



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**EFFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE  
*ARCEUTHOBIUM GLOBOSUM* Y *ARCEUTHOBIUM*  
*VAGINATUM* COMO SUPLEMENTO EN LA  
ALIMENTACIÓN DE OVINOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN  
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS  
NATURALES**

**P R E S E N T A:**

**MARIA MITSI NALLELI BECERRIL GIL**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Octubre  
2023.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**EFFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE  
*ARCEUTHOBIMUM GLOBOSUM* Y *ARCEUTHOBIMUM*  
*VAGINATUM* COMO SUPLEMENTO EN LA ALIMENTACIÓN  
DE OVINOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**PRESENTA:**

**MARIA MITSU NALLELI BECERRIL GIL**

**COMITÉ DE TUTORES:**

**DRA. JULIETA G. ESTRADA FLORES**

**DR. AGUSTÍN OLMEDO JUAREZ**

**DR. ANGEL ROLANDO ENDARA AGRAMONT**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, Octubre 2023.

## Resumen

Los sistemas de producción ovina poseen diferentes estrategias de alimentación como el uso de plantas parásitas como *Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule* y *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*. Estas especies han sido catalogadas como las plagas más dañinas y distribuidas en los bosques de alta montaña en el territorio nacional.

El trabajo se desarrolló en tres etapas; en la primera etapa, se realizó el análisis de la composición química proximal del muérdago amarillo (*A. globosum*) y negro (*A. vaginatum*) de cuatro categorías de edades de *Pinus hartwegii* (brinzales, latizales, juveniles y adultos) y su efecto en la cinética de fermentación ruminal *in vitro*. La segunda etapa, se realizó el análisis fitoquímico del muérdago negro con el fin de identificar compuestos de interés con posible actividad antihelmíntica y antioxidante, mediante cromatografía de capa fina y HPLC. Por último, en la tercera etapa, se desarrolló un ensayo biodirigido de los metabolitos secundarios identificados en la especie de muérdago negro (*A. vaginatum*) para evaluar su actividad antihelmíntica *in vitro* en la población de parásitos de *Haemonchus contortus*.

Los resultados de la primera etapa fueron los siguientes: se encontraron diferencias significativas entre especies de muérdago ( $P < 0.001$ ) el contenido de materia seca, materia orgánica, fibra detergente neutro y fibra ácido detergente. El contenido de materia seca del muérdago negro fue diferente entre las edades de los árboles muestreados. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en el contenido de PC entre especies de muérdago ni edades de los árboles muestreados. El contenido de fenoles totales, taninos totales y taninos condensados fueron diferentes entre especies de muérdago ( $P < 0.0001$ ) fue superior en el muérdago amarillo, sin encontrar efectos en la edad de árboles muestreados. La digestibilidad *in vitro* de ambas especies de muérdago en promedio fue de 437 g/kg MS, hubo diferencias significativas entre especies de muérdago ( $P < 0.05$ ). La producción de gas B (mL de gas) presentó diferencias entre especies de muérdago y edades de árboles muestreados ( $P < 0.0001$ ). No se encontraron diferencias en la tasa de producción de gas c ( $P > 0.05$ ), en promedio fue de 0.040. El tiempo Lag, fue diferente entre especies de muérdago ( $P < 0.05$ ). Se concluye que la composición química entre la especie de muérdago negro y amarillo son diferentes, contienen metabolitos secundarios que modifican la producción de gas *in vitro* y la digestibilidad de las especies. Ambas especies de muérdago son una opción para la alimentación del ganado ovino en sistemas de producción de alta montaña, debido a su aporte de proteína y contenido de carbohidratos estructurales, además pueden ser una opción para reducir el nivel de infestación en árboles brinzales y jóvenes, y constituyen un control de plantas parásitas en el APFFNT.

Los resultados de la segunda fase, donde se analizó la composición química mediante cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del extracto de acetato de etilo del muérdago negro *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, se encontraron compuestos flavonoides y otros ácidos fenólicos que al ser separados se identificaron polifenoles, dos flavanonas glicosiladas, glicósido de quercetina, cinamatos, cumarina, flavona, derivado del ácido cinámico, ácido ferúlico, cumarato, ácido protocatechuico, naringenina y naringina.

En la tercera etapa, se llevó a cabo la evaluación antihelmíntica *in vitro* del extracto de *A. vaginatum* y cinco subfracciones con mayor rendimiento contra el parásito *Haemonchus contortus*, mediante la prueba de inhibición de la eclosión de huevos (%IEH) y se determinaron las concentraciones efectivas (CE50 y CE90). La mejor actividad antihelmíntica se observó en el extracto obtenido con acetato de etilo completo y la

subfracción AvR9, registró 96.1% de IEH a 0.25 mg/mL, con una CE50 de 0.12 y 0.088 mg/mL respectivamente. Los resultados de ese estudio demostraron que *A. vaginatum* es capaz de inhibir el proceso de eclosión de huevos de *H. contortus* y puede ser una opción viable para el control de haemoncosis en pequeños rumiantes.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*, se deduce que la utilización de muérdago en la dieta de ovinos es una opción viable que aporta fibras, proteína y taninos condensados, además posee propiedades antihelmínticas que beneficia la salud de los ovinos.

## Abstract

Sheep production systems have different feeding strategies such as the use of parasitic plants like *Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule* and *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*. These species have been catalogued as the most damaging and distributed pests in high mountain forests in the national territory.

The work was carried out in three stages; in the first stage, the analysis of the proximal chemical composition of yellow (*A. globosum*) and black (*A. vaginatum*) mistletoe from four age categories of *Pinus hartwegii* (small saplings, saplings, juvenil and adults) and their effect on the kinetics of ruminal fermentation *in vitro* was carried out. In the second stage, phytochemical analysis of black mistletoe was carried out to identify compounds of interest with possible anthelmintic and antioxidant activity, using thin layer chromatography and HPLC. Finally, in the third stage, a biodirected assay of the secondary metabolites identified in the black mistletoe species (*A. vaginatum*) was carry out to evaluate their *in vitro* anthelmintic activity on the *Haemonchus contortus* parasite population.

The results of the first stage, proximate chemical analysis, showed significant differences between mistletoe species ( $P < 0.001$ ) in dry matter, organic matter, neutral detergent fibre and acid detergent fibre content. The dry matter content of black mistletoe was different between the different age category of trees sampled. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were found in CP content between mistletoe species and tree ages category sampled. The content of total phenols, total tannins and condensed tannins were different between mistletoe species ( $P < 0.0001$ ) and was higher in yellow mistletoe, with no effect of age category of trees sampled. *In vitro* digestibility of both mistletoe species averaged 437 g/kg DM, with significant differences between mistletoe species ( $P < 0.05$ ). B-gas production (mL of gas) showed differences between mistletoe species and tree age categories sampled ( $P < 0.0001$ ). No differences were found in the gas production rate c ( $P > 0.05$ ), which averaged 0.040. Lag time was different between mistletoe species ( $P < 0.05$ ). It is concluded that the chemical composition between black and yellow mistletoe species are different, containing secondary metabolites that modify the *in vitro* gas production and digestibility of the species. Both mistletoe species are an option for feeding sheep in high mountain production systems, due to their protein and structural carbohydrate content, and can also be an option to reduce the level of infestation in small saplings and young trees and are an option in control of parasitic plants in the APFFNT.

The results of the second stage, where the chemical composition was analysed by thin layer chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC) of the ethyl acetate extract of the black mistletoe *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, flavonoid compounds and other phenolic acids were found and when separated, polyphenols, two glycosylated flavanones, quercetin glycoside, cinnamates, coumarin, flavone, cinnamic acid derivative, ferulic acid, coumarate, protocatechuic acid, naringenin and naringin were identified.

In the third stage, the *in vitro* anthelmintic evaluation of the *A. vaginatum* extract and five subfractions with the best performance against the parasite *Haemonchus contortus* was carried out using the egg hatch inhibition test (%IEH) and the effective concentrations (EC50 and EC90) were determined. The best anthelmintic activity was observed in the extract obtained with full ethyl acetate and AvR9 subfraction, recorded 96.1% IEH at 0.25 mg/mL, with an EC50 of 0.12 and 0.088 mg/mL respectively. The results of this study demonstrated that *A. vaginatum* is able to inhibit the hatching process of *H.*

*contortus* eggs and may be a viable option for the control of haemonchosis in small ruminants.

Based on the results obtained in the *in vitro* experiments, it can be deduced that the use of mistletoe in sheep diets is a viable option that provides fibre, protein and condensed tannins, as well as possessing anthelmintic properties that benefit sheep health.

## Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 Producción ovina en México.....	2
2.1.1 Sistemas de producción de ovinos.....	3
2.1.2 Alternativas en la alimentación del ganado ovino.....	4
2.2 Metabolitos secundarios en plantas.....	6
2.2.1 Compuestos que contienen nitrógeno.....	7
2.2.2 Terpenoides .....	8
2.2.3 Compuestos que contienen sulfuro.....	8
2.2.4 Compuestos Fenólicos.....	9
2.2.5 Técnicas de identificación de compuestos fenólicos.....	13
2.3 Metabolitos secundarios y su efecto en la alimentación animal.....	14
2.4 Metabolitos secundarios y su efecto en salud animal.....	15
2.4.1 <i>Haemonchus contortus</i> .....	16
2.4.2 Control integrado de nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes .....	17
2.5 Área de Protección de Flora y Fauna el Nevado de Toluca .....	18
2.5.1 <i>Pinus hartwegii</i> Lindl. ....	19
2.5.2 Plagas que afectan a la población de árboles del APFFNT.....	19
2.5.3 <i>Arceuthobium globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> .....	21
2.5.4 <i>Arceuthobium vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i> .....	21
2.5.5 Ciclo biológico del muérdago enano.....	22
<b>2.5.6</b> Control del muérdago <i>Arceuthobium</i> spp.....	23
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>4 HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>6 OBJETIVOS</b> .....	27
<b>6.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	27
<b>6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	27
<b>7 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	28
<b>7.1 Etapa 1: Composición nutricional de <i>Arceuthobium vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i> y <i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> y su efecto en la cinética de fermentación ruminal in vitro.</b> 28	
7.1.1 Colecta de muestras.....	28
7.1.2 Secado y molido de muestras .....	28
7.1.3 Determinación de fenoles totales, taninos totales y taninos condensados.....	28
7.1.4 Análisis químico proximal .....	28
7.1.5 Cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> .....	29

7.1.6	Diseño experimental y análisis de resultados .....	29
<b>7.2</b>	<b>Etapa 2 Evaluación antihelmíntica del extracto de <i>A. vaginatum</i> subsp <i>vaginatum</i></b>	<b>30</b>
7.2.1	Aislamiento e identificación de compuestos secundarios del extracto y subfracciones .....	30
7.2.2	Identificación de compuestos mayoritarios por HPLC .....	30
7.2.3	Obtención de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> .....	30
7.2.4	Porcentaje de Inhibición de la eclosión de huevos (IEH).....	31
7.2.5	Análisis estadístico y estimación de Concentraciones Efectivas (CE).....	31
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>8.1</b>	<b>Artículo publicado en Tropical and Subtropical Agroecosystems</b> .....	<b>32</b>
	<b>Composición nutricional de <i>Arceuthobium vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i> y <i>A. globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> y su efecto en la cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i>.</b> ....	<b>32</b>
<b>8.2</b>	<b>Artículo enviado y en segunda ronda de revisión en la Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária</b> .....	<b>34</b>
	<b>Bioactive compounds from the parasitic plant <i>Arceuthobium vaginatum</i> inhibit <i>Haemonchus contortus</i> egg hatching“</b> .....	<b>34</b>
<b>8.3</b>	<b>Artículo de divulgación publicado Enfoque Rural, Año 2, Núm. 1 (2021). Evaluación de la fermentación <i>in vitro</i> de dos variedades de muérdago enano del Área de Protección de Flora y Fauna “Nevado de Toluca”.</b> .....	<b>36</b>
<b>8.4</b>	<b>Participación en congresos</b> .....	<b>37</b>
8.4.1	XVII Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria.....	37
8.4.2	2do Congreso Internacional en Ciencias Veterinarias y Producción Animal .....	38
8.4.3	Reunión Nacional de Investigación Pecuaria .....	40
8.5	Estancia de investigación en Centro de Investigación Biomédica del Sur-Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos. ....	43
8.6	Estancia de investigación en Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Jiutepec, Morelos. ....	45
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>46</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>49</b>
<b>11</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>50</b>



## **Lista de cuadros**

<b>Cuadro 1:</b> Estados con mayor producción nacional de carne de ovino en México según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera en 2019.....	2
<b>Cuadro 2:</b> Producción municipal de carne de ovino en el Estado de México en el año 2019 según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. ....	3
<b>Cuadro 3:</b> Principales metabolitos secundarios en las plantas.....	6

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Carta FAMACHA.....	17
<b>Figura 2:</b> <i>Pinus hartwegii</i> Lindl. Fuente: CONABIO,2023 .....	19
<b>Figura 3:</b> <i>Arceuthobium globosum</i> subsp. <i>grandicaule</i> en árboles infestados y muérdago maduro. (Fuente: Elaboración propia) .....	21
<b>Figura 4:</b> <i>Arceuthobium vaginatum</i> subsp. <i>vaginatum</i> en árboles infestados y aspecto de un muérdago maduro (Fuente: Elaboración propia).....	22
<b>Figura 5:</b> Ciclo biológico del muérdago <i>Arceuthobium</i> spp. Fuente: Manion (1999).....	23

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La crianza de ovinos se lleva a cabo en gran diversidad de lugares en México, uno de estos es la alta montaña del centro de México que se caracterizan por nulo acceso a tierras de cultivo para la siembra y cosecha de cereales por lo que la alimentación del ganado ovino se basa en el uso de pastoreo de praderas nativas del bosque, subproductos o residuos de cosecha, entre otras. Estos sistemas requieren de opciones para mejorar la alimentación del ganado ovino, como el uso de forrajes locales tal es el caso de plantas parásitas que afectan la viabilidad del bosque.

El Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT) se encuentra afectado por diversas plagas, dos de ellas son muérdago amarillo (*Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule*) y muérdago negro (*Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*) las cuales afectan cerca del 43% de la población de árboles de *Pinus hartwegii* en las diferentes etapas de crecimiento (adulto, juvenil, latizal y brinzal) y reducen la viabilidad del bosque (Endara-Agramont *et al.*, 2014). Para controlar esta plaga forestal se utilizan diversas estrategias, una de ellas es la poda manual de ambas especies de muérdago de árboles en las diferentes etapas de crecimiento, en zonas altamente infestadas e incorporarlas en la alimentación del ganado ovino.

Algunas plantas como *Gymnopodium floribundum* son nutraceuticas debido a sus propiedades descritas por Hoste *et al.* (2015) en donde describen que la planta debe (1) tener un contenido nutricional y digestibilidad *in vivo* aceptable, (2) debe contener compuestos secundarios activos con actividad antihelmíntica confirmada *in vitro*, y (3) el consumo de estas plantas no debe generar un impacto negativo en el rendimiento animal (Méndez-Ortiz *et al.* 2019). El uso de estos alimentos son una alternativa sustentable para el control de parasitosis en el ganado rumiante, ocasionadas por parásitos como *Haemonchus contortus*. Por ejemplo, se ha demostrado que la alimentación con *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce* posee alta cantidad de proteína cruda y metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de parásitos en el tracto gastrointestinal (Olmedo-Juárez *et al.* 2014).

Se ha demostrado que el muérdago amarillo posee metabolitos secundarios que pueden mejorar la alimentación de pequeños rumiantes, además otra especie de muérdago como *Arceuthobium oxycedri*, posee grupos de compuestos secundarios biológicamente activos que tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Zaidi *et al.* 2006; Pernitsky *et al.* 2011).

Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo será la evaluación químico nutricional, digestibilidad y producción de gas *in vitro* de las plantas *A. globosum* y *A. vaginatum* y la composición fenólica de *A. vaginatum* y su efecto ovicida *in vitro* contra el parásito *Haemonchus contortus*.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Producción ovina en México

En el mundo, la oveja doméstica *Ovis aries* ha sido una especie de pequeños rumiantes criada para obtener lana, leche y carne, se ha adaptado a diferentes regiones a través del mundo desde los altiplanos húmedos y fríos del norte de Europa hasta las áreas áridas de África, Asia y Australasia (región al oeste de Oceanía, que comprende Australia, Melanesia y Nueva Zelanda) (Ferguson *et al.*, 2017).

Los ovinos se adaptan a gran variedad de sistemas y en otras formas de agricultura, donde la tenencia de tierra es limitada y los recursos no son suficientes para la crianza de grandes rumiantes (Ferguson *et al.*, 2017), los sistemas de producción se basan en el pastoreo, otros sistemas mantienen a los animales en corrales y su alimentación es mediante la estabulación y dietas altas en granos (Ferguson *et al.*, 2017). Son de suma importancia para la economía familiar como una forma de ahorro, además de ser una actividad que provee de productos de alto valor nutricional que mejora la calidad de vida de los pobladores (Herrera-Haro *et al.*, 2019).

La producción ovina en México se realiza en diversas condiciones agroecológicas, concentrando la producción de ovino en el altiplano central mexicano, así como su mercado (Hernández-Cortázar *et al.*, 2014). Aunque existe desabasto, la producción de ovinos se ha visto mejorada debido a los diversos programas de apoyo a la producción ovina de la región, para abastecer mercado de carne del país (Hernández-Cortázar *et al.*, 2014).

De acuerdo con el SIAP (2019), la producción de carne de ovino se concentra en el Estado de México, después el estado de Hidalgo como se observa en la tabla 1. La venta del ganado ovino en México se realiza por pieza y no son considerados el peso del canal final y la calidad de la carne de los animales (Hernández-Cortázar *et al.*, 2014).

**Cuadro 1:** Estados con mayor producción nacional de carne de ovino en México según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera en 2019.

<b>Estado</b>	<b>Producción (Toneladas)</b>	<b>Valor de la Producción (Miles de pesos)</b>	<b>Animales sacrificados (Cabezas)</b>
<b>México</b>	9,289.1	719,494.2	421,808
<b>Hidalgo</b>	6,770.4	619,575.8	323,383
<b>Veraacruz</b>	5,425.1	391,281.3	281,406
<b>Jalisco</b>	4,536.1	372,582.1	209,845
<b>Puebla</b>	4,400.5	264,716.6	206,306
<b>Zacatecas</b>	4,278.6	322,622.5	196,44

Los municipios que tienen una mayor producción dentro del estado de México se presentan en la tabla 2. De estos, los que forman parte del APFFNT y se perfilan como los principales municipios de producción de carne ovina son Zinacantepec y Almoloya

de Juárez. Para el año 2020 el Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados en el sistema producto ovino, determino un precio promedio por kilo en peso vivo de ovino de \$45.00, en el Estado de México con un peso vivo por animal promedio de 45 kg.

(SIAP, 2019).

**Cuadro 2:** Producción municipal de carne de ovino en el Estado de México en el año 2019 según el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

<b>Municipio</b>	<b>Producción (toneladas)</b>	<b>Valor de la producción (miles de pesos)</b>	<b>Animales sacrificados (cabezas)</b>
<b>Juchitepec</b>	446.9	35,279.6	22,028
<b>Acambay de Ruíz Castañeda</b>	372.3	27,981.1	15,856
<b>San José del Rincón</b>	376.2	29,449.2	16,554
<b>Jocotitlán</b>	350.8	27,561.9	15,743
<b>Ixtlahuaca</b>	317.0	24,647.8	13,732
<b>Villa del Carbón</b>	313.5	24,977.9	12,747
<b>Almoloya de Juárez</b>	263.7	18,504.3	12,440
<b>Atlacomulco</b>	270.5	21,123.6	11,974
<b>Zinacantepec</b>	267.5	19,805.9	12,892
<b>San Felipe Del Progreso</b>	235.8	18,431.3	10,375
<b>Temoaya</b>	200.7	14,528.7	9,908
<b>Jilotepec</b>	200.3	15,694.8	8,121

### 2.1.1 Sistemas de producción de ovinos

Existen diferentes sistemas de producción de ovinos en el mundo, desde sistemas tradicionales (pastoreo, trashumancia), extensivos (pastoreo y suplementando con granos) e intensivo (corrales con alta suplementación de granos) (Ferguson *et al.*, 2017). En México a estos sistemas se suma la producción ovina de traspatio, que consiste en la cría y manejo de animales en sistemas de producción maíz-ovinos donde el cultivo del maíz se complementa con la crianza de ovinos para darle valor agregado a la producción del maíz al alimentar a los ovinos con grano y rastrojo (Bobadilla-Soto *et al.*, 2022). Los sistemas extensivos de ganadería se desarrollan principalmente en recursos forrajeros, donde el pastoreo tiene impacto en la vegetación en términos de productividad, calidad, diversidad de especies y mejoran el paisaje (Bernués *et al.*, 2005).

La producción de ovinos se ha desarrollado como una actividad paralela a otras actividades agrícolas, pecuarias y no agrícolas entre otras actividades para complementar el ingreso familiar (Herrera-Haro *et al.*, 2019). Cerca del 80% del rebaño ovino nacional es criado por productores de bajos recursos económicos y tienen bajo nivel tecnológico, además el 95% del inventario nacional formado por ganado criollo y solo 5% restante por

razas especializadas (Hernández-Marín *et al.*, 2017). Esta actividad pecuaria se lleva a cabo desde hace al menos 40 años y representa una tradición en la zona de alta montaña del APFFNT (Martínez-Hernández *et al.*, 2014), otros autores mencionan que es una actividad de reciente incursión, siendo menor a los 10 años de antigüedad (Pérez-Hernández *et al.*, 2011). En otros estados como Hidalgo tienen una tradición de producción ovina ubicando los sistemas de producción como un medio de vida y subsistencia, además, en la zona conurbada al sur de la Ciudad de México, más del 70% de los productores lleva a cabo la engorda y cría de corderos (Herrera-Haro *et al.*, 2019).

Los sistemas extensivos de alimentación en ovinos de pequeña escala en la zona de APFFNT tienen cerca de 191,000 cabezas de ganado de los cuales el 60% son ovejas región (Hernández-Valenzuela *et al.*, 2019). En el APFFNT se han identificado las razas de ovinos que se crían en estos sistemas son Suffolk (40%), cruces de Suffolk-Hampshire (40%), Hampshire (10%) y criollo local (10%) (Martínez-Hernández *et al.*, 2018). Estos sistemas dependen de la mano de obra familiar, hay desconocimiento en el manejo reproductivo y sanitario de los ovinos (Hernández-Valenzuela *et al.*, 2019).

El principal método de alimentación es el pastoreo, en sus diversas modalidades dependen de terrenos externos para la alimentación trashumante (Pérez-Hernández *et al.*, 2011). Los productores son ejidatarios que emplean las áreas comunales para el pastoreo de ganado ovino (Martínez-Hernández *et al.*, 2018). Estos territorios comunales están subdivididos según su uso en: áreas comunes, potreros y terrenos de cultivo, con el aprovechamiento de los residuos de cosecha en la alimentación del ganado ovino (Martínez-Hernández *et al.*, 2018; Hernández-Valenzuela *et al.*, 2019).

El manejo de la alimentación se realiza en sistema de producción semiestabulado (utilizado por el 60% de la población que se dedica a la crianza de ovinos), en la mañana se realiza el pastoreo en la zona, se llevan a pastar los animales libremente en periodos cortos de 10 minutos en rutas de 2 a 4 km, y en las tardes se suplementa la alimentación en los corrales (Hernández-Valenzuela *et al.*, 2019). El manejo del pastoreo es probablemente uno de los usos del suelo más extensos de la tierra, esta práctica está en dilema debido a la conservación y uso restringido de recursos naturales, pero los efectos sobre las comunidades de plantas, en muchos casos han revelado ser contradictorias (Martínez-Hernández *et al.*, 2018; Hernández-Valenzuela *et al.*, 2019).

Los productores invierten mayores recursos económicos cuando es época de secas, debido a que los pastos disminuyen, debido a las fuertes condiciones adversas del clima a partir del mes de noviembre y se tiene que suplementar con otros forrajes, cuando las características nutritivas de los pastizales se ven desfavorecidas (Martínez-Hernández *et al.*, 2014; Martínez-Hernández *et al.*, 2018).

Además, los sistemas de producción ovina se ven afectados por diversos factores que disminuyen su productividad, uno de ellos es la incidencia de parasitosis.

### 2.1.2 Alternativas en la alimentación del ganado ovino

La alimentación del ganado ovino en zonas de alta montaña como el APFFNT hace uso de pastoreo en el bosque, cultivos como heno de avena, rastrojo de maíz y cultivo de papa

(Hernández-Valenzuela *et al.*, 2019). El 53.7% de los rebaños se proporciona algún tipo de suplementación, principalmente alimento balanceado (Herrera-Haro *et al.*, 2019) o elaborados por los productores utilizando materias como salvado de trigo, *Avena sativa*, *Vicia sativa*, soya, maíz, entre otros (Herrera-Haro *et al.*, 2019; Hernández-Valenzuela *et al.*, 2019). Algunos productores realizan la estabulación del ganado ovino para aumentar la ganancia de peso y los precios a venta, este manejo pone en riesgo la viabilidad de la unidad de producción ya que depende de la compra de insumos externos (Hernández-Valenzuela *et al.*, 2019).

Hernández-Luna *et al.* (2017) realizaron un experimento en la alimentación del ganado ovino utilizando a *Arceuthobium globosum* como parte de un ingrediente en la dieta de ovinos para hacer uso de los recursos forrajeros locales además de contrarrestar el impacto que tiene esta plaga en el bosque del APFFNT. Se encontró que la inclusión de 15 g/kg MS represento la inclusión de 2.43 g/kg MS de taninos condensados en la dieta, aumento la conversión alimenticia por lo que se consideró que es una alternativa sustentable para el manejo de las plantas parásitas en los bosques de alta montaña (Hernández-Luna *et al.*, 2017).

El uso de plantas con contenido de metabolitos secundarios tiene un efecto en la conversión alimentaria de los animales, así como efectos benéficos en la salud como por ejemplos efecto antioxidante y antihelmíntico (Durmic y Blache, 2012). Lo que genera nuevas opciones. Otros hallazgos realizados por Díaz-Medina *et al.* (2021) demostraron el valor nutritivo y la actividad antioxidantes de tres especies de hierbas como *Tithonia tubiformis*, *Cosmos bipinnatus* y *Tagetes lucida* para su posible implementación en la alimentación de rumiantes, la inclusión de *T. lucida* en la dieta produjo un aumento del 18% en el contenido de metabolitos secundarios y un aumento del 30% en la actividad antioxidante en comparación con la dieta control, lo que indica que las plantas ensayadas pueden utilizarse como aditivos para aumentar la actividad antioxidante de las dietas en ovinos sin efectos negativos.

## 2.2 Metabolitos secundarios en plantas

Los metabolitos secundarios en las plantas constituyen un reservorio enorme de biodiversidad química. En comparación con los metabolitos primarios los cuales son esenciales para el crecimiento de las plantas y su desarrollo, los metabolitos secundarios tienen papeles internos en las plantas y son integrales en la comunicación de la planta con su medio ambiente (Kutchan et al., 2015).

Los metabolitos secundarios de las plantas son mecanismos de supervivencia y de defensa en repuesta a estresantes ambientales, ataque de patógenos (microorganismos), insectos, herbívoros y competencia entre plantas (Castillejos-Velázquez, 2005). Han sido utilizados en producción animal como antibióticos, antioxidantes, antiinflamatorios, vasodilatadores, promotores del crecimiento, mejoran la eficiencia de utilización de los alimentos, modificando la estructura de la población microbiana y en consecuencia el perfil de fermentación ruminal, además, aumenta el bienestar animal al mejorar la salud de los animales por tener propiedades antioxidantes (Durmic y Blache, 2012).

Cerca de 200,000 estructuras químicas han sido reportadas como compuestos secundarios de plantas con muchas clases algunos de los cuales son responsable de su olor, sabor (terpenos) y pigmentación (quinonas y taninos), como inhibidores de tripsina, quimotripsina y  $\alpha$ -amilasa, fitohemaglutinina/lecitina, ácido fítico, ácido oxálico, nitrato y nitrito, L-mimosina ( $\beta$ -(3-hydroxy-4-pyridona-1-yl)- L- alanina), canavanina, L-DOPA( L-3,4-Dihidroxyfenilalanina), gopipol, ácido clorogénico, saponinas, ester de forbol, alcaloides, flavonoides, taninos, aminoácidos no proteicos, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos y terpenos (Makkar *et al.*, 2007a; Durmic y Blache, 2012; Castillejos-Velázquez, 2005). Se pueden clasificar según la sustancia química que les constituye (Goldberg 2003 en Ahmad *et al.*, 2017; Elshafie *et al.*, 2023).

**Cuadro 3:** Principales metabolitos secundarios en las plantas.

<b>Grupo principal</b>	<b>Subgrupos</b>
<b>Compuestos que contienen nitrógeno</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcaloides</li> <li>• Glucósidos cianogénicos</li> <li>• Glucosinolatos</li> <li>• Aminoácidos tóxicos</li> </ul>
<b>Terpenoides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monoterpenos sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos, sesquarterpenos, tetraterpenos, politerpenos y norisoprenoides</li> </ul>
<b>Compuestos que contienen sulfuro</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glutación (GSH)</li> <li>• GSL, fitoalexinas, tioninas, defensinas y lecitinas</li> </ul>
<b>Compuestos polifenólicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taninos</li> <li>• Fenoles simples</li> <li>• Flavonoides</li> </ul>

A continuación, se mencionan las características más importantes dentro de cada grupo y subgrupo de los compuestos secundarios anteriormente enlistados.



## 2.2.1 Compuestos que contienen nitrógeno

### 2.2.1.1 *Alcaloides*

Son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides (Jiménez-Sepúlveda *et al.*, 2003; Kabera *et al.*, 2014). Son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica (García-Ávalos y Pérez-Urria, 2011; Kabera *et al.*, 2014).

Los alcaloides son un grupo muy heterogéneo, por lo general son tóxicos, algunas plantas ricas en alcaloides son las especies de *Phalaris*, *Datura stramonium*, ryegrass *Lolium perenne* L. infectada con hongo endofítico (*Acremonium lolii*). El consumo de estas ocasiona parálisis y latido rápido del corazón llevando a la muerte (Makkar, 1999).

### 2.2.1.2 *Glicósidos cianogénéticos*

Son  $\beta$ -glycosidos de  $\alpha$ -hidroxinitrilos (cianohidrinás). Se caracterizan por su habilidad para liberar cianuro de hidrógeno (HCN) cuando son hidrolizados por  $\beta$ -glicosidasas; este proceso (cianogénesis) ocurre típicamente cuando el tejido vegetal que contiene los glicósidos cianogénicos es liberado, por ejemplo, cuando se muerden, mastican o ingieren por herbívoros o insectos (Kutchan *et al.*, 2015).

Los glicósidos cianogénéticos son importantes componentes de defensa de las plantas contra herbívoros debido al sabor amargo y la liberación de HCN después de la ruptura tisular (Kutchan *et al.*, 2015).

La mayoría de los glicósidos cianogénéticos son derivados de cinco aminoácidos protéicos: tirosina, fenilalanina, valina, leucina e isoleucina, el aminoácido no proteico (2-ciclopentenil) glicina y el ácido nicotínico. Se encuentran en diferentes cultivos como *Trifolium*, *Prunus* spp., *Amelanchier* spp., *Vicia sativa* ssp. *angustifolia*, arveja, *Sorghum vulgare*, y *Lotus* (Majak, 2001).

### 2.2.1.3 *Glucosinolatos*

Los glucosinolatos son aniones orgánicos solubles en agua cuya estructura química corresponde a ésteres  $\beta$ -tioglucósidos N-hidroxisulfato o ésteres (Z)-N-hidroximinosulfato o S-glucopiranosil tiohidroximatos (Arias-Cortes, 2011).

Son responsables del sabor picante y aroma sulfuroso de plantas como *Cruciferae*, *Brassicaceae*, dicotiledóneas (*Resedaceae*, *Euphorbiaceae*, *Plantaginaceae*) (Arias-Cortes, 2011). Son tóxicos para el ganado, causando gastroenteritis aguda, salivación e irritación de la boca, disminuyendo los niveles de glutatión en sangre y reduciendo la ingestión voluntaria, tal vez por incidir directamente sobre los microorganismos

ruminales, reduciendo así la digestibilidad del forraje y el ritmo de paso de la ingesta (Makkar *et al.*, 2007a).

#### 2.2.1.4 Aminoácidos tóxicos

Cumplen con una doble función, almacenaje de nitrógeno para la planta y defensa. Su efecto tóxico se produce por su analogía estructural con los aminoácidos esenciales, al ser incorporados por error en la formación de proteínas enzimáticas o neurotransmisores. Se encuentran principalmente en las leguminosas, arvejas, *leucaena*, nabos (Akande *et al.* 2010).

*Leucaena leucocephala* es un análogo de los aminoácidos aromáticos, contiene mimosina que en monogástricos y rumiantes provoca crecimiento deficiente, alopecia, problemas reproductivos, lesiones de boca, lesiones esofágicas y depresión de niveles de tiroxina (Akande *et al.*, 2010).

#### 2.2.2 Terpenoides

Los terpenoides son la más grande clase de metabolitos secundarios en las plantas, tienen una enorme diversidad estructural, son unidades formadas por cinco carbonos las cuales se denominan unidades de isopreno, se clasifican en Monoterpenos, hemiterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, y triterpenos. Poseen una diversidad funcional y estructural en las plantas y puede ser básica en el crecimiento de las plantas como algunas hormonas, las gibberellinas, brassinosteroides, ácido abscísico, strigolactonas (Kutchan *et al.*, 2015).

Las cadenas de terpenoides son muy lipofílicas, constituyen parte en los aceites esenciales, resinas, latex y cera. Estos tienen papeles ecológicos como defender a la planta de herbívoros y patógenos, inhibir la germinación y el crecimiento de plantas competentes o atraer a los animales para la dispersión de polen y semillas (Kutchan *et al.*, 2015).

Tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiparasitarias, debido a un daño en la membrana, la interferencia de procesos metabólicos (Radulovic *et al.*, 2013).

#### 2.2.3 Compuestos que contienen sulfuro

##### 2.2.3.1 Glutatión

El glutatión (también glutatión) (GSH)<sup>2</sup> es un tripéptido constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato. Principal antioxidante de las células es ubicuo y ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno, como los radicales libres y los peróxidos. En las células, el glutatión se encuentra principalmente en su estado reducido (GSH) y, en mucha menor proporción, en su estado oxidado (GSSG) (Martínez-Sámamo *et al.*, 2011).

##### 2.2.3.2 Lecitinas e inhibidores de las proteasas

Las lectinas son proteínas capaces de unirse de forma reversible a fragmentos glicídicos de glicoconjugados. Estas sustancias provocan inhibición en el crecimiento y reducción en la ingestión afectando enzimas y hormonas gastrointestinales como la colecistoquinina, y a la absorción intestinal al unirse con las células epiteliales de las microvellosidades, además se unen a células rojas de la sangre, inhiben el crecimiento de los animales y disminuyen los niveles de insulina en la sangre (Makkar *et al.*, 2007a).

Los inhibidores de tripsina se encuentran en semillas de leguminosas son biomoléculas que participan en la regulación de la actividad de las enzimas proteolíticas, la protección de los zimógenos y mecanismos de defensa en diferentes organismos (inhibidores de la tripsina y quimotripsina) (Makkar *et al.*, 2007a).

En presencia de una proteasa y un sustrato producen una notoria disminución en la velocidad de la reacción catalizada por la enzima en el páncreas (Quicazán y Caicedo, 2012). Estos inhibidores pueden inactivarse mediante un tratamiento con calor, la fermentación y la germinación (Makkar *et al.*, 2007a).

#### 2.2.4 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas incluyen flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbeno y lignanos (Cong-Cong *et al.* 2017).

##### 2.2.4.1 Flavonoides

Son compuestos polifenólicos formados por 15 carbonos, con tres puentes de carbono que conectan dos anillos aromáticos de carbono que conectan dos anillos aromáticos. Son omnipresentes en las plantas, pero están muy concentrados en la epidermis de las hojas y en la piel de los frutos, donde desempeñan un papel importante como metabolitos secundarios (Kumar *et al.*, 2022).

Los diversos procesos en los que intervienen los flavonoides son la estimulación de los nódulos fijadores de nitrógeno, la protección UV, resistencia a enfermedades y pigmentación.

Los flavonoides se clasifican en flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, flavan-3-oles y flavanonas. Los grupos hidroxilo suelen estar presentes en las posiciones 4, 5 y 7 del anillo aromático. Los flavonoides que contienen azúcar contienen principalmente glucósidos naturales. La disponibilidad de hidroxilos y azúcares aumenta significativamente la solubilidad en agua de los grupos metilo de los flavonoides, y las unidades de isopentil como sustituyentes hacen que los flavonoides sean lipofílicos (Kumar *et al.*, 2022).

##### 2.2.4.1.1 Flavonas

Pertencen al grupo de los flavonoides (2-fenil-1-benzopiran-4-ona), son pigmentos amarillos naturales que poseen características protectoras del sistema cardiovascular,

sistema nervioso, anticancerosas y antiinflamatorias, algunos ejemplos de flavanonas son naringenina, apinenina y luteolina (Simmonds, 2010).

#### 2.2.4.1.2 Flavonoles

Los flavonoles son una clase de flavonoides que tienen como columna vertebral a la 3-hidroxiavona, su diversidad se deriva de las diferentes posiciones de los grupos -OH (Rainer y Siegfried, 2006), los más conocidos son quercetina, miricetina kaempferol, fisetina e isorhamnetina (Kumar *et al.*, 2022).

#### 2.2.4.1.3 Flavan-3-oles

Esta es la subclase compleja de los flavonoides, que comprende una serie de monómeros simples monómeros (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina, taninos condensados, y las proantocianidinas poliméricas y oligoméricas. A diferencia de las isoflavonas planares, las flavonas flavonoles y antocianidinas, la presencia de C3 saturado en el anillo C heterolítico hace que las flavanonas, los flavan-3-oles y las proantocianidinas no sean planares (González-Mera *et al.*, 2019).

Los centros quirales de los flavan-3-oles en C2 y C3 dan lugar a cuatro isómeros para cada nivel de hidroxilación del anillo B de los cuales (-)-epicatequina y (+)-catequina se dan ampliamente en la naturaleza y la (+)-epicatequina y la (-)-catequina son comparativamente raras. Un centro quiral extra está presente en el C4 de las proantocianidinas (tanto oligoméricas como poliméricas), mientras que las flavanonas sólo tienen un centro quiral en C2 (Kumar *et al.*, 2022).

Las proantocianidinas de tipo A poseen un enlace éter adicional entre C-7 y C-2. Las proantocianidinas pueden presentarse como estructuras grandes y complejas de hasta 50 unidades. Los flavan-3-oles forman galocatequinas tras la hidroxilación y también forman ésteres con el ácido gálico. Las procianidinas se incluyen exclusivamente en las proantocianidinas que contienen unidades de (epi)catequina, y éstas son el tipo más abundante de proantocianidinas en las plantas (Sharma *et al.*, 2022).

#### 2.2.4.1.4 Antocianidinas

Las antocianidinas, también denominadas antocianos, que son los principales derivados conjugados, están ampliamente distribuidos por todo el reino plantae y son los responsables de los colores púrpura, rojo y azul de flores y frutos (Zavaleta *et al.*, 2005).

Además, también se obtienen de semillas, tallos, raíces y hojas. Las principales funciones de las antocianinas son proteger a las plantas de la luz intensa y los rayos UV sombreando las células mesofílicas de las hojas y atraer a los polinizadores. Las antocianidinas más comunes son la malvidina, la cianidina, la peonidina, la petunidina, la pelargonidina y la delphinidina (Kumar *et al.*, 2022).

Estos compuestos se encuentran como conjugados de azúcar en los tejidos vegetales y se conocen como antocianinas y también suelen estar presentes en forma de conjugados con ácidos orgánicos como el málico y el acético y también con hidroxicinamatos, y aunque

su conjugación se produce con mayor frecuencia en C3, también puede tener lugar en las posiciones 3, 5 y 7 (Kumar *et al.*, 2022).

#### 2.2.4.1.5 Flavanonas

La ausencia del doble 2,3 y del centro quiral en C2 suele caracterizar a las flavanonas. El anillo C está unido al anillo B en C2 en la configuración  $\alpha$ . Como la estructura de la flavanona es muy reactiva, se somete fácilmente a reacciones de O-metilación, hidroxilación y glicosilación. Las flavanonas se encuentran en altas concentraciones en los cítricos, y el glucósido flavanona común se encuentra en grandes cantidades en la piel de los cítricos en formas químicas como la hesperetina-7-O-rutinósido (hesperidina) (Simmonds, 2010).

#### 2.2.4.1.6 Isoflavonas

Los fitoestrógenos son generalmente isoflavonas que se presentan en forma de glicósidos. La fracción de azúcar está unida a uno o varios de los grupos hidroxilo localizados en varias posiciones del núcleo de la isoflavona. Se encuentran en concentraciones más elevadas en leguminosas como la soya, linaza, cártamo y semilla de algodón. (Departamento de Agricultura de EE.UU., Servicio de Investigación Agrícola, 2002; Francis *et al.*, 2001).

La genisteína, la daidzeína y el coumestan-coumestrol, denominados fitoestrógenos, se obtienen de la alfalfa y los tréboles (*Trifolium* spp.) y tienen una actividad estrogénica que podría ser perjudicial para la reproducción de animales de pastoreo como vacas y ovejas. La similitud estructural de los isoflavonoides con el estradiol provoca inhibición de la ovulación (Morales-Ramírez *et al.* 2022).

#### 2.2.4.2 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se clasifican en ácidos benzoicos (hidroxibenzoicos) o ácidos cinámicos (ácidos hidroxicinámicos). La ruta biosintética directa de los ácidos benzoicos no está clara; sin embargo, suelen producirse a partir del ácido cinámico y sus derivados. Ejemplos frecuentes son: los ácidos p-hidroxibenzoicos, entre ellos vanílico, protocatéquico, siríngico y gálico, además del ácido gentísico, derivado del catabolismo de la tirosina mientras que los ácidos cinámicos son ortooxigenados y posteriormente metilados, dando lugar a la formación de la mayoría de los ácidos hidroxibenzoicos como el ferúlico, el p-cumárico, el cafeico y el sinápico (Marchiosi *et al.*, 2020).

Los ácidos fenólicos se encuentran en formas libres o conjugadas con ésteres, éteres y una variedad de otras moléculas (azúcares simples, ácidos orgánicos y polímeros vegetales) (Marchiosi *et al.*, 2020).

##### 2.2.4.2.1 Ácido protocatéquico

El ácido protocatéquico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, PCA) es considerado una sustancia antioxidante, antiinflamatorio, con efecto anticarcinogénico (NCBI, 2023). Es un compuesto bioactivo en las plantas de *Hibiscus sabdariffa* L. (Delgado-Bautista, 2016).

#### 2.2.4.3 Cumarinas

Las cumarinas incluyen los compuestos derivados de la benzo- $\alpha$ -pirona, que es una conocida lactona del ácido o-hidroxicinámico, cuyo nombre según la IUPAC es 2H-cromen-2-ona. La cumarina funciona como defensor para la planta, ya que posee propiedades supresoras del apetito (Zavaleta *et al.*, 2006).

#### 2.2.4.4 Taninos

Los taninos son sustancias polifenólicas con diversos pesos moleculares y complejidad variable. Sus múltiples grupos hidroxilos fenólicos dan lugar a la formación de complejos principalmente con proteínas y, en menor medida, con iones metálicos, aminoácidos y polisacáridos (Makkar, 2003b). Están ampliamente distribuidos en forrajes de clima cálido (Hristov *et al.*, 2013). Los taninos, de acuerdo con su composición química, se dividen en:

- **Taninos hidrolizables:** tienen un núcleo central de carbohidratos al que se unen varios ácidos carboxílicos fenólicos mediante ésteres de ácido gálico (galotanino) o ácido elágico (elagitaninos).
- **Taninos condensados:** también llamados proantocianidinas, que no tienen núcleo de carbohidratos y se derivan por condensación de precursores de flavonoides o polímeros de flavonoides (Makkar *et al.*, 2007a; Bhatta *et al.*, 2009; Jayanegara *et al.*, 2012).

El tipo y concentración de taninos es determinada por el tipo de planta, madurez, estado fenológico y estructura de la planta (en la inflorescencia hay mayor concentración de taninos que en los tallos y hojas) (Jin *et al.*, 2012). Además, los factores externos como temperatura, precipitación afectan la concentración de estos (Bodas *et al.*, 2012).

Los taninos se unen a carbohidratos, proteínas y lípidos inhibiendo la actividad bacteriana del rumen sobre estos compuestos (Kamalak *et al.* 2005). Los complejos tanino-proteína se forman en la saliva de los animales que consumen especies taníferas y su saliva es rica en prolina, son estables en el rango de pH de todo el tracto digestivo, protegiendo la degradación de las proteínas vegetales por los microorganismos ruminales al impedir la colonización por la microflora ruminal y su fermentación (Makkar *et al.*, 2007a) mejorando la absorción de aminoácidos esenciales en el intestino delgado (Kamalak *et al.* 2005; Hristov *et al.*, 2013). Además, otro mecanismo de adaptación es la creación de enzimas degradantes de taninos se debe a una adaptación de la población microbiana ruminal a forrajes taníferos, ocurre en algunas razas de ovejas, provoca un aumento en la rapidez de fermentación, y con ello mayor energía metabolizable disponible por los

microorganismos ruminales (Jin *et al.*, 2012) a partir de sustratos forrajeros ricos en taninos (Elahi *et al.* 2012; Guerrero *et al.*, 2012).

La composición fenólica de *Lotus corniculatus* tuvo un efecto en la producción animal, incrementando la producción de leche, lactosa y contenido de proteína, debido al incremento de la suplementación de proteína metabolizable (Cieslak *et al.*, 2012). Las *Selenomonas ruminantium* subsp. *ruminantium* son capaces de crecer en medios con ácido tánico o taninos condensados como única fuente de energía gracias a que poseen enzimas con actividad tanino-acilhidrolasa.

Los compuestos taníferos poseen propiedades antimicrobianas (Cieslak *et al.*, 2012), desparasitantes (Hristov *et al.*, 2013), mejoran el aporte de aminoácidos esenciales a duodeno, entre otros beneficios de interés en producción animal. El efecto desparasitante de los taninos condensados (71.5 g/kg MS) de *Havardia albicans* en ovinos, se encontró afectación en el tamaño y fecundidad de las hembras de *Haemonchus contortus* (Galicia-Aguilar *et al.*, 2012).

La ingestión de plantas taníferas pueden reducir el consumo de alimento, potencialmente tóxicos para los animales ocasionando toxicidad de riñón e hígado (Makkar *et al.*, 2007a). Los taninos pueden ser excretados por la orina para evitar una intoxicación por fenoles, además la inactivación de taninos puede ser mediante bacterias ruminales (Elahi *et al.*, 2012).

#### 2.2.5 Técnicas de identificación de compuestos fenólicos

Los análisis de fenoles y taninos totales, se basa en técnicas de reducción-oxidación y el uso de reactivos como Folin-Ciocalteu. Este método es usado ampliamente para fenoles totales debido a su alta sensibilidad y reproducibilidad. Los fenoles no tánicos se distinguen de los taninos utilizando una matrix sólida, polivinilpolipirrolidona (PVPP) que elimina los taninos del extracto (Makkar, 2003b).

El método espectrofotométrico determina taninos relativamente de un estándar y otro, llamado al ácido tánico, ácido gálico, catequinas, taninos de quebracho, leucoantocianidas. Esta diferencia (taninos) cuando es expresada como equivalente de ácido tánico de varios árboles y arbustos; cada gramo de taninos (por masa) tuvo un poder reductor equivalente de 0.76 a 1.25 g de ácido tánico (Makkar, 2003b).

Por otro lado, existen diferentes técnicas de identificación de compuestos fenólicos que incluyen la utilización de técnicas de separación tal como la cromatografía, la cual es una técnica analítica para separar una mezcla compleja de sustancias químicas en sus componentes individuales para identificar sus componentes y cantidades (González de Buitrago, 2010).

La cromatografía líquida se divide en plana y de columna. La cromatografía plana se divide en de papel y de placa. La cromatografía de columna se divide en cromatografía de líquido sólido (que a su vez se divide en columna abierta y HPLC, UPLC, UHPLC), la columna de intercambio iónico y de exclusión molecular (Sharapin, 2000).

La cromatografía de placa es uno de los mejores métodos para la separación rápida de mezclas de flavonoides a partir de extracciones de metanol o metanol-agua del material vegetal seco. Para este análisis se requiere de solvente, cromatocabinas, papel cromatográfico y lámpara UV (Mabry *et al.*, 1970).

La cromatografía en columna tenemos una columna de sílica empaquetada en una columna de cristal, el extracto de nuestra planta será eludido por un principio de gravedad, en donde las diferentes porciones del extracto serán arrastradas por la fase móvil que es el solvente que se va agregando a la columna, el cual se modifica en polaridad para separar uno a uno los compuestos que se obtienen. Las fases estacionarias pueden ser normal o reversa, el tamaño de partícula es más grande es de 40-70 micrómetros (Mabry *et al.*, 1970).

La cromatografía de alta resolución (HPLC) se lleva a cabo mediante una columna cromatográfica (fase estacionaria), y la fase móvil a alta presión. La muestra pasa a través de la columna mediante la fase móvil, y sus componentes son retenidos dependiendo de las interacciones químicas o físicas, así como a la naturaleza del compuesto. La muestra para analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna. Posteriormente se observa el grado de retención de los componentes de la muestra y el tiempo de retención, lo cual revela la composición de la muestra al compararla con los tiempos de retención de los compuestos químicos evaluados anteriormente con las características de la fase móvil (Mabry *et al.*, 1970).

### 2.3 Metabolitos secundarios y su efecto en la alimentación animal

Se necesita hacer el uso eficiente de alimentos no convencionales o alternativos para alcanzar la demanda de alimentos en países en desarrollo. Uno de los principales problemas de la utilización de estos alimentos es la presencia de uno o de varios metabolitos secundarios, así como desarrollar y usar análisis *in vitro* apropiados para su cuantificación prediciendo la disponibilidad de nutrientes y efectos secundarios de estos como alimentos (Makkar, 1999).

Los metabolitos secundarios se encuentran en un gran número de plantas con potencial para la alimentación animal. La mayoría de los metabolitos secundarios en niveles medios y bajos (1-4%) de consumo disminuyen el consumo de alimento y el ritmo de crecimiento, y a niveles altos (>5%) ocasionan toxicidad de tejidos, llevando eventualmente a la muerte de los animales (Makkar, 1999).

La eficiencia en la utilización de alimentos que contienen lectinas o inhibidores de las proteasas pueden combatirse por tratamiento con calor. Cianógenos se pueden remover mediante sumergir el ingrediente en el agua y los taninos pueden ser inactivados por la



adición de polietilenglicol (PEG MW 4000 y 6000) y iones de minerales para aliviar los efectos negativos de los taninos y los compuestos fenólicos (Makkar, 1999; Makkar *et al.* 2007b).

Los metabolitos secundarios de las plantas se asocian a la mejora en el valor nutritivo, aumentar el consumo voluntario, fermentación ruminal, digestibilidad y ganancia diaria de peso en ovejas o cabras (Makkar *et al.*, 2007b) y pueden tener efectos benéficos en la salud animal. Las proantocianidinas, comúnmente llamadas taninos condensados presentes en leguminosas forrajeras como *Onobrychis viciaefolia*, *Lotus Corniculatus* y *Lotus pedunculatus* se asocian con la mejora en la digestión de proteína y también a la protección de timpanismo en los rumiantes y menor carga de parásitos (Mueller-Harvey, 2006). Al disminuir los protozoarios en el rumen ocasiona a una mayor eficiencia en la proteína de origen microbiano (Makkar *et al.*, 2007b).

Los efectos positivos de los taninos se basan en la capacidad que tienen para anclarse a proteínas, los taninos pueden reducir la cantidad de proteína que se digiere en el rumen y aumenta la cantidad de proteína disponible para su digestión en el intestino delgado, se ha referido a esta proteína como “proteína de escape ruminal”, lo que además reduce la excreción de menos nitrógeno en orina y solo ligeramente más nitrógeno en heces. Los niveles óptimos de taninos condensados difieren entre especies animales, en promedio se habla de <50g/kg dan efectos benéficos (Mueller-Harvey, 2006).

## 2.4 Metabolitos secundarios y su efecto en salud animal

Tradicionalmente el uso de algunas plantas ha ayudado a el desarrollo de alternativas en el control de parasitosis de importancia en veterinaria como son los nemátodos *Haemonchus*, *Teladorsagia* y *Trichostrongylus*, donde altas concentraciones de taninos catequin galato (p.e. 400g/kg) reducen el conteo de huevos de parásitos. Este efecto antihelmíntico de las plantas depende de la especie de planta y la zona geográfica en donde crecen (Mueller-Harvey, 2006).

Se ha demostrado que algunas plantas como *Vernonia amigdalina*, *Garcinia kola* y *Leucaena leucocephala*, *Lotus corniculatus* tienen propiedades antihelmínticas se asocia al contenido de metabolitos secundarios tales como taninos condensados, saponinas, esteroides, terpenoides, glucósidos cardíacos, son utilizados dentro del sistema de pastoreo para el control ecológico de nemátodos en el ganado (Mueller-Harvey, 2006; Aderibigbe *et al.*, 2022).

Los metabolitos secundarios poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatorias y antioxidantes. Compuestos aislados partir de plantas como *Artemisia absinthium* y *Malva sylvestris* L. como el ácido clorogénico, 1,5, 4,5-ácido dicafeoilquínico, alcaloides, diterpenos, quercetina y apigenina han demostrado tener estos efectos (Mravčáková *et al.*, 2020).

Su efecto antimicrobiano, puede emplearse como antibióticos en alimentación animal, combatiendo en una parte la resistencia antimicrobiana de productos convencionales, además son una alternativa natural al uso de antibióticos convencionales, lo cual es fundamental en sistemas de ganadería ovina ecológica, cada vez más demandados y apreciados por el consumidor, no solo su empleo como promotores de crecimiento sino para el tratamiento de patologías (Maurin y Lopez, 2015). Por otro lado, los antioxidantes pueden mejorar la defensa celular y ayudar a prevenir el daño por oxidación de los componentes celulares (Sato *et al.*, 2011).

Los taninos condensados en las plantas también previenen el timpanismo en los rumiantes que consumen gran cantidad de leguminosas, ya que este es ocasionado por la formación de espuma en el rumen y si no es tratada puede ocasionar la muerte en los animales, se menciona que de 1-5 g kg es suficiente para prevenir el timpanismo, como *Onobrychis viciifolia* (Mueller-Harvey, 2006).

#### 2.4.1 *Haemonchus contortus*

*Haemonchus* es un género de parásitos gastrointestinales que pertenece a la clase Nematoda, la familia de Trichostrongylidae y la sub-familia de Haemonchinae, el género cuenta con tres especies: *H. contortus*, *H. placei* y *H. longistipes* (Kuisseu *et al.*, 2021). *H. contortus* afecta pequeños rumiantes en áreas tropicales de África, América Central, Sureste de Asia, subtropicos de Australia y América del Sur (Quiroz-Romero, 1994).

*Haemonchus contortus* es un parásito hematófago que se aloja en la capa mucosa del abomaso (Kuisseu, *et al.* 2021), provoca pérdida de eritrocitos y hierro, lo que lleva a la inflamación de la mucosa del abomaso y activación del sistema inmunológico (Storillo, 2016). Las larvas y los parásitos adultos en el abomaso causan aumento del pH y gastritis, comprometiendo la capacidad digestiva, pérdida de energía, proteínas y anorexia.

##### 2.4.1.1 *Ciclo biológico de Haemonchus contortus*

El ciclo biológico es directo y comienza con los parásitos adultos presentes en el abomaso del huésped, estos parásitos tienen alta capacidad de oviposición y los huevos morulados se eliminan en las heces. La fase ambiental comienza tras la deposición de heces, en presencia de oxígeno, los huevos se convierten en larvas de primera etapa (L1), en este ambiente se alimentan y produce cambios a la larva de segunda etapa (L2) y posteriormente a larvas de tercer estadio (L3), que son infecciosas. Esta parte del ciclo se produce en condiciones ideales de temperatura entre 18 a 26 °C y humedad entre 80 a 100% (Mendes *et al.*, 2020; Storillo, 2016).

Las L3 migran erráticamente fuera de la masa fecal, ayudados por presencia de humedad al pasto y son ingeridos por el hospedero. Después de la ingestión, existe un control natural de la carga parasitaria por la relación entre la cantidad de larvas ingeridas y mortalidad de adultos, lo que resulta en el equilibrio dinámico entre la tasa de ingestión de larvas, la tasa de mortalidad y reemplazo (Mendes *et al.*, 2020).

Los parásitos adultos pueden ser identificados macroscópicamente dependiendo de la ubicación específica en el abomaso y el tamaño que varía de 1.1 a 2.7 cm de longitud (Mendes *et al.*, 2020). Los parásitos adultos macho presentan una bolsa copulatriz, espículas cortas, protuberancia en forma de gancho mientras que los parásitos adultos hembra poseen el útero de color blanco opalino se enrolla en forma helicoidal alrededor del intestino, que le da el característico aspecto de “palo de barbero”, también tienen vulva protegida por ensanchamientos cuticulares llamados solapas vulvares; Las hembras son capaces de ovipositar entre 5.000 a 10.000 huevos/día (Niño-Urbe, 2022).

El diagnóstico de haemonchosis se basa en signos clínicos como pérdida de peso, diarrea, cabello despeinado, anemia, deshidratación y edema submandibular (Mendes *et al.*, 2020). La pérdida de sangre comienza con el desarrollo de la cuarta fase larvaria y la anemia se detecta entre los 10 o 12 días después de la infección. Se estima que un parásito adulto extrae entre 0.05 ml de sangre por día. La severidad de la enfermedad está íntimamente relacionada con el número de larvas que se establecen en el hospedador (Niño-Urbe, 2022).

Por todo esto, el resultado de la infección por *H. contortus* depende de la tasa de ingestión de las larvas infectantes, la capacidad del hospedador para rechazarlas y la destreza de este para reponer la pérdida de sangre (Niño-Urbe, 2022).

#### 2.4.2 Control integrado de nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes

El tratamiento convencional de las parasitosis se ha basado en el uso de antihelmínticos químicos esto ha generado algunos problemas como son; resistencia de la población de nemátodos hacia los compuestos químicos de los antihelmínticos, contaminación de carne y leche y la contaminación del suelo y acuíferos (Pérez-Anzúrez *et al.*, 2022).

Hay diversas opciones para el tratamiento de esta enfermedad, en las que se incluye la desparasitación selectiva de los animales infectados mediante el método FAMACHA, manejo nutricional, selección genética, control biológico (hongos nematófagos), vacunas, así como el tratamiento de las praderas pastoreadas como descontaminación del pasto con pastoreo rotativo y extractos de plantas con metabolitos secundarios (Mendes *et al.*, 2020; Pérez-Anzúrez *et al.*, 2022).

El método FAMACHA (figura 1) es una carta que mide la coloración de la mucosa ocular de los ovinos va de 5 niveles, 1 y 2 indican que el animal se encuentra libre de parásitos hematófagos, el nivel 3 indica que el animal podría desparasitarse valorando la condición corporal y peso del animal, 4 y 5 indica que se debe desparasitar inmediatamente. Con este tratamiento selectivo, se ahorra el consumo de medicamentos y permite prolongar la eficacia de los medicamentos antihelmínticos al crear una población larvaria de refugio (Kenyon *et al.*, 2009).

El uso del hongo nematófago *Arthrobotrys musiformis*, tiene propiedades nematicidas mediante partículas de nemina generan un proceso de morfogénesis que transforma los micelios en trampas para los nemátodos de *Haemonchus contortus* (Pérez-Anzúrez *et al.*, 2022).

La vacunación contra algunos parásitos como *Haemonchus contortus* con la vacuna Barbervax previene al hospedero con dosis de antígenos parasitarios para estimular sus defensas inmunitarias y así se protegen de infestaciones futuras por helmintos (Kebeta *et al.*, 2022).

Algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional contienen metabolitos secundarios que poseen propiedades desparasitantes probadas en los rumiantes, algunos ejemplos de estas plantas son *Caesalpinia coraria*, *Brongniartia motalvoana* que en concentraciones bajas en estudios *in vitro* como 2.5, 3.12 y 0.8 mg/mL tiene un efecto antihelmíntico del 93-100% (Olmedo-Juárez *et al.*, 2022; Cortes-Morales *et al.*, 2022).

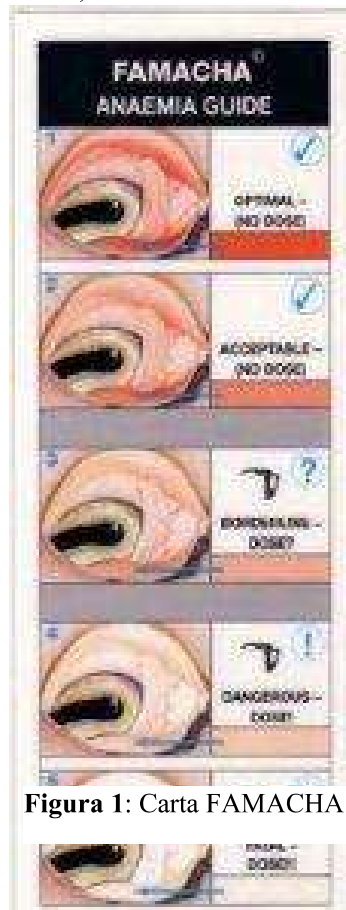


Figura 1: Carta FAMACHA.

## 2.5 Área de Protección de Flora y Fauna el Nevado de Toluca

El Área de Protección de Flora y Fauna el Nevado de Toluca (APFFNT) también conocido como Xinantecátl, y después Parque Nacional Nevado de Toluca, está conformada por una superficie total de 53,590-67-86.28 hectáreas ubicado en el Estado de México, en los municipios de Toluca, Zinacantepec, Almoloya de Juárez, Amanalco, Temascaltepec, Coatepec Harinas, Villa Guerrero, Villa Victoria, Calimaya y Tenango del Valle (DOF, 2013). El clima es subhúmedo semifrío, con temperaturas anuales de -2 a 7°C y precipitaciones anuales desde 1,000 a 1,400 mm. Su clasificación climática se ubica en *C (w<sub>2</sub>) (w)c*, que describe un clima semifrío húmedo con lluvias en verano y menos 5% de lluvia invernal (García, 2004).

En el año de 2013 cambio el estatus de APFFNT fue decretado el 25 de enero de 1936, siendo presidente de la República el Gral. Lázaro Cárdenas del Río y secretario de Agricultura y Fomento el Gral. Saturnino Cedillo publicó el Diario Oficial de la Federación. Forma parte del eje Neovolcánico a una altura de 3,000 a 4,600 m.s.n.m. es la cuarta montaña más alta del país (SEMARNAT y CONANP, 2016). Del APFFNT descienden innumerables escurrimientos que, conforme van llegando a las partes bajas, se unen para formar afluentes tributarios del Lerma y del Balsas. Es considerada como un área importante de captación de la cuenca del río Lerma el cual, abastece de agua a los habitantes de las ciudades de México y Toluca (Chávez-Solano *et al.*, 2019). El 54.9% del APFFNT está enfocada hacia el aprovechamiento de recursos forestales, agricultura, ganadería, vivienda y desarrollo turístico (Ayala *et al.*, 2014).

Se asumió la necesidad de declarar al Xinantecátl como un área de protección tratando de salvaguardar la integridad del bosque, así como proteger y utilizar sosteniblemente los recursos naturales de la zona (Toscana-Aparicio y Granados-Ramírez, 2015). La falta de capacitación sobre el manejo integral de los bosques del APFFNT, visitas de turismo local no controladas (Ayala *et al.*, 2014), actividades de tipo extractivas no controladas (tala ilegal) y los incendios forestales contribuyen al deterioro del bosque (Martínez-Hernández *et al.*, 2014), lo que conlleva a la aparición de enfermedades y plagas en la población de árboles de la zona (Ayala *et al.*, 2014; SEMARNAT Y CONANP, 2016).

El área protegida alberga 227 especies de invertebrados y vertebrados que incluyen rotíferos, artrópodos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, además, se compone de un bosque de coníferas y encinos, también se encuentran pastizales alpinos; cuenta con 125 géneros y 255 especies de plantas vasculares Las principales especies de árboles que se encuentran en el APFFNT son *Pinus hartwegii* y *P. montezumae* (CONANP, 2016).

### 2.5.1 *Pinus hartwegii* Lindl.

El ocote blanco o pino de las alturas (*Pinus hartwegii*) (Figura 2) es un árbol de la familia de las pináceas que se encuentra en las montañas de las Sierras Madre Oriental y Occidental, y en Centroamérica hasta Honduras. El pino tiene gran importancia por su distribución geográfica limitada ya que puede crecer en altitudes desde los 2,600 a 4,200 msnm, tolera bajas temperaturas (-30 °C), tiene 31 m de alto y arriba de 128 cm de diámetro a la altura de pecho (DN) (Queijeiro-Bolaños y Cano-Santana, 2016; CONABIO, 2023).

Su corteza es de color marrón a grisáceo, se divide en placas escamosas, las hojas son de color verde oscuro y se encuentran en fascículos de 3 a 6 acículas, los conos son ovoides negros o púrpura oscuro y maduran entre 20 y 22 meses después (CONABIO, 2023).



**Figura 2:** *Pinus hartwegii* Lindl. Fuente: CONABIO, 2023

Las cuatro categorías de edades de los pinos son brinzales, latizales, juveniles y adultos. Los pinos brinzales son plantas nacidas de semilla que tienen hasta un metro de altura, también conocidas como plántulas forestales están presentes en los estratos más bajos del bosque y son los más vulnerables al ataque de plantas parasitas.

La siguiente etapa de crecimiento del *P. hartwegii* es latizal, en esta el individuo alcanza a percibir el máximo crecimiento en altura, se diferencian las copas se dividen en dos etapas, el latizal bajo, donde los individuos alcanzan 8-15 m de altura y 10 a 20 cm de diámetro; y el latizal alto con alturas medias de 15 a 20 m y diámetro de entre 20 y 30 cm.

Los árboles juveniles tienen forma piramidal en la corteza tiene marcadas hendiduras a lo largo del tronco que son de color café con manchas claras. Las hojas se encuentran unidas en grupos de 5 a 6 hojas, cada hoja de forma larga y delgada, la forma típica de las hojas de pino en aguja, de 20 a 30 cm de largo, se observan las estructuras de conos o piñas los cuales miden de 6 a 9 cm de largo y cerca de 5 a 6 cm de ancho. Por último, en la etapa de adulto es cuando los individuos llegan a la madurez, la altura de los ejemplares supera los 20 m y el diámetro varía entre 30 y 50 cm.

### 2.5.2 Plagas que afectan a la población de árboles del APFFNT

Una plaga forestal es cualquier organismo patógeno que ocasiona daños de tipo mecánico o fisiológico a los árboles y por lo regular causan pérdidas económicas a los humanos. En México son una de las principales causas de deterioro en los bosques templados. Actualmente se reconocen 250 especies de patógenos que afectan el arbolado nacional (SEMARNAT, 2016), la mayor parte correspondió a los descortezadores (39%), seguidos por los muérdagos (32%), defoliadores (19%) y barrenadores (6%)

Los descortezadores, defoliadores, barrenadores de yemas y brotes, barrenadores de conos y semillas, chupadores de savia, plantas parásitas, tales como *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* y *A. globosum* subsp. *grandicaule* y en menor proporción por muérdagos verdaderos (Endara-Agramont, 2014).

Los descortezadores del género *Dendroctonus*, son uno de los principales factores de mortalidad durante el desarrollo y establecimiento de los bosques y plantaciones (Rodríguez, 2010). Pertenecen a la familia Scolytidae, sus integrantes son considerados insectos barrenadores y defoliadores, los cuales también tienen una gran importancia comercial (Zúñiga-Bermúdez *et al.*, 1994).

Las plantas parásitas son aquellas que dependen totalmente de otro organismo para subsistir, ejemplos de ellos son los géneros *Phoradendron* Nutt., *Arceuthobium* y *Psittacanthus* Mart. Son especies de muérdago o injertos de las familias Viscaceae y Loranthaceae y crecen sobre especies de gimnospermas y angiospermas. Los frutos de estas especies tienen un tejido viscoso (viscina) que recubren las semillas, que al germinar producen una raíz llamada haustorio (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).

El género *Phoradendron* incluye arbustos perennes, monoicos o dioicos, con hojas en pares y simples, cuya inflorescencia tiene 1 o varias espigas axilares, cada espiga con 1 o varios artículos fértiles y cada artículo con 2 o más hileras de flores. Las flores son unisexuales, de color verde a amarillo y el fruto es una baya blanquecina, ovoide a globosa, con 1 semilla rodeada por una capa viscina (Gómez-Sánchez *et al.* 2011).

El género *Psittacanthus* agrupa arbustos perennes, con hojas en pares y simples, estipuladas y comúnmente decusadas, de forma variable que va de falcada hasta ovada u obovada. Inflorescencia terminal o axilar en umbela o racimo indeterminado con varias triadas o diadas de flores hermafroditas. Flores de color rojo a anaranjado o escarlata brillante, estambres rojo-anaranjados; estilo tan largo como los pétalos, liso y recto; estigma más o menos capitado y finamente papilado. El fruto es una baya grande, azulada a negruzca, a veces con el cálculo acrescente, con una semilla rodeada por abundante tejido viscido (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).

El género *Arceuthobium* comprende unas 32 especies distribuidas en todo el mundo desde África central, Europa, Asia, América del Norte (Guatemala, Honduras, México, oeste de Estados Unidos y Oeste de Canadá; extremo sur hasta Utah, Wyoming y Nebraska en los Estados Unidos), en México se distribuye en Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Durango, Jalisco y Zacatecas (González-Gaona *et al.*, 2017). En el área Natural protegida “Parque Nacional Nevado de Toluca” en el Estado de México, se determinó la presencia del muérdago enano *Arceuthobium globosum* y *A. vaginatum*, en 10 289 ha, lo que representa 58% del total de la superficie del bosque de pino (Endara-Agramont *et al.*, 2014).

En México, estas plantas parásitas son el segundo agente biótico de destrucción de los bosques de clima templado, afectan árboles de la familia Pinaceae y Cupressaceae, principalmente el desarrollo de *Pinus hartwegii*, se observa un crecimiento anormal de las ramas infectadas, formación de escobas de bruja, muerte regresiva de la copa y muerte de plantas jóvenes (Hawksworth y Wiens, 1996; González-Gaona *et al.*, 2017).

Las etapas fenológicas del muérdago se dividen en cuatro vegetativa, floración, fructificación y dispersión de semillas. En estados de fructificación se observan los frutos inmaduros, en desarrollo y maduros; estos tienen un tamaño de 5.5 mm de largo por 3.5 de ancho y en su interior contienen viscina, que les ayuda a adherirse a la corteza del árbol o a las agujas del pino que infestan (Gutiérrez-Vilchis y Reséndiz-Martínez, 1994).

Los muérdagos o injertos perjudican a su hospedero en menor o mayor grado, produciéndole en ocasiones la muerte. No obstante, estas plantas son importantes por su empleo en la medicina tradicional mexicana para tratar enfermedades, y son fuente importante de compuestos bioactivos con actividad inmunomoduladora y antitumoral (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).

### 2.5.3 *Arceuthobium globosum* subsp *grandicaule*

Las características morfológicas del muérdago enano *Arceuthobium globosum* subsp. *globosum* (Figura 3), sus brotes de 18-50 (máx. 70, media 25) cm de altura, de color verde amarillento, típicamente oscuros en la base de los brotes más viejos, flabelados y ramificados. El diámetro basal de los brotes de 10-48 (media 17) mm. El tercer entrenudo 14-37 (media 27) mm de largo, 3-20 (media 7) mm de ancho. Las flores estaminadas de unos 5 mm de ancho, cuádruples. Los frutos maduros 6-7 mm de largo, 35 mm de ancho.



**Figura 3:** *Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule* en árboles infestados y muérdago maduro. (Fuente: Elaboración propia)

Las semillas tienen un tamaño de 5 x 3 mm y en su interior contienen viscina que les ayuda a adherirse a la corteza del árbol o a las agujas del pino que infestan (Gutiérrez-Vilchis y Reséndiz-Martínez, 1994; Hawksworth y Wiens, 1996).

La distribución del muérdago enano más abundante en el centro de México (Jalisco, Michoacán, México, Hidalgo, Ciudad de México, Guerrero, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, y Oaxaca), y también es localmente común en las tierras altas del oeste de Guatemala (Huehuetenango). Su rango de elevación es de 2,450-4,000 m (Hawksworth y Wiens, 1996).

### 2.5.4 *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*

*A. vaginatum* subsp. *vaginatum* pertenece a la familia *Santalacea* tiene brotes de 20-55 cm lobulados y erectos de coloración negra (**Figura 4**) (Queijeiro-Bolaños *et al.*, 2014). Los brotes generalmente de más de 10 cm de altura y más de 1 cm de diámetro en la base; frutos de 4-5 mm de longitud, no brillantes Presenta brotes cafés oscuro a negro raramente rojizos de 20 a 55 cm de alto, diámetro basal de brotes dominantes 4 a 20 (7.0) mm, tercer entrenudo 5 a 30 (17.4) mm de largo y 2.5 a 8.5 (5.0) mm de ancho. Las plantas presentan un dimorfismo sexual considerable y flores estaminadas de 1.6 por 1.1 mm, frutos maduros de 5.5 por 3.5 mm, la floración de marzo a abril, la maduración de los frutos es en agosto del año siguiente a la polinización con un periodo de desarrollo de 16-17 meses (Hawksworth y Wiens, 1996).

Los hospedantes y requerimientos ecológicos de *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* y las dos subespecies de *A. globosum* son similares, y con frecuencia coocurren, a veces incluso en el mismo lugar, a veces incluso en el mismo árbol (Hawksworth y Wiens, 1996). *A. vaginatum* tiene la gama de hospedadores más amplia conocida de todos los taxones del género, se ha colectado en 13 especies de pinos: *P. arizonica* var *arizonica*, *P. arizonica* var *stormiae*, *P. cooperi*, *P. durangensis*, *P. engelmannii*, *P. hartwegii*, *P. herrerae*, *P. lawsonii*, *P. montezumae*, *P. patula*, y *P. rudis*,



**Figura 4:** *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* en árboles infestados y aspecto de un muérdago maduro (Fuente: Elaboración propia).

en forma adicional como hospedero secundario a *P. teocote* (Hawksworth y Wiens, 1996). Tiene el más amplio rango de distribución de los muérdagos enanos en nuestro país (Queijeiro-Bolaños *et al.*, 2013).

Se ha catalogado en la Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2022) que esta especie de muérdago se utiliza como un remedio para el dolor de pulmones y reumas en la medicina tradicional mexicana. Además, ha demostrado tener efecto en la inhibición de bacterias como *Streptococcus mutans* y *S. pyogenes* a 60-120 mg/mL (Hernández-Sánchez, 2009).

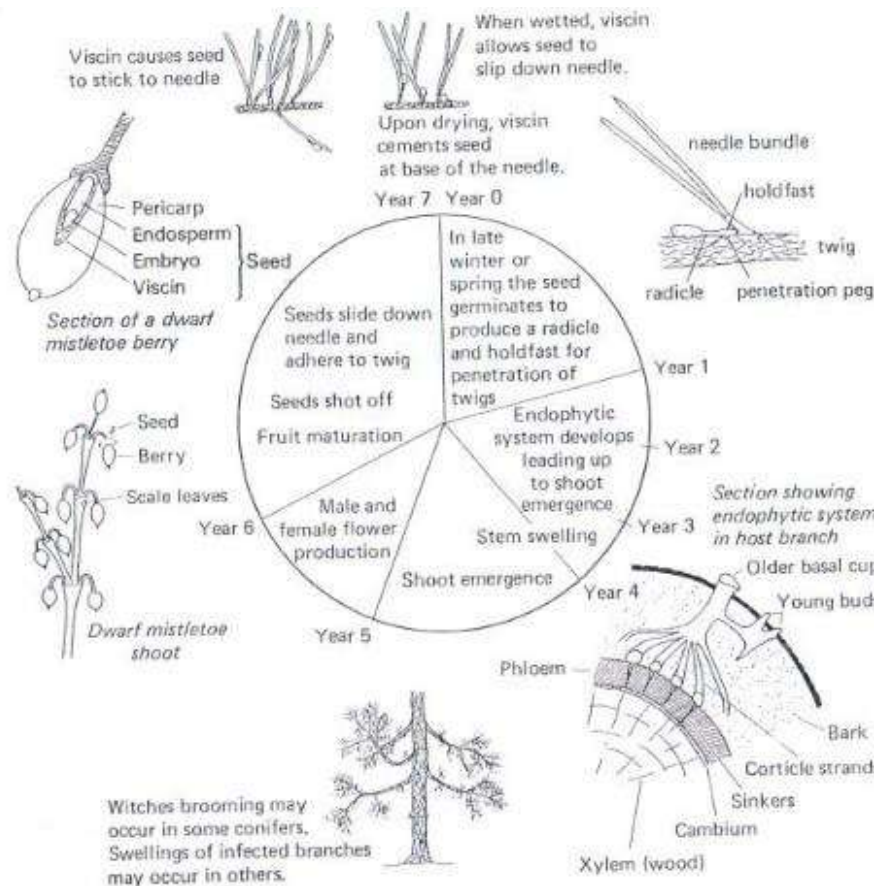
Se ha reportado las propiedades antibacterianas de plantas que pertenecen a la familia Viscaceae, como *Viscum álbum* (Pernitsky *et al.*, 2011) *A. americanum* tuvo un efecto bactericida en las poblaciones de *Bacillus* sp, *Staphylococcus aureus* y *S. pyogenes*.

Los compuestos fenólicos del muérdago *Arceuthobium* spp. se encuentran distribuidos en las células parenquimáticas del xilema, presentes en el crecimiento primario y secundario de la planta (Hawksworth y Weins, 1996).

#### 2.5.5 Ciclo biológico del muérdago enano

La enfermedad se establece como el resultado de la explosión de las semillas viscosas desde el hospedador, los disparos de la semilla tienen un rango usualmente de 6 a 10 m, depende de donde dispersión o el aire. Las semillas se adhieren a los objetos en donde pega, debido a su cubierta viscosa y pegajosa. Cuando la cubierta viscosa se seca, actúa como un pegamento permitiendo a la semilla aferrarse al hospedero hasta la germinación y la penetración ocurra. La dispersión de semillas usualmente ocurre en otoño o a finales de verano, pero la germinación se lleva a cabo hasta la primavera (Manion, 1999).





**Figura 5:** Ciclo biológico del muérdago *Arceuthobium* spp. Fuente: Manion (1999).

Una vez que la penetración ocurre, el parásito desarrolla un extenso sistema de absorción haustorial, resultado en la producción de “platinas” que penetran dentro del xilema del hospedero. Estas se subsecuentan incrustando por un crecimiento adicional de traqueidas de xilema. Los elementos de vasculares de las platinas se conectan con las traqueidas del xilema del huésped, y el parásito obtiene la mayor parte de carbohidratos y probablemente toda su agua y minerales a partir del hospedero (Figura 5). El ciclo de vida del muérdago desde la infección a la producción de semilla, toma 4 a 5 años. La dispersión a largo rango, por transporte externo de las aves, sirve para introducir la planta parásita en nuevos rodales (Manion, 1999).

### 2.5.6 Control del muérdago *Arceuthobium* spp.

Los métodos de control de plantas parásitas más empleados incluyen el cultural, biológico, químico y manejo silvícola los cuales pueden reducir del impacto de plantas parásitas.

El control cultural se realiza mediante la eliminación de los hospederos infectados por la limpieza mediante el corte. La poda y la remoción de los árboles más largos con infecciones de la corona puede ser practicada en rodales de alto valor ligera o moderadamente infectados. La remoción del muérdago de los hospederos reduce las tasas de reproducción e incrementa el vigor del hospedante, aunque años más tarde pueden rebrotar (Geils *et al.*, 2002).

El control biológico se realiza mediante la interacción de ciertas especies de insectos se alimentan de brotes, frutos y semillas del muérdago enano, de manera ocasional y oportunista, el saltamonte *Melanoplus devasto* destruyo más del 90% de los brotes de *Arceuthobium campylopodum* en una plantación de *Pinus jeffreyi* de California. La hormiga *Atta mexicana* se alimenta de brotes de *Arceuthobium duranguense* en Sinaloa, México. La presencia de dos especies de insectos del orden Hemiptera y Coleoptera pertenecientes a la familia Pseudococcidae y Curculionidae (*Pityophthorus*) respectivamente. El daño que ocasiona al muérdago es que barrena el tallo de la mata, ocasionando una desecación de esta e incluso la muerte (Arriola-Padilla *et al.*, 2012).

Otra opción de control biológico de las especies de muérdago *Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule*, *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* son los hongos *Altenaria alternata*, *Fusarium proliferatum* y *Cladosporium cladosporioides*, *lternaria sp.*, *Epicoccum spp.*, y *Phoma spp*, las cuales ocasionan marchitamiento y cambios de coloración, aunque no fue efectivo el tratamiento con estas especies de microorganismos (González *et al.*, 2016).

El control químico se realiza mediante productos químicos para el control del muérdago enano es Florel (el ingrediente activo es el ingrediente activo es el etefón), un regulador del crecimiento que provoca la abscisión de los brotes de muérdago. El etefón no mata el sistema de raíces endofíticas del muérdago enano, y el parásito rebrota rápidamente. Sin embargo, el químico retrasa la producción de semillas de muérdago enano, lo que pospone la propagación del parásito de 2 a 4 años (Hoffman, 2012).

Los incendios contribuyen a la aparición de estas plagas, al mismo tiempo pueden ser una opción para erradicar esta plaga.

Por último, el manejo silvícola se realiza con el propósito de reducir los niveles de infección y el impacto de los muérdagos enanos mediante aclareos, quemas y aclareo-quema. Los niveles de infección en los sitios se calificaron de bajos a moderados ya que los aclareos reducen la densidad arbórea del rodal y la severidad de la infección, el efecto combinado también reduce los niveles de severidad en todas las clases de edad. Al comparar sitios sometidos a aclareo-quema y el testigo, se observó que en los primeros se disminuye el área basa infectada, a partir de la segunda década de evaluaciones, la efectividad de este tratamiento disminuyó después de 20 años, lo que sugirió una nueva intervención (Hessburg *et al.*, 2008).

### 3 JUSTIFICACIÓN

En el APFFNT se encuentran unidades de producción ovina que requieren alternativas de alimentación para utilización de los recursos disponibles con el fin de aumentar la producción ovina. En el APFFNT hay una alta incidencia de plantas parásitas como las especies de muérdago *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* y *A. globosum* subsp. *grandicaule* que amenaza la prevalencia del bosque de *Pinus hartwegii*, principalmente las edades de árbol más afectadas son las de menor crecimiento como son árboles brinzales, latizales y juveniles. Se propone como plan de control realizar la poda manual de ambas especies de muérdago de árboles en las primeras etapas de crecimiento y en fustales, en zonas altamente infestadas para posteriormente incorporarlas en la alimentación del ganado ovino.

El uso de muérdago amarillo *A. globosum* como aditivo en la alimentación de ovinos fue evaluado y se encontró que mejora la conversión alimentaria, debido al contenido de nutrientes, ya que aporta proteína, fibra y tiene alta digestibilidad; además contiene taninos condensados (Hernández-Luna *et al.*, 2017); los cuales tienen un impacto positivo en la alimentación y en la salud animal. Algunos efectos de los metabolitos secundarios en la alimentación animal son mejoran el aporte de proteína de sobrepaso al duodeno y en la cinética de fermentación *in vitro*; además tienen efecto en la salud animal debido a sus propiedades antihelmínticas y antioxidantes.

Con lo anterior, se plantea que las especies de muérdago *A. vaginatum* y *A. globosum* tienen potencial para ser forrajes aditivos en la dieta de ovinos, por lo que es necesario conocer más sobre su composición bromatológica y otras propiedades de acuerdo con las edades de árboles infestados de *P. hartwegii* y observar si influye en el contenido de nutrientes, compuestos fenólicos y en la cinética de fermentación *in vitro*.

Por otro lado, los metabolitos secundarios tienen efecto en la salud animal al tener propiedades desparasitantes. En otros trabajos, se ha desarrollado investigación respecto al uso de extractos de plantas con efecto desparasitante, el cual ha sido empleado como un método de control alternativo de parásitos que poseen resistencia a antihelmínticos, tal es el caso del parásito *Haemonchus contortus*, un parásito hematófago que ocasiona grandes pérdidas en las unidades de producción ovina.

El uso de *A. vaginatum* en la medicina tradicional mexicana permitió identificar potencial de esta planta parásita en la salud animal. La especie de *A. vaginatum* es utilizada en la medicina tradicional mexicana como un remedio para afecciones digestivas entre otras, debido al contenido de flavonoides y otros metabolitos secundarios, por lo que se propone conocer su potencial para el control de *Haemonchus contortus*.

#### 4 HIPÓTESIS

No existen diferencias significativas entre especies de muérdago colectadas en las diferentes edades de árboles en *P. hartwegii*, en la composición química, fenólica, cinética de fermentación ruminal *in vitro*, digestibilidad *in vitro* y actividad ovicida contra *Haemonchus contortus*.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición química, fenólica, producción de gas *in vitro*, digestibilidad de *Arceuthobium globosum* y *A. vaginatum*, su relación con diferentes edades de *P. hartwegii* afectados en el APFFNT y el efecto ovicida del extracto de acetato de etilo de *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* sobre *H. contortus* en condiciones *in vitro*.

### 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el contenido de materia seca, materia orgánica, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y proteína cruda de *Arceuthobium globosum* y *A. vaginatum* en cuatro edades de *P. hartwegii*.
- Estimar el contenido de fenoles totales, taninos totales y taninos condensados del *A. globosum* y *A. vaginatum* en cuatro edades de *P. hartwegii*.
- Describir la producción de gas *in vitro* y digestibilidad de la materia seca, materia orgánica y fibra detergente neutro del *A. globosum* y *A. vaginatum* en cuatro categorías de edad de *P. hartwegii*.
- Identificar los compuestos mayoritarios mediante HPLC extraídos con acetato de etilo en *A. vaginatum*.
- Determinar el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) en *H. contortus* aplicando diferentes concentraciones de las fracciones obtenidas del extracto.
- Calcular las concentraciones efectivas (CE<sub>50</sub> y CE<sub>90</sub>) del extracto de acetato de etilo y las fracciones de *A. vaginatum* sobre la población de *H. contortus*.

## 7 MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Etapa 1: Composición nutricional de *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* y *A. globosum* subsp. *grandicaule* y su efecto en la cinética de fermentación ruminal *in vitro*.

#### 7.1.1 Colecta de muestras

La colecta de las dos especies de muérdago enano (*Arceuthobium globosum* y *A. vaginatum*) se realizó en dé junio-agosto del año 2021, se obtuvo de áreas de infestación seleccionadas en los bosques de *Pinus hartwegii* del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT) ubicado en el Eje Central y Eje Neovolcánico, Faja Neovolcánica Transmexicana con una extensión de 53,590 hectáreas (19°07'07" N, 099°46'53" O). El clima es templado subhúmedo con precipitaciones de mayo a octubre, la temperatura media anual es de 4,0°C (rango: 8,7 a -0,7°C). La precipitación media anual es de 1.215,9 mm (SMN, 2022).

Se recolectaron cuatro categorías de edad (CE) de árboles de *P. hartwegii* en cada punto de muestreo: árboles jóvenes pequeños ( $\geq 30$  cm < 1,5 m de altura), brinzales grandes ( $\geq 1,5$  m de altura < 2,5 diámetro a la altura del pecho altura o DAP), juveniles ( $\geq 2,5$  < 7,5 DAP) y adultos ( $\geq 7,5$  DAP). Se recogieron un total de 105 muestras de muérdago, de las cuales 54 eran de muérdago amarillo y 51 de muérdago negro. Los estados fenológicos predominantes fueron la fructificación y dispersión de semillas (Queijeiro-Bolaños *et al.*, 2014).

#### 7.1.2 Secado y molido de muestras

La materia seca (MS) se estimó en un secador botánico a 50° C durante 72 horas para evitar la desnaturalización de los metabolitos secundarios (Makkar, 2003a). A continuación, se molieron a 1-2 mm en un molino Cyclon 2000 y Pulvex, para su posterior análisis químico proximal, composición fenólica y producción de gas *in vitro*.

#### 7.1.3 Determinación de fenoles totales, taninos totales y taninos condensados

El contenido de fenoles totales (FT) y taninos totales (TT) se analizó mediante el método Folin-Ciocalteu basado en Makkar *et al.* (2003a), con una muestra de 50 mg. La concentración de taninos condensados (TC) se analizó mediante la técnica descrita por Makkar (2003a) basada en Porter *et al.* (1986), con una muestra de 10 mg.

#### 7.1.4 Análisis químico proximal

Para determinar el contenido de materia orgánica (MO) y proteína bruta (PB) se utilizó la metodología normalizada descrita por la AOAC (2023).

Los contenidos de fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) se analizaron según Van Soest *et al.* (1991) utilizando microbolsas ANKOM-57 en el analizador de fibras Ankom200 (ANKOM, 2023).

### 7.1.5 Cinética de fermentación ruminal *in vitro*

La medición de la producción de gas *in vitro* se realizó según Theodorou *et al.* (1994). La lectura del volumen de gas producido se registró después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 72, 84 y 96 horas de incubación, utilizando un transductor de presión Lutron. Los datos se ajustaron al modelo para analizar la cinética de fermentación (France *et al.*, 2000):

$$G = A \times (1 - e^{-c(t-L)})$$

Donde:

G= producción total de gas acumulada al tiempo (ml)

A= es la producción de gas asintótica (ml)

c= Tasa de producción de gas *in vitro* (/h) a partir de la fracción lentamente fermentable del alimento (b)

B= Fracción fermentable de la FDN (ml gas)

T= tiempo de retardo (h)

L= es el tiempo Lag de inicio de la fermentación de la FDN (h)

En cada botella Wolfe de vidrio de 140 ml con  $0.99 \pm 0.01$  g de muestra repetida 4 veces, se colocaron 10 ml de líquido ruminal y se añadieron 90 ml de solución buffer con un medio anaeróbico que contenía bicarbonato de amoníaco y de sodio ( $35\text{g NaHCO}_3 + 4\text{g NH}_4\text{HCO}_3$  por litro). El radio de dilución del líquido ruminal fue 1:9 v/v con medio anaeróbico. El líquido ruminal fue obtenido de tres ovejas alimentadas con una dieta de 60% forrajes y 40% concentrado suplementado con una premezcla mineral. El método de extracción del líquido fue mediante sonda nasogástrica almacenado en termos previamente calentados a  $39^\circ\text{C}$ , fue colado a través de una gasa doble gaseándolo constantemente con  $\text{CO}_2$ . Estas botellas fueron incubadas a  $39^\circ\text{C}$  durante 96 horas, se realizaron mediciones de presión del gas producido dentro de cada botella utilizando un transductor de presión Lutron por 96 h a diferentes intervalos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 16, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 72, 84 y 96 horas).

Se calculó la Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca (DIVMS), de la Materia Orgánica (DIVMO) de la Fibra Detergente Neutro (DIVFDN) mediante el método propuesto por Pell y Schofield (1993).

### 7.1.6 Diseño experimental y análisis de resultados

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial.

$$Y_{ijk} = \mu + E M_i + E A_j + (E M E A)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

- $\mu$ =media general de los tratamientos
- EMI =efecto del i-ésima especie de muérdago (i=2).
- EAj =efecto de la j-ésima edad del árbol (j=4).
- (EM EA) ij = efecto de la interacción entre especie de muérdago y edad del árbol.
- e ijk =error experimental.

Los resultados se analizaron con un análisis de varianza y se aplicó la prueba de Tukey cuando se presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). El paquete estadístico que se usó fue SAS (2006).

## 7.2 Etapa 2 Evaluación antihelmíntica del extracto de *A. vaginatum* subsp *vaginatum*

### 7.2.1 Aislamiento e identificación de compuestos secundarios del extracto y subfracciones

Una muestra representativa de *A. vaginatum* (2.5 kg) fue macerada en cinco litros de acetato de etilo a temperatura ambiente (25-30°C) por 24 h. Después de este tiempo, se filtró el material vegetal utilizando gasas, algodón, y papel filtro (Whatman #4). El extracto acetato de etilo líquido (E-AcOEt) fue concentrado por destilación a presión reducida utilizando el rota-evaporador (Buchi R-210: Flawil, Suiza) a 45 °C obteniendo un extracto semisólido. Las trazas de solvente fueron eliminadas en una liofilizadora (Labconco 4.5) obteniendo un extracto sólido color violeta oscuro. Parte del E-AcOEt (25.3 g) fue empacquetado con 41.8 g de sílica (fase normal, 70-230, Merck) en una columna de vidrio (60 cm x 4.5 cm) y fue sometido a un proceso de elución utilizando un sistema hexano/ acetato de etilo con una polaridad ascendente del 10%. Se tomaron submuestras de 200 mL, y después se analizaron mediante cromatografía de capa fina, se agruparon en 14 reuniones, de acuerdo con su similitud química (AvR1-AvR14). Las reuniones con mayores rendimientos (AvR5, AvR7, AvR9, AvR11, AvR13 y AvR14) fueron evaluadas para determinar su efecto antihelmíntico.

### 7.2.2 Identificación de compuestos mayoritarios por HPLC

El análisis de cromatografía de alta resolución (HPLC) se realizó utilizando un detector de fotodiodos Waters 2996, el cual permite la detección en la absorbancia de los espectros UV entre los 190-600 nm y un módulo de separación HPLC 2695. Para la separación química, se utilizó una columna fase reversa Discovery (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m tamaño de partícula) (Supelcotsil, Sigma-Aldrich Co., Alemania). Se utilizó una fase móvil con agua acidificada con 0.5% de ácido trifluoroacético (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B). El sistema de gradiente fue: 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; 26-27 100% B; 28-30 min 0% B. El volumen de inyección fue de 10  $\mu$ L y el ritmo de flujo se mantuvo en 0.9 mL/ min.

### 7.2.3 Obtención de huevos de *Haemonchus contortus*



Un ovino (tres meses de edad, 20 kg de peso vivo) previamente infectado con 7000 larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (INIFAP-HcIVMr-SAI strain, México) fue utilizado como animal donador de huevos. Se mantuvo en confinamiento bajo la regulación de bienestar animal NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 1999), después de 21 días se realizó el conteo de huevos mediante la técnica de McMaster (Coles *et al.*, 1992).

Se obtuvieron 60 g de heces directo del recto, se maceraron en un mortero con agua limpia. En seguida el material fecal líquido fue depositado en tubos Falcon (30 mL) y se agregó solución salina saturada (25 mL). Los tubos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 5 min y el sobrenadante conteniendo los parásitos fueron lavados con agua limpia en dos tamices con un diámetro de 75 y 32  $\mu\text{m}$  respectivamente. El material retenido en el tamiz de 32  $\mu\text{m}$  se lavó y se obtuvo una solución final, que posteriormente fue centrifugada a 3,500 rpm/ 3 min, para obtener huevos libres de materia orgánica. El sedimento fue lavado tres veces con agua destilada, con la finalidad de obtener huevos limpios. Posteriormente, se realizó el conteo de huevos de la solución final y se hizo un ajuste de  $150 \pm 10$  huevos en 50  $\mu\text{L}$  (Cortes-Morales *et al.*, 2022).

#### 7.2.4 Porcentaje de Inhibición de la eclosión de huevos (IEH)

Los bioensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pozos con 12 repeticiones por tratamiento (tres replicas con 4 repeticiones). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: extracto de acetato de etilo (E-AcOEt a 0.12, 0.25, 0.50, 1 y 2 mg/mL), y seis reuniones (AvR5, AvR7, AvR9, AvR11, AvR13 y AvR14) a 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/mL. La reunión con mayor actividad (AvR9) fue evaluada a 0.015- 2 mg/mL. Adicionalmente, se utilizó agua y metanol al 2% como controles negativos y tiabendazol (0.1 mg/mL) como control positivo. A cada pozo se agregó una suspensión acuosa de 50  $\mu\text{L}$  conteniendo  $100 \pm 10$  de huevos y en seguida se depositaron 50  $\mu\text{L}$  de los tratamientos según correspondiera. Las placas fueron incubadas a 30 °C por 48 h. El porcentaje IEH de cada tratamiento se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%IEH = \left[ \frac{\text{Número de huevos}}{\text{Número de larvas} + \text{Número de huevos}} \right] * 100$$

#### 7.2.5 Análisis estadístico y estimación de Concentraciones Efectivas (CE)



Los porcentajes de IEH fueron analizados bajo un diseño completamente al azar con submuestreo, con el siguiente modelo estadístico:  $Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$ ; donde:  $Y_{ij} = \%IEH$ ;  $\mu =$  media general;  $T_i =$  efecto del extracto, reuniones y controles;  $\xi_{ij} =$  error del tratamiento. La diferencia entre medias se comparó con una prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Además, se estimaron las concentraciones efectivas ( $CE_{50}$  y  $CE_{90}$ ) mediante un análisis de regresión utilizando el procedimiento PROC-PROBIT del paquete estadístico SAS (SAS, 2006).







## 8 RESULTADOS

### 8.1 Artículo publicado en Tropical and Subtropical Agroecosystems.

#### Composición nutricional de *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* y *A. globosum* subsp. *grandicaule* y su efecto en la cinética de fermentación ruminal *in vitro*.

Maria Mitsi Nalleli Becerril-Gil, Agustín Olmedo-Juárez, Angel Rolando Endara-Agramont y Julieta Gertrudis Estrada-Flores.

[TSAES] Editor Decision  

 Carlos A. SANDOVAL-CASTRO <revistaccb      ...

Para: Julieta Gertrudis Estrada Flores Vie 23/06/2023 01:37 PM  
CC: Becerril Gil Maria Mitsi Nalleli; aolmedoj y 1 usuarios

Tropical and Subtropical Agroecosystems  
Dr Julieta Gertrudis Estrada Flores:

We have reached a decision regarding your submission to Tropical and Subtropical Agroecosystems, "Nutritional composition of *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* and *A. globosum* subsp. *grandicaule* and their effect on *in vitro* ruminal fermentation kinetics".

Your submission to Tropical and Subtropical Agroecosystems has now been accepted and transferred for copyediting we will be in contact once this stage has finalized

In the mean time we invite you to update your manuscript Metadata in the journal online system information.

Please verify that the manuscript information (title, summary and titulo y resumen)  
\* it is captured in both languages windows (spanish and english)  
\*Please use capital letters for "title" and "titulo" along the phrase except for scientific names

\*update summary and keywords  
Please be sure keywords are separated by ";" and not ","

No further action is required if you have already updated the metadata

Dr. Carlos A. Sandoval Castro  
Campus de Ciencias Biologicas y Agropecuaria,  
Universidad Autonoma de Yucatan,  
Mexico  
carlos.sandoval@correo.uady.mx

---

Tropical and Subtropical Agroecosystems  
<http://www.veterinaria.uadv.mx/ojs/index.php/TSA>



**NUTRITIONAL COMPOSITION OF *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* AND *A. globosum* subsp. *grandicaule* AND THEIR EFFECT ON *IN VITRO* RUMINAL FERMENTATION KINETICS †**

**[COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* Y *A. globosum* subsp. *grandicaule* Y SU EFECTO EN LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO*]**

**Maria Mitsi Nalleli Becerril-Gil<sup>1</sup>, Agustín Olmedo-Juárez<sup>2</sup>,  
Ángel Rolando Endara-Agramont<sup>1</sup> and Julieta Gertrudis Estrada-Flores<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR). Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). Campus UAEM El Cerrillo, C.P. 50090, Toluca, Estado de México, México. Email: jgestradaf@uaemex.mx*

<sup>2</sup>*Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Km. 15.5 Carretera Federal Cuernavaca-Cuatula No. 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos. C.P. 62574 Morelos, México.*

*\*Corresponding author*

**SUMMARY**

**Background:** *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* (BM; black mistletoe) and *Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule* (YM; yellow mistletoe), are two parasitic plant species abundant in the forests of northern and central Mexico and Central America, affect 43% of the *P. hartwegii* tree population in the Nevado de Toluca Flora and Fauna Protection Area (NTFFPA), including mistletoe as a complementary feed in sheep can reduce the environmental impact generated by these pests to the forest and also reduce the purchase of feed for livestock. **Objective:** To evaluate the chemical composition, phenolic content and *in vitro* fermentation kinetics of two mistletoe species (M) *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* (BM; black mistletoe) and *A. globosum* subsp. *grandicaule* (YM; yellow mistletoe), in four age categories (AC) of *Pinus hartwegii* (AC: small sapling, large sapling, juvenile and adult) collected in the Nevado de Toluca Flora and Fauna Protection Area (NTFFPA). **Methodology:** The chemical composition (dry matter DM; neutral detergent fiber NDF; acid detergent fiber ADF and crude protein CP), phenolic content (total phenols TP; total tannins TT and condensed tannins, CT), *in vitro* fermentation kinetics parameters and *in vitro* digestibility were analyzed. The experimental design used was completely randomized design with 2x4 factorial arrangement. **Results:** DM content was different between M ( $P < 0.05$ ), the highest was found in BM. The NDF and ADF content was different between M, ranging from 364.45-467.43 g/kg DM. No differences ( $P > 0.05$ ) were observed in CP which averaged 62.08 g/kg DM. The TP, TT and CT content was different between M ( $P < 0.05$ ), the highest content was in YM with no effect observed in AC. B-gas production (mL of gas) presented differences between M and AC sampled ( $P < 0.05$ ). The gas production rate c on average was 0.042. Lag time was different between M ( $P < 0.05$ ). The *in vitro* digestibility of dry matter and organic matter were different between M ( $P < 0.05$ ). **Implications:** The results reported here serve as a tool for decision making on its possible inclusion as a forage addition to a diet in sheep feeding. **Conclusions:** The chemical composition and *in vitro* digestibility was different between M and the AC, contain secondary metabolites such as total phenols and condensed tannins and have an impact on *in vitro* fermentation.

**Keywords:** chemical composition; condensed tannins; *in vitro* fermentation; *Arceuthobium*; dwarf mistletoe.

**RESUMEN**

**Antecedentes:** *Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* (MN; muérdago negro) y *Arceuthobium globosum* subsp. *grandicaule* (MA; muérdago amarillo), son dos especies de plantas parásitas abundantes en los bosques del norte y centro de México y Centroamérica, afectan al 43% de la población arbórea de *P. hartwegii* en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (APFFNT), incluir el muérdago como alimento complementario en ovinos puede reducir el impacto ambiental generado por estas plagas al bosque y además disminuir la compra de alimento para el ganado. **Objetivo:** Evaluar la composición química, el contenido fenólico y la cinética de fermentación ruminal *in vitro*.

† Submitted February 2, 2023 – Accepted June 22, 2023. <http://doi.org/10.36360/taes.4761>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462

ORCID = M.M.N. Becerril-Gil. <http://orcid.org/0000-0001-3417-9569>; A. Olmedo-Juárez. <http://orcid.org/0000-0001-3499-7449>; A.R. Endara-Agramont. <http://orcid.org/0000-0001-8413-6351>; J.G. Estrada-Flores. <http://orcid.org/0000-0002-3376-5128>

## 8.2 Artículo enviado y en segunda ronda de revisión en la Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

### Bioactive compounds from the parasitic plant *Arceuthobium vaginatum* inhibit *Haemonchus contortus* egg hatching“.

Maria M.N. Becerril-Gil, Julieta G. Estrada-Flores, Ángel R. Endara-Agramont, Manases González-Cortazar, Alejandro Zamilpa, Pedro Mendoza-de Gives, María Eugenia López-Arellano, Agustín Olmedo-Juárez.

Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária - Manuscript ID RBPV-2023-0132   



Rosangela Machado <onbehalf@manuscriptcentral.com>

09:28 (3 hours ago) ☆ ↶ ⋮

to aoimedoj, me, jgestradaf, gmanases2000, azamilpa\_2000, arendaraa, mendoza.pedro, lopez.marieugenia

English > Spanish Translate message

Turn off for: English

16-Aug-2023

Dear Dr. Olmedo-Juárez:

Your manuscript entitled "Bioactive compounds from the parasitic plant *Arceuthobium vaginatum* inhibit *Haemonchus contortus* egg hatching" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Your manuscript ID is RBPV-2023-0132.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbpv-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.

Sincerely,  
Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária Editorial Office

### Bioactive compounds from the parasitic plant *Arceuthobium vaginatum* inhibit *Haemonchus contortus* egg hatching

Compostos bioativos da planta parasita *Arceuthobium vaginatum* inibem a eclosão dos ovos de *Haemonchus contortus*

#### Abstract

The aim of this study was to assess the *in vitro* ovicidal activity of an ethyl acetate extract from *Arceuthobium vaginatum* (EtOAc-E) and their subfractions (AvR5-AvR14) against *Haemonchus contortus* using the egg hatching inhibition (EHI) The extract and subfractions were tested at 0.12-2.00 mg/mL, as negative control were used distilled water and methanol (2%) and as a positive control Thiabendazole (0.10 mg/mL). Treatments with a dependent effect on concentration were subjected to regression analysis to determine the effective concentrations (EC<sub>50</sub> and EC<sub>90</sub>). Results were analysed using an ANOVA through random design. The major secondary compounds present in the extract and subfractions were identified by high performance liquid chromatography (HPLC). The EtOAc-E and AvR9 subfraction revealed the best ovicidal effect recording a 90% and 100% of EHI at 0.25 and 2 mg/mL with an effective an EC<sub>50</sub>= 0.12 and 0.08 mg/mL respectively. The HPLC analysis in the EtOAc-E and bioactive fractions

indicated the presence of a polyphenol, glycosylated flavanones, quercetin glucoside, cinnamates, coumarin, cinnamic acid derivative, ferulic acid, coumarate, naringenin, protocatechuic acid and naringin. Results of the present study demonstrated that *A. vaginatum* is able to inhibit the egg hatch process on *H. contortus* and could be a viable option for the control of small ruminant haemonchosis.

**Keywords:** *Arceuthobium*, anthelmintic activity, polyphenols, *Haemonchus*, organic extracts.

### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade ovicida *in vitro* de um extrato de acetato de etila (EtOAc-E) de *Arceuthobium vaginatum* e suas subfrações (AvR5-AvR14) contra *Haemonchus contortus* usando o teste de inibição da eclosão de ovos (EHI). O extrato e as subfrações foram testados a 0.12-2,00 mg/mL, controle negativo foram usados água destilada e metanol (2%) e como controle positivo Tiabendazol (0.10 mg/mL). Os tratamentos com efeito dependente na concentração foram submetidos à análise de regressão para determinar as concentrações efetivas (CE50 e CE90). Os principais compostos secundários presentes no extrato e nas subfrações foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A subfração EtOAc-E e AvR9 revelou o melhor efeito ovicida registrando 90% de EHI a 0.25 mg/mL com um EC50 efetivo = 0.12 e 0.08 mg/mL, respectivamente. A análise por HPLC no EtOAc-E e nas frações bioativas indicou a presença de polifenol, flavanonas glicosiladas, glicosídeo de quercetina, cinamatos, cumarina, derivado do ácido cinâmico, ácido ferúlico, cumarato, naringenina, ácido protocatecúico e naringina. Os resultados do presente estudo demonstraram que *A. vaginatum* é capaz de inibir o processo de eclosão dos ovos em *H. contortus* e pode ser uma opção viável para o controle da hemoncose de pequenos ruminantes.

**Palavras-chave:** *Arceuthobium*; atividade anti-helmíntica; polifenóis; *Haemonchus*; extratos orgânico.

8.3 Artículo de divulgación publicado Enfoque Rural, Año 2, Núm. 1 (2021).  
Evaluación de la fermentación *in vitro* de dos variedades de muérdago enano del Área de Protección de Flora y Fauna “Nevado de Toluca”.

**Evaluación de la fermentación *in vitro* de dos variedades de muérdago enano del Área de Protección de Flora y Fauna “Nevado de Toluca”**

Fondo de Investigación: N°150000  
Fecha de Aceptación: 02/02/2020

Becerra-Gil María Mitsi Nalleli<sup>1</sup>  
Hernández-Luna Guadalupe Brendal<sup>2</sup>  
Olmedo-Juárez Agustín<sup>3</sup>  
Endara-Agramont Ángel Rolando<sup>4</sup>  
Estrada-Flores Julieta Gertrudis<sup>5</sup>

**RESUMEN**

El muérdago enano es una planta parásita que pertenece a la familia Loranthaceae, afecta a especies de coníferas a lo largo del país, está presente en el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca. Esta planta se evaluó para ser utilizada como un forraje para alimentar ganado ovino, debido a su alta disponibilidad. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción de gas *in vitro* de dos especies de muérdago enano, muérdago amarillo (*Arceuthobium globosum*) y muérdago negro (*Arceuthobium vaginatum*), solos (tratamiento control 0% de inclusión) o asociados en 2 niveles de inclusión (15 y 30%) dentro de dietas experimentales. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en la producción de gas del muérdago amarillo a la hora 24 con 85.21 ml/g MS, siendo superior comparado con el muérdago negro con 72.98 ml/g MS. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos del muérdago amarillo en las primeras horas de producción de gas *in vitro*. La producción de gas en ambos tratamientos (15% y 30%) de inclusión del muérdago negro tuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) en la producción de gas a las 6 y 24 horas, no encontrando diferencias entre tratamientos a las 44 y 72 horas. Se concluye que la producción de gas *in vitro* de ambas especies fue diferente, y añadiéndolas en un 15 a un 30% en

## 8.4 Participación en congresos

### 8.4.1 XVII Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria.

XVII Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria. Universidad Autónoma de Chapingo, Colegio de Posgraduados, Campus Puebla. Morelia, Michoacán. 19 al 21 de octubre del 2022.



8.4.2 2do Congreso Internacional en Ciencias Veterinarias y Producción Animal

Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.  
Tulancingo de Bravo, Hidalgo del 3 al 4 de noviembre del 2022.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Instituto de Ciencias Agropecuarias  
Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Otorga la presente  
CONSTANCIA**

a

**M.M.N. Becerril-Gil, J.G. Estrada-Flores, A.R. Endara-Agramont, M.  
González-Cortazar, A. Zamilpa, A. Olmedo-Juárez**

Por su participación como ponente con el tema **“Actividad ovicida in vitro de  
*Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum* contra *Haemonchus contortus*”**, en  
el marco del **“2do Congreso Internacional de Ciencias Veterinarias y Producción  
Animal”**, llevado a cabo los días 3 y 4 de noviembre.



**“Amor, Orden y Progreso”**  
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, a 3 de noviembre de 2022



**Dr. Armando Peláez Acero**  
Director de ICAP-UAEH



**Dr. Vicente Vega Sánchez**  
Jefe del AAMVZ-ICAP-UAEH



**Dr. Adrian Zaragoza Bastida**  
Presidente del Congreso



GEN 064/22





**ACTIVIDAD OVICIDA *in vitro* DE *Arceuthobium vaginatum* subsp *Vaginatum*  
CONTRA *Haemonchus contortus***

***In vitro* OVICIDAL ACTIVITY OF *Arceuthobium vaginatum* subsp *Vaginatum* AGAINST  
*Haemonchus contortus***

M.M.N. Becerril-Gil<sup>1</sup>, J.G. Estrada-Flores<sup>1</sup>, A.R. Endara-Agramont<sup>1</sup>, M. González-Cortazar<sup>2</sup>, A. Zamilpa<sup>3</sup>, A. Olmedo-Juárez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México.

<sup>2</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

<sup>3</sup>Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro de Investigación Biomédica del Sur.

**RESUMEN**

Las granjas de producción ovina en pastoreo se ven afectadas por la incidencia de enfermedades parasitarias que reducen el crecimiento de los animales, de las más importantes es la ocasionada por *Haemonchus contortus*. El uso sin prescripción de medicamentos para el control de parasitosis ha ocasionado resistencia antihelmíntica, por lo que se han propuesto alternativas como el uso de extractos de plantas etnobotánicas que tienen potencial antihelmíntico. El muérdago enano *Arceuthobium vaginatum* subsp *vaginatum* es una planta hemiparasita que afecta árboles de *Pinus hartwegii* en el Área Natural de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, se utiliza como remedio para el tratamiento de algunos padecimientos en la medicina tradicional mexicana. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antihelmíntico del extracto de acetato de etilo y una fracción del muérdago *A. vaginatum* (MAcoE y FcMAcoE) sobre huevos de *H. contortus* bajo condiciones *in vitro*. Los tratamientos evaluados fueron el extracto de acetato de etilo de muérdago (MAcoE) y una fracción FcMAcoE a concentraciones de 0.12-2.00 mg/mL. El MAcoE y la fracción FcMAcoE mostraron un efecto inhibitorio de la eclosión cercano al 100% a partir de la concentración de 0.25 mg/mL. Se concluye que el extracto de acetato de etilo del muérdago *A. vaginatum* posee actividad antihelmíntica contra huevos de *H. contortus* indicado que esta especie vegetal podría ser candidata como un antiparasitario natural potencial para el control de la Hemonchosis ovina.

**Palabras clave:** *Arceuthobium vaginatum*, efecto antihelmíntico, *Haemonchus*.

**ABSTRACT**

Sheep grazing farms are affected by the incidence of parasitic diseases that reduce animal growth, the most important of which is caused by *Haemonchus contortus*. The unprescribed use of drugs for the control of parasitosis has caused anthelmintic resistance, so alternatives have been proposed, such as the use of ethnobotanical plant extracts that have anthelmintic potential. The dwarf mistletoe *Arceuthobium vaginatum* subsp *vaginatum* is a hemiparasite plant that affects *Pinus hartwegii* trees in the Nevado de Toluca Flora and Fauna Protection Natural Area and is used as a remedy for the treatment of some ailments in traditional Mexican medicine. The objective of this work was to determine the anthelmintic effect of ethyl acetate extract and a fraction of the mistletoe *A. vaginatum* (MAcoE and FcMAcoE) against *H. contortus* eggs under *in vitro* conditions. The treatments tested were mistletoe ethyl acetate extract (MAcoE) and an FcMAcoE fraction at 0.12-2.00 mg/mL. The MAcoE and FcMAcoE fraction displayed an egg hatching inhibitory effect close to 100% from 0.25 mg/mL concentration. It concluded that the extract and fraction from mistletoe *A. vaginatum* possess anthelmintic activity against *H. contortus* eggs, indicating that this vegetal species could be candidate as a potential natural antiparasite for controlling the sheep haemonchosis.

### 8.4.3 Reunión Nacional de Investigación Pecuaria

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuaria. Villahermosa, Tabasco. 9 al 12 de noviembre 2022



**20 REUNIONES**  
**22 científicas**  
09 - 12 NOV  
TABASCO

REUNIONES NACIONALES DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN PECUARIA, AGRÍCOLA, FORESTAL Y ACUICOLA PESQUERA

OTORGA LA PRESENTE

# CONSTANCIA

A

**BECERRIL GIL MARIA MITSU MALLELI, AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ, ÁNGEL ROLANDO ENDARA AGRAMONT, JULIETA GERTRUDIS ESTRADA FLORES**

---

Por su participación con el trabajo denominado:

**DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS NUTRITIVAS DE ARCEUTHOBIMUM VAGINATUM Y SU EFECTO SOBRE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO**



**DR. LUIS ÁNGEL RODRÍGUEZ DEL BOSQUE**  
Vicepresidente del Comité Organizador Nacional

**VILLAHERMOSA TABASCO, 09 AL 12 DE NOVIEMBRE DE 2022**

*Ciencia para vivir*



Reunión Nacional de Investigación

# — PECUARIA —



## MEMORIA

Foto: Felipe de Jesús Ruiz López

### COMPILADORES:

Ana María Anaya Escalera, Claudia García Figueroa, Laura Yaverik Alvarado Avila  
Miguel Enrique Arechevaleta Velasco y Luis Reyes Muro

ISSN

2954-4765



## DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS NUTRITIVAS DE *Arceuthobium vaginatum* Y SU EFECTO SOBRE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro*.

Maria Mitsi Nalleli Becerra Gil<sup>1</sup>, Agustín Olmedo Juárez<sup>2</sup>, Ángel Rolando Endara Agramont<sup>1</sup> y Julieta Gertrudis Estrada Flores<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales, Universidad Autónoma del Estado de México. <sup>2</sup>CENID-SAJ INIFAP, Estado de México, México.  
[jgestradaf@uaemex.mx](mailto:jgestradaf@uaemex.mx)

**Palabras clave.** Taninos condensados, muérdago enano, cinética de fermentación ruminal.

### INTRODUCCIÓN

La producción de carne de ovino es una actividad económica importante en el Estado de México, misma que requiere de fuentes de alimentación alternativas que mejoren la eficiencia en la utilización de nutrientes para incrementar la productividad, con el fin de incorporar variables de sostenibilidad y reducir el impacto al medio ambiente, a través de la generación de alimentos limpios y de calidad para las comunidades. En los sistemas de producción ovina de alta montaña se utilizan plantas del bosque para la alimentación del ganado, una de éstas es el muérdago enano (*Arceuthobium vaginatum*), la cual es considerada una de las plagas más dañinas en los bosques de México y América Central, afectando principalmente a los árboles de *Pinus hartwegii* (Quejello-Bolaños et al., 2005). En el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca esta plaga se encuentra distribuida en 43% de la superficie, se dispersa a lo largo del año y representa una alternativa para la alimentación de ganado en zonas marginales donde se lleva a cabo la crianza de ovinos (Hernández-Luna et al., 2017). El muérdago enano contiene metabolitos secundarios que pueden favorecer la fermentación ruminal y el desempeño animal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la composición química proximal, compuestos fenólicos, cinética de fermentación ruminal y digestibilidad de *A. vaginatum* bajo condiciones *in vitro*.

### MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de material vegetal.** La colecta del muérdago se llevó a cabo en el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca (APFFNT), Estado de México en los meses de junio-agosto del 2021. Las etapas fenológicas predominantes fueron fructificación y dispersión de semillas (Quejello-Bolaños et al., 2014). La colecta se realizó en seis sitios de muestreo dentro del APFFNT considerando cuatro categorías de edades de árboles *Pinus hartwegii*; brinzales ( $\geq 30\text{cm}$   $< 1.5$  m de altura), latizales ( $\geq 1.5$  m de altura  $< 2.5$  de diámetro a la altura de pecho, DN), juveniles ( $\geq 2.5$  DN  $< 7.5$  de DN) y fustales o adultos ( $\geq 7.5$  DN). De cada categoría se obtuvieron muestras de tres a seis árboles diferentes, se extrajeron 51 muestras en total. Las muestras fueron llevadas al laboratorio del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales de la UAEMex. Se colocaron en un secador botánico a 50° C por 72 h, después se molieron en molino Pulvex, hasta obtener un tamaño de partícula de 1-2 mm.

**Análisis químico proximal y determinación de compuestos fenólicos.** El contenido de materia seca (MS, g/kg de MS), materia orgánica, contenido de fibra detergente neutro (FDN, g/kg de MS) y fibra detergente ácido (FDA, g/kg de MS), fueron determinados mediante el método de micro bolsas (ANKOM, 2005) de acuerdo con Van Soest et al. (1991). El contenido de proteína cruda se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 1990). La cantidad de fenoles (FT, g/kg de MS) y taninos totales (TT, g/kg de MS) se determinó con el método propuesto por Makkar et al. (2007). La medición de taninos condensados (TC, %) se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Porter et al. (1986).

**Parámetros de fermentación ruminal y digestibilidad.** La cinética de fermentación se determinó mediante la metodología propuesta por Theodorou et al. (1994). Se realizaron mediciones de presión del gas producido de forma individual en botellas de vidrio utilizando un transductor de presión (Lutron) por 96 h a diferentes intervalos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 72 y 96 h). Se calculó la digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS), de la materia orgánica (DIVMO) de la fibra detergente neutro (DIVFDN) mediante el método propuesto por Pell y Schofield (1993). Los parámetros de fermentación ruminal se calcularon a partir del ajuste de la producción de gas a la ecuación de France et al. (2000); se obtuvo la producción de gas de la FDN (B, ml gas), tasa de fermentación ruminal *in vitro* (c/h, %) y el tiempo  $L_{90}$  (h) que es el tiempo de inicio de la fermentación de la FDN.

8.5 Estancia de investigación en Centro de Investigación Biomédica del Sur-Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos.



Universidad Autónoma del Estado de México

Ref. JGEF/19012022/3  
19 de enero de 2022

**DR. ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ**  
**DIRECTOR DEL CIBIS-IMSS**  
**P R E S E N T E:**

Enviando un cordial saludo me dirijo a usted, solicito amablemente tenga a bien autorizar que la M. en C. María Mitsi Nalleli Becerril Gil, estudiante del cuarto semestre del Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Autónoma del Estado de México con número de cuenta 0644617 y quien realiza el proyecto de tesis doctoral "Efecto de los compuestos fenólicos de *Arceuthobium globosum* y *Arceuthobium vaginatum* como suplemento en la alimentación de ovinos" bajo mi cargo, pueda realizar una estancia de investigación con el Dr. Manasés González Cortazar durante el periodo comprendido entre el 31 de enero al 11 de febrero del 2022.

La estancia tiene como objetivo aislar y caracterizar los compuestos fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico de *Arceuthobium globosum* y *Arceuthobium vaginatum*. Sin más por el momento, reciba saludos cordiales.

Atentamente  
**PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**

*"2022, Celebración de los 195 Años de la Apertura de las Clases en el Instituto Literario"*

**DRA. JULIETA GERTRUDIS ESTRADA FLORES**  
**INVESTIGADORA DEL ICAR**

c.c.p. Dr. Carlos Galdino Martínez García. Subdirector Académico del ICAR  
c.c.p. Dra. María Cristina Chávez Mejía. Encargada del Despacho de la Dirección del ICAR  
c.c.p. Archivo.



Respondió el Jue 10/03/2022 04:56 PM.



ZA

Zamilpa Alejandro <azamilpa\_2000@yahoo.com.mx>



Para: Becerril Gil Maria Mitsi Nalleli

Jue 10/03/2022 01:16 PM

CC: Manases Gonzalez Cortazar <gm... **y 2 más**

Estimada Mitsi. Te escribo para confirmarte de recibido y tengo el agrado de informarte que tu solicitud de estancia ha sido aprobada. El Dr. Manasés González se encargará de informarte los días que podrías asistir dependiendo del movimiento de la pandemia

Atentamente

Dr. Zamilpa

Dr. Alejandro Zamilpa Alvarez Centro de Investigación Biomédica del Sur (IMSS) Argentina No. 1 Xochitepec Morelos, México Tel/Fax: (777)3612155

El jueves, 10 de marzo de 2022 11:32:09 GMT-6, Becerril Gil Maria Mitsi Nalleli <mbecerrilg617@alumno.uaemex.mx> escribió:

8.6 Estancia de investigación en Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Jiutepec, Morelos.



## 9 DISCUSIÓN GENERAL

El uso de plantas no convencionales con alto contenido de metabolitos secundarios en la alimentación animal es de reciente estudio, debido a que representan un recurso forrajero que además de tener propiedades nutritivas tienen efecto en la salud animal.

En el presente estudio, se evaluó las propiedades nutricionales y su efecto en la salud animal de dos plantas parásitas conocidas como muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) que inciden en el bosque del APFFNT, la cual ha ido en aumento debido a las malas prácticas de extracción de madera entre otros factores (Endara-Agramont *et al.* 2014), por lo que se requieren medidas de control como la poda manual (Sotero-García *et al.* 2018) y su utilización en la alimentación animal.

El experimento uno evidenció la composición química de las dos especies de muérdago en cuatro categorías de edad, demostraron tener diferencias significativas en el contenido de compuestos secundarios entre especies. Además, se encontró que el contenido de FDN y FAD de ambas especies de muérdago se debe a la madurez y su contenido se asemeja al reportado en otras plantas no convencionales como *Viscum rotundifolium*, *Viscum album* y *V. verrucosum* (Ramantsi *et al.*, 2019; Jibril *et al.*, 2020; Atalay, 2020). El contenido de MS, FDN y FDA del muérdago se asocia a la composición histológica de los brotes de muérdago, se caracterizan por un crecimiento primario y secundario que se encarga de dar soporte, el crecimiento secundario contiene estructuras de bloques de tejido vascular que caracterizan al muérdago como una planta leñosa, además, la epidermis de estas especies de muérdago tiene un alto contenido de celulosa (Hawksworth y Wiens, 1996).

El muérdago representa un recurso forrajero, donde el contenido de materia seca es diferente ( $P < 0.05$ ) según la edad del árbol en que se establece, en árboles adultos el muérdago amarillo y todas las edades del muérdago negro se puede obtener un mayor contenido de materia vegetal, con una mayor proporción de carbohidratos estructurales fermentables en la especie muérdago negro en comparación con la especie muérdago amarillo. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en el contenido proteico de las dos especies de muérdago, fue inferior al reportado para arbustos en Etiopía, como *Sesbania somalensis* y *Acacia bussei* (Gebeyew *et al.*, 2020) y se asocia a su capacidad fotosintética (Costa-Santos *et al.*, 2021). La ingesta proteica de estas especies puede satisfacer las necesidades de mantenimiento de ovejas adultas (68 g/d) según AFRC (1993).

La producción total de gas (B) presentó diferencias significativas entre las especies de muérdago y las edades de los árboles muestreados ( $P < 0.05$ ), está asociada al contenido de fenólicos totales y taninos condensados, ya que inhiben la actividad de los microorganismos debido a sus propiedades antibacterianas y antiprotozoarias, que reducen la producción de gas *in vitro* (Fagundes *et al.*, 2020). En algunos estudios con otras especies forrajeras, valores similares de gas han sido reportados para el arbusto *Flemingia macrophylla* con 81.99 mL (Fagundes *et al.*, 2020).

Por otro lado, la tasa de producción de gas *in vitro* (c) no mostró diferencias significativas entre las especies de muérdago, ni en las categorías de edad de los árboles muestreados. La tasa de producción de gas *in vitro* se debe al contenido de nitrógeno/proteína bruta y FDN (Bureenok *et al.*, 2019). El tiempo de retardo fue significativamente diferente entre las especies de muérdago ( $P < 0.05$ ), el inicio de la fermentación de FDN varía alrededor de 4 horas entre especies, con un tiempo de retardo más largo observado en el muérdago amarillo (11.24 h). La digestibilidad de la materia seca *in vitro* y de la materia orgánica *in vitro* fue diferente entre las especies de muérdago debido al contenido de FDN y FAD



entre las especies. El contenido de FDN fue menor en la especie muérdago amarillo, se observa una mejor digestibilidad debido a una mayor calidad de FDN en el muérdago amarillo que en el muérdago negro ( $P < 0.05$ ), ya que la cantidad de FAD en el muérdago amarillo fue menor comparado con el muérdago negro ( $P < 0.05$ ) debido a su contenido de celulosa y lignina.

En el experimento dos donde se evaluó el extracto de *Arceuthobium vaginatum* como antihelmíntico, se encontró que posee propiedades antihelmínticas contra parásitos de *H. contortus*. *Arceuthobium vaginatum* es tradicionalmente usada en el Estado de México para el tratamiento de enfermedades respiratorias y algunas alteraciones digestivas. Para el mejor de nuestro conocimiento, no se ha realizado investigación antihelmíntica en la planta de acuerdo con la literatura disponible por lo que este sería el primer reporte de actividad nematocida de *A. vaginatum* contra el nematodo *H. contortus*.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el E-AcoEt de *A. vaginatum* tiene la capacidad de inhibir los procesos de eclosión de huevos de *H. contortus*. Numerosos estudios a nivel *in vitro* e *in vivo* de extractos orgánicos con diferente polaridad sobre nemátodos plantas y animales han evidenciado ciertos efectos nematocidas (Badar *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2020). El efecto nematocida observado en el E-AcOEt fue similar a los reportados por Mhomga *et al.* (2022) con extracto acetónico de *Cochlospermum planchonii* se pudo observar un efecto inhibitorio del 100% a una concentración de 0.31 mg/mL. Por otro lado, el extracto de acetato de etilo de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) mostro un efecto ovicida cercano al 100% con una concentración de 5 mg/mL (Rodrigues, *et al.*, 2020). En el presente estudio cuando el extracto de *A. vaginatum* fue fraccionado, se requirió menores concentraciones en las fracciones bioactivas (AvR5, AvR7 y AvR11) para lograr un efecto ovicida similar a lo reportado en un estudio anterior.

El fraccionamiento del extracto AcOEt de *A. vaginatum* permitió el aislamiento e identificación de nueve compuestos en las fracciones bioactivas entre ellos se observó a derivados del ácido hidroxicinámico, cumaratos y naringenina. En *A. vaginatum* subsp. *vaginatum* se han identificado flavonoides tales como 3-O-glicosido de quercetina y 3-O-galactosido de quercetina y miricetina (Crawford y Hawksworth, 1979). Los metabolitos secundarios mencionados anteriormente pueden considerarse como componentes químicos responsables de una gran cantidad de actividades biológicas incluyendo actividad antioxidante y antihelmíntica (Ondua *et al.*, 2021). Por ejemplo, *A. comosus* contiene ácido p-cumarico el cual tiene un potente efecto nematocida sobre *H. contortus* (Rodrigues *et al.*, 2020), por lo tanto, la actividad antihelmíntica en este estudio podría deberse a los derivados del ácido hidroxicinámico presente en algunas fracciones como AvR5 y AvR7. En este estudio fue aislada una cumarina en AvR5 mostro un alto efecto antihelmíntico, junto con otros compuestos bioactivos como cinamatos y flavonas, producen un efecto sinérgico que mejora la actividad antihelmíntica de las plantas (Klongsiriwet *et al.*, 2015; von Son de Fernex *et al.*, 2015; Mendonça Soares *et al.*, 2019). Otra especie de planta parásita, como *A. oxycedri* contiene ácido clorogénico y catequina (Orhan *et al.*, 2019) lo cual se asocia a los derivados de ácido hidroxicinámico encontrados en el extracto de *A. vaginatum*. Por otro lado, en *Acacia farnesiana* se han reportado tres diferentes estructuras de naringenina, de las cuales la más activa fue naringenina 7-O-(6''-galloilglucosido) (Zarza-Albarrán *et al.*, 2020), en este trabajo se

identificó naringenina en la subfracción más bioactiva AvR9, aunque aún no se conoce con exactitud cuál es la estructura química de naringenina presente en esta subfracción, puede asociarse el efecto antihelmíntico a esta molécula además al efecto sinérgico por el cumarato presente en esta fracción. El efecto antihelmíntico en la inhibición de la eclosión de huevos se asocia a la alteración en la permeabilidad de la membrana externa del huevo, lo que impide el intercambio de oxígeno y no permite la liberación de la larva (Cortes-Morales *et al.*, 2019). De acuerdo con estos resultados, los efectos antihelmínticos sobre la población de *H. contortus* pueden ser la base para llevar a cabo estudios *in vivo* y de esta forma corroborar la actividad antihelmíntica del muérdago *A. vaginatum* subsp. *vaginatum*, una planta parásita que afecta bosques de coníferas en gran parte del territorio nacional.

## 10 CONCLUSIÓN GENERAL

En los estudios realizados, se puede considerar la inclusión de muérdago amarillo y negro en la alimentación del ganado. La composición química de los muérdagos negro y amarillo difieren en la edad de los árboles infectados, principalmente el contenido de materia seca. El contenido de proteína y fibras puede compararse con arvenses de la zona que son utilizadas en la alimentación de ovinos, por lo que, en áreas afectadas del nevado de Toluca, puede ser una opción para el control de esta planta parásita.

Además de las características nutricionales, el muérdago negro (*Arceuthobium vaginatum* subsp. *vaginatum*) tiene metabolitos secundarios que poseen propiedades antihelmínticas *in vitro*, principalmente contra la especie *H. contortus*, el cual puede ser útil para el control de parasitosis internas, no obstante, se requiere de investigación adicional para identificar, caracterizar los compuestos responsables de la inhibición de la eclosión de huevos en las subfracciones más bioactivas, y analizar su modo de acción, así como su citotoxicidad en el organismo.

Esto hace del muérdago amarillo y negro una opción para su uso en la alimentación del ganado, cuya importancia se basa en que su utilización también puede mejorar el control de esta planta parásita, en los bosques del APFFNT.

## 11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aderibigbe, S.A., Opayemi, O.S., Bolaji, S.A. *et al.* In vitro effect of three tropical plants on adult *Haemonchus placei*, an haematophagous nematode from cattle. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* **11**, 72 (2022). <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00255-7>
- AFRC. Agricultural and Food Research Council. (1993). Energy and protein requirements of ruminants: Agricultural and food research council.
- Ahmad, Ejaz & Arshad, Muhammad & Khan, Muhammad & Amjad, Muhammad Shoaib & Sadaf, Huma & Riaz, Iqra & Sabir, Sidra & Ahmed, Nabila & ., Saboon. (2017). Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and phytochemistry*. 6. 205-214.
- Akande, K. E., Doma, U. D., Agu, H. O., & Adamu, H. M. (2010). Major antinutrients found in plant protein sources: their effect on nutrition. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(8), 827-832.
- Ankom, 2005. Procedures for NDF and ADF. Ankom Technology Method. [https:// www.ankom.com](https://www.ankom.com). Accessed 18 April 2022.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists)., 2023. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 'Animal Feed—General', Wendt Thiex, Nancy J (ed.), New York. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.037>, accessed 18 May 2023.
- Arias-Cortes, M. M. (2011) Análisis y comparación de los glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolum tuberosum*) para evaluar su uso potencial en el control del patógeno de la papa *Spongospora subterranea*. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Arriola-Padilla, V.J., Résendiz-Martínez, F., Chaires-Grijalva, M.P., Medellín-Jiménez, R. Pérez-Silva M. (2012). Insecta asociada a muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) en los parques Nacionales Izta-Popo y La Malinche. *Entomología Mexicana*, 11(2), pp. 829-834.
- Atalay, A.İ., 2020. Determination of nutritive value and anti-methanogenic potential of mistletoe leaves (*Viscum album*) grown on different host, *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences* 4, pp. 120-123.
- Ayala, C, Castelán R., Martínez, C., Merlo A., Ortiz H.G., León, N., Córdova Tapia, F., Gálvez, K., Fernández, P. y Zambrano, L. (2014). Análisis del Borrador del Programa de Manejo del Área de Protección de Flora y Fauna “Nevado de Toluca”. Technical Report · August 2014 10.13140/RG.2.1.1279.8884.
- Badar, S. N., Iqbal, Z., Sajid, M. S., Rizwan, H. M., Shareef, M., Malik, M. A., and Khan, M. N. 2021. Comparative anthelmintic efficacy of *Arundo donax*, *Areca catechu*,

and *Ferula assa-foetida* against *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*, 30(2) e001221. doi: 10.1590/S1984-29612021028.

- Bernués, A., Riedel, J. L., Asensio, M. A., Blanco, M., Sanz, A., Revilla, R., & Casasús, I. (2005). An integrated approach to studying the role of grazing livestock systems in the conservation of rangelands in a protected natural park (Sierra de Guara, Spain). *Livestock Production Science*, 96(1), 75-85.
- Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., ... & Kurihara, M. (2009). Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5512-5522.
- Bobadilla-Soto, E. E., Ochoa-Ambriz, F. y Perea-Peña, M. (2022). El sistema de producción maíz-ovinos de traspatio en los pueblos Mazahuas del Estado de México. *Terra Latinoamericana*, 40, 1-10. e945. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.945>
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 78-93.
- Bureenok, S., Langsoumechai, S., Pitiwittayakul, N., Yuangklang, C., Vasupen, K., Saenmahayak, B., and Schonewille, J. T., 2019. Effects of fibrolytic enzymes and lactic acid bacteria on fermentation quality and in vitro digestibility of Napier grass silage, *Italian Journal of Animal Science*, 18:1, pp. 1438-1444, <http://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1681910>
- Castillejos-Velázquez L. (2005) Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona. Departamento de ciencia animal i dels aliments.
- Chávez-Solano, F. R., Carreto-Bernal, F., & Serrano-Barquín, R. C. (2019). Turismo de naturaleza en el Área de Protección de Flora y Fauna (APFF) Nevado de Toluca, estado de México, a través de la geoinformática. *Espacio y Desarrollo*, (34), 33-56.
- Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., & Szumacher-Strabel, M. (2012). Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Animal feed science and technology*, 176(1-4), 102-106.
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., and Waller, P. J. 1992. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1-2):35-44. doi:10.1016/0304-4017(92)90141-U.

- CONABIO (comp.) 2023. Catálogo de autoridades taxonómicas de especies de flora y fauna con distribución en México. Base de datos SNIB-CONABIO, México.
- Cong-Cong X., Bing W., Yi-Qiong P., Jian-Sheng T., Tong Z. (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(10): 0721-0731.
- Cortes-Morales, J. A., Olmedo-Juárez, A., Trejo-Tapia, G., González-Cortazar, M., Domínguez-Mendoza, B. E., Mendoza-de Gives, P., & Zamilpa, A. (2019). In vitro ovicidal activity of *Baccharis conferta* Kunth against *Haemonchus contortus*. *Experimental parasitology*, 197, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.01.003>.
- Cortes-Morales, J., Olmedo-Juárez, A., González-Cortázar, M., Zamilpa, A., Lopez-Arellano, M., Blé-González, E.A., Tapia-Maruri, D., Flores-Franco, G., & Salinas-Sánchez, D.O. (2022). In vitro ovicidal activity of *Brongniartia montalvoana* against small ruminant gastrointestinal nematodes. *Experimental parasitology*, 108336.
- Costa-Santos, A. C., Rejane-de Almeida, W., Maldonado-López, Y., Cuevas-Reyes, P., and Santos, J. C., 2021. Variation in the co-occurrence of pathogen and herbivores between ontogenetic stages of *Miconia albicans*. *Trees*, 35, pp. 1001-1011.
- Crawford, D.J. y Hawksworth, F.G. 1979. Flavonoid chemistry of *arceuthobium* (viscaceae). *Brittonia* 31: 212–216. doi: 10.2307/2806177.
- Delgado-Bautista M.K. (2016). Perspectiva actual de los polifenoles en México. *Entretextos*. Universidad Iberoamericana León. Año7, núm 21. ISSN:2007-5316.
- Díaz-Medina, L. K., Colín-Navarro, V., Arriaga-Jordán, C. M., Brunett-Pérez, L., Vázquez-de-Aldana, B. R., & Estrada-Flores, J. G. (2021). In vitro nutritional quality and antioxidant activity of three weed species as feed additives for sheep in the Central Highlands of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 53(3), 394.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. 2013. ACUERDO por el que se da a conocer el Resumen del Programa de Manejo del Área Natural Protegida con categoría de Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca. <http://www.ordenjuridico.gob.mx/leyes.php#gsc.tab=0&gsc.q=nevado%20de%20otolca&gsc.sort=>. Consultado el 20 de agosto del 2023.
- Durmic, Z., y Blache, D. (2012). Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal feed science and technology*, 176(1-4), 150-162.

- Elahi, M. Y., Rouzbehan, Y., & Rezaee, A. (2012). Effects of phenolic compounds in three oak species on in vitro gas production using inoculums of two breeds of indigenous Iranian goats. *Animal feed science and technology*, 176(1-4), 26-31.
- Elshafie HS, Camele I, Mohamed AA. A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(4):3266. <https://doi.org/10.3390/ijms24043266>
- Endara-Agramont A.R., Cedillo-A M., Nava-Bernal E.G. (2014) Actualización del mapa de plagas y enfermedades forestales del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca. México: Universidad Autónoma del Estado de México. En prensa.
- Fagundes, G. M., G. Benetel, K. C. Santos, K. C. Welter, F. A. Melo, J. P. Muir, and I. C. S. Bueno., 2020. Tannin-Rich Plants as Natural Manipulators of Rumen Fermentation in the Livestock Industry, *Molecules*. 25, pp. 2943. <https://doi.org/10.3390/molecules25122943>.
- Ferguson, D., Lee, C., & Fisher, A. (Eds.). (2017). *Advances in sheep welfare*. Woodhead Publishing.
- Flachowsky, G., & Lebzien, P. (2012). Effects of phytogenic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 70-77.
- France, J.K., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., López, S., & Bannink, A. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *The British journal of nutrition*, 83 2, 143-50.
- Francis G., Makkar H.P.S., Becker K. 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*. Volume 199, Issues 3-4. Pages 197-227. ISSN 0044-8486, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00526-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00526-9).
- Galicia-Aguilar, H. H., Rodríguez-González, L. A., Capetillo-Leal, C. M., Cámara-Sarmiento, R., Aguilar-Caballero, A. J., Sandoval-Castro, C. A., & Torres-Acosta, J. F. J. (2012). Effects of *Havardia albicans* supplementation on feed consumption and dry matter digestibility of sheep and the biology of *Haemonchus contortus*. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 178-184.
- García, E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Universidad Nacional Autónoma de México.

- García-Ávalos, A. y Pérez-Urria E.C. (2011). Metabolismo secundario de plantas. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009. ISSN: 1989-3620
- Gebeyew, K., Abera, B., Bajigo, A., Gebresilassie, G., Martínez, Y., & Adebowale, T. (2020). Indigenous medicinal uses, toxicity, and chemical composition of browsing plant used by camel in Ethiopia Somali Regional State: a survey. *Tropical animal health and production*, 52, 1459-1466.
- Geils, Brian W.; Cibrián Tovar, Jose; Moody, Benjamin, tech. coords. 2002. Mistletoes of North American Conifers. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. Ogden, UT: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 123 p.
- Goldberg G (2003). Plants: diet and health. The report of a British nutrition foundation task force. Oxford, U.K.: Blackwell Publishing Ltd., 347.
- Gómez-Sánchez M., Sánchez-Fuentes L.J. y Salazar-Olivo L.A. 2011. Anatomía de especies mexicanas de los géneros *Phoradendron* y *Psittacanthus*, endémicos del Nuevo Mundo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 1203-1218, 2011
- González de Buitrago J.M. 2010. Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico (Tercera Edición), Cromatografía. pp. 197-210. ISBN 9788445820292. <https://doi.org/10.1016/B978-84-458-2029-2.50014-8>.
- González Mera, I.F., González Falconí, D.E., Morera Córdova1, V. 2019. Secondary metabolites in plants: main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Revista bionatura*. Volumen 4 / Número 4. doi. 10.21931/RB/2019.04.04.11.
- González, G. E., C. Serrano, G., K. V. de Lira, R. y G. Sánchez, M. 2016. Evaluación de hongos para el control microbiano de muérdago enano (*Arceuthobium* sp.) y solicitud de protección. Informe técnico parcial proyecto CONAFOR Sanidad Forestal. INIFAP, CEPAB, Ags. 18p.
- González-Gaona, E., Serrano Gómez, C., de Lira Ramos, K. V., Quiñonez Barraza, S., Sánchez Martínez, G., López Pérez, I., Sánchez Lucio, R. (2017). Identificación, distribución y control de muérdago enano (*Arceuthobium* spp.) en bosques de coníferas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Norte Centro. Campo Experimental Pabellón. Pabellón de Arteaga, Ags., México.
- Guerrero, M., Cerrillo-Soto, M. A., Ramírez, R. G., Salem, A. Z. M., González, H., & Juárez-Reyes, A. S. (2012). Influence of polyethylene glycol on in vitro gas production profiles and microbial protein synthesis of some shrub species. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 32-39.



- Hawksworth, F. y D. G. Wiens. (1996). Dwarf Mistletoes: Biology, Pathology, and Systematics. Washington, D. C: United States Department of Agriculture/Forest Service.
- Hawu, O., Ravhuhali, K.E., Musekwa, M.G., Sipango, N., Mudau, H.S., Mokoboki, K.H. y Moyo, B.I. 2022. Utilization of the *Viscum* Species for Diet and Medicinal Purposes in Ruminants: A Review. *Animals*, 12: 2569. doi: 10.3390/ani12192569
- Hernández-Cortázar, I., Rejón-Ávila, M., Valencia-Heredia, E., & Araujo-Andrade, L. (2014). Análisis de inversión para la producción de ovinos en el municipio de Tzucacab, Yucatán, México. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 34, 677-687.
- Hernández-Luna G.B., Endara-Agramont A.R., González-Ronquillo M., Martínez-Hernández J., Vilmar-Kozloski G y Estrada-Flores J. G. (2017) La utilización de muérdago enano (*Arceuthobium globosum*) como forraje en la alimentación de rumiantes. En: Sustentabilidad Agropecuaria. Experiencias de investigación para el desarrollo agropecuario, forestal y rural. Luis Brunett Pérez, Gómez Demetrio, William, Gutiérrez Castillo Adriana del Carmen, Enrique Jaimes Arriaga. Universidad Autónoma del Estado de México. Ciudad de México: Colofón; Estado de México.
- Hernández-Marín, J. A., Valencia-Posadas, M., Ruíz-Nieto, J. E., Mireles-Arriaga, A. I., Cortez-Romero, C., & Gallegos-Sánchez, J. (2017). Contribución de la ovinocultura al sector pecuario en México. *Agroproductividad*, 10(3).
- Hernández-Sánchez, A.P. 2009. Plantas medicinales y su efecto antimicrobiano: un servicio ecosistémico de la cuenca del río Magdalena, D.F. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Biología.
- Hernández-Valenzuela, D., Sánchez Vera, E., Gómez Demetrio, W., & Martínez García, C. G. (2019). Productive and socioeconomic characterization of a sheep production system in a natural protected area in Mexico. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 10(4), 951-965.
- Herrera Haro, José G., Álvarez Fuentes, Gregorio, Bárcena Gama, Ricardo, & Núñez Aramburu, Juan Manuel. (2019). Caracterización de los rebaños ovinos en el sur de Ciudad de México, México. *Acta universitaria*, 29, e2022. Epub 01 de diciembre de 2019. <https://doi.org/10.15174/au.2019.2022>
- Hessburg, P.F., Povak, N.A., y S.R. Brion. 2008. Thinning and prescribed fire effects on dwarf mistletoe severity in an Eastern Cascade Range dry forest, Whashington. *Forest Ecology and Management* 255:2907-2915.
- Hoffman J.F. (2012). Management Guide for Dwarf Mistletoe. Forest Health Protection and State Forestry Organizations. US Forest Service.

- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M. y Terrill, T.H. (2015). Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock *Veterinary Parasitology*, 212, 5–17.
- Hristov, A. N., Oh, J., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., ... & Gerber, P. J. (2013). Special topics—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of animal science*, 91(11), 5045-5069.
- Jayanegara, A., F. Leiber, and M. Kreuzer. 2012. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 96:365–375.
- Jibril, J.A., Gazali, Y.M., Dantani, M., Alamin, H. and Zannah, B.B., 2020. Performance of Balami Rams Fed Graded Levels of Mistletoe Leaves (*Viscum album*) and Sorghum Stover in Semi-Arid Zone of Borno State, Nigeria. *Niger. Nigerian Journal of Animal Science and Technology*, 3, pp. 25- 285.
- Jiménez-Sepúlveda, G., Ducoing-Porta H., & Sosa-Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Jin, L., Wang, Y., Iwaasa, A. D., Xu, Z., Schellenberg, M. P., Zhang, Y. G., ... & McAllister, T. A. (2012). Effect of condensed tannins on ruminal degradability of purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent.) harvested at two growth stages. *Animal feed science and technology*, 176(1-4), 17-25.
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J Pharm Pharmacol*, 2(7), 377-392.
- Kamalak, A. D. E. M., Canbolat, O., Sahin, M., Gurbuz, Y., & Ozkan, C. O. (2005). The effect of polyethylene glycol (PEG 8000) supplementation on in vitro gas production kinetics of leaves from tannin containing trees. *South African Journal of Animal Science*, 35(4), 229-237.
- Kebeta M.M., Hine B.C., Walkden-Brown S.W., Kahn L.P., Piedrafita D.P., Bailey S., Doyle E.K. 2022. Investigation of the combined efficacy of two *Haemonchus contortus* vaccines in weaner Merino sheep. *Veterinary Parasitology*. vol.301.
- Kenyon, F., Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berran, B., Varady, M., van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercruyse, J., Jackson, F., 2009. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet. Parasitol.* 164, 3–11.

- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A. R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E. M., & Hoste, H. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 5(3), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.06.001>.
- Kuiseu J., Fréjus T. A., Zinsou, Olounlade P.A., Géorcelin G. Alowanou A.D., Dansou C., Hounzangbe-Adote, Babayemi O.J y Edorh P.A. (2021). Prevalence, effects and alternative control methods of *Haemonchus contortus* in small ruminants: A review. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 13(2), 84-97
- Kumar, S., Saini, R., Suthar, P., Kumar, V., Sharma, R. (2022). Plant Secondary Metabolites: Their Food and Therapeutic Importance. In: Sharma, A.K., Sharma, A. (eds) *Plant Secondary Metabolites*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-4779-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-16-4779-6_12).
- Kutchan M.T, Gershenzon J., Lindberg B. M., Gang D.R. Chapter 24. Natural Products. Buchanan, B. B., Grisse, W., y Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons.
- Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. The Cell Research Institute and Department of Botany The University of Texas at Austin. ISBN 978-3-642-88460-3
- Madibela, O. R., & Jansen, K. (2003). The use of indigenous parasitic plant (*Viscum verrocosum*) in reducing faecal egg counts in female Tswana goats. *Livestock Research for Rural Development*, 15, 9.
- Makkar H.P.S. y Sánchez, M. Speedy WA., (2007b). Feed supplementition blocks. Chapter. *Feed supplementation blocks for increased utilization of tanniferous foliages by ruminants*. Food and Agriculture Organization of United Nations. Rome.
- Makkar, H. (1999). *Plant secondary metabolites as antinutrients in monogastric nutrition*. Institute of animal production in the tropics and subtropics. University of Hohenheim. Stuttgart, Germany.
- Makkar, H. P., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007a). *Plant secondary metabolites* (pp. 101-106). Totowa, NJ, USA: Humana Press. doi: 10.1007/978-1-59745-425-4\_1
- Makkar, H.P. (2003a) *Chemical, protein precipitation and bioassays for tannins, tannin levels and activity in unconventional feeds, and effects and fate of tannins. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage*. (Kluwer Academic Publishers, Netherlands).

- Makkar, H.P.S. (2003b). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin- rich feeds. *Small Ruminant Research* 49. pp.241-256. doi:10.1016/S0921-4488(03).00.142-1.
- Manion, P.D., 1991. *Tree disease concepts* (No. 634.963 M278 1991). Prentice Hall.
- Marchiosi, R., dos Santos, W.D., Constantin, R.P. *et al.* Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochem Rev* 19, 865–906 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09689-2>
- Martínez-Hernández, J., Arriaga-Jordán, C. M., González-Rebeles Islas, C., Estrada Flores, J.G. (2014). Evaluación de la productividad primaria durante la época de secas en el Área de protección de flora y fauna “Nevado De Toluca” México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(2),299-302. [fecha de Consulta 30 de Octubre de 2020]. ISSN: . Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=939/93931761021>
- Martínez-Hernández, J., López-González, F., Arriaga-Jordán, C., González-Rebeles I., C., Rosa García, R., Hernández-Luna, G., & Valdés Reyna, J. Estrada Flores, J. (2018). Characterization of grasslands in the “Nevado de Toluca Flora and Fauna Protection Area” for sheep production. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21(3). Retrieved from <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2518/1189>
- Martínez-Sámamo, J., Torres-Durán, P. V., & Juárez-Oropeza, M. A. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de educación bioquímica*, 30(2), 56-67.
- Maurin, J. and López, S. 2015. ¿En qué consisten los efectos antimicrobianos de los extractos de plantas? *Albéitar*, 183: 46-47.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., and Krause, D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, pp. 83-93.
- Mekuriaw S., Tsunekawa A., Ichinohe T., Tegegne F., Haregeweyn N., Nobuyuki K., Tassew A., Mekuriaw Y., Walie M., Tsubo M. and Okuro T., 2020. Mitigating the anti-nutritional effect of polyphenols on in vitro digestibility and fermentation characteristics of browse species in north western Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. 52, pp. 1287–1298. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02126-3>.
- Mendes, J. P., Tsuzuki, T. T., Ferreira, M. B., Garcia, W. R., Valentim, J. K., & Pietramale, R. T. R. (2020). *Haemonchus contortus* e medidas estratégicas de

control para ovinos. *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde*, 24(2), 105-110.

Méndez-Ortiz, F. A., Sandoval-Castro, C. A., Ventura-Cordero, J., Sarmiento-Franco, L. A., Santos-Ricalde, R. H., & Torres-Acosta, J. F. J. (2019). *Gymnopodium floribundum* fodder as a model for the in vivo evaluation of nutraceutical value against *Haemonchus contortus*. *Tropical animal health and production*, 51, 1591-1599.

Mendonça Soares, Robert Domingues, Baldo Gaspar E., Azevedo dos Santos P., Marques Canuto K., Pelegrine Minho A. y Botelho Vieira MI. (2019). In vitro ovicidal effect of a *Senecio brasiliensis* extract and its fractions on *Haemonchus contortus*. *BMC Veterinary Research*. doi: 10.1186/s12917-019-1843-7.

Mhomga, L.I., Adamu, M., Idika, I.K., Sakong, B.M., Marire, B.N. y Nwosu, C.O. 2022. In vitro anthelmintic activities of three ethnomedicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 20 (3) e0504: 1-6. doi: 10.5424/sjar/2022203-18708

Monteiro, G. F., Boaneres, D., Novais, S., França, M. G., Antonini, Y., Barbosa, M., Oki Y., and Fernandes G. W., 2022. Imbalance of water potential and photosynthetic efficiency in the parasitic relationship between *Struthanthus flexicaulis* and *Baccharis dracunculifolia*. *Folia Geobotanica*, 57 (1), pp 71-82.

Morales Ramírez M., Vargas Estrada D., Juárez Rodríguez I., Pérez-Rivero J.J., Sierra Reséndiz A., et al, (2022). Efectos de los fitoestrógenos en la fisiología reproductiva de especies productivas. *Revisión. Rev Mex Cienc Pecu*;13(3):803-829.

Mravčáková, D., Komáromyová, M., Babják, M., Urda Dolinská, M., Königová, A., Petrič, D., Čobanová, K., et al. (2020). Anthelmintic Activity of Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and Mallow (*Malva sylvestris* L.) against *Haemonchus contortus* in Sheep. *Animals*, 10(2), 219. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ani10020219>.

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.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 72, 3,4-Dihydroxybenzoic acid. Retrieved July 28, 2023 from [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3\\_4-Dihydroxybenzoic-acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_4-Dihydroxybenzoic-acid).

Niño Uribe, Á. I. (2022). Estudio de persistencia de la infectividad en los pastos, de larvas de *Haemonchus contortus* susceptibles y resistentes a bencimidazoles, en el sur de la provincia de Corrientes (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

- Olmedo-Juárez A., Rojo-Rubio R., Arece-García J., Salem AZM, Kholif AE & Morales-Almaraz E. (2014) In Vitro Activity of *Pithecellobium Dulce* and *Lysiloma Acapulcensis* on Exogenous Development Stages of Sheep Gastrointestinal Strongyles, *Italian Journal of Animal Science*, 13:4, 3104, DOI: 10.4081/ijas.2014.3104.
- Ondua, M., Mfotie Njoya, E., Abdalla, M.A. *et al.* 2021. Investigation of anthelmintic activity of the acetone extract and constituents of *Typha capensis* against animal parasitic *Haemonchus contortus* and free-living *Caenorhabditis elegans*. *Parasitology Research*. 120: 3437–3449. doi: 10.1007/s00436-021-07269-7.
- Orhan, I. E., Akkol, E. K., Suntar, I., & Yesilada, E. (2019). Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of the extracts and (+)-catechin obtained from *Arceuthobium oxycedri* (DC) M. Bieb (dwarf mistletoe). *South African Journal of Botany*, 120, 309-312.
- Pell AN y Schofield P (1993) Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*. 76, 1063-1073.
- Pérez-Anzúrez, G. Olmedo-Juárez, A.; von Son de Fernex, E.; Alonso –Díaz, M.A., Delgado-Núñez, E.; López Arellano, M.E. González-Cortázar, M.; Zamilpa, A. Ocampo-Gutierrez, A.Y.; Paz-Silva, A. *et al.* 2022. *Arthrobotrys musiformis* (Orbiliiales) Kills *Haemonchus contortus* Infective Larvae (Trichostrongylidae) Through Its Predatory Activity and Its Fungal Culture filtrates. *Pathogens*, 11, 1068. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101068>
- Pérez-Hernández P., Vilaboa-Arroniz J., Chalate-Molina H., Candelaria-Martínez B., Díaz-Rivera P., López-Ortiz S. 2011. Análisis descriptivo de los sistemas de producción con ovinos en el estado de Veracruz, México. *Revista Científica FCV-LUZ* 4(21): 327-334.
- Pernitsky, K.Y., Mason Q.D., Cinel B., y Friedman C.M.R. (2011). Discovery and partial purification of an antibiotic from lodgepole pine dwarf mistletoe (*Arceuthobium americanum*) active against Gram-positive organisms including Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(9), 1722-1727.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223-230.
- Queijeiro-Bolaños, M. E., & Cano-Santana, Z. (2016). Growth of hartweg's pine (*Pinus hartwegii*) parasitized by two dwarf mistletoe species (*Arceuthobium* spp.). *Botanical Sciences*, 94(1), 51-62.

- Queijeiro-Bolaños, M.E., Cano-Santana, Z., García-Guzmán, G., 2014. Incidence, severity, and aggregation patterns of two sympatric dwarf mistletoe species (*Arceuthobium* spp.) in Central Mexico. *European Journal of Forest Research*, 133, 297–306 <https://doi.org/10.1007/s10342-013-0762-6>.
- Quicazán, M., & Caicedo, L. (2012). Inactivación del inhibidor de tripsina durante el tratamiento térmico de bebidas de soya. *Vitae*, 19(1), S337-S339.
- Quiroz-Romero, H. (1994). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Editorial Limusa.
- Rainer C. y Siegfried W. 2006. The Potential of Flavonoids to Influence Drug Metabolism and Pharmacokinetics by Local Gastrointestinal Mechanisms, *Current Drug Metabolism*; 7(7) . <https://dx.doi.org/10.2174/138920006778520570>.
- Ramantsi, R., Mnisi, C.M. and Ravhuhali, K.E., 2019. Chemical composition and in vitro dry matter degradability of mistletoe (*Viscum verrucosum* (Harv.)) on *Vachellia nilotica* (L.) in North West Province of South Africa. *Tropical Agriculture*, 96, pp. 53-60. <https://doi.org/10.37234/TA96012019/0000960106>
- Rodrigues, C.I., da Costa, D.M., Santos, A.C.V., Batatinha, M.J.M., Souza, F.V.D., de Souza, E.H., Botura, M.B., Alves, C.Q., Soares, T.L. and Brandão, H.N. 2020. Assessment of in vitro anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of BRS Boyrá pineapple leaf extracts. *Veterinary Parasitology*, 285:109219.
- Rodríguez, O. A. (2010). Fluctuación de *Dendroctonus adjunctus* Blandford (CURCULINOIDAE: SCOLYTINAE) y sus depredadores atraídos por frontalina + alfa-pineno, en la estación experimental. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*. 11: 20-27.
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. Available at: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/nom-062-zoo-1999?state=published>. Accessed 29 March 2023.
- SAS., 2006. SAS Institute. SAS User's guide: Statistics. Ver 9.0 Cary NC, USA.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., & Iseki, K. (2011). In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International journal of pharmaceutics*, 403(1-2), 136–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.035>
- SEMARNAT y CONANP, 2016. Programa de Manejo Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

- SEMARNAT, 2016. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave de Desempeño Ambiental y de Crecimiento Verde. Edición 2015.
- Sharapin N. (2000) Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTED Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Sharma, A., Sharma, S., Kumar, A., Kumar, V., Sharma, A.K. (2022). Plant Secondary Metabolites: An Introduction of Their Chemistry and Biological Significance with Physicochemical Aspect. In: Sharma, A.K., Sharma, A. (eds) Plant Secondary Metabolites. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-4779-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-16-4779-6_1)
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2019). Anuario Estadístico de la Producción Ganadera. Disponible en: [https://nube.siap.gob.mx/cierre\\_pecuario/](https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/)
- Simmonds M.S.J. 2010. Biopharmaceuticals in Plants. Towards the Next Century of Medicine pp. 206, Volume 47 Issue 1. ISBN-13: 978-1-4398-0474-2.
- Sisay, A., Negesse, T. and Nurfeta, A., 2018. Short chain fatty acid production, organic matter digestibility and metabolisable energy content of indigenous browses from Ethiopian rift valley. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science, 11 (1), pp. 61-68.
- Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM) (2020). Consultado desde: [http://www.economia-sniim.gob.mx/SNIIM-pecuarios-nacionales/estadisticas/e\\_Ganpie2f.asp?cent=911++++++&ACCION=Aceptar](http://www.economia-sniim.gob.mx/SNIIM-pecuarios-nacionales/estadisticas/e_Ganpie2f.asp?cent=911++++++&ACCION=Aceptar).
- SMN., 2022. Servicio Meteorológico Nacional. En: <https://smn.conagua.gob.mx/es/>. (Accesado 07 Noviembre 2022).
- Sotero-García AI., Gheno-Heredia YA., Martínez- Campos AR. And Arteaga-Reyes T., 2016. Plantas medicinales usadas para las afecciones respiratorias en Loma Alta, Nevado de Toluca, México. Acta Botanica Mexicana 114: pp. 51-68. <https://doi.org/10.21829/abm114.2016.1102>
- Sotero-García, A I.; Arteaga-Reyes, Tizbe T.; Martínez-Campos, Ángel R. Y Galicia, Leopoldo. 2018. Efecto de las podas sobre *Arceuthobium* spp. en bosques densos y semidensos de *Pinus hartwegii* (Lindl.). Madera bosques [online]. vol.24, n.2, e2421582. Epub 15-Jun-2018. ISSN 2448-7597. <https://doi.org/10.21829/myb.2018.2421582>.
- Storillo, V. M. (2016). *Resistência, resiliência e sensibilidade de ovinos ao Haemonchus contortus: comparações hematológicas e bioquímicas* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).



- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S. and McAllan, A.B. France J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant's feeds, *Animal Feed Science and Technology*, 48, 185-197, [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Toscana-Aparicio, A. y Granados-Ramírez, R. (2015). Recategorización del Parque Nacional Nevado de Toluca. *Polít. cult.* [online]. 2015, n.44 [citado 2020-09-29], pp.79-105. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-77422015000200005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-77422015000200005&lng=es&nrm=iso). ISSN 0188-7742.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.
- von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M. Á., Mendoza-de Gives, P., Valles-de la Mora, B., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., & Gallegos, E. C. (2015). Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Veterinary Parasitology*, 214(1-2), 89-95.
- Zarza-Albarrán, M. A., Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Mendoza-de Gives, P., González-Cortazar, M., Tapia-Maruri, D., & Zamilpa, A. (2020). Galloyl flavonoids from *Acacia farnesiana* pods possess potent anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. *Journal of ethnopharmacology*, 249, 112402.
- Zavaleta J, *et al.* (2005). Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Revista Horizonte Médico*. 2005, vol. 2, no 5, p. 29-38. Recuperado en: [http://www.revistasacademicas.usmp.edu.pe/\\_uploads/articulos/bff34-art4\\_vol5\\_n2.pdf](http://www.revistasacademicas.usmp.edu.pe/_uploads/articulos/bff34-art4_vol5_n2.pdf).
- Zeb, A., Ullah, F., Ayaz, M., Ahmad, S., y Sadiq, A. 2017. Demonstration of biological activities of extracts from *Isodon rugosus* Wall. *Ex Benth: Separation and identification of bioactive phytoconstituents by GC-MS analysis in the ethyl acetate extract*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17: 1-16. doi:10.1186/s12906-017-1798-9.
- Zúñiga-Bermúdez, G., M. González-Herrera, H. Fernández-Arias y I. R. Cisneros-Barrios. (1994). Estudio de la anatomía e histología del tubo digestivo de *Dendroctonus adjunctus* Blandford (Coleoptera: Scolytidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 62: 23-35.