



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**EFFECTO DE LOS POLIFENOLES TOTALES Y TANINOS  
CONDENSADOS DE *Gliricidia sepium* SOBRE NEMATODOS  
GASTROINTESTINALES**

**CLAUDIA PÉREZ PÉREZ**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2019



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas

Campeche-Córdoba-Montecillo-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe Claudia Pérez Pérez, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe 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 el Dr. Emilio Manuel Aranda Ibañez, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "EFECTO DE LOS POLIFENOLES TOTALES Y TANINOS CONDENSADOS DE *Gliricidia sepium* SOBRE NEMATODOS GASTROINTESTINALES" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero de Tesis y la 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.

H. Cárdenas, Tabasco, a 28 de junio de 2019.

---

Claudia Pérez Pérez  
Firma

---

Dr. Emilio Manuel Aranda Ibañez  
Vo. Bo. Profesor Consejero de Tesis

La presente tesis, titulada “**EFFECTO DE LOS POLIFENOLES TOTALES Y TANINOS CONDENSADOS DE *Gliricidia sepium* SOBRE NEMATODOS GASTROINTESTINALES**”, realizado por la alumna: Claudia Pérez Pérez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

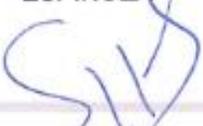
CONSEJERO:

  
DR. EMILIO MANUEL ARANDA IBÁÑEZ

ASESORA:

  
DRA. LUZ DEL CARMEN LAGUNES  
ESPINOZA

ASESOR:

  
DR. MANUEL MATEO HERNÁNDEZ  
VILLEGAS

ASESOR:

  
DR. JESÚS ALBERTO RAMOS JÚAREZ

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 28 DE JUNIO DEL 2019

# EFFECTO DE LOS POLIFENOLES TOTALES Y TANINOS CONDENSADOS DE *Gliricidia sepium* SOBRE NEMATODOS GASTROINTESTINALES

Claudia Pérez Pérez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2019

## RESUMEN

Las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) son la principal problemática que incrementa la mortalidad de animales y los costos de producción en regiones tropicales trayendo como consecuencia baja utilidad al productor. El incremento de NGI resistentes a antihelmínticos (AH) químicos ha resultado en el desarrollo de estrategias alternativas, entre ellos se destacan los relacionados con el uso de plantas que contienen metabolitos secundarios (MS) con potencial antiparasitario. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto AH *in vitro* de los polifenoles totales (PFT) y taninos condensados (TC) contenidos en los extractos acetona/agua (EAA) y acuoso (EA) de hojas de *Gliricidia sepium* sobre huevos y larvas de NGI de ovinos. Las pruebas químicas cualitativas detectaron taninos, alcaloides, esteroides y flavonoides. Las pruebas cuantitativas demostraron la presencia de 18.76 mg g<sup>-1</sup> de polifenoles totales y 9.98 g kg<sup>-1</sup> de taninos condensados en la edad de 90 días. Se realizaron seis tratamientos (2400, 1200, 600 y 300 µg/mL y dos controles, uno positivo con un antihelmíntico comercial Tiabendazol y uno negativo con agua destilada) con cuatro repeticiones por tratamiento para ambos extractos. Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza y prueba de comparación de medias. Los huevos de NGI fueron obtenidos de un ovino de tres meses de edad con infección natural y utilizados para realizar las pruebas *in vitro* eclosión de huevos (EH) y desarrollo larval (DL). En ambos extractos la concentración de 1200 µg/mL fue la que mostró mayor eficacia en la prueba de EH. En la prueba de DL la concentración 300 µg/mL del EA presentó la menor eficacia (48.01%), mientras que en el EAA todas las concentraciones fueron estadísticamente iguales. Los resultados muestran que los extractos de *G. sepium* exhiben efecto AH *in vitro* contra NGI.

**Palabras clave:** Eclosión de huevos, desarrollo larvario, *G. sepium*, polifenoles, taninos.

# EFFECT OF TOTAL POLYPHENOLS AND CONDENSED TANNINS OF *Gliricidia sepium* ON GASTROINTESTINAL NEMATODES

Claudia Pérez Pérez, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2019

## ABSTRACT

Gastrointestinal nematode (GIN) infections are the main problem that increases animal mortality and production costs in tropical regions, resulting in low utility to the producer. The increase of GIN resistant to chemical anthelmintics (AH) has resulted in the development of alternative strategies, among which those related to the use of plants containing secondary metabolites (SM) with antiparasitic potential stand out. The objective of the present study was to evaluate the in vitro AH effect of the total polyphenols (PFT) and condensed tannins (TC) contained in the acetone / water (AWE) and aqueous extracts (AE) of leaves of *Gliricidia sepium* on eggs and larvae of GIN of sheep. The qualitative chemical tests detected tannins, alkaloids, sterols and flavonoids. The quantitative tests showed the presence of 18.76 mg g<sup>-1</sup> of total polyphenols and 9.98 g kg<sup>-1</sup> of condensed tannins at the age of 90 days. Six treatments were performed (2400, 1200, 600 and 300 µg / mL and two controls, one positive with a commercial anthelmintic Tiabendazole and one negative with distilled water) with four repetitions per treatment for both extracts. The data were analyzed by means of an analysis of variance and means comparison test. The eggs of GIN were obtained from a three-month-old sheep with natural infection and used to perform in vitro tests egg hatching (EH) and larval development (LD). In both extracts, the concentration of 1200 µg / mL was the most effective in the EH test. In the LD test, the 300 µg / mL concentration of the AE presented the lowest efficacy (48.01%), while in the AWE all the concentrations were statistically equal. The results show that extracts of *G. sepium* exhibit AH effect in vitro against GIN.

**Key words:** Egg hatching, larval development, *G. sepium*, polyphenols, tannins.

## DEDICATORIA



*Dedico esta tesis a mis padres Antonio y Cleotilde, por tenerme fe, esperanza, por su amor incondicional e infinito, por acompañarme siempre en los buenos y malos momentos de mi vida, por escucharme y por sus esfuerzos para apoyarme en esta etapa de mi vida.*

*A mi hermana Jane Mariam y a mis sobrinos, ya que siempre tuvieron tiempo para alentarme y mandándome bendiciones.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme cada día la oportunidad de seguir adelante en cada proyecto trazado en mi vida, por escucharme cada vez que le hablé pidiendo fortaleza y protección.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado con la beca (813630) para la realización de mis estudios de maestría en ciencias para llevar a cabo este proyecto.

Al Colegio de Postgraduados campus Tabasco por haberme aceptado como estudiante de la maestría y por permitirme acceder a las instalaciones del campo experimental “la loma” para la obtención de muestras biológicas, así como a su personal de campo por ayudarme en la manipulación de los animales.

A los Doctores que me impartieron clases dándome otra perspectiva de la investigación.

Al Dr. Jorge Oliva Hernández por habernos proporcionado el principal material, las hojas de cocoíte, para la realización de este proyecto.

A los miembros de mi comité académico: Dr. Emilio Manuel Aranda Ibáñez por su apoyo constante, a la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza por su tiempo, paciencia, su guía durante la realización de las pruebas en la segunda fase del trabajo en su laboratorio de Fisiología Vegetal del Campus y sus observaciones, al Dr. Manuel Mateo Hernández Villegas por su orientación en la fase experimental, aportaciones y dedicación y al Dr. Jesús Alberto Ramos Juárez por haberme tenido paciencia, por su valioso tiempo y por las sugerencias aportadas para enriquecer el trabajo.

A la Universidad Popular de la Chontalpa (UPCH) por permitirme trabajar en sus laboratorios para la realización de la fase experimental de la tesis.

A la Q.F.B. Diana Laura Rivera Torrez por su apoyo, su paciencia, su tiempo y por enseñarme las técnicas de laboratorio para la obtención de los extractos vegetales y la realización de las pruebas *in vitro*.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	II
ABSTRACT .....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS .....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 GENERAL .....	4
2.2 PARTICULARES.....	4
3 HIPÓTESIS .....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
4.1 NEMATODOS GASTROINTESTINALES Y SU CICLO DE VIDA .....	5
4.2 ANTIHELMÍNTICOS COMERCIALES Y SU MODO DE ACCIÓN .....	7
4.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA .....	8
4.4 RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA (RA) .....	9
4.5 PROPIEDADES ANTIHELMÍNTICAS DE LAS PLANTAS .....	9
4.6 METABOLITOS SECUNDARIOS (MS) EN FABACEAS.....	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
5.1 CONDICIONES AMBIENTALES .....	13
5.2 SELECCIÓN DE LOS ÁRBOLES.....	13
5.3 CORTE DE UNIFORMIDAD DE BIOMASA .....	13
5.4 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL .....	14
5.5 PRUEBAS CUALITATIVAS: ANÁLISIS FITOQUÍMICO .....	14
5.5.1 FLAVONOIDES (PRUEBA DE SHINODA) .....	14
5.5.2 ESTEROLES (PRUEBA DE LIEBERMANN-BURCHARD) .....	14
5.5.3 SAPONINAS .....	14
5.5.4 ALCALOIDES (REACTIVO DE WAGNER) .....	15

5.5.5 TANINOS .....	15
5.6 PRUEBAS CUANTITATIVAS: CUANTIFICACIÓN DEL PORCENTAJE DE TANINOS CONDENSADOS EN LAS TRES EDADES DE REBROTE .....	15
5.6.1 DESENGRASADO DE MUESTRAS .....	15
5.6.2 EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.....	15
5.6.3 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.....	16
5.6.4 DETERMINACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS (PROANTOCIANIDINAS) .	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	19
6.1 PRUEBAS CUALITATIVAS.....	19
6.2 PRUEBAS CUANTITATIVAS.....	20
6.3 EFECTO DEL EXTRACTO ACETONA: AGUA Y ACUOSO DE <i>GLIRICIDIA SEPIUM</i> SOBRE LA ECLOSIÓN DE HUEVOS DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES.....	21
6.4 EFECTO DEL EXTRACTO ACETONA: AGUA Y ACUOSO DE <i>GLIRICIDIA SEPIUM</i> SOBRE DESARROLLO LARVARIO DE HUEVOS DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES.....	25
7. CONCLUSIONES.....	27
8. LITERATURA CITADA.....	28

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Curva de calibrado para polifenoles totales con ácido gálico. ....	16
<b>Cuadro 2.</b> Metabolitos secundarios presentes en las hojas de <i>Gliricidia sepium</i> a diferentes edades de rebrote. ....	20
<b>Cuadro 3.</b> Medias de polifenoles totales y taninos condensados presentes en las diferentes edades de rebrote de <i>Gliricidia sepium</i> . ....	21
<b>Cuadro 4.</b> Medias de inhibición de los extractos de <i>Gliricidia sepium</i> sobre huevos de nematodos gastrointestinales.....	22
<b>Cuadro 5.</b> Medias de inhibición del desarrollo larval de los extractos de <i>Gliricidia sepium</i> sobre nematodos gastrointestinales .....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Metabolitos secundarios derivados de los metabolitos primarios.....	11
<b>Figura 2</b> Huevos en estado de mórula de NGI .....	23
<b>Figura 3</b> Huevo larvado de NGI.....	23
<b>Figura 4.</b> Larvas L <sub>1</sub> de nematodos gastrointestinales expuestas al extracto acetona: agua y acuoso de <i>G. sepium</i> durante 7 días, leídos al 400x.....	26

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La resistencia antihelmíntica (RA) de los nemátodos gastrointestinales (NGI) en los ovinos en pastoreo es un problema mundial. Esta ha provocado la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para el control de NGI en los rebaños de pequeños rumiantes. Una de las posibles opciones para dicho control es el uso de plantas que contienen metabolitos secundarios (MS) para el control de NGI. El uso de plantas ha sido aplicado a través de la medicina etnoveterinaria en Pakistán (Ahmed y Murtaza, 2014), Israel (Landau *et al.*, 2013), India (Sharma y Manhas, 2015), Brasil (Ritter *et al.*, 2012), Reino unido y Etiopía (Peachey *et al.*, 2014) para el tratamiento de diversas afecciones en los animales, usando principalmente hojas para preparar infusiones. La etnoveterinaria se basa en el uso de la medicina tradicional y consiste en la preparación de extractos de una o varias plantas que son aplicadas directamente a los animales en busca de efectos curativos (Githiori *et al.*, 2006). Debido al potencial antiparasitario que han demostrado algunas plantas en la etnoveterinaria, han habido diversos estudios a nivel *in vitro* para la selección y aplicación de extractos de plantas para usos medicinales usando distintos disolventes: etanólico (Simalango y Utami, 2014; Carval *et al.*, 2017), metanólico (Marie-Magdeleine, *et al.*, 2010; Ngaradoum *et al.*, 2017; Váradyová *et al.*, 2018;), acetónico (Fouché *et al.*, 2016), acetona: agua (Chan-Pérez *et al.*, 2016), hexánico y diclorometano (Hernández-Villegas *et al.*, 2011) y acuoso (Nogueira *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2013; Belemilga *et al.*, 2014; Mendoca *et al.*, 2019). La mayoría de los estudios se han centrado en infecciones inducidas de *Haemonchus contortus* evaluando el efecto AH mediante pruebas de eclosión de huevos, inhibición de la migración larval, inhibición de la motilidad de adultos y desenvaine larval. En el caso de infecciones naturales y la prueba de desarrollo larval es poco lo que se ha investigado.

Sin embargo, los metabolitos secundarios (MS) a los cuales se les atribuye el potencial antiparasitario pueden variar en la planta debido a diversos factores. Las condiciones ambientales a las cuales las fabáceas forrajeras están expuestas durante su crecimiento pueden limitar la acumulación de biomasa y la concentración de MS (García *et al.*, 2005; Jayanegara *et al.*, 2011). Existe una gran variación cualitativa y cuantitativa en el

contenido de MS entre diferentes especies vegetales. El contenido de estas sustancias puede alcanzar hasta un 40% de la materia seca dependiendo de factores climáticos, edafológicos y de la parte de la planta en que se encuentren (Santacoloma-Varon y Enrique-Granados, 2010). Kumar (1992) encontró que los distintos compuestos que puede producir una especie presentan una determinada distribución dentro de los órganos, tejidos y células de una planta, y ello responde frecuentemente a las influencias ambientales. En un trabajo realizado por Santacoloma-Varon y Enrique-Granados (2010) encontraron que el contenido de Polifenoles Totales (PFT) y los taninos condensados (TC) de *Tithonia diversifolia* a 960 m y 131 m de altitud, fueron mayores en las plantas que se encontraban a una mayor altitud. Similarmente, el comportamiento mostrado por *G. sepium* en las mismas condiciones de altitud se observó una diferencia significativa en PFT y TC causada por la diferencia en altitud. García-Ferrer et al. (2016) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos en cuatro especies de fabáceas forrajeras a diferentes edades de rebrote (21, 42, 63 y 84 días), encontrando diferencias significativas en todas las edades evaluadas. Según Waterman y Mole (1994), el contenido de MS está influenciado por el genotipo de la planta (la especie y la variedad), las características ambientales (la radiación solar y la disponibilidad de agua), la velocidad de crecimiento, la madurez, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades. Así mismo, la presencia de los MS está relacionada con los mecanismos de defensa de la planta. Los distintos tipos de MS que puede producir una especie presentan una distribución dentro de los órganos, los tejidos y las células de una planta, y ello responde a menudo de las influencias ambientales, siendo el clima, la humedad y la luminosidad los factores que más inciden en la presencia de MS (Santacoloma-Varon y Enrique-Granados, 2010). Por lo tanto, conocer cómo la edad del rebrote afecta la cantidad de MS en las hojas es importante para diseñar programas de control integral que consideren el uso de esta herramienta. Esta investigación está encaminada a buscar alternativas debido al amplio fenómeno de RA en poblaciones de NGI resistentes a los AH comerciales actualmente disponibles.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los nematodos gastrointestinales (NGI) en ovinos son la mayor causa de enfermedades alrededor del mundo, especialmente en áreas tropicales de México donde el clima cálido, la humedad, la época del año, la etapa fisiológica y la edad influyen en el incremento de la susceptibilidad de los ovinos a la infección. Por otra parte, la alimentación de los ovinos en la región tropical, se base en el uso de los pastos, por lo tanto, la exposición a las larvas de nematodos es continua durante todo el año y esto favorece el desarrollo y la supervivencia de NGI de vida libre trayendo con ello retraso en las ganancias de peso, aumento de los requerimientos de la alimentación, reducción en la calidad de la canal, la predisposición a otras enfermedades, pérdidas económicas a los productores y mortandad en animales jóvenes. Las enfermedades parasitarias se encuentran entre las causas más frecuentes e importantes que ocasionan una ineficiencia económica en los sistemas pecuarios del país. La estrategia principal a nivel mundial para tratar de controlar las infecciones parasitarias a lo largo de varios años ha sido a través del control químico, sin embargo, el abuso de los desparasitantes comerciales ha traído como consecuencia la resistencia antihelmíntica y los residuos de éstos encontrados en la carne de los animales, ha afectado el consumo de la carne y los derivados de. Esta situación hace necesario buscar alternativas de control parasitario. Una de las alternativas es el uso de plantas leguminosas que posean propiedades antihelmínticas (AH). Estas propiedades benéficas son asociadas a los metabolitos secundarios (MS). La actividad nematocida de los extractos de plantas ha sido apoyada por una serie de estudios previos a nivel *in vitro* e *in vivo*.

## **2. Objetivos**

### **2.1 General**

Estudiar el efecto de polifenoles totales y taninos condensados extraídos con acetona: agua y agua de hojas de *Gliricidia sepium* sobre nematodos gastrointestinales de ovinos infectados naturalmente.

### **2.2 Particulares**

- i. Determinar la presencia de compuestos fenólicos, y cuantificar el contenido de polifenoles totales y taninos condensados en hojas de *Gliricidia sepium* a tres edades de rebrote (60, 90 y 120 días).
- ii. Evaluar el efecto ovicida y larvicida de los polifenoles totales y taninos condensados contenidos en el extracto acetona: agua y acuoso de hojas de *Gliricidia sepium* sobre nematodos gastrointestinales de ovinos infectados naturalmente.

## **3 Hipótesis**

Las hojas de *Gliricidia sepium* presentan diferencias en la concentración de compuestos fenólicos por la edad de rebrote y estos tienen efecto ovicida y larvicida cuando es aplicado a nematodos gastrointestinales de ovinos infectados naturalmente.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Nematodos gastrointestinales y su ciclo de vida

Las especies de NGI que afectan a ovejas y cabras incluyen: *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia / Ostertagia*, *Strongyloides*, *Bunostomum*, *Nematodirus*, *Chabertia*, *Trichuris*, *Cooperia*, *Skrjabinema* y *Oesophagostomum* (Asmare *et al.*, 2016) y comparten el mismo ciclo de vida que es directo, e incluye dos fases: una exógena y otra endógena. Los parásitos adultos machos, en el tracto gastrointestinal (TGI) copulan con las hembras, y éstas ponen huevos que contienen embriones en desarrollo (Vlassoff *et al.*, 2001). En la fase exógena los huevos de los NGI salen junto con las heces del animal al ambiente, se cree que la incubación y posterior liberación de la larva de la primera etapa es el resultado de una combinación de eventos mecánicos y enzimáticos. La cáscara del huevo consiste en tres capas básicas que son secretadas por el embrión. Estos incluyen una capa lipídica interna, una capa quitinosa media y una capa vitelina externa. Estas capas comienzan a formarse inmediatamente después de la fertilización del huevo. Se cree que la membrana vitelina externa se origina en la fertilización cuando se forma una segunda membrana debajo del oolema. La capa cortical medial se forma entre estas dos membranas, empujando la membrana vitelina hacia el exterior donde se endurece (Bird, 1971). Durante este tiempo, el citoplasma del huevo se vuelve muy activo, con un retículo endoplásmico rugoso y gránulos refringentes que se desarrollan en el área cortical (Croll, 1976). Pocas horas después de la fertilización, el área cortical proteica y quitinosa se engrosa y se desarrolla (Croll, 1976). En varias especies de nematodos, la quitina y los complejos de proteínas aparecen como microfibrillas de quitina de 2,8 nm incrustadas en una matriz de proteínas (Neville, 1975). La capa quitinosa se compone de fibrillas de este tamaño rodeadas por una capa proteica, lo que sugiere que esta es la unidad básica de esta capa (Wharton, 1980). La capa basal o lipídica está formada por material secretado en la superficie del citoplasma del huevo o por la extrusión de gránulos refringentes del huevo (Wharton, 1979). A medida que la capa lipídica se desarrolla, el huevo adquiere su característica impermeabilidad. La eclosión se produce en respuesta a un estímulo o estímulos de un huésped, como en algunas formas parasitarias, o tiene lugar en condiciones ambientales normales en

respuesta a estímulos que forman parte de este entorno normal. Rogers y Brooks (1977) en un análisis descubrieron que la cáscara de huevo de *Haemonchus contortus* había sido dañada por la lipasa y leucina aminopeptidasa durante la eclosión, mientras que Perry (1989) encontró la presencia de quitinasa durante la eclosión de *Trichostrongylus colubriformis*. Estas enzimas son las que rompen la cáscara y eclosionan a larva L1 en 24 a 30 h, para luego evolucionar a larva L2 en alrededor de dos a tres días; éstas, sufren una segunda ecdisis o muda para transformarse en larva L3 o estadio infectante en cuatro a siete días según las condiciones ambientales. La L3 es activa: sube a los tallos y las hojas de los pastos y las herbáceas que sirven como alimento a los rumiantes para producir de ese modo la infección (Torres-Acosta y Aguilar-Caballero, 2005; Wang *et al.*, 2014). En la fase endógena la larva infectante recién consumida busca su sitio de predilección en el TGI. Los diferentes géneros de NGI encuentran dicho sitio al detectar glucoproteínas y glucolípidos producidos por el glucocáliz de los bordes de las células epiteliales. Estas sustancias sirven como receptores que permiten a las larvas unirse con la superficie epitelial (Torres-Acosta y Aguilar-Caballero, 2005). La larva penetra la membrana mucosa (en el caso de *Haemonchus* o *Trichostrongylus*) o entra a las glándulas gástricas (*Ostertagia*) o en la submucosa de intestino grueso (*Oesophagostomum*) y en un periodo de uno a dos días se transforma en larva L4. Las L4 permanecen en la membrana mucosa, en las glándulas gástricas o en la submucosa del intestino grueso por un periodo de 14 días. Luego emergen y se transforman en la etapa de adulto joven conocida como L5 y después en parásitos adultos machos y hembras (Aguilar-Caballero *et al.*, 2008). El período prepatente (tiempo de ingestión de la larva infectiva, hasta la maduración del adulto y puesta de huevos) de la mayoría de los nematodos es de 21 días aproximadamente, pero este período puede ser extendido por aquellos que son capaces de entrar a un período de retraso en el crecimiento llamado hipobiosis, fenómeno en el que las larvas infectantes permanecen latentes como L4 dentro del hospedero. Aunque aparentemente existen diferentes circunstancias que inician el estado de hipobiosis, con mayor frecuencia el estímulo es el medio ambiente adverso, recibido por la larva infectiva de vida libre antes de ser ingerida por el huésped. Esto, podría ser como una astucia del parásito para evitar las condiciones climáticas adversas para su progenie, permaneciendo sexualmente inmadura en el huésped hasta

el retorno de condiciones más favorables. La maduración de esas larvas arrestadas parece estar ligada con el ciclo de reproducción del huésped alrededor del parto y por el comienzo de la época de lluvias (Taylor *et al.*, 2007). Los factores extrínsecos tales como el clima, los sistemas de manejo y la influencia de la geografía y la flora en el nicho ecológico ocupado por los estadios de vida libre de los nematodos parásitos gastrointestinales ejercen claramente una gran influencia en el tamaño de la infección larval en el hospedero (Sinclair *et al.*, 2016).

En todos los niveles de edad en ambos sexos los animales pueden ser infectados (Taylor *et al.*, 2009; Sczesny-Moraes *et al.*, 2010).

## **4.2 Antihelmínticos comerciales y su modo de acción**

Hasta la fecha, el modo habitual de control del parasitismo gastrointestinal se basa en el uso repetido de AH comerciales. Los AH utilizados para controlar a los NGI se agrupan en tres familias principales de antihelmínticos de amplio espectro y son clasificados según su modo de acción:

### **1. Benzimidazoles y Probenzimidazoles**

Estas moléculas actúan sobre los microtúbulos de las células intestinales y tegumentarias del parásito y se fijan directamente sobre las moléculas de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina de los parásitos bloqueando así su unión y evitando la formación de los microtúbulos (Mottier *et al.*, 2006).

Los benzimidazoles y los probenzimidazoles actúan sobre los NGI y los parásitos respiratorios. Algunos de ellos (fenbendazol, oxfendazol, albendazol) tienen cierta actividad sobre los cestodos y trematodos (Mottier *et al.*, 2006; Meany *et al.*, 2007).

### **2. Imidiazotiazol (levamisol) y Tetrahidropirimidinas (Ipirantel, morantel)**

Actúan como antagonistas colinérgicos. Las células musculares de los nemátodos normalmente permanecen cerradas en ausencia de agentes de afinidad, pero pueden abrirse en presencia de sustancias de afinidad específica como los AH nicotínicos; la unión con los receptores nicotínicos y extra sinápticos de las membranas de las células

somáticas de los nemátodos provocan una contracción muscular al afectar la permeabilidad de las membranas de las células musculares, causando parálisis y muerte del nemátodo (Mottier *et al.*, 2006).

### 3. Lactonas Macroclínicas (avermectinas y milbemicinas).

Las lactonas macroclínicas (LM) actúan como agonistas aumentando la permeabilidad de los canales de cloro de las células musculares. Cuando las moléculas de LM se unen a los receptores agonistas del ácido gamma aminobutírico (GABA) que es un neurotransmisor, provocan una hiperpolarización de las membranas somáticas musculares y/o neuronal que se traduce en parálisis muscular (Prichard, 2002) afectando la faringe, los músculos del cuerpo y del útero de los NGI (Vercruyssen y Rew, 2002) dañando la capacidad de alimentación y reproducción del parásito (Martín, 1996; Kôler, 2001).

### 4.3 Importancia económica

Anualmente el productor usa mucho dinero para combatir el parasitismo gastrointestinal (Jabbar *et al.*, 2006). La infección por NGI es reconocida como el principal obstáculo en la producción de pequeños rumiantes en zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial (Waller, 2003). Lo anterior se ha reflejado en la ineficiencia económica en los sistemas pecuarios del país; tales problemas producen pérdidas económicas tanto directas como indirectas en la producción de los animales, trayendo como consecuencia baja utilidad al productor (Domke *et al.*, 2013). En Italia las infecciones gastrointestinales influyeron en la baja producción en la leche de cabra (pérdidas directas) (Alberti *et al.*, 2014); mientras que en Etiopía las pérdidas económicas debidas a la helmintosis en rumiantes incluyen una disminución en la ingesta de alimentos y menores ganancias de peso, disminución de la fertilidad, reducción de la capacidad de trabajo, sacrificio no intencional, menor producción de leche, costos de tratamiento y mortalidad en animales fuertemente parasitados (pérdidas indirectas) (Mohamed *et al.*, 2016). Sin embargo, el uso intensivo de AH comerciales tiene grandes desventajas, como la falta de disponibilidad en algunos lugares, la calidad inconsistente en algunos países, el alto costo y la contaminación ambiental (Gradé *et al.*, 2008). Se estima que el gasto anual mundial para combatir esta

problemática en el ganado es de US\$1.7 billones (Jabbar *et al.*, 2006; Agaie y Onyeyili, 2007). Las cifras mundiales indican que cada año se pierden alrededor de 4 billones de dólares como resultado de estas infecciones.

#### **4.4 Resistencia antihelmíntica (RA)**

Aunque los antihelmínticos (AH) comerciales ofrecen un rápido control se ha detectado resistencia antihelmíntica (RA) de *H. contortus* (Schnyder *et al.*, 2005; Cringoli *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2012; Adiele *et al.*, 2013; Soro *et al.*, 2013) en varios continentes. La principal señal de resistencia es el incremento en el número de parásitos que sobreviven a la dosis que se considera letal de los AH comerciales. Diversos estudios han demostrado que se ha creado RA en tres grupos de AH: benzimidazoles/probenzimidazoles, tetrahidropirimidinas y lactonas macrocíclicas (Barrère *et al.*, 2012; Bentounsi *et al.*, 2012; Veríssimo *et al.*, 2012; Falzon *et al.*, 2013; Chaudhry *et al.*, 2014; Muñoz-Lagunes *et al.*, 2015). La resistencia hacia benzimidazoles se ha reportado en América (Brasil *et al.*, 2012), África (Bentounsi *et al.*, 2012), Asia (Garg and Yadav, 2009), Europa (Geurden *et al.*, 2014) y Oceanía (Rendell, 2010). En México, fue en 1988 que se reportó por primera vez la aparición de RA (Ruelas *et al.*, 1990). Estos autores reportaron la aparición de una cepa de *H. Contortus* resistente al albendazol. En Yucatán, en un estudio realizado en la zona oriente del estado, se encontró un 15.8% de resistencia al bencimidazol en rebaños de ovinos y un 23.7% sospechoso (Torres-Acosta *et al.*, 2003). El incremento de cepas de nematodos resistentes a AH sintéticos, los residuos de éstos que entran a la cadena alimenticia y la contaminación ambiental han propiciado la búsqueda de estrategias alternativas para encontrar solución a la problemática del parasitismo gastrointestinal en ovinos (Salgado y Santos, 2016).

#### **4.5 Propiedades antihelmínticas de las plantas**

Una alternativa es el uso de la medicina etnoveterinaria usando hierbas tradicionales con actividad AH (Sandoval *et al.*, 2012; Landau *et al.*, 2014; Ahmed & Murtaza, 2015, Sharma & Manhas, 2015,). Los extractos de plantas con actividad AH ha sido reportada en varias regiones del mundo ofreciendo una nueva estrategia prometedora para la industria de la biotecnología y una que beneficiara a los criadores de rumiantes (Sawleha

*et al.*, 2010; Nery *et al.*, 2010; Goswami *et al.*, 2011; Getachew *et al.*, 2012; Mohammed *et al.*, 2013; Kakar *et al.*, 2013; Deepa *et al.*, 2015)

En este contexto, las plantas que contienen metabolitos secundarios (MS) pueden ser la alternativa para el control parasitario en rumiantes (Oliveira *et al.*, 2017). Las leguminosas tropicales han recibido mayor atención por su elevada concentración de MS (García *et al.*, 2016) y por los beneficios que ofrecen de acuerdo con su calidad nutricional. *Gliricidia sepium* es una planta de usos múltiples y que se encuentra distribuida en el sureste mexicano y Centroamérica, un estudio previo detectó la presencia de compuestos polifenólicos (von Son-de Fernex *et al.*, 2012). Sin embargo, investigaciones recientes han utilizado bloqueadores de taninos en extractos de otras plantas obteniendo aún el efecto AH (von Son-de Fernex *et al.*, 2016) y otros autores han identificado otras moléculas bioactivas con efecto AH, como los flavonoides glicosilados, las flavonas y las lactonas sesquiterpénicas (Molan *et al.* 2003; Barrau *et al.* 2005).

#### **4.6 Metabolitos secundarios (MS) en Fabaceas**

Las investigaciones fitoquímicas han revelado una alta diversidad estructural de metabolitos secundarios en las plantas de la familia de las Fabaceas, que comprenden más de 21,000 alcaloides, 700 aminoácidos no proteicos, 200 glucosidos y glucosinolatos cianogénicos, >20,000 terpenoides, >10,000 polifenoles, >1500 poliacetilenos y ácidos grasos, 750 policetidos y 200 carbohidratos (Dewick, 2002; Wink, 2008).

La síntesis y el almacenamiento de los MS pueden considerarse como una estrategia para la defensa y la comunicación. Las plantas son sésiles y no pueden escapar cuando son atacadas por herbívoros ni tienen el complejo sistema inmune de animales contra bacterias, hongos, virus y parásitos. Para defenderse contra herbívoros, plantas competidoras y patógenos, las plantas han desarrollado una diversidad de metabolitos secundarios con una amplia gama de propiedades farmacológicas y toxicológicas (Wink & Schimmer, 2010).

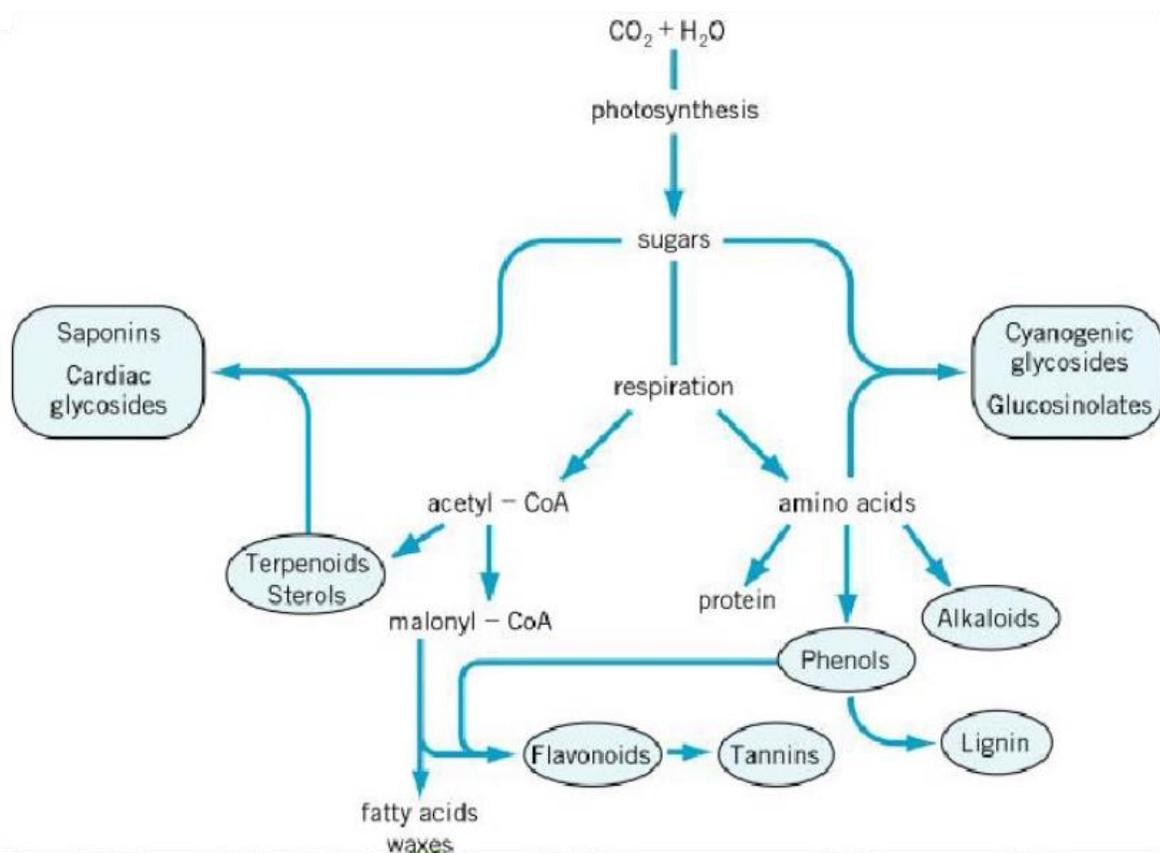
El metabolismo primario se considera esencial para la vida y es común a todos los seres vivos del mundo, sin embargo, el metabolismo secundario únicamente se produce en ciertos grupos vegetales además de regular interacciones plantas con otros organismos (kuklinski, 2000).

Compuestos procedentes del metabolismo secundario:

\*Isoprenoides: terpenos, aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos.

\*Derivados fenólicos: 1) Shikimatos: fenoles y ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas, taninos. 2) Acetatos: quinonas, antracenosidos.

\*Alcaloides.



**Figura 1** Metabolitos secundarios derivados de los metabolitos primarios

Las plantas siempre producen una mezcla compleja de MS que generalmente consiste en miembros de diferentes grupos, como polifenoles, terpenoides y otros (Wink, 2008).

Existe evidencia experimental de que una potenciación sinérgica de las actividades biológicas se logra mediante combinaciones de compuestos de defensa individuales en una mezcla (Wink, 2008).

Con 745 géneros y más de 19,500 especies, las leguminosas representan la tercera familia de plantas más grande (Lewis *et al.*, 2005). Al ser una familia más grande no sorprende la enorme diversidad de MS. Debido a que las leguminosas pueden fijar el nitrógeno atmosférico, las leguminosas pueden producir más MS que contiene nitrógeno.

Los polifenoles (incluidos los taninos) pueden formar varios enlaces de hidrogeno e incluso enlaces iónicos (cuando sus grupos hidroxilo fenólicos se disocian) con la mayoría de las proteínas e incluso con bases de ADN. De este modo, modulan la actividad de muchas proteínas, que incluyen enzimas, canales iónicos, transportadores, factores de transcripción, proteínas motoras y proteínas del citoesqueleto. Como consecuencia, muchos polifenoles son farmacológicamente activos, entre otros antioxidantes, antiinflamatorios, antibacterianos, antifúngicos y antivirales (Wink 2008).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Condiciones ambientales**

El estudio se realizó bajo condiciones de campo durante la época de lluvias del 2017 (julio-noviembre) en el banco de proteína del Campo Experimental Huimanguillo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Este campo experimental, se localiza en el estado de Tabasco, km 1 de la carretera Huimanguillo-Cárdenas, entre las coordenadas 17° 51' 04.52" latitud norte y 93° 23' 46.96" longitud oeste, a una elevación de 20 msnm. En esta zona se cuenta con clima cálido húmedo, con temperatura anual de 25 °C y con una precipitación pluvial de 2 200 mm; los suelos son tipo Gleysoles, Acrisoles y Fluvisoles. No se aplicó fertilización, ni se dispuso de irrigación en esa época del año.

### **5.2 Selección de los árboles**

El material biológico de *G. sepium* fue seleccionado uniformemente en cuanto a diámetro de tronco, así como altura, y se distribuyeron al azar para cada edad de rebrote. Dichos árboles se dividieron en cinco bloques, en cada bloque se incluyeron árboles de las tres edades de rebrote, dando un total de 16 árboles para rebrote de 60 días, 16 árboles para 90 días y 16 árboles para 120 días.

### **5.3 Corte de uniformidad de biomasa**

A cada bloque se le asignó en forma aleatoria las tres edades de rebrote: 60, 90 y 120 días. Los días de las edades de rebrote se contaron a partir del corte de uniformidad. El corte de uniformidad se realizó en todos los bloques el 06 de julio de 2017. De esta manera las cosechas se realizaron los días 06 de septiembre, 06 de octubre y 06 de noviembre.

#### **5.4 Colecta del material vegetal**

La biomasa foliar de *G. sepium* a los 60, 90 y 120 días de rebrote, se cortó y seco en una estufa con extracción de aire a 40°C durante 72 horas; diariamente el material fue removido para obtener un secado uniforme, después el material fue molido en un molino (Thomas-Wiley®) con malla de 1 mm, posteriormente se envasaron en bolsas de papel y se almacenaron en un cuarto oscuro limpio y seco hasta su uso.

#### **5.5 Pruebas cualitativas: Análisis fitoquímico**

Los análisis para determinar de manera cualitativa la presencia de metabolitos secundarios (MS) se realizó de acuerdo con lo descrito por Domínguez (1979).

##### **5.5.1 Flavonoides (prueba de Shinoda)**

Para comprobar la existencia de flavonoides en el material vegetal (*G. sepium*), en un tubo de ensaye se colocó 1 mg de la muestra y se disolvió en 1 ml de agua destilada, posteriormente se adicionó el reactivo de Shinoda (Mg y HCl diluido), observándose de inmediato una coloración anaranjada que confirma la presencia de flavonoides.

##### **5.5.2 Esteroles (prueba de Liebermann-Burchard)**

En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 g de la muestra (*G. sepium*), posteriormente se adicionó 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, luego la solución se llevó a enfriamiento a 0° y se le añadió una gota ácido sulfúrico, la aparición del color azul, la prueba fue positiva a esteroles.

##### **5.5.3 Saponinas**

Se colocaron en un tubo de ensaye 0.5 g de la muestra de cada edad de rebrote y se le adicionaron 2 mL de agua destilada agitando vigorosamente durante 3 minutos y se dejó en reposo para medir la persistencia de la espuma por 30 minutos. Cuando se agita una disolución acuosa de una muestra que contiene saponinas produce espuma (aparición de pequeñas burbujas extrañas cremosas) que es estable por 15 minutos o más.

#### **5.5.4 Alcaloides (Reactivo de Wagner)**

Se pesó 1 mg de cada una de las muestras y se colocaron en tubos de ensayos (60, 90 y 120 días), posteriormente se le adicionó el reactivo de Dragendorff (yoduro doble de bismuto y potasio), la presencia del color marrón es indicativa de alcaloides.

#### **5.5.5 Taninos**

Se colocaron 0.2 gr de la muestra en un tubo de ensaye y en presencia de ácido clorhídrico y formaldehído al 30 % en baño maría durante 30 minutos, los taninos forman masas algodonosas precipitadas llamadas flabafenos permitiendo la identificación en la muestra.

### **5.6 Pruebas cuantitativas: Cuantificación del porcentaje de taninos condensados en las tres edades de rebrote**

#### **5.6.1 Desengrasado de muestras**

Las muestras fueron desengrasadas por 2 h con hexano al 95% en una relación harina/hexano 1:10 (p/v) en agitación constante a 280 rpm a 4°C. La mezcla fue centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y el precipitado resultante libre de grasa se dejó secar a temperatura ambiente hasta la evaporación total del solvente y finalmente se conservaron hasta antes de su uso a 4°C.

#### **5.6.2 Extracción de polifenoles totales**

Para la extracción se pesaron, por triplicado, 100 mg de cada muestra desengrasada y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL; se extrajeron por agitación (1 min en vortex) con 1 ml de metanol al 80% (CH<sub>3</sub>OH). Seguidamente la muestra se colocó en baño María por 15 minutos a 50 °C. La mezcla fue centrifugada a 10 000 rpm durante 15 minutos, recuperando el sobrenadante en otro microtubo. El residuo fue nuevamente lavado con 500 µl de metanol al 100% y nuevamente agitado y centrifugado. El extracto total recuperado se ajustó a un volumen de 1.5 ml, se almacenó protegiéndose de la luz a -20 °C hasta su uso.

### 5.6.3 Cuantificación de polifenoles totales

Para la cuantificación, a 200  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido se le agregaron 1500  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La reacción se llevó a cabo, agregando a las soluciones estándar y muestras 100  $\mu\text{L}$  de reactivo fenol-Folin-Ciocalteau y 200  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio anhidro al 15% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Las muestras y estándares se mezclaron en vortex y se dejaron reposar por 30 min en oscuridad. La absorbancia fue medida a 765 nm en un espectrómetro (Thermoelectron, Genesys 10 UV). El ácido gálico fue utilizado como estándar. La reacción se realizó por duplicado.

Se preparó una solución stock de 0.1 mg de ácido gálico  $\text{mL}^{-1}$  para crear la curva de calibración (Cuadro 1) y determinar CFT como equivalentes de ácido gálico ( $\text{mg g}^{-1}$ ) con el reactivo de Folin-Ciocalteau ( $Y=1.068x$ ,  $r^2 = 0.998$ ) (Makkar *et al.*, 1993).

**Cuadro 1.** Curva de calibrado para polifenoles totales con ácido gálico.

No.	Ácido gálico ( $\text{mg/mL}$ )	Ácido gálico ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	0	0	200
1	0.02	40	160
2	0.04	80	120
3	0.06	120	80

### 5.6.4 Determinación de taninos condensados (proantocianidinas)

Se utilizó la técnica de Butanol en medio ácido (Porter *et al.*, 1986). Por duplicado, en un tubo de ensayo se mezclaron 250  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico obtenido como se describió en la determinación de fenoles totales, 1500  $\mu\text{L}$  de butanol: HCl (95:5,v/v) y 50  $\mu\text{L}$  de reactivo férrico (Sulfato de amonio férrico al 2% en HCL 2N) luego, se cubrió el tubo con una canica, se evaporó en baño María durante 1 hora y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El blanco se preparó de igual forma y sin calentar (Shangkhom *et al.*, 2011). Se midió la absorbancia a 550 nm por espectrometría (Espectrómetro Thermoelectron, Genesys 10 UV). El contenido de taninos condensados como leucocianidina equivalente fue calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{TC (g kg}^{-1}\text{MS)} = (\text{A}_{550 \text{ nm}} \times 78.26 \times \text{Factor de dilución}) / \text{RMSP (g kg}^{-1}\text{MS)}$$

En esta fórmula 78.26 es un factor de corrección establecido. Se asume que el coeficiente de extinción molar ( $E_{1\%,1\text{ cm}, 550\text{nm}}$ ) de leucocianidinas es 460.

### **5.7 Obtención de los extractos**

Del material vegetal (*G. sepium*) seco y molido de la edad de 90 días se tomaron 50 g y fue mezclado con el disolvente acetona/agua (70:30 v/v). La acetona se eliminó del extracto por medio de un rotaevaporador (Büchi modelo R-52). La fracción acuosa fue liofilizada (Labconco® Modelo 117). El extracto acuoso (EA) fue obtenido por infusión utilizando una relación hojas-agua (1:20 p/v). A 100 mL de agua después de su ebullición se le adicionaron 5 g de material vegetal seco y molido. La solución fue filtrada y posteriormente envasada en frascos de cristal de 250 mL y congelada a una temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el extracto acuoso fue liofilizado (Labconco® Modelo 117). Ambos extractos fueron mantenidos en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **5.8 Prueba de eclosión de huevos (EH)**

Para la prueba de eclosión de huevos (EH) de los NGI se usó la prueba *in vitro* de acuerdo con la World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) descrito por Coles *et al.* 1992. Las heces fecales fueron obtenidas directamente del recto de un cordero de tres meses infectado naturalmente. Los huevos se obtuvieron mediante la técnica de lavados (centrifugado con solución glucosada). Los extractos de las hojas de *G. sepium* se analizaron para determinar la inhibición de la eclosión de huevo (EH). Se usó tiabendazol (99.8 pureza: Sigma-Aldrich®) como control positivo y como control negativo se utilizó agua. La suspensión de huevos, a una concentración de 200 huevos/150 $\mu\text{L}$  se concentró en placas de 24 pocillos (1.0 mL por pocillo) y se mezcló con el mismo volumen de solución de extracto vegetal preparada a 2400, 1200, 600 y 300  $\mu\text{L}$ . El tiabendazol se disolvió en dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) y se diluyó a una concentración de 0.5 mL. Las placas se cubrieron y se mantuvieron en una incubadora a  $28^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Las larvas eclosionadas (muertas o vivas) y los huevos no eclosionados se contaron bajo un microscopio de disección con un aumento de 40x. El experimento tuvo cuatro repeticiones por cada tratamiento.

## **5.9 Prueba de desarrollo larval (DL)**

Para la prueba de desarrollo larvario (DL) se usó la prueba *in vitro* descrita por Hubert y Kerboeuf, (1992). La prueba se llevó a cabo en una placa con 24 pocillos. A cada pocillo se añadió medio nutritivo (20  $\mu\text{L}$ ) a una suspensión de 200  $\mu\text{L}$  que contenía aproximadamente 150-200 huevos, se cubrió la placa y se colocó en una incubadora a 27 °C durante 48 h (larvas en la primera etapa). Se añadió extracto vegetal (2400, 1200, 600 y 300  $\mu\text{L}$ ). Se realizaron cuatro réplicas por concentración de extracto vegetal, así como para el tiabendazol y el control negativo (agua destilada). Transcurridos los 7 días, se agregó una gota de Lugol (15  $\mu\text{L}$ ) para detener el desarrollo. Las larvas se contaron en un microscopio con aumento de 40x.

## **5.10 Análisis estadístico**

Se utilizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos (2400, 1200, 600 y 300  $\mu\text{g/mL}$ ) y dos controles: positivo (Tiabendazol) y negativo (agua) con cuatro repeticiones por tratamiento. El análisis de varianza fue utilizado para conocer las diferencias entre tratamientos y fue realizado con el programa SPSS versión 2015. Se utilizó la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para comparación de medias.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 Pruebas cualitativas

En el cuadro 2 se muestran los MS observados en las diferentes edades de rebrote de *G. sepium*. Basado en la intensidad del color en las pruebas cualitativas se designaron signos en cada edad de rebrote para indicar que tan marcada era la presencia de cada metabolito, en el caso de las saponinas se tomó en cuenta el tiempo que desapareció la espuma de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. La presencia débil de saponinas fue confirmada en la edad de 60 días por la formación de espuma, este fenómeno es característico de disoluciones que contienen saponinas, la espuma debe permanecer estable durante 15 minutos y desaparecer paulatinamente, sin embargo, estas desaparecieron al estar en reposo durante 5 minutos, por el contrario, se puede ver que a los 90 y 120 días hay ausencia. La presencia de taninos fue confirmada en las edades de 90 y 120 días, por la formación de masas algodonosas precipitadas llamadas flabafenos en las muestras vegetales en baño maría durante 30 minutos, mientras que en la primera edad de rebrote (60 días) no se detectó este comportamiento.

Los taninos se definen como compuestos polifenólicos solubles en agua, de estructura química variada y ampliamente distribuidos en las plantas. Son de alto peso molecular (500 – 3000 Daltons) y se localizan en las vacuolas, combinados con alcaloides y proteínas, desempeñan una función defensiva contra insectos y hongos (Makkar y Goodchild, 1996). Las plantas varían cualitativamente en su síntesis como respuesta a los cambios ambientales y fisiológicos.

El consumo de altas concentraciones de taninos condensados (>7% de Materia Seca), ha sido asociado con efectos detrimentales en los rumiantes, tales como la reducción del consumo de alimento, inhibición del crecimiento e interferencia con la morfología y actividad proteolítica de los microbios en el rumen. Concentraciones bajas o moderadas de TC (<6% de Materia Seca) ha resultado en efectos positivos de los rumiantes: por ejemplo, incremento del crecimiento, incremento de la producción de leche e incremento en la producción de lana, todo esto ha sido asociado con el consumo de TC (Hoste *et al.*, 2006).

Las pruebas cualitativas también revelaron la presencia de esteroides en los 60, 90 y 120 días por la aparición del color azul después de adicionar una gota de ácido sulfúrico (Prueba de Liebermann-Burchard). La presencia de alcaloides se confirmó en las tres edades (60, 90 y 120 días) por la aparición del color marrón cuando se les adicionó el reactivo de Dragendorff (Prueba de Wagner). La presencia de flavonoides fue confirmada por la aparición de un color anaranjado después de adicionar unas gotas de ácido clorhídrico (Prueba de Shinoda). Los taninos se confirmaron al formar masas algodonosas en presencia de ácido clorhídrico y formaldeído.

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Gliricidia sepium* a diferentes edades de rebrote.

Edad	Saponinas	Taninos	Esteroides	Alcaloides	Flavonoides
60	+	-	++	+	+++
90	-	+	++	++	+++
120	-	+	++	+	+++

-Ausencia    +Presencia débil    ++Moderada    +++ Altamente

## 6.2 Pruebas cuantitativas

Los valores obtenidos en las pruebas cuantitativas se concentraron en el Cuadro 3 donde se observa que los PFT alcanzaron el valor más alto a la edad de 90 días mientras que en las edades de 60 y 120 días los valores fueron bajos. En las edades de 60 y 90 días los TC tuvieron mayor concentración mientras que a los 120 días disminuyó. Este comportamiento es parecido al que obtuvieron García-Ferrer *et al.* (2016) donde *Clitoria* obtuvo los mayores valores de TC (20.1 g kg<sup>-1</sup>) y de PFT (155.4 g kg<sup>-1</sup>) a los 42 días de edad de corte, para posteriormente disminuir ligeramente. Por el contrario, Berard *et al.* (2011) encontraron que el contenido de TC en hojas de fabáceas tropicales, *Acacia angustissima* y *Calliandra calothyrsus* (33 y 196 g kg<sup>-1</sup> MS respectivamente), y en *Dalea purpurea* (68.7 g kg<sup>-1</sup> MS), aumentaba conforme la planta maduraba. Verdecia *et al.* (2014) reportaron el contenido de TC (77.6 g kg<sup>-1</sup>) y PFT (10.0 g kg<sup>-1</sup>) en la fabácea

herbácea *Neonotonia wightii* ellos también observaron aumento con la madurez de la planta y los mayores valores los obtuvieron a los 90 días. En este caso TC sobrepasaron los límites en los cuales se puede afectar la fermentación ruminal. Concentraciones bajas a moderadas de TC, entre 5 y 55 g kg<sup>-1</sup> MS, contribuyen a la protección de las proteínas en el rumen, permitiendo su paso hasta el intestino delgado, donde son degradadas y absorbidas (Gebrehiwot *et al.*, 2002; Berard *et al.*, 2011; Patra y Saxena, 2011).

Los taninos son los compuestos secundarios vegetales más comunes, su mayor característica es la de formar complejos químicos no solo con proteínas sino también con varios compuestos como polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas (Rosales, 1998).

**Cuadro 3.** Medias de polifenoles totales y taninos condensados presentes en las diferentes edades de rebrote de *Gliricidia sepium*.

Días a madurez	Polifenoles totales mg g <sup>-1</sup>	Taninos condensados g kg <sup>-1</sup>
60	16.47 <sup>a</sup>	10.25 <sup>a</sup>
90	18.76 <sup>b</sup>	9.98 <sup>a</sup>
120	16.08 <sup>a</sup>	5.19 <sup>b</sup>

Medias con literales diferentes en una misma columna presentan diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

### 6.3 Efecto del extracto acetona: agua y acuoso de *Gliricidia sepium* sobre la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales.

En la prueba de eclosión de huevos se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), correspondiendo al extracto acuoso (EA) los mayores porcentajes de inhibición. En general, ambos extractos afectaron negativamente la eclosión. Estos resultados son similares a los encontrados por Wabo *et al.* (2011), quienes evaluaron el extracto acetónico de hojas de *G. sepium*, contra huevos de *H. contortus* encontrando el 100 % de inhibición a una concentración de 1.2 mg/mL, aunque en el presente trabajo fue el EA que mostró el mismo porcentaje, el cual mostró actividad ovicida (Figura 2) en ambos estudios. El mecanismo de acción de los MS en la inhibición de la eclosión de huevos podría estar asociado al enlace de estos, con las enzimas involucradas en el proceso de eclosión. La inactivación de las enzimas (metaloproteasas, lipasas, aminopeptidasas,

etc.) pueden causar reducción en la tasa de eclosión o incluso detener completamente el proceso de eclosión (Vargas-Magaña *et al.*, 2014). El cascarón de los huevos de NGI consta de tres capas gruesas, la cual les proporciona resistencia a las condiciones ambientales adversas (temperatura, humedad, radiación UV y pisoteo). Estas características complican el desarrollo de estrategias de control efectivas (von Son-de Fernex *et al.*, 2016). Este efecto ovicida podría ser atribuido a la presencia de los taninos, ya que éstos posiblemente penetraron en las diferentes capas del huevo e inhibieron la formación de larvas afectando su desarrollo (Molan *et al.*, 2000; Tava y Avato 2006). Se señala que los compuestos bioactivos son letales para los blastómeros en los huevos. Sreelatha *et al.* (2011) explicaron que los extractos que contienen estos compuestos químicos pueden inducir la apoptosis celular, induciendo un cambio morfológico y fragmentación del ADN formando un tipo de cáncer en la célula.

**Cuadro 4.** Medias de inhibición de los extractos de *Gliricidia sepium* sobre huevos de nematodos gastrointestinales

Concentración (µg/mL)	% de Inhibición de la eclosión de huevos
Extracto acetona/agua	
2400	70.22 <sup>b</sup>
1200	87.12 <sup>c</sup>
600	41.30 <sup>a</sup>
300	15.95 <sup>a</sup>
Tiabendazole 10 µL	85.25 <sup>c</sup>
Agua destilada 1 mL	00.00 <sup>d</sup>
Extracto acuoso	
2400	89.15 <sup>b</sup>
1200	99.25 <sup>c</sup>
600	78.27 <sup>b</sup>
300	00.00 <sup>a</sup>
Tiabendazole (10 µL)	98.60 <sup>c</sup>
Agua destilada 1 mL	00.00 <sup>a</sup>

Medias con literales diferentes en una misma columna y en el mismo tratamiento indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 2** Huevos en estado de mórula de NGI

En los huevos expuestos al EA, se observó el desarrollo de la larva (Figura 3), sin embargo, los huevos no eclosionaron. Como se muestra en el cuadro 4, a la concentración de 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el extracto acuoso de hojas de *G. sepium*, mostró casi el doble de eficacia que el EAA (78 % vs 41 % respectivamente).

Se han sugerido tres posibles mecanismos sobre cómo los metabolitos podrían inhibir la eclosión del huevo larvado. Primero, los MS podrían afectar la permeabilidad del cascarón del huevo. Segundo, los MS podrían inhibir algunas enzimas que están involucradas en la eclosión del huevo y Tercero, los MS podrían afectar a los receptores de eclosión que se encuentran en el cascarón del huevo (Vargas-Magaña *et al.*, 2014).



**Figura 3** Huevo larvado de NGI

Los MS encontrados en este trabajo, se ha reportado que poseen actividad antihelmíntica. Por ejemplo, las propiedades antihelmínticas de los taninos, de especies forrajera de la familia Fabaceae, tanto de climas templados como de zonas tropicales,

han sido documentada en diversos ensayos *in vitro* en diferentes estadios de vida del ciclo de vida de los NGI (Molan *et al.*, 2000). Dependiendo de estructura bioquímica, los taninos se subdividen dos grupos principales: los TC (protoantocianidinas) que son oligómeros o polímeros de flavan-3-ols y los taninos hidrolizables, que son polímeros de ácido gálico (gallotaninos) o elágico (ellagitaninos) con una molécula esterificada, comúnmente glucosa. Las protoantocianidinas son el único tipo de taninos que se encuentra en las leguminosas forrajeras. Basado en la constitución de la naturaleza del monómero (flavan-3-ol) se distinguen cuatro subclases dentro de los TC: prodelfinidina, procianidina, prorobetinidinas y profesitinidinas. En las leguminosas forrajeras, se encuentran principalmente procianidinas y prodelfinidinas, en diferentes proporciones. Las cantidades difieren ampliamente entre la especie de planta y/o variedad (Mueller-Harvey, 2006).

#### 6.4 Efecto del extracto acetona: agua y acuoso de *Gliricidia sepium* sobre desarrollo larvario de huevos de nematodos gastrointestinales.

En la prueba de desarrollo larvario no hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en el EAA (Cuadro 5). En este ensayo la concentración de 1200  $\mu\text{g/mL}$  mostró mayor eficacia, siendo el EA que tuvo una ligera tendencia con respecto al EAA (98,9 vs 93.0 respectivamente). Estadísticamente la mayoría fueron iguales, a excepción de la concentración 300  $\mu\text{g/mL}$  del EA el cual tuvo la más baja eficacia (48%).

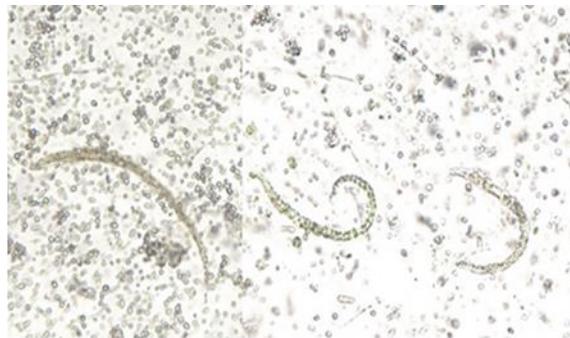
**Cuadro 5.** Medias de inhibición del desarrollo larval de los extractos de *Gliricidia sepium* sobre nematodos gastrointestinales

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de inhibición del desarrollo larval
Extracto acetona/agua	
2400	86.13 <sup>a</sup>
1200	93.08 <sup>a</sup>
600	91.99 <sup>a</sup>
300	82.74 <sup>a</sup>
Tiabendazole (10 $\mu\text{L}$ )	100 <sup>a</sup>
Agua destilada 1 mL	00.00 <sup>b</sup>
Extracto acuoso	
2400	94.24 <sup>a</sup>
1200	98.91 <sup>a</sup>
600	97.10 <sup>a</sup>
300	48.01 <sup>b</sup>
Tiabendazole (10 $\mu\text{L}$ )	100 <sup>a</sup>
Agua destilada 1 mL	00.00 <sup>c</sup>

Medias con las mismas literales en el mismo tratamiento son iguales estadísticamente ( $p>0.05$ ).

Ambos extractos mostraron actividad antihelmíntica al inhibir el desarrollo larvario (figura 4). El mayor porcentaje de inhibición fue observado en el extracto acuoso (99 %) a la concentración de 1200  $\mu\text{g/mL}$  y el menor (48 %) fue observado en el mismo extracto a

la concentración de 300 µg/mL. Resultados similares fueron reportados por Feboli *et al.* (2016) quienes evaluaron los extractos etanólico, hexánico y de acetato de etilo de *Opuntia ficus*, encontrando un 100 % de inhibición del desarrollo larval, a la menor concentración probada (1.56 mg/mL). Estos autores, atribuyen el efecto antihelmíntico a la presencia de flavonoides, saponinas y taninos presentes en *O. ficus*. El contenido de taninos y polifenoles extraídos de *G. sepium* (Cuadro 3) podrían haber ejercido efecto en la inhibición del desarrollo larval, ya que los taninos podrían haberse unido a la proteína disponible en los tubos de nutrición larval, y reducir la disponibilidad de nutrientes, provocado inanición y muerte de la larva. Los insectos y larvas de insectos pueden ingerir TC, que se enlazan a la mucosa intestinal y causan autólisis (Schultz, 1989). Esto podría aplicarse también al desarrollo de larvas de nematodos. Los TC también pueden enlazarse a la cutícula de la larva, que es rica en glicoproteína y causar su muerte. Molan *et al.* (2000) demostraron que los taninos, extraídos de forrajes tales como sulla (*H. coronarium*) y del trébol (*L. pendunculatus*), inhibieron el desarrollo de huevos *Trichostrongylus colubriformis* al estado de larva (L<sub>1</sub>) y a larva infectiva (L<sub>3</sub>). Estos autores, por lo tanto, sugieren que los forrajes que contienen taninos pueden alterar el ciclo de vida de los NGI de ovinos y reducir la contaminación de las pasturas con larvas infectivas.



**Figura 4.** Larvas L<sub>1</sub> de nematodos gastrointestinales expuestas al extracto acetona: agua y acuoso de *G. sepium* durante 7 días, leídos al 400x.

## 7. CONCLUSIONES

En las pruebas cualitativas los flavonoides y esteroides son similares y constantes en las tres edades, mientras que los alcaloides se encuentran de manera moderada. En el caso de los taninos condensados, debido a su estructura la prueba cualitativa no detectó los taninos en la primera edad (60 días) hasta los 90 y 120 días, pero si se detectaron en las tres edades en la prueba cuantitativa.

La edad de rebrote afectó el contenido de polifenoles totales y de taninos condensados y en comparación con otras plantas *G. sepium* tiene valores bajos de estos compuestos.

La edad con valores altos de metabolitos secundarios fue de 90 días.

Los extractos acetona: agua y acuoso de hojas de *G. sepium*, afectaron la eclosión de huevos y el desarrollo larvario *in vitro* de NGL.

## 8. LITERATURA CITADA

- Adiele, R.C., Fakae, B., Isuzu, I.U. 2013. Anthelmintic activity of *Securidaca longepedunculata* (Family: *Polygalaceae*) root extract in mice, *in vitro* and *in vivo*. Asian Pacific journal tropical medicine 6, 841–846.
- Agaie, B.M., & Onyeyili, P.A. 2007. Anthelmintic activity of the crude aqueous leaf extracts of *Anogeissus leiocarpus* in sheep. African Journal of Biotechnology. 6, 1511-1515.
- Aguilar-Caballero, A.J., Torres-Acosta, J.F.J, Sarmiento, R.C., Hoste, H., Sandoval-Castro, C.A. 2008. Immunity against gastrointestinal nematode; the goat history. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 9, 73-82.
- Ahmed, J.M., Murtaza, G., 2014. A study of medicinal plants used as ethnoveterinary: Harnessing potential phytotherapy in Bheri, District Muzaffarabad (Pakistan). Journal of Ethnopharmacology 159, 209–214
- Alberti, E.G., Zanzani, S.A., Gazzonis, A.L., Zanatta, G., Bruni, G., Villa, M., Manfredi, M.T. 2014. Effects of gastrointestinal infections caused by nematodes on milk production in goats in a mountain ecosystem: Comparison between a cosmopolite and a local breed. Small Ruminant Research 120: 155–163
- Asmare, K., Sheferaw, D., Aragaw, K., Abera, M., Sibhat, B., Haile, A., Kiara, H., Szonyi, B., Skjerve, E., Wieland, B. 2016. Gastrointestinal nematode infection in small ruminants in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. Acta Tropica 160: 68–77
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., 2005. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. Parasitology 131, 531–538.

- Barrère, V., Alvarez, L., Suarez, G., Ceballos, L., Moreno, L., Lanusse, C., Prichard, R.K. 2012. Relationship between increased albendazole systemic exposure and changes in single nucleotide polymorphisms on the  $\beta$ -tubulin isotype 1 encoding gene in *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 186, 344–349.
- Belemlilga, M. B., Traoré, A., Ouédraogo, S., Kaboré, A., Tamboura, H. H., & Guissou, I. P. (2016). Anthelmintic activity of *Saba senegalensis* (A. DC.) Pichon (*Apocynaceae*) extract against adult worms and eggs of *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 945-949.
- Bentounsi, B., Khaznadar, A., Cabaret, J. 2012. Resistance of *Trichostrongylus spp.*(Nematoda) to benzimidazole in Algerian cattle herds grazed with sheep. *Parasitol. Res.* 110, 1021–1023.
- Berard, N. C., Y. Wang, K. M. Wittenberg, D. O. Krause, B. E. Coulman, T. A. McAllister, and K. H. Ominski. 2011. Condensed tannin concentrations found in vegetative and mature forage legumes grown in western Canada. *Canadian Journal of Plant Science* 91: 669-675.
- Bird A. F. 1971. *The Structure of Nematodes*, pp. 114-137. Academic Press, New York.
- Chan-Pérez, J.I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H. Castañeda-Ramírez, G.S., Vilarem, G., Mathieu, C. 2016. In vitro susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary Parasitology* 217, 53–60
- Chaudhry, U., Miller, M., Yazwinski, T., Kaplan, R., Gilleard, J. 2014. The presence of benzimidazole resistance mutations in *Haemonchus placei* from US cattle. *Veterinary Parasitology*. 204, 411–415.
- Cringoli, G., Veneziano, V., Rinaldi, L., Sauve, C., Rubino, R., Fedele, V., Cabaret, J. 2007. Resistance of *trichostrongyles* to benzimidazoles in Italy: a first report in a

goat farm with multiple and repeated introductions. *Parasitology research* 101,577–581.

Croll N. A. 1976. *The Organization of Nematodes*, pp. 279-300. Academic Press, New York.

Deepa, C.K., Darsana, U., Sujith, S., Priya, M. N., Juliet, S. 2015. Effect of *Mallotus phillipensis* flower extracts against the third stage larvae of *Haemonchus contortus*. *International Journal of Applied Pure Science and Agriculture*, 1: 19-23.

Dewick, P.M. 2002. *Medicinal natural products, A Biosynthetic Approach*, 2nd ed. Wiley, New York.

Domke, A. V. M., Chartier, C., Gjerde, B., Leine, N., Vatn, S., & Stuen, S. 2013. Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Veterinary Parasitology*, 194(1), 40–48.

Duarte, E.R., Silva, R.B., Vasconcelos, V.O., Nogueira, F.A., Oliveira, N.J.F. 2012. Diagnóstico do controle e perfil de sensibilidade de nematóides de ovinos ao albendazol e ao levamisol no norte de Minas Gerais. *Pesq. Vet. Bras.* 32,147–152.

Falzon, L.C., Menzies, P.I., Shakya, K.P., Jones-Bitton, A., Vanleeuwen, J., Avula, J., Stewart, H., Jansen, J.T., Taylor, M.A., Learmount, J., Peregrine, A.S., 2013. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario. *Canada Veterinary Parasitology* 193(1–3), 150–162.

Féboli A, Laurentiz CA, Soares CSS, Augusto GJ, Anjos AL, Magalhaes GL, Filardi SR, Laurentiz SR .2016. Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus indica* against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology* 226: 65-68.

Ferreira, L.E., Castro, P.M.N., Chagas, A.C.S., França, S.C., Belebani, R.O. 2013. In vitro anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae)

against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental Parasitology* 134, 327–332

García-Ferrer, L., Bolaños-Aguilar, E. D., Lagunes-Espinoza, L. C., Ramos-Juárez, J., & Osorio-Arce, M. M. 2016. Concentración de compuestos fenólicos en fabáceas forrajeras tropicales en edad diferente del rebrote. *Agrociencia*, 50(4), 429-440.

García, D. E., Medina, M. G., & Ojeda, F. 2005. Efecto de la fertilización orgánica, la variedad y la época en el perfil polifenólico de *Morus alba* (L.). *Avances en Investigación Agropecuaria*, 9(2).

Garg, R., & Yadav, C. L. 2009. Genotyping of benzimidazole susceptible and resistant alleles in different populations of *Haemonchus contortus* from Himalayan and sub-Himalayan regions of North-West India. *Tropical animal health and production*, 41, 1127.

Gebrehiwot, L., P. R. Beuselinck, and A. R. Craig. 2002. Seasonal variations in condensed tannin concentration of three *Lotus* species. *Agronomy Journal* 94: 1059-1065.

Getachew, S., Ibrahim, N., Abebe, B., Eguale, T. 2012. In vitro evaluation of anthelmintic activities of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* in Alemgena Wereda, Ethiopia. *Acta Parasitologica Globalis* 3: 20-7.

Geurden, T., Hoste, H., Jacquiet, P., Traversa, D., Sotiraki, S., Frangipane diRegalbono, A., Tzanidakis, N., Kostopoulou, D., Gaillac, C., Privat, S., Giangaspero, A., Zanardello, C., Noé, L., Vanimisetti, B., Bartram, D., 2014. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Veterinary Parasitology* 201 (1–2), 59–66.

Githiori, J. B., Athansiadou, S., Thamsborg, S. M., 2006. Use of plants novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis-on small ruminants. *Veterinary Parasitology*. 139, 308-320.

- Goswami, S., Pandey, A., Tripathi, P., Singh, A., Rai, A. 2011. An in vitro evaluation of the anthelmintic activity of *Hedychium spichatum* rhizomes and *Zingiber zerumbet* rhizomes on the *Pheritima Posthuma* model: a comparative study. *Pharmacognosy Research* 3, 140–142.
- Gradé, J.T., Arble, B.L., Weladji, R.B., Van Damme, P. 2008. Anthelmintic efficacy and dose determination of *Albizia anthelmintica* against gastrointestinal nematodes in naturally infected Ugandan sheep. *Veterinary Parasitology*, 157: 267-274.
- Hernández-Villegas, M. M., Borges-Argáez, R., Rodríguez-Vivas, R. I., Torres-Acosta, J. F. J., Méndez-González, M., & Cáceres-Farfán, M. 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, 179(1-3), 100-106.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., Hosking, S. O. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 22:253-261.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M.N., Afaq, M., 2006. Anthelmintic resistance; the state of play revisited. *Life Sciences* 79, 2413–2431.
- Jayanegara, A., E. Wina, C. R. Soliva, S. Marquardt, M. Kreuzer, and F. Leiber. 2011. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology* 163: 231-243.
- Kakar, S.A., Tareen, R.B., Kakar, M.A., Jabeen, H., Kakar, S.R., Al-Kahraman, Y.M.S.A., Shafee, M. 2013. Screening of antibacterial activity of four medicinal plants of Balochistan-Pakistan. *Pakistan J. Bot.* 44, 245–250
- Kôler, P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*. 31, 336-345.

- Kuklinsky, C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega. Barcelona. España. pp. 7-17. *Ciencia Veterinaria*. 2: 16 – 20.
- Landau, S.Y., Muklada, H., Abu-Rabia, A., Kaadan, S., Azaizeh, A. 2014. Traditional Arab ethno-veterinary practices in small ruminant breeding in Israel. *Small Ruminant Research* 119,161–171
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M. 2005. *Legumes of the World*. The Royal Botanical Gardens, Kew.
- Marie-Magdeleine C., Mahieu, M., D’Alexis, S., Philibert, L., Archimede, H. 2010. In vitro effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science* 89, 88–92
- Makkar, H. P. S., M. Blummel, N. K. Borowy, and K. Becker. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 61: 161-165.
- Makkar, H. P. S., & Goodchild, V. A. 1996. Quantification of tannins, a laboratory manual. Pasture, Forage and Livestock Program. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Second edition. Aleppo, Syria, 3.
- Meany, M.; Allister, J.; McKinstry, B.; McLaughlin, K.; Brennan, G.P.; Forbes, A.B.; Fairweather, I. 2007. *Fasciola hepatica*: ultrastructural effects of combination of tricabendazole and clorsulon against mature fluke. *Parasitology Research*.100:1091-1104.
- Mendoca, S. S., Domingues, R., Baldo, G. E., Azevedo dos Santos, P., Marques, C. K., Pelegrine, M. A., Motelho, V. M. I. 2019. In vitro ovicidal effect of a *Senecio brasiliensis* extract and its fractions on *Haemonchus contortus*. *BMC Veterinary Research*, 15:99

- Mohammed, A., Wossene, A., Giday, M., Tilahun, G., & Kebede, N. 2013. *In vitro* anthelmintic activities of four medicinal plants against *Haemonchus contortus*. African Journal of Plant Science, 7, 369-373.
- Molan AL, Hoskin SO, Barry TN, McNabb WC. 2000. Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. Veterinary Record 147:44-48.
- Molan, A.L., Duncana, A.J., Barry, T.N., McNabb, W.C. 2003. Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. Parasitology International 52, 209–218.
- Mottier, L.; Alvarez, L.; Ceballos, C.; Lanusse, C. 2006. Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. Experimental Parasitology. 113:49-57.
- Mueller-Harvey, I (2006) Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture. 86: 2010-2037
- Muñiz-Lagunes, A., González-Garduño, R., López-Arellano, M.E., Ramírez-Valverde, R., Ruíz-Flores, A., García-Muñiz, G., Ramírez-Vargas, G., Mendoza-de Gives, P., Torres-Hernández, G. 2015. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, Mexico. Tropical Animal Health and Production 47, 1049–1054.
- Nery, P.S., Nogueira, F.A., Martins, E.R., Duarte, E.R. 2010. Effect of *Anacardium humile* on the larval development of gastrointestinal nematodes of sheep. Veterinary Parasitology 171, 361–364.
- Neville A. C. 1975. Biology of the Arthropod Cuticle, pp. 1-250. Springer, Berlin, Germany
- Ngaradoum, O., Kagira, J. M., Karanja, S. M., Kipyegon, K., & Maina, N. 2017. In vitro ovicidal and larvicidal activity of aqueous and methanolic extracts of *Ziziphus mucronata* barks against *Haemonchus contortus*. Eur J Exp Bio, 7, 1.

- Nogueira, F. A., Fonseca, L. D., da Silva, R. B., de Paiva Ferreira, A. V., Nery, P. S., Geraseev, L. C., Duarte, E. R. 2012. In vitro and in vivo efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. *Parasitology Research*, 111:325–330.
- Oliveira, F.A., Costa J.L.M., Lima, A.S., Silva, R.C., Ribeiro, M.N.S, Mesquista, J.W.S., Rocha, C.Q., Marcelo Tangerina, M.P., Vilegas, W. 2017. Anthelmintic activity of plant extracts from *Brazilian savanna*. *Veterinary Parasitology* 236, 121–127.
- Patra, A. K., and J. Saxena. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 24–37.
- Perry, R.N. 1989. Dormancy and Hatching of Nematode Eggs. *Parasitology today*.5: 377-383.
- Porter, L. H., L. N. Hrstich, and B. C. Chan. 1986. The conversión of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry* 25: 223-230.
- Prichard, R. K. 2002. Resistance against macrocyclic lactones. *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Vercruysse J. & Rew RS CABI Publishing, 163-182.
- Puerto A.M., Arece G.J., López L.Y., Roche, Y., Molina, M., Sanavria, A., & da Fonseca, A. H. 2014. Efecto in vitro de extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* en el desarrollo de las fases exógenas de estrogílicos gastrointestinales de ovinos. *Revista de Salud Animal*, 36(1), 28-34.
- Peachey, L.E., Pinchbecka, G.L., Matthews, J.B., Burdenc, F.A., Mulugetac, G., Scantleburya, C.E., Hodgkinson, J.E. 2014. An evidence based approach to the evaluation of ethnoveterinary medicines against strongyle nematodes of equids. *Veterinary Parasitology* 210, 40–52
- Rendell, D.K. 2010. Anthelmintic resistance in cattle nematodes on 13 south-west Victorian properties. *Australian Veterinary Journal* 88, 504–509.

- Ritter, R.A., Barros, M.M.B., Barros M.F.O., Rodrigues, S.T., Lira S. M, Ramos J.C.S.,  
Dores C.P.M., Biondi, G.F., Canevese R.S., Malheiros T.M. 2012. Ethnoveterinary  
knowledge and practices at Colares island, Pará state, eastern Amazon, Brazil.  
Journal of Ethnopharmacology 144,346–352
- Rogers, W.P. and Brooks, F. (1977) Int. 3. Parasitology. 7,61-65
- Rosales, M. M., Murgueitio, E. y Osorio, H. 1998. Agroforesteria para la Producción  
Animal en Latinoamérica, Memorias de una Conferencia Electrónica, FAO-CIPAV;  
Cali, Colombia.
- Rúelas, R. C., Rodríguez, D. H., Romero, H. Q., & Olazarán, S. (1990). Resistencia de  
*Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. Revista Mexicana  
de Ciencias Pecuarias, 28(1), 30-34.
- Salgado, J.A., Santos, C.P. 2016. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal  
nematodes of small ruminants in Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol.25, 3–17.
- Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., Salem, A.Z.M., Chan-Pérez, J.J.  
2012. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in  
livestock. Animal Feed Science and Technology 176,192– 201.
- Santacoloma-Varón, L.E., y Enrique-Granados, J. 2010. Evaluación del contenido de  
metabolitos secundarios en dos especies de plantas forrajeras encontradas en dos  
pisos térmicos en Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 1, 31-  
35.
- Sawleha, Q., Dixit, A. K., & Dixit, P. (2010). Use of medicinal plants to control  
*Haemonchus contortus* infection in small ruminants. Veterinary World, 3(11), 515.
- Sczesny-Moraes, E.A., Bianchin, I., Silva, K.F., Catto, J.B., Honer, M.R., Paiva, F. 2010.  
Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep, Mato Grossodo Sul,  
Brazil. Pesq. Vet. Bras. 30, 229–236.

- Schnyder, M., Torgerson, P.R., Schönmann, M., Kohler, L., Hertzberg, H. 2005. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, 128, 285–290.
- Schultz, J.C. 1989. Tannins insect interaction. In: R.W. Hemingway and J.J. Karcheys, (eds) *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*, (Plenum Press, New York) 417-433.
- Sharma, R., Manhas, R.K. 2015. Ethnoveterinary plants for the treatment of camels in Shiwalik regions of Kathua district of Jammu & Kashmir, India. *Journal of Ethnopharmacology* 169,170–175
- Simalango, D. M., & Utami, N. V. 2014. *In vitro* antihelminthic effect of ethanol extract of black seeds (*Nigella sativa*) against *Ascaris suum*. *Procedia Chemistry*, 13, 181-185.
- Sinclair, R., Melville, L., Sargison, F., Kenyon, F., Nussey, D., Watt, K., & Sargison, N. (2016). Gastrointestinal nematode species diversity in Soay sheep kept in a natural environment without active parasite control. *Veterinary Parasitology*, 227, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.020>
- Soro, D., Koné, W.M., Bonfoh, B., Dro, B., Toily, K.B., Kamanzi, K. 2013. In vivo anthelmintic activity of *Anogeissus leiocarpus* Guill & Per (Combretaceae) against nematodes in naturally infected sheep. *Parasitol Res.* 112, 2681–2688.
- Sreelatha, S., Jeyachitra, A., Padma, P.R. 2011. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 49:1270–5.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. *Veterinary Parasitology*. 3<sup>a</sup>. Edición. Blackwell Publishing Oxford
- Taylor, M.A., Learmount, J., Lunn, E., Morgan, C., Craig, B.H. 2009. Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of methods used for their detection. *Small Ruminant. Res.* 86, 67–70.

- Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., 2005. Control, Prevención y erradicación de la nematodiasis gastrointestinal en rumiantes. En: Rodríguez, V.I., Cob, G.L. (pp. 161-176). Enfermedades de importancia económica en mamíferos domésticos. McGraw-Hill.
- Torres-Acosta, J.F.J., Dzul-Canche, U., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas R.I. 2003. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatán, México. *Veterinary Parasitology*. 114, 33-42.
- Váradyová, Z., Písarčíková, J., Babják, M., Hodges, A., Mravčáková, D., Kišidayová, S., Königová, Alž., Vadlejch, J., Várady, Mariá.. 2018. Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*, *Experimental Parasitology*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.009>.
- Vargas-Magaña JJ, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Chan-Pérez JI. Anthelmintic activity of acetone–water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology* 2014;206(3):322–7.
- Verdecia, D.M.; Herrera, R.S.; Ramírez, J.L.; Leonard, I.; Bodas, R.; Prieto, N.; Andrés, S.; Giráldez, F.J.; González, J.S.; Arceo, Y.; Paumier, M.; Alvarez, Y.; López, S. 2014. Efecto de la edad de rebrote en el contenido de metabolitos secundarios de la *Neonotonia wightii* en el Valle del Cauto, Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 48, núm. 2, pp. 149-154
- Vercruysse, J.; Rew, R. 2002. General Efficacy of the Macrocyclic Lactones to Control Parasites of Cattle. En: *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy* . Edit. Vercruysse, J.; Rew, R.S. CAB International. Pp. 185-199.
- Veríssimo, C.J., Niciura, S.C., Alberti, A.L., Rodrigues, C.F., Barbosa, C.M., Chiebao, D.P., Cardoso, D., da Silva, G.S., Pereira, J.R., Margatho, L.F., da Costa, R.L., Nardon, R.F., Ueno, T.E., Curci, V.C., Molento, M.B. 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 187, 209–216.

- Vlassoff, A., Leathwick, D.M., Heath, A.C.G., 2001. Control of nematodes in sheep: the epidemiology of nematode infections of sheep. *New Zealand Veterinary Journal*. 49, 213-221.
- von Son-de Fernex, E., Alonso- Díaz, M.A., Valles, M.B., Capetillo, L.C.M. 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*, 131, 413–418.
- von Son de Fernex, E., Alonso, D.M.A., Mendoza de Gives, P., Valles de la Mora, B., Zamilpa, A., González, C.M., 2016. Actividad ovicida de extractos de cuatro especies de plantas contra el nematodo gastrointestinal *Cooperia punctata*. Publicación Digital de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Vol. 3 No. 2 April-June.
- Wabo PJ, Florence TK, Mbida M, Tedonkeng PE, Bilong CFB (2011) *In vitro* activities of acetonic extracts from leaves of three forage legumes (*Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena diversifolia*) on *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 125-128.
- Waller, P.J., 2003. The future of anthelmintic in sustainable parasite control programs for livestock. *Journal of Helminthology*. 40, 97-102.
- Wang, T., van Wyk, J. A., Morrison, A., & Morgan, E. R. 2014. Moisture requirements for the migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae out of faeces. *Veterinary Parasitology*, 204, 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.014>
- Waterman, P.G., Mole, S. 1994. *Method in Ecology Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Blackwell Sci. Publ. London. 66-103.
- Wharton D. A. 1980. Nematode egg-shells. *Parasitology* 81, 447-463.
- Wharton D. A. 1979. Oogenesis and eggshell formation in *Aspiculuris tetraptera* Schulz (Nematoda: Oxyuroidea). *Parasitology* 78, 131-143.

Wink, M. 2008. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multicomponent mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism* 9, 996–1009.

Wink, M., Schimmer, O. 2010. Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. In: Wink, M. (Ed.), *Functions and Biotechnology of plant secondary metabolites*. Annual Plant Reviews, vol. 39. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 21–161.