a su fórmula activa. La herbolaria es una práctica ampliamente difundida en México para el tratamiento de gran variedad de padecimientos, como son parásitos gastrointestinales. *Ruta chalepensis* posee compuestos con actividades variadas como; repelente, insecticida, nematicida, entre otras. El objetivo del estudio fue evaluar la actividad larvicida y ovicida del extracto acuoso íntegro y ovicida de las fases acuosa y orgánica de *R. chalepensis*. El extracto íntegro se evaluó contra huevos a 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/mL y larvas (30, 60, 90, 120, 150 y 200 mg/mL) a 28°C por 48 y 72 h respectivamente. Posteriormente el extracto acuoso se particionó con acetato de etilo. La fase acuosa y orgánica fueron evaluadas en un ensayo de inhibición de la eclosión a 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/mL a 28°C por 48 h. El criterio de evaluación se basó en el porcentaje de mortalidad larval a las 72 h y la inhibición de la eclosión de huevos a las 48 h posconfrontación. Se utilizó un diseño completamente al azar con un modelo lineal general (PROC GLM) y una prueba de comparación de medias de Tukey. El extracto íntegro provocó 74% de mortalidad larval a 200 mg/mL ($p < 0.05$) y 96 y 100% de inhibición de la eclosión a 10 y 20 mg/mL; respectivamente. La partición acuosa mostró una actividad inversa a la dosis; el mayor porcentaje de inhibición (78.5%) se observó con 2.5 mg/mL. La fase orgánica provocó 100% de inhibición de la eclosión en prácticamente todas las concentraciones evaluadas. Los resultados obtenidos indican que el extracto acuoso de *R. chalepensis* posee compuestos con actividad antihelmíntica y que la mayor parte de estos se concentra en la fase orgánica, lo que le confiere actividad ovicida aun en bajas concentraciones.

3.1 INTRODUCCIÓN

Los nematodos gastrointestinales son uno de los principales problemas que afectan al ganado, cuando se encuentran en sistemas de pastoreo (Moya y Escudero, 2015). *Haemonchus contortus* es uno de los nematodos de mayor importancia económica, debido a sus hábitos hematófagos y su alta prolificidad (Saminathan et al., 2015) es por esto que provoca mayores costos de producción, reducción del potencial zootécnico y muerte de los animales infectados (Roeber et al., 2013). Para enfrentar este problema se implementó el uso de antihelmínticos químicos, el primer grupo antihelmíntico disponible en el mercado fueron los benzimidazoles en la década de los años 60 del siglo XX (Medero y Banchemo, 2013); sin embargo, el abuso en el uso de estos productos trajo consecuencias negativas irreversibles, como: aparición de nematodos resistentes a las drogas químicas, permanencia de residuos de antiparasitarios en productos y subproductos de origen animal para el consumo humano, contaminación del ambiente y deterioro de la microfauna benéfica (Atlija et al., 2016). La resistencia de los nematodos contra la mayoría de las drogas está en constante crecimiento, por esta razón, se han explorado otras alternativas que puedan ser utilizadas, dentro de las principales opciones se encuentra, el uso de plantas y extractos de plantas que contienen compuestos bioactivos contra nematodos (Dey et al., 2015). Las plantas medicinales se usan para tratar enfermedades gastrointestinales, los principales metabolitos identificados con propiedades antihelmínticas son los taninos, terpenoides, saponinas y compuestos fenólicos (Castillo-Mitre et al., 2017). En este contexto se ha reportado que el extracto de tallos, hojas y flores de *Ruta chalepensis* posee actividad laxante, antirreumática, vermífuga, antiespasmódica, antiinflamatoria, antimutagénica (Sánchez 2002), antiséptica, repelente (Grigorjeb y Brizuela, 2010); así como biopesticida contra fitonematodos (Quevedo et al., 2010). El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad larvicida y ovicida del extracto acuoso integro de tallos y hojas de *R. chalepensis* así como la actividad ovicida de la partición acuosa y orgánica separada con acetato de etilo contra *H. contortus*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Localización

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), del Instituto Nacional de investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Jiutepec, Morelos, México. La extracción de compuestos de las plantas se realizó en el centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS) en Xochitepec, Morelos, México.

3.2.2 Material vegetal

La colecta de *R. chalepensis* se realizó en un jardín particular en la localidad de La Milpa, Villa García, Zacatecas, México, en abril del 2014. La especie vegetal fue identificada con el número de Boucher 2076.

3.2.3 Método de extracción

La planta se lavó y se secó en una estufa de convección a 60°C por tres días. El material seco se molió para tener partículas del orden de 1 mm. El material molido se depositó en un matraz Erlenmeyer de cuatro L, se le agregó agua destilada hasta aforar a 4 L, se dejó macerando por 24 h. Después de este periodo, el material vegetal se filtró con papel Whatman N° 4. El extracto fue concentrado en un evaporador rotatorio (Heidolph Laborota 4000, Germany) a 50°C con rotación de 90 rpm y vacío constante. Se eliminó el solvente hasta obtener una mezcla densa, la cual se congeló a -80°C y finalmente se liofilizó en un equipo heto spywinner lyophilizer y se mantuvo en la oscuridad a -20°C hasta su uso.

3.2.4 Partición fitoquímica del extracto acuoso usando Acetato de Etilo

El extracto acuoso de *R. chalepensis* fue particionado usando cromatografía líquido-líquido con acetato de etilo (AcO), un solvente inmisible en agua. Se usó en proporción 1:1 y la mezcla se colocó en un embudo de separación de cristal marca Pixier® 2000 mL N° 6400 en forma de pera, se dejó reposar por cinco minutos para permitir la separación entre las fases. Posteriormente se abrió el grifo para recuperar las fases por separado, la fase más densa en este caso fue la acuosa y por lo tanto se recuperó

primero y la menos densa AcO al final. La práctica se realizó en repetidas ocasiones hasta procesar todo el extracto acuoso. Las dos fases se concentraron en un evaporador rotatorio (Heidolph Laborota 4000, Germany). La fase acuosa se concentró a 50°C con rotación de 90 rpm y vacío constante, se eliminó el solvente hasta obtener una mezcla densa, la cual se congeló a -80°C. La fase AcO se concentró a 46 °C con rotación de 90 rpm y vacío constante hasta eliminar por completo el solvente. Finalmente se liofilizaron ambas fases en un equipo heto spywinner lyophilizer y se mantuvieron en la obscuridad a -20°C hasta su uso (García, 2015).

3.2.5 Cromatografía en capa fina

Se realizó un screening fitoquímico de la fase orgánica del extracto acuoso de *R. chalepensis* en placas precubiertas de sílica gel 60 F₂₅₄, se usaron tubos capilares para sembrar la muestra, la placa se desarrolló en una cámara de vidrio con un sistema de baja polaridad (95:5 diclorometano: metanol) para poder observar la mayor cantidad posible de compuestos presentes en la muestra analizada. Después de desarrollada, la placa se secó agitándola ligeramente, una vez seca se observó bajo una luz ultravioleta a 254 nm y 365 nm de longitud de onda en busca de compuestos. Las placas se revelaron con reactivo para flavonoides, Sulfato Sérico y cuatro Hidroxi. Después de revelado las placas se secaron en una platina caliente hasta visualizar las bandas de colores indicadoras de la presencia de compuestos. Los compuestos correspondientes a las bandas de interés fueron identificados por comparación con compuestos puros, aislados o comerciales que presentaran un patrón de colorimetría y desarrollo similar (Von Son-de Fernex et al., 2015).

3.2.6 Técnicas Parasitológicas

3.2.6.1 Obtención de larvas infectantes y huevos de *Haemonchus contortus*

El cordero donador de huevos fue mantenido en una corraleta, siguiendo las regulaciones del cuidado, bienestar y del no sufrimiento animal, regulado por la norma oficial mexicana NOM-051-ZOO-1995. Las larvas infectantes del parásito se obtuvieron de heces de un cordero infectado con 350 L₃ de *H. contortus* por kg PV, las heces se colectaron en un recipiente de plástico por 24 h. Estas fueron trituradas y se hidrataron con agua de la llave y se mezclaron con partículas de hule espuma, el recipiente se

tapó con una malla que permitiera la ventilación y se almacenó en un gabinete a temperatura ambiente por 7 días, cuidando la humedad y la oxigenación del cultivo (Palacios-Landín et al., 2015). Las larvas fueron recuperadas por la técnica del embudo de Baermann (FAO, 2010). Los huevos del nematodo se lavaron en tamices y se centrifugaron por 1 minuto a 3000 rpm con un gradiente de separación, usando solución salina saturada. La porción flotante fue decantada en un tamiz de 37 mm y se lavó repetidamente con agua destilada para retirar los cristales de sal; los huevos se recuperaron del tamiz con ayuda de una pipeta Pasteur y se centrifugaron nuevamente para ser concentrados y cuantificados (Jasso-Díaz et al., 2014).

3.2.6.2 Actividad letal del extracto acuoso íntegro de *R. chalepensis* contra larvas infectantes (L3) de *H. contortus*

El ensayo se realizó en una placa de microtitulación de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 200 larvas L₃ de *H. contortus* contenidas en 10 µL de agua y 90 µL del extracto solubilizado en agua destilada (100 µL volumen final). Se evaluaron seis concentraciones del extracto íntegro (30, 60, 90, 120, 150 y 200 mg/mL) con tres repeticiones por concentración. Las placas experimentales fueron mantenidas a 28°C por 72 h dentro de una cámara de humedad. Después del periodo de confrontación, se cuantificaron larvas vivas y muertas en cada pozo, en diez alícuotas de 5 µL.

3.2.6.3 Inhibición de la eclosión provocada por el extracto íntegro, la fase acuosa y orgánica de *R. chalepensis*

El ensayo de inhibición de la eclosión se realizó en una placa de microtitulación de 96 pozos. En cada pozo se colocaron 100 huevos de *H. contortus* contenidas en 50 µL de agua y 50 µL del extracto solubilizado en agua destilada al doble de la concentración a evaluar (100 µL volumen final), se evaluaron cinco concentraciones de cada tipo de extracto (1.25, 2.5, 5, 10 y 20 mg/mL) y cuatro repeticiones por tratamiento. La placa fue mantenida a 28°C por 48 h en una cámara de humedad. Después del periodo de incubación, se agregaron 5 µL de lugol en cada pozo para detener la eclosión. Tanto larvas en primer estadio (L₁), como huevos fueron cuantificados en cada pozo. En cada experimento se utilizó agua destilada como control negativo.

3.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con una prueba de normalidad, indicando una distribución no normal, por lo que fue necesario hacer una transformación $\arcsin\sqrt{X_{ij}}$.

Los datos transformados fueron analizados con un modelo de efectos fijos completamente al azar con seis tratamientos utilizando el PROC GLM del SAS y una prueba de comparación de medias de Tukey (SAS, 1999).

3.4 RESULTADOS

La mortalidad larval atribuida al efecto del extracto íntegro de tallos y hojas de *R. chalepensis*, se muestran en el Cuadro 9. El extracto acuoso ejerció un bajo efecto nematocida a concentraciones entre 30 y 120 mg ($p < 0.05$), sin embargo, un efecto ascendente en la mortalidad larval proporcional a la concentración del extracto, fue observado a las concentraciones de 150 y 200 mg/mL, logrando valores de mortalidad larval cercanos al 60 al 75%, respectivamente.

Cuadro 9. Mortalidad larval causada por el extracto acuoso íntegro de *Ruta chalepensis* (media \pm error estándar, %)

Concentración mg/mL	M \pm EE	% de mortalidad
30	30 \pm 5	12 ^a
60	44 \pm 7	19 ^a
90	54 \pm 9	23 ^a
120	66 \pm 5	27 ^a
150	131 \pm 12	57 ^b
200	147 \pm 26	75 ^c
Concentración		$p < 0.0001$

*Letras diferentes en columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$)

M= promedio de larvas muertas, EE= Error estándar

Por otra parte, los resultados de la prueba de inhibición de la eclosión, se muestran en el Cuadro 10, se observó un efecto dependiente de la dosis; las concentraciones de 2.5 y 5 mg/mL lograron valores de 41 y 57%; mientras que a 10 y 20 mg/mL se logró una inhibición del 96 y 100%; respectivamente.

Cuadro 10. Inhibición de la eclosión causado por el extracto acuoso íntegro de *R. chalepensis* (media \pm error estándar, %)

Concentración mg/mL	M \pm EE	% de mortalidad
1.25	6 \pm 1	1 ^a
2.5	87 \pm 49	41 ^a
5	122 \pm 50	57 ^a
10	225 \pm 15	96 ^b
20	221 \pm 40	100 ^b
Concentración		p<0.0001

*Letras diferentes en columna indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$)

M= promedio de larvas muertas, EE= Error estándar

Los porcentajes de inhibición de la eclosión utilizando la fase acuosa y orgánica se muestran en el Cuadro 11. El efecto de la fase acuosa fue inesperado; con 1.25 mg/mL se observó 57% de inhibición y al duplicar a 2.5 mg/mL, la inhibición fue del 78%, sin embargo, las concentraciones subsecuentes (5, 10 y 20 mg/mL) mostraron actividad inversa al incremento en la concentración, hasta llegar 20% de inhibición con 20 mg/mL. En cambio la fase orgánica provocó 100% de inhibición en todas las concentraciones evaluadas.

Cuadro 11. Inhibición de la eclosión causado por la fase acuosa y orgánica de *R. chalepensis* (media \pm error estándar, %)

Concentración mg/mL	Fase acuosa		Fase orgánica	
	M \pm EE	Inhibición eclosión	M \pm EE	Inhibición eclosión
1.25	86 \pm 4	57 ^c	108 \pm 9	100 ^a
2.5	111 \pm 9	78 ^b	105 \pm 9	100 ^a
5	79 \pm 4	50 ^c	112 \pm 9	100 ^a
10	80 \pm 22	47 ^c	105 \pm 9	100 ^a
20	60 \pm 7	20 ^d	86 \pm 9	100 ^a

*Letras diferentes en columna y fila indican diferencia estadística ($p \leq 0.05$)

M= promedio de larvas muertas, EE= Error estándar

3.5 DISCUSIÓN

El estudio muestra evidencia de que las estructuras aéreas (tallos y hojas) de *R. chalepensis* poseen compuestos bio-activos contra larvas y huevos del nematodo *H. contortus* bajo condiciones *in vitro*. Resultados similares sobre la actividad nematicida de este tipo de extracto los obtuvo Sánchez (2002) quien observó que el extracto acuoso de las partes aéreas de *Ruta graveolens* provocó un 87% de mortalidad de *Radopholus similis*, un nematodo parásito del banano. Así mismo, Sasanelly (1992) reportó efecto letal del extracto acuoso de *R. graveolens* dependiendo de la dosis y del tiempo de confrontación contra *Xiphinema index*, ya que causó 100% de mortalidad a las 12 h de contacto con el extracto a una concentración del 32%. La mortalidad larval registrada en este estudio a 150 y 200 mg/mL es muy importante; sobre todo si consideramos que se trata de un extracto acuoso íntegro, el cual puede contener gran cantidad de compuestos sin actividad nematicida que pueden ser eliminados al purificar por procesos cromatográficos y al eliminar compuestos no deseables se podría esperar una mortalidad mayor quizá utilizando concentraciones inferiores a las utilizadas con el extracto íntegro (Jasso-Díaz et al., 2017). En el ensayo de inhibición de la eclosión, se observó una respuesta dependiente de la concentración, registrando una inhibición absoluta a 20 mg/mL, este hecho confirma la presencia de compuestos como alcaloides, cumarinas, triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas y esteroides (Barboza et al., 2010) que poseen potencial antihelmíntico en tallos y hojas de *R. chalepensis*.

Por otra parte, la fase acuosa del extracto, mostró un comportamiento diferente; ya que un pico de máxima actividad fue observado al utilizar 2.5 mg/mL. Contrario a lo que se esperaba, no hubo efecto ascendente en la actividad contra huevos del parásito y en contraste concentraciones superiores a los 2.5 mg/mL provocaron la disminución proporcional del efecto en la inhibición de la eclosión de huevos del parásito, observando solo 20% de inhibición de la eclosión al utilizar 20 mg/mL. En cambio la fase orgánica obtenida a partir de la bipartición líquido:líquido con acetato de etilo inhibió 100% la eclosión *in vitro*, de huevos del parásito *H. contortus* con todas las concentraciones evaluadas (1.25, 2.5, 5, 10, y 20 mg/mL). No se tiene una explicación

categoría sobre este fenómeno observado con la fase acuosa de *R. chalepensis*; sin embargo, los resultados de la presente investigación confirman la teoría que otros investigadores han sugerido respecto a que los solventes no polares como el acetato de etilo concentran gran número de sustancias reportadas con potencial nematocida y en este estudio se observó que la fase orgánica tuvo un efecto letal contra huevos en todas las concentraciones evaluadas. Similarmente Akkari et al. (2015) evaluó el aceite esencial de flores y hojas *R. chalepensis* inhibió en un 100% la eclosión de huevos de *H. contortus*, con 1 mg/mL, similar a lo observado en este estudio con fase orgánica, la concentración letal más baja evaluada fue de 1.25 mg/mL. La cromatografía en capa fina de la fase orgánica del extracto reveló la presencia de grupos químicos similares a las cumarinas, posiblemente estos compuestos sean los responsables de la actividad ovicida observada en este estudio.

3.6 CONCLUSIÓN

La fase orgánica obtenida con acetato de etilo del extracto acuoso de tallo y hoja de *R. chalepensis* posee metabolitos del tipo cumarinas, mismas que se cree son las responsables de la actividad ovicida y larvicida observada en el extracto íntegro y en la fase orgánica de dicho extracto. Es necesario realizar la purificación biodirigida de la fase orgánica para identificar la fracción y/o la molécula responsable de la actividad nematocida observada en el extracto acuoso obtenido de tallos y hojas de *R. chalepensis*.

CAPITULO IV

**Actividad Nematicida *in vitro* de extractos metanólicos de plantas Mexicanas
contra larvas del cuarto estadio de *Haemonchus contortus***

ABSTRACT

Haemonchus contortus histotrophic larvae are highly pathogenic as the adult parasitic stage due to its hematophagia habits and their destructive activity of the epithelial cells once they have entered into the abomasum mucosae. The objective of the present chapter was to assess the *in vitro* lethal activity of *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* and *Tagetes filifolia* methanolic extracts against *Haemonchus contortus* histotrophic larvae (L₄). Histotrophic larvae of the parasite were obtained from infective larvae (L₄) which were incubated in 0.1% sacharose, 0.02% bovine seric albumin, red blood cells maintained in a VyM solution and an antibiotic-antifungal solution (100x, Gibco®) and sterile PBS pH 4. Larvae were adapted at 37°C temperature and at 5% CO₂ and 95% air atmosphere to develop from infective to histotrophic larvae. After a 14 days period the presence of histotrophic larvae was confirmed by microscopy. Then, an *in vitro* assay was performed to evaluate the effect of the different plant extracts on the larvae mortality. The assay was performed using 96 well micro-titration plates. Six different concentrations of the extracts were assessed (30, 60, 90, 120, 150, and 200 mg/mL) and two lecture times 48 and 72 h post-confrontation were considered. Micro-titration plates were maintained at 28°C. After incubation, ten 5- μ L aliquots from each well were taken and deposited on a slide for observing and quantifying the dead and live larvae presents in each aliquot-drop. Mean of dead and live larvae in wells of the different treatments were estimated and a completely randomized design with a 4x6x2 factorial arrangement (four plant species, six concentrations and two lecture times) was used. Data were analysed by a PROC GLM model and the means comparison was performed using the Tukey test. A high lethal activity was obtained (82%) at 200 mg/mL with *T. filifolia* extract and the highest lethal activity (88%) was found with *R. chalepensis* extract at the same concentration. These results are similar with other studies where used *T. filifolia* and *R. chalepensis* extracts against *H. contortus* eggs and infective larvae.

Key words: *T. filifolia*, *R. chalepensis*, plant extracts, *Haemonchus*, histotrophic larvae

RESUMEN

Las larvas histiotrópicas son tan patógenas como los nematodos adultos, debido a sus hábitos hematófagos y a la destrucción de las células epiteliales al introducirse en el tejido abomasal. El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar la actividad letal *in vitro* del extracto metanólico de *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* y *Tagetes filifolia* contra larvas histiotrópicas (L₄) del parásito *Haemonchus contortus*. Para realizar el ensayo, se realizó un cultivo con 0.1% de sacarosa, 0.02% de albúmina sérica bovina, eritrocitos conservados en solución VyM y antibiótico-antimicótico (100x, Gibco®) y PBS estéril pH 4 se adaptaron a temperatura de 37°C y atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire para evolucionar larvas infectantes a larvas histiotrópicas. Después de un periodo de 14 días se confirmó la presencia de larvas en estadio cuatro y fueron sometidas a una prueba *in vitro* para evaluar la mortalidad causada por los extractos de las diferentes plantas bajo estudio. La prueba de mortalidad de L₄ se realizó en placas de microtitulación de 96 pozos. Se probaron diferentes concentraciones de los extractos (30, 60, 90, 120, 150, y 200 mg/mL) a dos tiempos de lectura (48 y 72 h), la placa experimental se mantuvo en una cámara de humedad a 28 °C. Después del periodo de incubación se tomaron 10 alícuotas de 5 µL de cada pozo para cuantificar larvas vivas y larvas muertas en cada pozo. Se utilizó un modelo completamente al azar con arreglo factorial 4x6x2 (cuatro especies de plantas, seis concentraciones y dos tiempos de lectura). Los datos obtenidos en las lecturas del bioensayo fueron analizados mediante un modelo lineal general (PROC GLM) de SAS y una comparación de medias de Tukey. Se obtuvo una excelente actividad del 82% con 200 mg/mL del extracto de *Tagetes filifolia* y la mayor mortalidad (88%) se obtuvo con 200 mg/ mL del extracto de *R. chalepensis*. Estos resultados coinciden con lo observado en los ensayos anteriores en los que *T. filifolia* y *R. chalepensis* presentaron la mayor actividad antihelmíntica contra larvas infectantes y huevos de *H. contortus*.

Palabras clave: *T. filifolia*, *R. chalepensis*, extractos de plantas, *Haemonchus*, histotrophic larvae

4.1 INTRODUCCIÓN

El mecanismo de acción de las moléculas con actividad antihelmíntica se basa en la interacción con receptores ligados a proteínas estructurales de los nematodos por lo que el estadio del desarrollo es vital ya que hay variabilidad en el mosaico antigénico de la cutícula en los diferentes estadios del desarrollo de *Haemonchus contortus*. En México se han usado gran número de plantas para curar enfermedades de los humanos, principalmente en las comunidades indígenas. Dentro de la especie ovina prevalece la haemonchosis, una enfermedad causada por el nematodo hematófago *Haemonchus contortus*. Las larvas en estadio cuatro (L₄) causan daño importante debido a que se alimentan de tejido (Galicia et al., 2008) y junto con los parásitos adultos se alimentan de sangre, causando anemia severa que usualmente aparece después de dos semanas de iniciada la infección (Roeber et al. 2013). Las larvas hipobióticas son deprimidas metabólicamente, y menos susceptibles a algunos antihelmínticos (Chaparro, 2011). La función del abomaso es altamente especializada y posee células diferenciadas enfocadas a funciones específicas como las células parietales encargadas de la producción de ácido clorhídrico (HCl) y de la pre-enzima pepsinógeno por las células principales, células productoras de mucus y las células G productoras de gastrina. La presencia de larvas hipobióticas provoca cambios en la mucosa abomasal como: destrucción de las células parietales, rotura de las uniones intercelulares o desmosomas con filtración de albúmina plasmática a la luz del abomaso, pasaje de pepsinógeno a plasma, aumento del pH abomasal, falla en la producción de pepsina, limitada digestibilidad primaria de proteínas, diarrea por exceso de proteínas endógenas y exógenas y por el aumento de la gastrinemia (Steffan et al., 2012). Resultados obtenidos por López-Arellano et al, (2005) muestran evidencia de que hay similitud entre los productos de excreción de L₄ de *H. contortus* con antígenos obtenidos del intestino de parásitos adultos, notificados con actividad inmunomoduladora. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad letal *in vitro* del extracto metanólico de *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis* y *Tagetes filifolia* contra larvas histiotrópicas (L₄) del parásito *Haemonchus contortus*.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 Localización

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), del Instituto Nacional de investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Jiutepec, Morelos, México. La extracción de compuestos de las plantas se realizó en el centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS-IMSS) en Xochitepec, Morelos, México.

4.2.2 Material vegetal

Las plantas *A. mexicana* y *T. officinale* fueron recolectadas en el municipio de Texcoco, Edo de México en octubre del 2013. *T. filifolia* fue colectado en el campo experimental perteneciente a la Universidad Autónoma del estado de Morelos (UAEM) en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, México, en octubre del 2013. Por otro lado, *R. chalepensis* fue colectada de un jardín en la localidad de La Milpa, Villa García, Zacatecas, México durante abril del 2014. Todas las plantas fueron colectadas durante el periodo de floración. Una planta de cada género/especie fue depositado en el jardín Etnobotánico y Museo de medicina tradicional de la ciudad de Cuernavaca, en el estado de Morelos, México y fueron identificadas por la Bióloga Margarita Avilés, asignándoles un número de ejemplar a cada una: *A. mexicana* (2055), *T. officinale* (2057), *T. filifolia* (2056) y *R. chalepensis* (2076).

4.2.3 Método de extracción

Las plantas se lavaron con agua corriente y se secaron en una estufa convencional a 60°C por tres días. El material seco se molió para tener partículas de 1 mm aproximadamente. Se pusieron en matraces Erlenmeyer de cuatro L y se agregaron dos litros de metanol para dejar macerando por 72 h. Después de este periodo, el material vegetal fue filtrado, usando papel Whatman del número cuatro. Los extractos fueron concentrados en un evaporador rotatorio (Heidolph Laborota 4000, Germany) a 46°C y una rotación de 90 rpm, con vacío constante. Una vez eliminado todo el solvente, el extracto fue liofilizado en un equipo Heto spywinner lyophilizer y mantenido a -20°C hasta su uso.

4.2.4 Obtención de larvas histiotrópicas de *H. contortus*

La evolución de L₃ a L₄ se realizó bajo condiciones *in vitro*. Las L₃ se desenvainaron utilizando hipoclorito de sodio comercial al 0.186%, el cual fue eliminado posteriormente con lavados de agua destilada. Las larvas desenvainadas se pusieron en Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos 1X (SSAF o PBS por sus siglas en inglés) y se aplicó antibiótico-antimicótico (100x, Gibco®) y se dejaron en agitación por un periodo de dos horas. Posteriormente, las L₃ fueron recuperadas por centrifugación a 3500 rpm y 4°C para su uso inmediato.

Las L₃ libres de contaminantes, fueron incubadas en un medio de cultivo con 0.1% de sacarosa, 0.02% de albúmina sérica bovina, eritrocitos conservados en solución VyM con antibiótico-antimicótico para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (100x, Gibco®) y PBS estéril pH 4 se adaptaron a temperatura de 37°C y atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. El tiempo establecido para la evolución de L₃ a L₄ fue de 14 días, en este periodo se revisó la viabilidad del medio así como la viabilidad y evolución de las larvas (López Arellano et al., 2005; Ramírez *et al.*, 2006).

4.2.5 Evaluación de la actividad letal del extracto metanólico de plantas contra huevos y larvas infectantes (L₃) de *H. contortus*

El ensayo se realizó en una placa de microtitulación de 96 pozos. Se colocaron 100 larvas L₄ de *H. contortus* contenidas en 50 µL de medio VIM y 50 µL del extracto solubilizado (en PBS, pH 7.4) en cada pozo (100 µL volumen final) (n=4). Se evaluaron seis concentraciones del extracto íntegro (30, 60, 90, 120, 150 y 200 mg/mL) y dos concentraciones de cada fracción (15 y 30 mg/mL). Las placas experimentales fueron mantenidas dentro de un recipiente húmedo a 22°C y se realizaron lecturas a 48 y 72 h. Las larvas vivas y muertas se cuantificaron en diez alícuotas de 5 µL.

4.2.6. Análisis estadístico

Se utilizó un modelo completamente al azar con arreglo factorial 4x6x2 (cuatro especies de plantas, seis concentraciones y dos tiempos de lectura). Los datos obtenidos en las lecturas del bioensayo fueron analizados mediante un modelo lineal general (PROC GLM) de SAS y una comparación de medias de Tukey.

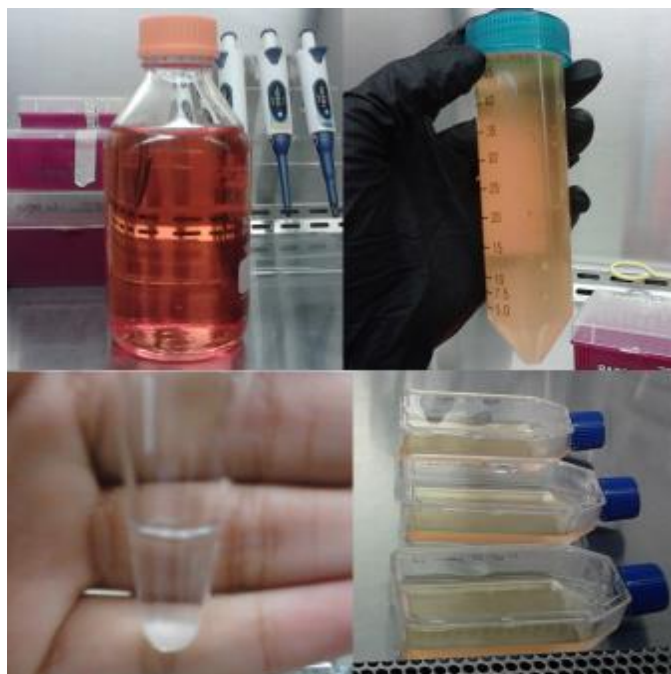


Figura 12 Procedimiento para el desarrollo larvario de L₃ a L₄.

4.3 RESULTADOS

La mortalidad de L₄ se reporta en el cuadro 12, los extractos de *T. officinale* y *A. mexicana* provocaron una mortalidad inferior al 25% a las 24 y 48 h después de la confrontación. Los extractos de *T. filifolia* y *R. chalepensis* provocaron mayor mortalidad, a partir de las 24 h de confrontación se observó una mortalidad del 67 y 73% de mortalidad y de 82 y 88% respectivamente a las 48 h con 200 mg /mL.

4.4 DISCUSIÓN

Contar con L₄ como germoplasma experimental para las evaluaciones *in vitro* de productos con potencial antihelmíntico, es muy importante para tener resultados que pueden ser relacionados directamente con los nematodos adultos, debido a que ambos se encuentran en ambientes similares y son estadios hematófagos por lo cual se deduce que poseen una estructura similar y de este modo se evita el sacrificar animales portadores para la obtención de parásitos adultos (López-Arellano et al., 2005). En este experimento se demostró que los extractos metanólicos de *T. filifolia* y *R. chalepensis* poseen metabolitos secundarios con actividad letal contra larvas histiotrópicas. Similar a lo observado en los ensayos con huevos y larvas del parásito. En la amplia revisión de

literatura realizada por la autora de este trabajo, no se encontraron trabajos similares; sin embargo, el potencial antihelmíntico de plantas, contra diferentes estadios del desarrollo de nematodos gastrointestinales ha sido probado y se han purificado sustancias para su posterior utilización como fármacos eficaces contra microorganismos patógenos, que afectan a las poblaciones animales.

Es importante continuar haciendo evaluaciones para identificar los compuestos activos contra larvas histiotrópicas para posteriormente utilizarlas como candidatos de evaluación *in vivo*.

Cuadro 12 Mortalidad de larvas histiotrópicas (mean \pm EE, %) de *Haemonchus contortus* (L4) expuestas a extractos metanólicos obtenidos de tallos y hojas de cuatro plantas seleccionadas a las 48 horas de exposición

Lectura	Planta	Concentración mg/mL											
		30		60		90		120		150		200	
		Media	Mortalidad	Media	Mortalidad	Media	Mortalidad	Media	Mortalidad	Media	Mortalidad	Media	Mortalidad
24 h	<i>Am</i>	22 \pm 2	14 ^a	23 \pm 1	15 ^a	24 \pm 1	16 ^a	24 \pm 2	16 ^a	25 \pm 2	18 ^a	17 \pm 2	20 ^a
	<i>To</i>	17 \pm 1	11 ^a	25 \pm 2	16 ^a	24 \pm 2	17 ^a	25 \pm 1	20 ^a	31 \pm 1	22 ^a	33 \pm 2	23 ^a
	<i>Tf</i>	16 \pm 1	11 ^a	17 \pm 1	14 ^a	20 \pm 2	17 ^a	24 \pm 1	21 ^a	33 \pm 1	27 ^a	66 \pm 8	67 ^b
	<i>Rch</i>	32 \pm 2	22 ^b	42 \pm 9	23 ^{ab}	53 \pm 14	42 ^b	62 \pm 22	57 ^b	73 \pm 6	67 ^b	77 \pm 22	73 ^b
48 h	<i>Am</i>	36 \pm 6	16 ^a	32 \pm 2	16 ^a	29 \pm 3	18 ^a	32 \pm 1	19 ^a	37 \pm 1	22 ^a	36 \pm 2	24 ^a
	<i>To</i>	31 \pm 2	16 ^a	25 \pm 4	17 ^a	27 \pm 2	19 ^a	31 \pm 1	21 ^a	34 \pm 2	20 ^a	35 \pm 2	23 ^a
	<i>Tf</i>	38 \pm 1	18 ^a	43 \pm 6	19 ^a	51 \pm 5	25 ^{ab}	64 \pm 11	45 ^b	67 \pm 3	56 ^b	91 \pm 2	82 ^b
	<i>Rch</i>	40 \pm 6	25 ^b	41 \pm 3	26 ^b	54 \pm 12	30 ^b	81 \pm 6	68 ^c	95 \pm 9	83 ^c	71 \pm 2	88 ^b
	Planta							<0.0001					
	Concentración							<0.0001					
	Tiempo de lectura							=0.0002					
	Planta*Concentración							>0.0001					
	Planta* Tiempo de lectura							=0.0144					
	Concentración*Tiempo de lectura							=0.2417					
	Planta* Conc*Tiempo de lectura							=0.7308					

Diferentes letras en columna de cada horario, indican la existencia de diferencia estadística ($p < 0.05$). *Am*= *Argemone mexicana*, *To*= *Taraxacum officinale*, *Tf*= *Tagetes filifolia*, *Rch*= *Ruta chalepensis*

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

El estudio de los metabolitos secundarios provenientes de plantas medicinales, con actividad antihelmíntica ha sido reconsiderado como un método alternativo para el control de los nematodos, parásitos de rumiantes. El extracto metanólico de tallos y hojas de *A. mexicana* posee una moderada actividad larvicida *in vitro* (36.6%) contra *H. contortus* (L₃) después de 72 h con 200 mg/mL. Algunas propiedades medicinales del aceite esencial de las semillas de *A. mexicana* son; bactericidas, antidiabetes, anti-VIH, anti-estres, anti-alérgico, fungicida, y antihelmíntico contra el nematodo de raíz *Meloidogyne incognita* (Brahmachari et al., 2013). El extracto metanólico de *R. chalepensis* provocó un efecto moderado (28.5%, $p < 0.05$); sin embargo, cuando se evaluó el efecto de inhibición de la eclosión, el efecto fue cercano al 100%. Se han publicado gran número de reportes acerca de sus propiedades medicinales, incluyendo actividad anti-protozoarios, como *Entamoeba histolítica* (Lans et al., 2007); antibacterial contra *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris* y fungicida contra *Candida albicans* (Torres et al., 2005). El resultado de estos estudios alienta el uso de extractos y es posible que los metabolitos obtenidos de esta planta pudieran tener actividad potencial como un producto ovicida. El extracto metanólico de *T. officinale*, provocó actividad baja contra huevos y larvas. Otros reportes informan sobre una actividad discreta contra nematodos de importancia en cultivos agrícolas como plantas de tomate afectadas por *Meloidogyne arenaria* 14-30% de inhibición de la eclosión, usando extractos acuosos (Aydinli y Menan. 2014).

En el extracto metanólico de las partes aéreas de *T. filifolia* se identificaron metabolitos como quercetagrina, metil-clorogenato y ácido clorogénico contra huevos y larvas de *H. contortus*. El ácido clorogénico mostró una alta actividad contra huevos de *H. contortus*, la actividad obtenida con el ácido clorogénico fue mayor que con Ivermectina comercial. El ácido clorogénico pertenece al grupo de los polifenoles, y junto con otros compuestos como curcumina, ácido caféico, y ácido ferúlico posee efecto inhibidor de cáncer de piel en ratones (Huang et al., 1988). En algunos estudios acerca de metabolitos secundarios producidos por las raíces de plantas, han sido identificados compuestos polifenólicos que incluyen al ácido clorogénico, ácido

dicafeoilquínico y ácido caféico (Bacetty et al., 2009). Tales metabolitos están asociados a nematodos fitoparásitos que afectan el sistema radicular de diversos cultivos (Wuys et al., 2007; Davies y Spiegel, 2011).

Este podría ser el primer reporte sobre la actividad nematicida de este compuesto contra *H. contortus* y es necesaria más información para confirmar los resultados, se debe estudiar, su modo de acción, así como su posible efecto contra otros estadios evolutivos del parásito como larvas histiotrópicas y parásitos adultos. Igualmente es importante corroborar que este compuesto no es un riesgo para los animales y si no tiene ningún efecto negativo sobre microorganismos benéficos del suelo.

El estudio muestra evidencia de que las estructuras aéreas (tallos y hojas) de *R. chalepensis* poseen compuestos bio-activos contra larvas y huevos del nematodo *H. contortus* bajo condiciones *in vitro*. Resultados similares sobre la actividad nematicida de este tipo de extracto los obtuvo Sánchez (2002) quien observó que el extracto acuoso de las partes aéreas de *R. graveolens* provocó un 87% de mortalidad de *Radopholus similis*, un nematodo parásito del banano. Así mismo, Sasanelly (1992) reportó efecto letal del extracto acuoso de *R. graveolens* dependiendo de la dosis y del tiempo de confrontación contra *Xiphinema index*, ya que causó 100% de mortalidad a las 12 h de contacto con el extracto a una concentración del 32%. La mortalidad larval registrada en este estudio a 150 y 200 mg/mL es muy importante; sobre todo si consideramos que se trata de un extracto acuoso íntegro, el cual puede contener gran cantidad de compuestos sin actividad nematicida que pueden ser eliminados al purificar por procesos cromatográficos y al eliminar compuestos no deseables se podría esperar una mortalidad mayor quizá utilizando concentraciones inferiores a las utilizadas con el extracto íntegro (Jasso-Díaz et al., 2017).

en este estudio se observó que la fase orgánica tuvo un efecto letal contra huevos en todas las concentraciones evaluadas. Similarmente Akkari et al. (2015) evaluó el aceite esencial de flores y hojas *R. chalepensis* inhibió en un 100% la eclosión de huevos de *H. contortus*, con 1 mg/mL, similar a lo observado en este estudio con fase orgánica, la concentración letal más baja evaluada fue de 1.25 mg/mL.

La cromatografía en capa fina de la fase orgánica del extracto reveló la presencia de grupos químicos similares a las cumarinas, posiblemente estos compuestos sean los responsables de la actividad ovicida observada en este estudio.

La mortalidad larvaria provocada por el extracto metanólico de *T. filifolia* (89%) fue la clave que despertó el interés por estudiar más a fondo en busca de la molécula responsable de la actividad y de esta forma fue posible identificar al ácido clorogénico (3) obtenido del extracto metanólico de *T. filifolia*, el cual posee una actividad contra la eclosión de huevos, inhibiendo en un 100% los huevos de *H. contortus* en ensayos *in vitro*. En la fracción TF11 se identificaron otros dos compuestos además del ácido clorogénico, estos fueron quercetagitrin (1) y metil-clorogenato (2); sin embargo, estos compuestos no mostraron actividad ovicida o larvicida. Esta investigación muestra evidencia del efecto ovicida y larvicida *in vitro* del ácido clorogénico obtenido del extracto metanólico de *T. filifolia* contra *H. contortus*.

La fase orgánica obtenida con acetato de etilo del extracto acuoso de tallo y hoja de *R. chalepensis* posee metabolitos del tipo cumarinas, mismas que se cree son las responsables de la actividad ovicida y larvicida observada en el extracto íntegro y en la fase orgánica de dicho extracto. Es necesario realizar la purificación biodirigida de la fase orgánica para identificar la fracción y/o la molécula responsable de la actividad nematocida observada en el extracto acuoso obtenido de tallos y hojas de *R. chalepensis*.

El uso de extractos orgánicos para el control de nematodos gastrointestinales es una excelente herramienta para, ayudar a reducir las poblaciones parasitarias al mismo tiempo que se disminuye el uso de productos químicos que son dañinos para el medio ambiente y para la población humana, por el consumo de residuos químicos presentes en los productos de origen animal, contaminados por el constante uso de antihelmínticos y otras fórmulas químicas que son poco degradadas en el organismo.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Ghaffar, F., M. Semmler, K.A.S. Al-Rasheid, B. Strassen, K. Fischer, G. Aksu, S. Klimpel, H. Mehlhorn. 2011. The effects of different plant extracts on intestinal cestodes and on trematodes. *Parasitol Res.* 108:979-984.
- Adamu, M., V. Naidoo, J.N. Eloff. 2013. Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *Vet Res* 9:38.
- Aguilar-Caballero, A.J., R. Cámara-Sarmiento, J.F.J. Torres-Acosta y C.C. Sandoval. 2011. El control de los nematodos gastrointestinales en caprinos ¿Dónde estamos?, *Bioagrocencias*, 4(2):10-16.
- Aguilar-Marcelino, L. 2012. Microorganismos con uso potencial contra el nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis doctoral, Colegio de Postgraduados, Campus montecillo, Texcoco, Estado de México, México.
- Akkari, H., O. Ezzine, S. Dhahri, F. B´chir, M. Rekik, S. Hajaji, M.A. Darghouth, M.L. Ben Jamáa, M. Gharbi. 2015. Chemical composition, insecticidal and *in vitro* anthelmintic activities of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products* 74: 745-751.
- Alba-Hurtado, F., M.A. Muñoz-Guzmán. 2013. Immune responses associated with resistance to Haemonchosis in sheep. *BioMed Res Intern.* 2013:1-11.
- Alemán, Y., L.M. Sánchez, T. Pérez, Y. Rodríguez, J.L. Olivares, J.G. Rodríguez. 2011. Actividad larvicida de extractos de *Rhizophora mangle* L. contra estrongílicos gastrointestinales de ovinos. *Rev. Salud Anim.* 33(2):111-115.
- Alonso-Díaz, M.A., J.F.J. Torres-Acosta, C.A. Sandoval-Castro, H. Hoste. 2011. Comparing Rothe sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol*, 181: 360-364.
- Alunda, J.M., Cuquerella, M. y Mohamed, F.E., 2013. Primera vacuna recombinante frente a la haemoncosis ovina. Oficina de transferencia de resultados de investigación-Universidad Complutense de Madrid. C/ Donoso Cortés, 65. 28015 Madrid. www.ucm.es/info/otri.
- Angulo-Cubillán, F.J., C.L. García, M. Cuquerella, J.M. Alunda. 2007. Relación *Haemonchus contortus*-Ovino: Una Revisión. *Rev. Sci. FCV-LUZ.* Vol. XVII, N° 6, 577-587.

- Anziani, O.S., C.A. Fiel. 2015. Resistencia a los antihelmínticos en nematodos que parasitan a los rumiantes en la Argentina; RIA. 41: 34-46.
- Aparicio-Medina, J.M., V. Paredes-Vanegas, O. González-López, O. Navarro-Reyes. 2011. Impacto de la Ivermectina sobre el ambiente. Revista científica la Calera, 11(17):64-66.
- Atlija, M. J.J. Arranz, V.M. Martínez y G.B. Gutiérrez. 2016. Detection and replication of QTL underlying resistance to gastrointestinal nematodes in adult sheep using the ovine 50K SNP array. Genet sel evol 48:4 DOI 10.1186/s12711-016-0182-4.
- Ávalos, G. A. y U.C.E. Pérez. 2009. Metabolismo secundario de las plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología vegetal. 2(3): 119-145.
- Aydinli, G., S. Mennan. 2014. Effect of some plant extracts on *Meloidogyne arenaria* Neal, 1889 (Tylenchida: Meloidogynidae) and tomato. Türk. Entomol. Derg, 38: 323-332.
- Bacetty, A.A., M.E. Snook, A.E. Glenn, J.P. Noe, N. Hill, A. Culbreath, P. Timper, P. Nagabhyru, C.W. Bacon. 2009. Toxicity of Endophyte-Infected Tall Fescue Alkaloids and Grass Metabolites on *Pratylenchus scribneri*. J Phytopatol, 99: 1336-1345.
- Barajas, P.J.S., B.R. Montes, A.F. Castrejón, M.H.E. Flores M.A. Serrato-Cruz. 2011. Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. Rev Mex Micol, 34: 85-91.
- Barboza, J., L. Hilje, J. Durón, V. Cartin, M. Calvo. 2010. Fagodisuasión de un extracto de ruda (*Ruta chalepensis*, Rutaceae) y sus particiones sobre larvas de *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera:Pyralidae) Int. Biol. Trop. ISSN-0034-7744, 58(1).
- Beserra de Oliveira, L. M., B. C. M. Leal, S. Maia de Moraes, A. L. F. Camurca-Vasconcelos y F. T. I. Macedo. 2011. Plantas taniníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Ciencia Rural Santa María, Vol. 4 N° 11. Pag. 1967-1974.
- Bhattacharjee, I., C. S. Kumar, S. Chatterjee, G. Chandra. 2006. Antibacterial potentiality of *Argemone Mexicana* solvent extracts against some pathogenic bacteria. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 101(6):645-648.
- Bonino, J., A. Mederos. 2003. Resistencia Antihelmíntica en ovinos. Revista del plan agropecuario n°. 107:42-47.
- Brahmachari, G., D. Gorai, R. Roy. 2013. *Argemone Mexicana*: chemical and pharmacological aspects#. Brazilian J Pharm 23: 559-575.
- Buttle, D. J., Behnke, J. M., Bartley, Y., Elsheikha, H. M., Bartley, D. J., Garnett, M. C., Donnan, A. A., Jackson, F., Lowe, A., Duce, I. R. 2011. Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus* Parasites & Vectors, 4(1):36.

- Campos, R., D. R. Herrera, R.H. Quirós y J.S. Olazarán. 1990. Resistencia de *Haemonchus contortus*. *Téc, Pec. Méx.* 28:30-34.
- Carrera-Chávez, B. 2008. La ovinocultura en México: Alternativas para los productores rurales. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de ciencias sociales y administración, Ciudad Juárez, Chihuahua, México.
- Castells, M.D., 2010, Resistencia Genética del Ovino a los Nematodos Gastrointestinales FAO Animal production and health paper. *Prod and sanidad anim.* P 138.
- Castillo, R.A.M. 2011. Elucidación asistida de estructura a partir de espectros de resonancia magnética nuclear. Tesis para el título de Magister en ingeniería-sistemas y computación. Universidad Nacional de Colombia.
- Castillo-Mitre, G.F., A. Olmedo-Juárez, R. Rojo-Rubio, M. González-Cortázar, P. Mendoza de Gives, E.E. Hernández-Beteta, D.E. Reyes-Guerrero, M.E. López-Arellano, J.F. Vázquez- Armijo, G. Ramírez-Vargas, A. Zamilpa. 2017. Caffeoil and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *J. Ethnopharmacol* 204:125-131.
- Chaparro, M.A.E., 2011. Un modelo matemático parametrizado con sistemas de inferencia difusa para el estudio de la dinámica poblacional del parásito *Ostertagia osterytagi* en bovinos. Tesis doctoral de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Charon, K.M., 2004. Genes controlling resistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. *Anim Sci Papers and Reports*, 22(1): 135-139.
- Costa, S. dos S. da-R., M.S.N. de A. Santos, M.F. Ryan. 2003. Effect of *Artemisia vulgaris* Rhizome Extracts on hatching, mortality, and plant infectivity of *Meloidogyne megadora*. *J Nematol*, 35(4): 437-442.
- Cuellar-Ordaz, A. 2009. Nuevas opciones para el control de parásitos en la ovinocultura tropical. 1er simposio de Ovinocultura Tropical, Palenque, Chiapas, México.
- Davies, K., Y. Spiegel. 2011. Biological control of plant-parasitic nematodes: Building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms, Springer Science & Business Media, 11, DOI: 10.1007/978-1-4020-9648-8.
- Dey, A.R., S. Akther, S. Hossain, T.R. Dey, N. Begum, *In vitro* Anthelmintic Effect of some Medicinal Plants against *Haemonchus contortus*. *J. Anim. Sci. Adv.*, 5: 1162-1170. DOI: 10.5455/jasa.20141230103624.
- Diez-Tascon, C., P.A. Macdonald, K.G. Dodds, J.C. Mcewan, A.M. Crawford. 2002. A screen of chromosome 1 for QTL affecting nematode resistance in ovine outcross population. Proceedings of the 7th World congress on genetics Applied to livestock production, Montpellier, France version

- Drago-Serrano, M.E., M.L. López, E.T.R. Sainz. 2006. Componentes bio-activos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas. Vol. 37. N° 004.
- Emery, D.L., B.M. Wagland, S.J. McClure. 1993. Rejection of heterologous nematodes by sheep immunized with larval or adult *Trichostrongylus colubriformis*. Int J Parasitol. 23:841-846.
- Esteban-Andrés, D., R. González-Garduño, G. Garduza-Arias, N. J. Ojeda-Robertos, F. Reyes-Montes y S. Gutiérrez-Cruz. 2013. Desarrollo de resistencia a nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo desafiados con diferentes niveles de infección. Rev. Med. Vet. Zoot, Vol. 60:169-181.
- FAO. 2003. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Consultado el 3 de abril 2010. Disponible en: www.fao.org/docrep/006/48135/html
- FAO. 2010. Evaluación de los recursos forestales mundiales, Informe principal www.fao.org/docrep/013/i1757s/i1757s; [acceso 14.05.14]-
- FAO. 2013. (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación).. <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/home.html>
- García, M.G. 2015. Efecto neuroprotector del extracto y fracciones de *Bouvardia ternifolia* (Cav) Schltdl. Tesis Doctoral de la Universidad Autónoma metropolitana. Ciudad de México, México.
- Ghaima, K.K., N.M. Hashim, S.A. Alli. 2013. Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*) J App. Pharm Sci. 3(5):96.
- Godoy, P., H. Che., R.N. Beech y R.K. Prichard. 2016. Characterization of P-glycoprotein-9.1 in *Haemonchus contortus*. Parasites and Vectors 9:52, pp 2-11. DOI 10.1186/s13071-016-1317-8
- Gómez-Castellano, J.R., 2008. Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaradiol. Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas, 7(1):3-9.
- González-Garduño, R., G. Torres-Hernández, M.E. López-Arellano, P. Mendoza de Gives. 2012. Resistencia antihelmíntica de nematodos parásitos en ovinos. Revista Geografía Agrícola, num. 48-49, pp. 63-74.
- González-Garduño, R., P.C. Córdova, H.G. Torres, G.P. Mendoza, G.J. Arece. 2011. Prevalencia de Parásitos Gastrointestinales en Ovinos Sacrificados en un Rastro de Tabasco, México. Rev. Vet. Mex, 42: 125-135.
- Gupta, M., S. Lodhi, y A. Shukla. 2015. Preliminary phytochemical analysis and *in vitro* anti-helmintic of *Martynia annua* Linn and *Permotrema reticulatum*. Asian Journal of Biomaterial Research 1(2):72-74.

- Herbotecnia.com. www.herbotecnia.com.ar/exo-dentdelion. Disponible en internet, consultado el 04 de febrero del 2017.
- Hernández, B.A., 2011. Estudio de la respuesta inmune frente a *Haemonchus contortus* en dos razas ovinas canarias. Tesis doctoral de la Universidad de las palmas de Gran Canaria Facultad de Veterinaria.
- Hoste, H., J.F.J. Torres-Acosta. 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Vet. Parasitol*, 180:144-154.
- https://www.ecured.cu/Escarabajo_pelotero, Escarabajo Pelotero. Consultado el 06.04.2017.
- Huang, M.T., C.R. Smart, C.Q. Wong, H.A. Conney. 1988. Inhibitory Effect of Curcumin, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Ferulic Acid on Tumor Promotion in Mouse Skin by 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, 48: 5941-5946.
- Hussain, S.Md., S. Farred, S. Ansari, Md. A. Rahman, I.Z. Ahmad, M. Saeed. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. Review Article. *J Pharm Bioall Sci*, 4(1):10-20.
- Irum, S., H. Ahmed, M. Mukhtar, M. Mushtaq, B. Mirza, K. Donskow-Lysoniewska, M. Qayyum, S. Simsek. 2015. Anthelmintic activity of *Artemisia vestita* Wall ex DC. and *Artemisia maritime* L. against *Haemonchus contortus* from sheep. *J Vet Parasitol*, 212: 451-455.
- Jasso-Díaz, G., G. Torres-Hernández, A. Zamilpa, P.C.M. Becerril, J.E. Ramírez-Briebesca, O. Hernández-Mendo, H. Sánchez- Arroyo, M. González-Cortazar, P. Mendoza de Gives. 2017. *In vitro* Assessment of *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis*, and *Tagetes filifolia* against *Haemonchus contortus* nematode eggs and infective (L₃) larvae. *Microbial Pathogenesis*, 109: 162-168.
- Jasso-Díaz, G., P. Mendoza de Gives, H.G. Torres, C.M. González, B.J.E. Ramirez, P.C. Becerril, M.O. Hernández, A.H. Sánchez. 2014. Actividad letal de extractos de tres plantas contra larvas infectantes e inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus*. Memorias del congreso internacional de ovinocultura y congreso nacional caprino, Puebla, Puebla.
- Lans, C., N. Turner, T. Khan, G. Brauer. 2007. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada. *J Vet Parasitol*, 148: 325-340.
- Llinas-Cervantes, X. 2012. Parásitos gastrointestinales del ganado bovino lechero del ejido Chametla, Baja California Sur. Tesis de Maestría de la universidad autónoma de Baja California Sur, México.
- Lope-Haumán, R.J. 2016. Validación de método famacha para diagnóstico de *Haemonchosis* en ovinos de pelo en provincia de Tambopata, Madre de Dios.

- Tesis de Profesional de Médico Veterinario y Zootecnista, Escuela Académica profesional de medicina veterinaria y zootecnia, Puerto Maldonado, Perú.
- López, A.M.E., P. Mendoza de Gives. 2011. Importancia de las parasitosis internas en rumiantes domésticos y resistencia a los antihelmínticos. En: Memorias XVI Congreso de producción Ovina y VIII seminario Internacional de Producción de ovinos en el Trópico. Villahermosa, Tabasco, México.
- López-Arellano, M.E., H.E. Liébano, P. Mendoza de Gives. *Haemonchus contortus* L4: Desarrollo *in vitro* y análisis de antígenos con posible potencial inmunoproliférico.
- Márquez, D., G. Jiménez, F. García, C. Garzón. 2008. Resistencia a los antihelmínticos en nematodos gastrointestinales de bovinos en municipios de Cundinamarca y Boyacá. Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 9(1):113-123.
- Martínez, O.M.C., J.J. Vargas-Magaña, H.L. Canul-Ku, R. Miranda-Soberanis, C. Capetillo-Leal, C.A. Sandoval-Castro, H. Hoste, J.F.J. Torres-Acosta. 2010. Effect of a tropical tannin rich plant *lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. J Vet Parasitol. Vol. 172:283-290.
- Mederos, A., G. Banchemo. 2013. Parasitosis gastrointestinales de ovinos y bovinos: situación actual y avances en la investigación. Sitio argentino de producción animal. Rev. INIA N° 34.
- Medina, P., F. Guevara, M. La O, N. Ojeda y E. Reyes. 2014. Resistencia antihelmíntica en ovinos: una revisión de informes del sureste de México y alternativas disponibles para el control de nematodos gastrointestinales. Rev. Pastos y forrajes, 37(3):257-263.
- Mendoza de Gives, P. 2002. Microorganismos en el Manejo de Parásitos de Ganado. INIFAP. CIVAC, Morelos.
- Mendoza de Gives, P. 2011. Carnivorous Fungi: the cruelest executioners of nematodes in the soil. J Int Mushroom.
- Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, E. y Aguilar-Marcelino, L. 2012. Plant extracts: A potential Tool for Controlling Animal Parasitic Nematodes. The Biosphere, Dr. Natarajan Ishwaran (Ed), InTech, Doi:10.5772/34783.
- Mendoza de Gives, P., N.C. Zapata, H.E. Liébano, A.M.E. López, R.D. Herrera y G.R. Gonzáles. 2006. Biological Control of Gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in México. N. Y. Acad. Sci. 1081:335-359.
- Miller, J.E., D.W. Horohov. 2006. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. J Anim Sci Vol. 84:E124.
- Mir, A.M., S.S. Sawhney, M.M.S. Jassal. 2013. Qualitative and quantitative analysis of phytochemicals of *Taraxacum officinale*. J Pharm Pharmacol, 2: 001-005.

- Montalvo, A.X., M.E.A. López, P.V. Víctor, L.E. Hernández y P.G. Mendoza. 2006. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a febandazol ivermectina en la región noroeste del Estado de Tlaxcala. Rev. Técnica Pecuaria en México, vol. 44, núm. 001, pp.81-90
- Morales, G. y L. A. Pino. 2001. Métodos alternativos para el control de los estróngilos digestivos en ovinos. Laboratorio de Parasitología, Instituto de Investigaciones Veterinarias, CENIAP, INIA, Av. Las delicias. Maracay, Edo. Aragua, Venezuela.
- Moreno, F. C., I. J. Gordon, M. R. Knox, P. M. Summer, L. F. Skerrat, M. A. Benvenuti y C. A. Saumell. 2012. Anthelmintic efficacy of five tropical native Australian plants Against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected goats. J Vet Parasitol. Vol. 187:237-243.
- Moya, M.A., V.G. Escudero. 2015. Las plantas medicinales en el control de nematodos gastrointestinales en cabras: potencial de las plantas que crecen en la región de Coquimbo, Chile. Rev. Bras PI Med., Campinas. 17(3):480-494.
- Ohri, P., S. Kaur-Pannu. 2010. Effect of phenolic compounds on nematodes- A review. J App. Nat. Sci. 2(2):344-350.
- Palacios-Landín, J., P. Mendoza de Gives, D.O. Salinas-Sánchez, M.E. López-Arellano, E. Liebano-Hernández, V.M. Hernández-Velázquez, M.G. Valladares-Cisneros. 2015. *In vitro* and *in vivo* Nematicidal Activity of *Allium sativum* and *Tagetes erecta* extracts against *Haemonchus contortus*. Türkiye Parazitoloji Derneği, 39: 260-264.
- Papadopoulos, E. 2008. "Anthelmintic resistance in sheep nematodes" Small Ruminant Research 76:99-103.
- Partida, P. 2007. Antecedentes, Desarrollo y Perspectivas del Borrego Pelibuey en México. Acontecer Ovino-Caprino, Vol. VIII. No. 37. Pp.4-12.
- Partida, P., J.A., V.D. Braña, R.F.G. Ríos y R.G. Buendía. 2012. Producción de carne ovina. Centro nacional de Investigación disciplinaria en fisiología y Mejoramiento Animal, Ajuchitlán, Qro, México, libro técnico No. 5
- Pérez-Pacheco, R., H.C. Rodríguez, J. Lara-Reyna. B.R. Montes, y V.G. Ramírez. 2004. Toxicidad de los aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* say. Acta zoológica mexicana (n.s.) 20(1):141-152.
- Porras, L.A.P. y M.A. López. 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Temas selectos de ingeniería de alimentos 3-1:121-124.
- Quevedo, O. R. Crozzoli, G. Perichi. 2010. Uso de extractos acuosos y etanólicos de plantas para el control de *Meloidogyne enterolobii* (Nematoda: Tylenchida). Fitopatol. Venez. 23(2): 45-53.
- Rodríguez, A.V., A.J. Aguilar, R. Cámara, J.F. Torres. 2011. Inmunización con L₃ de *Haemonchus contortus* sobre la ganancia de peso y la carga parasitaria en

- corderos bajo pastoreo. En: Memorias de la reunión AMTEO. Villahermosa, México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Roeber, F., A.R. Jex, R.B. Gasser. 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites & Vectors*, 6:153. <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/153>.
- Roeber, F., A.R. Jex, R.B. Gasser. 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites & Vectors*, 6:153. <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/153>.
- Romero, J.R. y C.A. Boero. 2001. Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la Argentina. *Revisión. Analeceta Veterinaria*, 21(1):21-37.
- Saddiqi, H.A., Z. Iqbal, M.N. Khan, M. Sarwar, G. Muhammad, M. Yaseen, A. Jabbar. 2010. Evaluation of three Pakistani sheep breeds for their natural resistance to artificial infection of *Haemonchus contortus*. *Vet Parsitol*, 168:141-145.
- Saminathan, M., A. Gopalakrishnan, A. Latchumikanthan, A.A.P. Milton, M. Aravind, K. Dhama and R. Singh. 2015. Histopathological and Parasitological Study of Blood-Sucking *Haemonchus contortus* Infection in Sheep. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(2):99-108.
- Sánchez, R. J.L., 2002. Efecto de extractos de *Ruta graveolens* (Rutaceae) sobre *Radopholus similis* e identificación de nematodos asociados al cultivo de plátano *Musa spp.* Tesis de Maestría por la Universidad de Colima, Colima, México.
- SAS Institute. 1999. The SAS System for Windows. Version 9.1. SAS Institute. Inc. Cary, N. C. USA.
- Sasanelli, N. 1992. Nematicidal activity of aqueous extracts from leaves of *Ruta graveolens* on *Xiphinema index*. *Nematol.Medit.*, 20:53-55.
- Saumell, C. A., A. S. Fernandez. 2000. Hongos hematófagos para el control biológico de nematodos parásitos de rumiantes. *Rev. Med. Vet.* Vol. 81:270-273.
- Scherer, R., H.T. Godoy. 2014. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity, *Rev. Bras. Pi. Med.*, Campinas, 16: 41-46.
- Schmeda-Hirschmann, G., T.A. Tapia, C. Theoduloz, J. Rodríguez, S. López, F.G. Egly. 2004. Free Radical Scavengers and Antioxidants from *Tagetes mendocina*. *Free Radic. Res.* 56: 227-232.
- Serrano, G. L.B., D.A. Soto, P.F. Ruiz, H.M.P. Nava, M.J. Morán, P.E.F. Martínez. 2013. Efecto tóxico del extracto acuoso de *Ruta graveolens* del Norte de México sobre el Hígado de Ratas Wistar. *Int J Morphol.*, 31(3):1041-1048.

- Shaukat, S.S., I.A. Siddiqui, H.G. Khan, M.J. Zaki. 2002. Nematicidal and allelopathic potential of *Argemone mexicana*, a tropical weed. *Plant Soil*, 245: 239-247.
- Sherrill, A. F., T. Craing, R. M. Kaplan, J. E. Miller, C. Navarre y M. Rings. 2006. Anthelmintic Resistance of Gastrointestinal Parasites in Small Ruminants. *J. Vet Intern Med*; 20:435-444.
- SIAP, 2012. Estadística de la producción pecuaria desde el 2001 al 2012. <http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/estadistica.aspx>.
- Sierra-García, I.N., M. Romero-Tabares, S. Orduz-Peralta. Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aisladas de suelo. *Actual Biol* 34 (96):5-19.
- Simmonds, M., R.V. Preedy. 2015. Nutritional composition of fruit cultivars, First ed., Academic Press., UK, 796 p.
- Soca, P.M. 2005. Los nematodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes. Comportamiento en los sistemas silvopastoriles cubanos. Tesis de Maestría. Estación experimental de pastos y forrajes "Indio Hatuey" ministerio de educación superior. Universidad Agraria de la Habana, la Habana, Cuba.
- Stepek, G., A.E. Lowe, D.J. Buttle, I.R. Duce, J.M. Behnke. 2007. Anthelmintic action of plant cysteine proteases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola* *in vitro* and *in vivo*. *J Parasitology* Vol. 134:103-112.
- Tampe, J., L. Parra, K. Huaiquil, A. Quiroz. 2016 Potential repellent activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* (Linnaeus) from Chile against *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae). *J. Soil Sci Plant Nutrition*, 16(1):48-59.
- Torres, L. O., M.E.T. Pérez, A. A. Contreras. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico, Edicions Universitat Barcelona, 173 p.
- Torres-Acosta, J.F.J., P. Mendoza-de-Gives, A.J. Aguilar-Caballero, J.A. Cuéllar-Ordaz. 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.* 189, 89-96.
- Vanimisetti, H.B., S.P. Greiner, A. M. Zajac, D.R. Notter. 2004. Performance of hair sheep composite breeds: Resistance of lambs to *Haemonchus contortus*. *J. Anim. Sci.* 82:595-604.
- Vargas, G.J.C. 2011. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en hojas de *Wigandia urens* (HYDROPHYLLACEAE). Tesis de licenciatura, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- Vatta, A.F., P.J. Waller, J.B. Githiori and G.F. Medley. 2012. Persistence of the efficacy of copper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in grazing South African goats. *Vet Parasitol.* Vol 190:159-166.
- Von Son-de Fernex, E., M.A. Alonso-Díaz, B. Valles-de la Mora, C.M. Capetillo-Leal. 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*, Journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr.
- Von Son-de Fernex, E., M.A. Alonso-Díaz, P. Mendoza-de Gives, B. Valles-de la Mora, M. González-Cortazar, A. Zamilpa. C.G. Epigmenio. 2015. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Vet Parasitol.* , <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.005>.
- Waller, P.J. 2004. Management and control of nematode parasites of small ruminants in the face of total anthelmintic failure. Department of parasitology (SWAPAR), National Veterinary Ins.
- Wuys, N., G. Lognay, M. Verscheure, M. Marlier, D. De Waele, R. Swennen. 2007. Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* in roots of susceptible and resistance banana (*Musa* spp.) *Plant Pathol.* 56: 878- 890.