



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES

“EFECTO ANTIHELMÍNTICO DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Acacia cochliacantha* SOBRE EL  
PARÁSITO NEMATODO *Haemonchus contortus*”

# TESIS

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

**PRESENTA:**

GASTÓN FEDERICO CASTILLO MITRE

Temascaltepec, Estado de México, México, Noviembre de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS  
Y RECURSOS NATURALES

“EFECTO ANTIHELMÍNTICO DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Acacia cochliacantha* SOBRE EL  
PARÁSITO NEMATODO *Haemonchus contortus*”

# TESIS

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

**PRESENTA:**

GASTÓN FEDERICO CASTILLO MITRE

**COMITÉ TUTORAL**

**Tutor académico**

DR. ROLANDO ROJO RUBIO

**Tutores adjuntos**

DR. AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ

DR. JOSÉ FERNANDO VÁZQUEZ ARMIJO

Temascaltepec, Estado de México, México, Noviembre de 2018

## DEDICATORIAS

A mi padre Héctor Castillo Sánchez, que con su ejemplo de vida me ha motivado en todo momento a luchar por mis sueños, ha no rendirme jamás ante las adversidades y culminar todos los proyectos emprendidos.

A mi madre María Elena Mitre Nava ( † ) por todo el amor, el cariño, las enseñanzas y los valores que me inculcó y que me formaron como ser humano.

A mi amada y maravillosa esposa María Ascención Torres Cruz, por su apoyo incondicional tanto en lo económico, emocional y espiritual a lo largo de todos mis estudios de posgrado, y por su ejemplo de vida que ha forjado a mi familia y que nos ha motivado todo el tiempo a fijarnos metas cada vez más altas.

A mis adorados hijos José Agustín Castillo Torres y Elena Montserrat Castillo Torres, porque representan en todo momento el motor principal de mi vida, de mis aspiraciones y de mis deseos de superación personal y profesional.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco infinitamente la oportunidad que me ha dado Dios nuestro señor para llegar hasta este momento de mi vida, de poder llevar a culmino un proyecto de vida que sin su voluntad simplemente no hubiese sido posible.

A la Universidad Autónoma del Estado de México y al Centro Universitario UAEM Temascaltepec, por todo el financiamiento recibido, el material de laboratorio y las instalaciones prestadas para llevar con éxito la presente investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

Al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del INIFAP por el apoyo brindado en el desarrollo de los experimentos realizados en el laboratorio de Helmintología.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas del Sur (CIBIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social por las facilidades brindadas en sus laboratorios de fitoquímica.

Al Dr. Rolando Rojo Rubio, director de mi comité tutorial por su afable apoyo brindado durante todos mis estudios de posgrado.

Al Dr. Agustín Olmedo Juárez, por su invaluable participación y apoyo en la realización de los experimentos, así como su dedicación y apasionada participación en los resultados obtenidos en la presente investigación.

Al Dr. Fernando Vázquez Armijo, por su participación dentro de mi comité tutorial.

Al Dr. Pedro Mendoza de Gives por las facilidades brindadas dentro del CENID-PAVET del INIFAP.

Al Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez y al Dr. Manases González Cortázar por su invaluable participación y dirección en los trabajos realizado dentro del CIBIS Xochitepec.

Al Ing. Agustín Rodríguez Gómez, por su copiosa participación durante el desarrollo de los experimentos in vitro en los laboratorios de Helmintología del CENID-PAVET.

## RESUMEN

El uso de medicamentos químicos antihelmínticos es una herramienta importante para el control de nematodos parasitarios gastrointestinales (NGI) en rumiantes; Sin embargo, su uso continuo y frecuente produce graves problemas de resistencia antihelmíntica y daños ambientales. Durante las últimas décadas, el uso de extractos de plantas se considera un método de control alternativo sobre los parásitos gastrointestinales en pequeños rumiantes, haciendo especial énfasis en el parásito *Haemonchus contortus*, que afecta la salud y la productividad de los animales de manera más severa en comparación con otros NGI. Los objetivos de esta investigación fueron: en primer término, fraccionar un extracto hidroalcohólico de *Acacia cochliacantha*, para evaluar su efecto sobre la inhibición de eclosión de huevos (IEH), del nematodo *Haemonchus contortus*; posteriormente, y en base a los resultados obtenidos en el primer experimento, la fracción orgánica EtAc-F (1,5 g) se re suspendió en una solución de diclorometano (60 ml) y finalmente se obtuvieron dos productos: un precipitado de color naranja (DCMt-P, 350 mg) y una fracción de diclorometano soluble (DCMt-F 1.15 sol). La fracción acuosa se extrajo mediante maceración con metanol (10 g, 50 ml) obteniendo una fracción soluble (Mt-F, 1.25 g), mismas fracciones que fueron evaluadas para determinar su efecto sobre la inhibición de la eclosión de huevos del nematodo *H. contortus*, y finalmente se montó un tercer experimento donde se incluyó las hojas de *A cochliacantha* en dietas de mantenimiento de cabritos de la raza Boer para evaluar su efecto sobre las tasas de eliminación de huevo en heces del parásito nematodo *H. contortus*.

En el primer experimento, las fracciones fueron obtenidas a partir del extracto integro mediante una bipartición con acetato de etilo, con la finalidad de separar por polaridad los compuestos bioactivos e identificarlos cualitativamente mediante cromatografía de capa fina. Tanto al extracto integro, como a las fracciones se les determino un tamizaje fitoquímico cualitativo, para revelar la presencia de flavonoides o terpenos. Los tratamientos fueron: fracción acuosa (FAq) y fracción orgánica (FACeT) a concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.2 y 3.1 mg/ ml. Se utilizó ivermectina al 0.05% como control positivo (C+), agua destilada y dimetilsulfoxido al 2.5% como controles negativos (C-). Los huevos de *H. contortus* fueron expuestos con las fracciones y los controles en placas de 96 pozos durante 48 horas. Los datos de la prueba de IEH, fueron analizados mediante un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar y la comparación de medias se determinó por la prueba de Tukey al 0.05 de significancia. Los resultados del análisis fitoquímico revelan la presencia de flavonoides en la FACeT. En la prueba de IEH se observó que la actividad ovicida de la FACeT, fue contundente en todas las concentraciones, inhibiendo la eclosión al 100 %. Mientras que en la FAq solo se alcanzó a obtener un 40% de IEH en su máxima concentración (50 mg/ ml). En el segundo experimento, las extracciones obtenidas de un extracto hidroalcohólico de hojas de *A. cochliacantha* (HA-E; 60 g) permitieron obtener una fracción orgánica de acetato de etilo (EtAc-F; 1.92 g) y, una fracción acuosa (Aq- F; 58.1 g) que contenía los compuestos más polares. Asimismo, la fracción orgánica EtAc-F (1,5 g) se re suspendió en una solución de diclorometano (60 ml) y finalmente se obtuvieron dos productos: un precipitado de color naranja (DCMt-P, 350 mg) y una fracción de diclorometano soluble (DCMt-F 1.15 sol). La fracción acuosa se extrajo mediante maceración con metanol (10 g, 50 ml) obteniendo una fracción soluble (Mt-F, 1.25 g). Todas estas fracciones se evaluaron a diferentes concentraciones (0.07–25 mg / mL) para identificar una actividad ovicida

(inhibición de la eclosión de huevos, EHI) en busca de un compuesto bioactivo. Se utilizó ivermectina (5 mg / ml) como fármaco de referencia (control positivo). Se utilizaron agua destilada, DMSO al 2,5% y metanol al 4% como controles negativos. Las fracciones que resultaron con la mayor actividad letal del huevo se identificaron mediante procesos de cromatografía. Los datos se analizaron mediante ANOVA y se utilizó una prueba Probit para obtener las concentraciones letales (CL50 y CL90). Resultados Los tratamientos menos polares (AcEt-F, DCMt-F y el precipitado DCMt-P) mostraron las actividades ovicidas más altas (100% EHI; a concentraciones de 3.12, 0.62 y 0.62 mg / mL). Los principales compuestos químicos encontrados en estas fracciones se identificaron como derivados de cafeína y cumarilo, que fueron: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico y quercetina. Los tratamientos menos activos (Aq-F, Mt-F) se identificaron como compuestos con características de espectros UV típicamente de derivados de flavonoides. Finalmente se montó el tercer experimento donde se evaluó la suplementación de hojas de *Acacia cochliacantha* en una dieta de mantenimiento para cabritos de la raza Boer sobre la tasa de eliminación de huevos de *Haemonchus contortus*, consumo de agua y materia seca. Se utilizaron diez cabritos recién destetados con un peso vivo inicial de  $16.850 \pm 1.630$  kg y 3 meses de edad, los cuales fueron infectados con larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *H. contortus* (350 L<sub>3</sub> por kilogramo de peso vivo). Se establecieron dos tratamientos: T1: control (animales infectados con larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus* y sin suplementación con hojas de *A. cochliacantha*) y T2: animales infectados con larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus* y suplementados con 5% hojas de *A. cochliacantha* en la dieta. Las variables medidas fueron HPG, consumo de agua y MS. Los resultados encontrados demostraron reducción ( $p < 0.05$ ) en la eliminación de huevos de *H. contortus* en los cabritos que consumieron las hojas de *A. cochliacantha*, el consumo de agua y materia seca fue similar en toda la fase experimental. Esto nos permite concluir que la adición de hojas de *A. cochliacantha* en dietas para cabritos tienen actividad antihelmíntica, lo cual esta leguminosa arbórea podría representar una opción para integrarla en la alimentación de cabritos Boer bajo un enfoque nutracéutico.

Palabras clave: Leguminosas, ácido cafeico, ácido cumárico, flavonoides.

## ABSTRACT

The use of anthelmintic chemical drugs is an important tool for the control of gastrointestinal parasitic nematodes (NGI) in ruminants; However, its continuous and frequent use produces serious problems of anthelmintic resistance and environmental damage. During the last decades, the use of plant extracts is considered an alternative method of control over gastrointestinal parasites in small ruminants, with special emphasis on the *Haemonchus contortus* parasite, which affects the health and productivity of animals more severely in comparison with other NGI. The objectives of this research were: first, to fractionate a hydroalcoholic extract of *Acacia cochliacantha*, to evaluate its effect on the inhibition of egg hatching (IEH), of the nematode *Haemonchus contortus*; Subsequently, and based on the results obtained in the first experiment, the organic fraction EtAc-F (1.5 g) was re-suspended in a dichloromethane solution (60 ml) and finally two products were obtained: an orange precipitate (DCMt-P, 350 mg) and a soluble dichloromethane fraction (DCMt-F 1.15 sol). The aqueous fraction was extracted by maceration with methanol (10 g, 50 ml) obtaining a soluble fraction (Mt-F, 1.25 g), same fractions were evaluated for ovicidal activity obtaining the egg hatching inhibition of the nematode *H. contortus*, and finally a third experiment was set up where the leaves of *A. cochliacantha* were included in maintenance diets of Boer kids to evaluate their effect on fetal egg elimination rates of the nematode parasite *H. contortus*. In the first experiment, the fractions were obtained from the whole extract by means of a bipartition with ethyl acetate, with the purpose of separating the bioactive compounds by polarity and qualitatively identifying them by means of thin layer chromatography. Both the whole extract and the fractions were subjected to a qualitative phytochemical screening to reveal the presence of flavonoids or terpenes. The treatments were: aqueous fraction (FAq) and organic fraction (FAcEt) at concentrations of 50, 25, 12.5, 6.2 and 3.1 mg / ml. 0.05% ivermectin was used as positive control (C +), distilled water and 2.5% dimethylsulfoxide as negative controls (C-). *H. contortus* eggs were exposed with fractions and controls in 96-well plates for 48 hours. The data from the IEH test were analyzed by means of a variance analysis under a completely randomized design and the comparison of means was determined by the Tukey test at 0.05 of significance. The results of the phytochemical analysis reveal the presence of flavonoids in the FAcEt. In the IEH test it was observed that the ovicidal activity of the FAcEt was strong in all concentrations, inhibiting hatching at 100%. While in FAq only 40% of IEH was reached at its maximum concentration (50 mg / ml). In the second experiment, the extractions obtained from a hydroalcoholic extract of leaves of *A. cochliacantha* (HA-E, 60 g) allowed to obtain an organic fraction of ethyl acetate (EtAc-F, 1.92 g) and an aqueous fraction (Aq). - F; 58.1 g) containing the most polar compounds. Likewise, the organic fraction EtAc-F (1.5 g) was re-suspended in a dichloromethane solution (60 ml) and finally two products were obtained: an orange precipitate (DCMt-P, 350 mg) and a fraction of soluble dichloromethane (DCMt-F 1.15 sol). The aqueous fraction was extracted by maceration with methanol (10 g, 50 ml) obtaining a soluble fraction (Mt-F, 1.25 g). All these fractions were evaluated at different concentrations (0.07-25 mg / mL) to identify an ovicidal activity (inhibition of egg hatching, EHI) in search of a bioactive compound. Ivermectin (5 mg / ml) was used as a reference drug (positive control). Distilled water, 2.5%

DMSO and 4% methanol were used as negative controls. The fractions that resulted with the greatest egg lethal activity were identified by chromatography processes. The data were analyzed by ANOVA and a Probit test was used to obtain the lethal concentrations (LC50 and CL90). Results The less polar treatments (AcEt-F, DCMt-F and precipitate DCMt-P) showed the highest ovicidal activities (100% EHI, at concentrations of 3.12, 0.62 and 0.62 mg / mL). The main chemical compounds found in these fractions were identified as derivatives of caffeine and coumaroil, which were: caffeic acid, ferulic acid, cumárico acid and also a flavonoid quercetin. The less active treatments (Aq-F, Mt-F) were identified as compounds with characteristics of UV spectra typically of flavonoid derivatives. Finally, the third experiment was carried out to evaluate the supplementation of *Acacia cochliacantha* leaves in a maintenance diet for Boer kids on the egg elimination rate of *Haemonchus contortus*, water consumption and dry matter. Ten freshly weaned kids with an initial live weight of  $16,850 \pm 1,630$  kg and 3 months of age were used, who were infected with infective larvae (L<sub>3</sub>) of *H. contortus* (350 L<sub>3</sub> per kilogram of live weight). Two treatments were established: T1: control (animals infected with larvae L<sub>3</sub> of *H. contortus* and without supplementation with leaves of *A. cochliacantha*) and T2: animals infected with larvae L<sub>3</sub> of *H. contortus* and supplemented with 5% leaves of *A. cochliacantha* in the diet. The variables measured were HPG, water and MS consumption. The results showed reduction ( $p < 0.05$ ) in the elimination of eggs of *H. contortus* in the kids that consumed the leaves of *A. cochliacantha*, the consumption of water and dry matter was similar throughout the experimental phase. This allows us to conclude that the addition of leaves of *A. cochliacantha* in diets for kids have anthelmintic activity, which this arboreal legume could represent an option to integrate it into the feeding of Boer kids under a nutraceutical approach.

Key words: Legumes, caffeic acid, cumaric acid, flavonoids.

## CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vi
INDICE DE CUADROS.....	xii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
CAPÍTULO 1. Compuestos secundarios.....	3
<b>2.1.1. Elementos básicos del metabolismo primario en relación con metabolismo secundario de plantas</b> .....	3
<b>2.1.2. TERPENOIDES</b> .....	5
<b>2.1.2.1. Hormonas</b> .....	6
<b>2.1.2.2. Pigmentos</b> .....	12
<b>2.1.2.2. Aceites esenciales</b> .....	14
<b>2.1.3. Alcaloides</b> .....	15
<b>2.1.3.1. Alcaloides Alifáticos</b> .....	17
<b>2.1.3.2. Alcaloides aromáticos</b> .....	19
<b>2.1.3.3. Alcaloides de origen diverso</b> .....	23
<b>2.1.4. Compuestos Fenólicos</b> .....	26
<b>2.1.4.1. Cumarinas</b> .....	29
<b>2.1.4.2. Flavonoides</b> .....	29
<b>2.1.4.3. Lignina</b> .....	30
<b>2.1.4.4. Taninos</b> .....	30
<b>2.1.5. Glicósidos</b> .....	32
<b>2.1.5.1. Saponinas</b> .....	32
<b>2.1.5.2. Glicósidos cardiacos</b> .....	33
<b>2.1.5.3. Glicósidos cianogénicos</b> .....	33
<b>2.1.5.4. Glucosinolatos</b> .....	34
<b>2.1.6. Funciones biológicas de los principales compuestos secundarios de las plantas</b> .....	35
CAPÍTULO 2. Principales enfermedades parasitarias en ovinos.....	41

2.2.1. Nematodos .....	41
2.2.1.1. <i>Características generales</i> .....	41
2.2.1.2. <i>Descripción del género Haemonchus</i> .....	44
2.2.1.3. <i>Descripción del género Trichostrongylus</i> .....	47
2.2.1.4. <i>Descripción del género Ostertagia</i> .....	49
2.2.1.5. <i>Descripción del género Cooperia</i> .....	50
2.2.1.6. <i>Descripción del género Nematodirus</i> .....	51
2.2.1.7. <i>Descripción del género Chabertia</i> .....	53
2.2.1.8. <i>Descripción del género Oesophagostomum</i> .....	54
2.2.1.9. <i>Fase de vida libre</i> .....	55
2.2.2. Trematodos y Cestodos .....	56
2.2.2.1. <i>Características generales de la clase Trematodos y cestodos</i> .....	56
2.2.2.2. <i>Descripción del género Dicrocoelium</i> .....	59
2.2.2.3. <i>Descripción del género Fasciola</i> .....	61
2.2.2.4. <i>Descripción del género Paraphistomum</i> .....	64
CAPÍTULO 3. Principales métodos de control parasitario .....	68
2.3.1. Resistencia, resiliencia y tolerancia .....	6669
2.3.2. Rotación de potreros .....	70
2.3.3. Manejo de la nutrición para mejorar la resistencia de los hospederos .....	71
2.3.4. Terapias alternativas en el control parasitario de ovinos .....	72
2.3.5. Uso de plantas y extractos sobre el control parasitario en ovinos .....	73
3.- JUSTIFICACIÓN .....	76
4.- PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	77
5.- HIPÓTESIS .....	78
6.- OBJETIVOS .....	79
6.1. General .....	79
6.2. Específicos .....	79
7.- RESULTADOS .....	80
CAPÍTULO 4. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE <i>Acacia cochliacantha</i> Y SU EFECTO CONTRA HUEVOS DEL PARÁSITO NEMATODO <i>Haemonchus contortus</i> .....	81
CAPÍTULO 5. Caffeoyl and coumaroyl derivatives from <i>Acacia cochliacantha</i> exhibit ovicidal activity against <i>Haemonchus contortus</i> .....	91

CAPÍTULO 6. El consumo de hojas de <i>Acacia cochliacantha</i> reduce la eliminación de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> en heces de cabritos Boer.....	98
<b>8. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	111
<b>9. CONCLUSIÓN GENERAL</b> .....	114
<b>10. BIBLIOGRAFÍA GENERAL</b> .....	115

## INDICE DE CUADROS

Tabla 1. Lugar de alojamiento en el hospedero del parásito <i>Trichostrongylus</i> de acuerdo a la especie	49
Caffeoyl and coumaroyl derivatives from <i>Acacia cochliacantha</i> exhibit ovicidal activity against <i>Haemonchus contortus</i> .	
Table 1. Results of the <i>Haemonchus contortus</i> egg hatching inhibition effect caused by an <i>Acacia cochliacantha</i> hydroalcoholic extract and five aqueous and organic fractions and its lethal concentration (LC <sub>50,90</sub> )	93
Table 2. Results of the <i>Haemonchus contortus</i> egg hatching inhibition test using <i>Acacia cochliacantha</i> dichloromethanolic sub-fractions and precipitate, major identified compounds	96
El consumo de hojas de <i>Acacia cochliacantha</i> reduce la eliminación de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> en heces de cabritos Boer	
Cuadro 1. Dietas experimentales de mantenimiento utilizadas en la fase experimental en cabritos infectados con <i>Haemonchus contortus</i>	107
Cuadro 2. Resultados del análisis químico proximal de hojas deshidratadas de <i>Acacia cochliacantha</i> y su contenido de taninos	108
Cuadro 3. Resultados del conteo fecal de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> (HPG, media $\pm$ desviación estándar) y porcentaje de eficacia de la dieta adicionada con hojas de <i>Acacia cochliacantha</i>	109
Cuadro 4. Resultados del consumo de agua y materia seca de los cabritos que recibieron las dietas experimentales con y sin hojas de <i>Acacia cochliacantha</i>	110

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas del metabolismo secundario de plantas para la producción de productos nitrogenados, productos fenólicos y terpenos a partir del metabolismo primario	5
Figura 2. Estructura química del Isopreno (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> )	6
Figura 3. Estructura de la 2-[trans-4-(4'clorofenil)ciclohexil]-3-hidroxi-1,4 naftoquinona	13
Figura 4. Estructura química de los monoterpenos del limoneno y mentol	15
Figura 5. Alcaloides derivados de los aminoácidos alifáticos	17
Figura 6. Biosíntesis de la nicotina y anabisisina	19
Figura 7. Estructura química de la esergina, eserina y eserolina	21
Figura 8. Estructura química de la histidina	23
Figura 9. Estructura química de la aconitina	24
Figura 10. Estructura química de la Xantina, alcaloide derivado de la purina	25
Figura 11. Estructura química del fenol	26
Figura 12. Ruta metabólica del ácido siquímico para la biosíntesis de polifenoles	27
Figura 13. Ruta del ácido siquímico: desaminación de la fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de lignina, flavonas, isoflavonas y flavonoides	28
Figura 14. Estructura química del ácido ferúlico y del ácido cafeico	29
Figura 15. Representación gráfica de una molécula de tanino hidrolizable (ácido gálico)	31
Figura 16. Representación gráfica típica de un tanino condensado (flavan-3-ol)	31
Figura 17. Estructura química de la tomatina y la avenacina A-1; saponinas presentes en los tomates y la avena, respectivamente, así como la	

solanina y la chaconina saponinas de la papa	33
Figura 18. Modelo bidimensional de una molécula de amigdalina	34
Figura 19. Estructura química de la sinigrina, glucosinolato presente en las semillas de la mostaza	35
Figura 20. Representación anatómica del parásito nematodo	42
Figura 21. Esquema de un nematodo hembra	44
Figura 22. Estriado característico de las hembras de <i>Haemonchus contortus</i>	46
Figura 23. Ciclo Biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	47
Figura 24. Representación morfológica del nematodo <i>Cooperia spp.</i>	52
Figura 25. Huevo típico de estrongílido (A) y huevo de <i>Nematodirus</i> (B)	54
Figura 26. Esquema general de un trematodo adulto	58
Figura 27. Morfología general de una tenia: (A) Esquema general con las regiones características, (B) Detalle de escólex y (C) Detalle de las proglótides maduras	59
Figura 28. Ciclo biológico de <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	61
Figura 29. Estructura morfológica de <i>Fasciola hepática</i>	63
Figura 30. Ciclo biológico de la <i>Fasciola hepática</i>	65
Figura 31. (A) El parásito adulto en el hospedador final (Rumiantes). (B) Huevo en heces. (C) Miracidios. (D) Hospedero intermediario. (E) Esporocisto, redias hijas, redias nietas y cercarías transformadas dentro del hospedero intermediario. (F) Cercarias libres en el medio. (G) Metacercaria lista para ser ingerida por el hospedero definitivo	66
Figura 32. Escala gráfica de la coloración de la conjuntiva del ojo, método FAMACHA®	73

FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE *Acacia cochliacantha* Y SU EFECTO CONTRA HUEVOS DEL PARÁSITO NEMATODO *Haemonchus contortus*

Figura 1. Identificación de flavonoides del extracto hidro- alcohólico y fracciones de la leguminosa *Acacia cochliacantha*, mediante cromatografía de capa fina 88

Figura 2. Porcentajes de inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* confrontados con la fracción orgánica (FACeT), a partir del extracto hidro-alcohólico de la leguminosa *A. cochliacantha* 88

Figura 3. Porcentajes de inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* confrontados con una fracción acuosa (Fq) a partir del extracto hidro-alcohólico de la leguminosa *A. cochliacantha* 89

Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*

Fig. 1. Results of the HPLC analysis showing *Haemonchus contortus* egg hatching inhibition (EHI) of 5 different fractions from *Acacia cochliacantha* leaves: A) hydroalcoholic extract (HA-E), B) Aqueous fraction (Aq-F), C) Ethyl acetate fraction (EtOAc-F), D) dichloromethane fraction (DCMt-F) and E) methanolic fraction (Mt-F) 94

Fig. 2. Results of the HPLC analysis showing *Haemonchus contortus* egg hatching inhibition (EHI) of 6 different fractions from *Acacia cochliacantha* leaves assessed at 1 mg/mL: A) dichloromethane fraction (DCMt-F), B) fraction C1F1, C) fraction C1F2, D) fraction C1F4, and E) fraction C1F6 95

Fig. 3. Chemical structure of anthelmintic hydroxycinnamic derivatives from *A. cochliacantha* leaves 96

Fig. 4. Images taken through an optical microscope showing *Haemonchus contortus* eggs (40x): A) morulated egg, B) embryonated egg (control), C) and D) *H. contortus* eggs after exposure to a *Acacia cochliacantha* DCMt-F fraction. Bar scale (40  $\mu$ M) 96

## 1.- INTRODUCCIÓN

La ganadería a nivel mundial atraviesa por serios problemas derivados a las pérdidas que ocasionan la infección causada por helmintos, los cuales representan un problema médico tanto para los humanos como para los animales domésticos. Las pérdidas económicas en la ganadería son cuantiosas, en México se estiman pérdidas millonarias que oscilan en los \$445.1 millones de dólares (Rodríguez *et al.*, 2017). Tradicionalmente los productores en aras de minimizar los efectos de altas cargas parasitarias, recurren al uso indiscriminado de sustancias químicas, estrategia que ha sido ineficiente debido a la carencia de criterios técnicos para su uso y aplicación de estos fármacos, lejos de mejorar la situación la ha agravado seriamente a través del tiempo ya que en las últimas décadas se ha incrementado el fenómeno de resistencia antihelmíntica que no es otra cosa que la disminución en la efectividad de los desparasitantes contra una población de parásitos (Papadopoulos, 2008). Por otro lado, también existe la controversia sobre los efectos causados al medio ambiente por el uso de estos fármacos antiparasitarios; de los antihelmínticos disponibles y actualmente de los más usados por los productores, son las ivermectinas/milbemicynas las que probablemente ejercen más efectos negativos sobre el medio ambiente, especialmente en las poblaciones de insectos benéficos asociados al estiércol, principalmente en sus formas larvianas (Marquéz, 2003). Diferentes vías de administración de estas drogas conducen a variadas concentraciones en las heces, lo que origina efectos que van desde toxicidad aguda en larvas y adultos hasta disrupción de la metamorfosis, e incluso, la interferencia de la reproducción. Así, por ejemplo, se ha demostrado que algunos dípteros son particularmente sensibles a estos efectos residuales en las heces de los rumiantes, observándose desde mortalidad larval hasta el desarrollo de anomalías en los estados adultos. Strong *et al.*, (1996) demostraron los efectos tóxicos de ivermectina excretada en el estiércol sobre algunas familias de insectos colonizadoras de heces en un experimento realizado con tres grupos de bovinos tratados con ivermectina y fenbendazol, observaron que en el estiércol de animales tratados con ivermectina no hubo desarrollo del díptero *Cyclorhapha spp.* y las larvas del díptero *Scarabaeidae spp.* fueron significativamente menores y con desarrollo inhibido que en los grupos tratados con fenbendazol y control no tratado.

Dentro de los endoparásitos los que mayor prevalencia y daño ocasionan, son los nematodos, estos endoparásitos pertenecen a la clase Nematoda, palabra que proviene del griego “nematos· que quiere decir “filiforme”. Estos endoparásitos tienen forma cilíndrica y están cubiertos por una cutícula quitinosa, estos endoparásitos están presentes en la mayoría de los rumiantes de diferentes regiones del mundo; su mayor o menor presencia se ve determinada por factores propios de los parásitos y por factores medio ambientales como el clima, el manejo animal, la edad de los animales, etapa de crecimiento de la pradera, etc. Entre los géneros de nematodos más importantes que afectan a los rumiantes se encuentran: *Haemonchus spp.*, *Mecistocirrus spp.*, *Ostertagia spp.*, *Trichostrongylus axei*, *Cooperia spp.*, *Bunostomum spp.*, *Nematodirus spp.*, *Oesophagostomum spp.* y *Dictyocaulus spp.* (Marquéz, 2003).

El *Haemonchus contortus*, es el nematodo gastrointestinal que más infectan tanto a bovinos, ovinos, caprinos y otros rumiantes en todo el mundo, sobre todo en regiones cálidas y húmedas. Este parásito es el gusano intestinal más frecuente y dañino, sobre todo para ovinos y el que representa

mayores pérdidas económicas para los productores alrededor del mundo. Las larvas y los adultos de este nematodo perforan o dañan la mucosa estomacal y chupan sangre de los vasos sanguíneos adyacentes, lo que causa inflamación (gastritis) y ulceración de la pared estomacal. Mientras chupan sangre liberan un anticoagulante en la herida lo que aumenta la pérdida de sangre y agrava la anemia. Esta particularidad en su sistema de alimentación del nematodo provoca una deficiencia en el aprovechamiento de los nutrientes y puede ocasionar, en casos severos de infestación la muerte de los animales (Marume *et al.*, 2011).

Para tratar de disminuir el creciente problema de la resistencia antihelmíntica, es necesario buscar nuevas alternativas de control parasitario, las leguminosas arbóreas y arbustivas presentes en las zonas de pastoreo de los rumiantes además de representar una opción para la alimentación del ganado, poseen propiedades medicinales que podrían ayudar a controlar las nematodiasis (Olmedo *et al.*, 2015). Actualmente existen bioensayos en condiciones de laboratorio que son de gran utilidad para evaluar las plantas en forma de extractos o fracciones sobre los nematodos gastrointestinales; considerando distintas etapas de vida del parásito como la inhibición de eclosión de huevos, desarrollo larvario y mortalidad de larvas infectantes. Los usos de estas pruebas permiten hacer una selección previa de las plantas que pueden ser candidatas a evaluaciones bajo condiciones *in vivo*. La leguminosa *A. cochliacantha* es un árbol que tiene diferentes compuestos fenólicos y polifenólicos, así como flavonoides. Diversas investigaciones han demostrado que plantas con estos compuestos tienen actividad antihelmíntica (Olmedo *et al.*, 2015; Von Son-de-Fernex *et al.*, 2012).

## 2.- REVISIÓN DE LITERATURA

### CAPÍTULO 1. Compuestos secundarios

#### 2.1.1. Elementos básicos del metabolismo primario en relación con metabolismo secundario de plantas

En el reino vegetal al igual que en todos los seres vivos se llevan a cabo diversas reacciones químicas catalizadas por enzimas con la finalidad de sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples, esta serie de reacciones químicas se denomina metabolismo, en las plantas y organismos autótrofos, este metabolismo se divide en dos:

1. El metabolismo primario que lleva a cabo funciones específicas de supervivencia, crecimiento, desarrollo y reproducción, y
2. El metabolismo secundario que no necesariamente están involucrados en estos procesos, estos metabolitos secundarios están encaminados a funciones ecológicas, de reproducción y de defensa contra los diversos factores que afectan el desarrollo de las plantas.

Ambos procesos dan lugar a compuestos químicos con diferentes funciones, en el metabolismo primario se sintetizan sustancias que sirven para el crecimiento y desarrollo de las plantas y que su función es básica en el organismo, este tipo de metabolismo sigue patrones muy similares en la mayoría de las células vivas. El metabolismo secundario produce una serie de metabolitos secundarios que poseen funciones esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, además de funcionar como un mecanismo de defensa en contra de bacterias, virus, hongos y ataque de herbívoros y protección contra factores medioambientales como la escasez de agua y nutrientes, bajas o altas temperaturas o las radiaciones UV (Salunkhe *et al.*, 1990).

En el metabolismo primario, la mayor parte del carbono, el nitrógeno y de la energía son destinados a sintetizar moléculas comunes a todas las células, necesarias para el correcto funcionamiento de los organismos, entre estas moléculas encontramos los aminoácidos, los nucleótidos, los azúcares y los lípidos, entre otros y básicamente desempeñan las mismas funciones en todas las especies.

En el metabolismo secundario. las plantas, a diferencia de otros organismos, destinan una importante cantidad de carbono asimilado y de la energía para la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que al parecer, no tienen una función de manera directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, estos metabolitos secundarios están más bien encaminados a funciones de protección contra herbívoros, procesos de fotooxidación, algunos como atrayentes de insectos para fomentar la polinización, entre otros procesos.

Sin embargo, los metabolitos secundarios presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se

sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia o incluso a algunas especies.

Estos metabolitos secundarios se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas y muchos han cobrado una gran importancia debido a que se les han dado diferentes usos y aplicaciones en la industria, algunos se utilizan como ingrediente activo en medicamentos, insecticidas perfumes o colorantes, entre otros (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a las flores y frutos, jugando un papel primordial en la reproducción de las plantas ya sea atrayendo a insectos polinizadores o mediante las esencias y colores de los frutos haciéndolos más apetitosos para los animales que los consumen contribuyendo con la dispersión de las semillas.

Otros compuestos funcionan como una barrera protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a algunas plantas sabores amargos o haciéndolas indigestas o incluso venenosas. También intervienen en mecanismos de defensas de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

Los compuestos secundarios presentes en algunos organismos vegetales se han utilizado por décadas y sus usos con fines medicinales y terapéuticos es tan antiguo como la civilización misma, Hipócrates dijo 400 años A.C. "DEJA QUE EL ALIMENTO SEA TU MEDICINA Y TU MEDICINA TU COMIDA", sin embargo, su estudio científico con fines terapéuticos y profilácticos en la sanidad animal es relativamente reciente tan solo 2 décadas aproximadamente.

Las principales rutas de biosíntesis de productos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono, y estas son: ruta del ácido siquímico, ruta del ácido malónico, ruta del ácido mevalónico y ruta del metileritritol fosfato (Lincoln y Zeiger, 2006) (Figura 1).

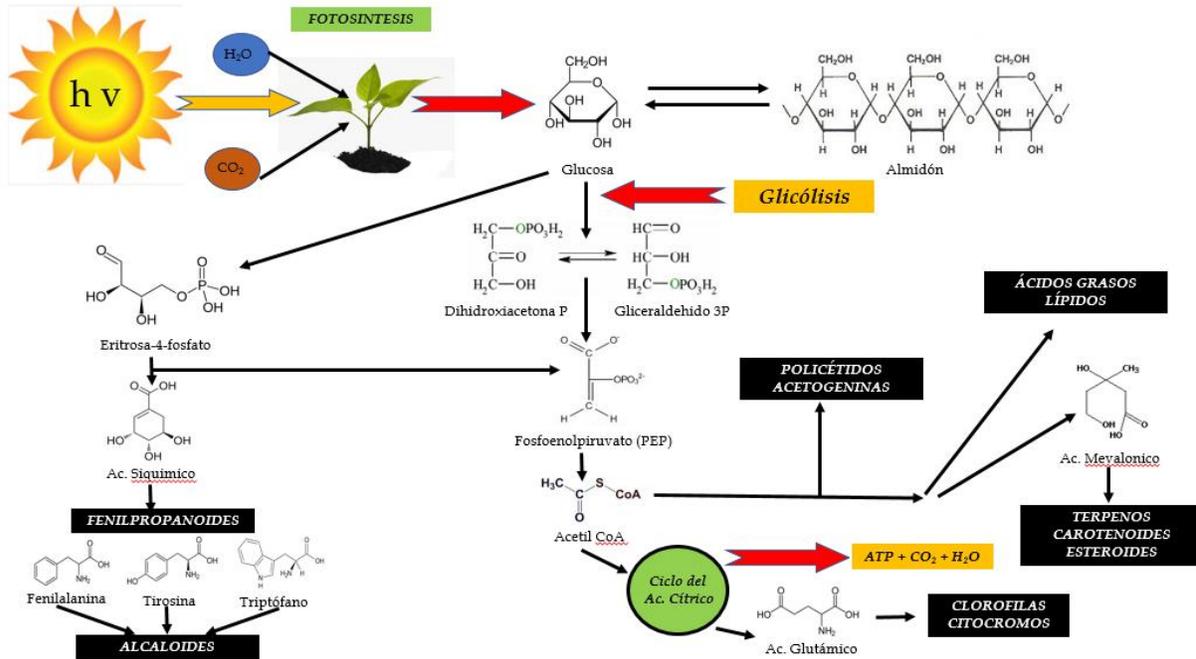


Figura 1. Rutas del metabolismo secundario de plantas para la producción de productos nitrogenados, productos fenólicos y terpenos a partir del metabolismo primario.

Los compuestos secundarios suelen ser agrupados según las sustancias químicas que los constituyen, en forma general podemos identificar a los terpenos (lactonas sesquiterpénicas, saponinas); a los compuestos fenólicos como los taninos, fitoestrógenos y cumarinas; a las toxinas nitrogenadas (alcaloides), y a los glicósidos cianogenéticos, glicósidos cardíacos glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lectinas e inhibidores de las proteasas (Ramos *et al.*, 1998).

### 2.1.2. TERPENOIDES.

Por lo general, los terpenos son insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) (figura 2). De tal manera que los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno que contengan, es decir que tenemos los llamados monoterpenos con dos unidades de C<sub>5</sub>, los sesquiterpenos con tres unidades de C<sub>5</sub>, los diterpenos tienen 4 unidades de C<sub>5</sub>, los triterpenos que contiene 30 C, los tetraterpenos con 40 C y finalmente se denominan politerpenos cuando tiene más de 8 unidades de isopreno.

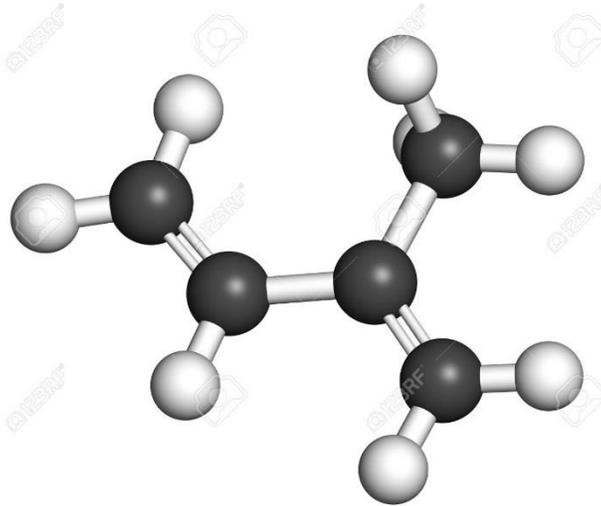


Figura 2. Estructura química del Isopreno ( $C_5H_8$ )

Estos terpenos o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con más de 40000 moléculas diferentes. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas, entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (involucradas en el proceso fotosintético), ubiquinonas (proceso respiratorio) y esteroides que son parte importantísima de la estructura de membranas celulares.

#### **2.1.2.1. Hormonas**

Las plantas, al igual que los animales, producen en sus células pequeñas cantidades de sustancias químicas que participan en la regulación de ciertos procesos fisiológicos con la diferencia que en los animales estas hormonas se producen en las glándulas que son órganos especializados para ello, y en las plantas estas sustancias se producen en los tejidos vegetales y posteriormente son liberadas en los tejidos de transporte para actuar sobre tejidos más alejados. Es importante mencionar que en un mismo proceso existe un efecto de interacción entre las diferentes hormonas segregadas y a su vez cada hormona influye en varios procesos resultando muchos de ellos comunes a varias hormonas, algunos procesos en los que se ven involucradas las hormonas son en el crecimiento tanto de las partes aéreas como del sistema radicular de las plantas, también se ven involucradas en la apertura estomática, la floración, la germinación y el desarrollo de los frutos, entre otros procesos (Squeo y Cardemi, 2006).

Con fines prácticos y dependiendo de su intervención en los diferentes procesos fisiológicos de las plantas, las hormonas se clasifican como: hormonas principales (Giberelinas, Etileno, Ácido abscísico, Auxinas y Citoquininas) y hormonas secundarias (Brasinoesteroides, Jasmonatos, Ácido salicílico, Sisteminas, Poliaminas, Oligosacarinas y Estrigolactonas).

## Giberelinas

Las Giberelinas (GAs) son compuestos naturales que actúan como reguladores endógenos del crecimiento y desarrollo de los vegetales superiores, son consideradas como reguladores esenciales del desarrollo, es decir fitohormonas que afectan, regulan o modulan múltiples y variadas respuestas del crecimiento en el reino vegetal. De acuerdo a su estructura química, las giberelinas constituyen una familia de diterpenos tetracíclicos ácidos, cuya estructura básica está constituida por un anillo de ent-giberelano, la mayoría de las giberelinas no poseen la capacidad *per se* para regular el desarrollo de las plantas, de hecho, casi todas las giberelinas son precursores o productos inactivados, laterales o finales de las rutas que sintetizan la GAs activas. La GAs C<sub>19</sub> que portan un grupo hidroxilo en la posición 3β (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>) muestran una mayor actividad biológica, las GAs activas se desactiva mediante la incorporación de un grupo de 2β-hidroxilo y la presencia de un grupo ácido en la posición C<sub>20</sub> también confiere inactividad irreversible. Por lo tanto, las GAs 2β-hidroxiladas. Las tricarboxilicas, los conjugados de GAs y los catabolitos de GAs tienden a acumularse *in vivo*, mientras que los intermediarios permanecen en niveles bajos (Davies, 2004).

Las GAs se encuentran en forma comercial como ácido giberélico que se obtiene de la fermentación de los extractos del hongo *Gibberella*. Se emplean en la producción de uva sin semilla, para aumentar el tamaño y la calidad de la manzana, estimula el desarrollo del tallo, interrumpe la latencia de tubérculos, además de utilizarse como iniciador de la germinación, para inducir una floración precoz e incrementar la proporción de flores masculinas, entre otros usos.

## Etileno

El etileno es una fitohormona que se encuentra en estado gaseoso presente en los organismos vegetales, debido a su naturaleza su movilidad a través de los tejidos vegetales es mucho mayor en comparación al de las demás hormonas, además de que solo se requiere una ínfima cantidad para producir efectos sobre la planta. El etileno puede ser degradado mediante oxidaciones sucesivas, pasando por etilénóxido, etilenglicol, ácido oxálico y finalmente CO<sub>2</sub>, el etileno se ha utilizado en la agricultura para retrasar la maduración de los frutos una vez cosechados mediante la oxidación a etilenglicol mediante reacciones con permanganato de potasio. El etileno también ha sido utilizado no solo para inducir la floración, sino también para sincronizarla de manera que el tamaño y grado de maduración de la fruta es más homogéneo lo que facilita la cosecha al reducir el número de recolectas. Sin embargo, los efectos más conocidos del etileno son sobre la maduración de los frutos, conforme va avanzando el nivel de maduración se va dando la transformación del almidón en azúcares, se da el ablandamiento y degradación de las paredes celulares junto con el desarrollo de aromas, sabores y colores (Chen *et al.*, 2009).

## **Ácido abscísico**

El ácido abscísico es una de las principales fitohormonas que está presente en todas las plantas vasculares, en la mayoría de los musgos y en algunos especímenes del reino fungí. Dentro de la planta, esta fitohormona puede encontrarse en casi todos los tejidos, sintetizándose en cualquier célula que posea un cloroplasto o un amiloplasto, aunque en mayoría se sintetiza en las células que contienen un cloroplasto, siguiendo la ruta de los carotenoides, en términos generales la mayor parte del ácido abscísico es biosintetizado en las raíces y hojas, viajando a través de los tejidos conductivos del xilema o floema. El ácido abscísico (ABA) es una hormona inhibidora del crecimiento y desarrollo, actúa sobre la semilla induciendo la tolerancia a la desecación fomentando la acumulación de determinados RNA mensajeros que codifican la producción de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), además de contribuir con otras hormonas en el incremento de la acumulación de proteínas de reserva en la semilla, evita que las semillas germinen precozmente de tal manera que evita la formación de semillas vivíparas, es decir, que las semillas hayan germinado precozmente en el interior del fruto húmedo, su efecto sobre la dormición de la semilla termina cuando sus niveles varían frente a la presencia de otras hormonas, específicamente, su efecto del ABA termina cuando las giberelinas inducen el proceso de germinación.

El efecto del ABA en la planta está relacionada a la respuesta que tiene al estrés de diversos tipos, aunque en términos generales su acción está ligada a la entrada de un estado de latencia o una inhibición del crecimiento, esto sucede en los periodos de frío donde el ABA junto con otras hormonas inducen la dormición de las yemas para protegerlas del frío. Durante un estrés hídrico el ABA induce el cierre de los estomas, inhibe el crecimiento del tallo e incrementa el crecimiento de las raíces, este proceso se da cuando las raíces detectan la falta de agua lo que incrementa la biosíntesis del ABA lo que lleva a un considerable incremento de la circulación del ABA en toda la planta a través del xilema. De igual manera el ABA participa en otras situaciones de estrés en las plantas como lo son el causado por lesiones o heridas físicas, pero las respuestas son variadas dependiendo de la planta de la que se trate (Taiz y Zeiger, 2006; Squeo y Cardemi, 2006).

## **Auxinas**

Las auxinas ocupan un lugar importante en el tema de las fitohormonas, ya que, por un lado, fue la primera hormona a la cual se le atribuyeron efectos sobre el crecimiento de las plantas, y por otro, es la única hormona que juega un papel vital en la planta. La palabra Auxina deriva del griego *auxin*, que literalmente significa “crecer” de tal manera su principal actividad biológica es muy similar a la del ácido 3-indolacético (AIA) que es la participación en la elongación celular en el coleóptilo y las secciones del tallo, además de participar en la división celular en cultivos de callos en presencia de citoquininas, también puede promover la formación de raíces adventicias en hojas y tallos cortados y otros fenómenos del desarrollo relacionados con la acción del AIA.

Las auxinas se sintetizan principalmente en el meristemo apical del tallo y raíces, en embriones y endospermo de frutos en crecimiento, en hojas jóvenes, nódulos y tumores entre otros, además,

en pequeñas proporciones también son sintetizadas en hojas maduras. La biosíntesis de las auxinas está relacionada con el aminoácido triptófano como posible precursor a través de varias rutas metabólicas siendo las principales: la ruta del ácidoindol-3-pirúvico (IPA), la ruta de la triptamina (TAM) y la ruta del índol-3-acetonitrilo (IAN), existe otra ruta biosintética que depende del triptófano, esta ruta utiliza el indol-3-acetamida como un intermediario, esta ruta es realizada por bacterias patógenas del género *Agrocacterium* (Ferguson *et al.*, 2009).

En la célula el AIA se acumula en dos órganos el citosol y los cloroplastos, la distribución del AIA en estos dos órganos está relacionada con el pH, como el AIA no puede atravesar las membranas por sí mismo, tiende a acumularse en los compartimentos más alcalinos de la célula, mientras que el AIAH se difunde rápidamente a través de ella.

Las auxinas están involucradas en muchos procesos del desarrollo vegetal debido a que afectan a la división, el crecimiento y la diferenciación de las células, sin embargo, su acción no es aislada, también influyen otras hormonas como el etileno, las giberelinas y las citoquininas.

Normalmente el enraizamiento, es decir, la formación de raíces adventicias en la base del esqueje es un proceso espontáneo, sin embargo, en especies recalcitrantes se ha comprobado que la aplicación de AIA auxinas sintéticas como la IBA y NAA, estimula el enraizamiento. En las especies en las que se manifiesta la dominancia apical, la supresión de la yema principal permite el crecimiento de las yemas laterales, este crecimiento de la yema principal puede ser inhibido cuando se aplica auxinas al corte. Las auxinas también influyen en la abscisión (caída de las hojas, flores y fruto de las plantas vivas). La zona de abscisión de las hojas está localizada cerca de la base del peciolo, durante la senescencia de las hojas, las paredes de las células en la capa de abscisión son digeridas, lo que hace que las hojas se vuelvan suaves y débiles y al final la capa de abscisión se parte debido a la tensión sobre las paredes celulares debilitadas. En las hojas jóvenes los niveles de auxinas son altos, disminuyendo progresivamente en las hojas maduras y son relativamente bajos en las hojas senescentes.

Las auxinas también están implicadas en el desarrollo del fruto, las auxinas se producen en el polen, en el endospermo y en el embrión de la semilla en desarrollo. Una polinización satisfactoria inicia el crecimiento del óvulo, a este proceso se le conoce como “cuajado del fruto”. El endospermo del fruto aporta las auxinas durante la primera etapa de desarrollo del fruto y el embrión en desarrollo puede sustituirlo como principal fuente de auxinas durante etapas posteriores. En muchas plantas angiospermas, las auxinas estimulan la partenocarpia de los frutos, los frutos partenocarpicos se caracterizan por la ausencia de semillas, esta partenocarpia se puede producir de forma espontánea cuyos ovarios contienen mayor concentración de auxinas que en aquellas que requieren de fertilización (Ferguson *et al.*, 2009).

## Citoquininas

Las citoquininas naturales son conocidas como derivados de una base púrica adenina (6-aminopurina). Estas citoquininas se clasifican de acuerdo a la naturaleza del sustituyente en N<sub>6</sub> de la adenina formando tres grupos, el primero denominado citoquininas isoprenoídicas (Zetina Z), la isopentenila y la dehidrozeatina, la única diferencia entre estos tres tipos de citoquininas es que la dehidrozeatina posee su cadena lateral saturada. Las citoquininas estimulan la división celular en los cultivos de tejidos vegetales no meristemáticos, es decir que, si un cultivo crece en presencia de AIA, existe un efecto de mitosis, pero en cuanto existe la división celular da lugar a células binucleadas, al añadir una citoquinina hay un aumento de la mitosis acompañada de citocinesis.

Su función biológica de las citoquininas es muy variada, en la parte aérea de las plantas, estimula el alargamiento de células en discos de hojas estioladas, e incluso logran alargar células de hojas desarrolladas además de favorecer el ensanchamiento de las células. Las citoquininas también ejercen una acción morfogénica, ya que inducen a la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos, bajo condiciones apropiadas de cultivo. El efecto sobre el tejido radicular de las plantas se ejerce cuando aumenta la concentración de quinetina (citoquinina) en relación con la auxina, este aumento induce la formación de brotes, que pueden desarrollarse y dar lugar a la formación de una plántula. Por el contrario, si la quinetina disminuye, se favorece la diferenciación de raíces.

Las citoquininas pueden sustituir la luz roja para romper el reposo de semillas de lechuga o tener un efecto de sinergismo con la luz cuando está estimulada la germinación. Otro efecto que puede tener las citoquininas, es la capacidad de retrasar la senescencia al retardar el tiempo de desaparición de la clorofila y la degradación de las proteínas que acompañan la senescencia.

Las citoquininas circulan por toda la planta desde la raíz hasta el tallo y las hojas, circulando a través del xilema y el floema, las citoquininas que se sintetizan en la raíz (zeatina y ribósido) son transportadas a lo largo del xilema hacia las hojas donde se acumulan durante la primavera e inicio del verano, cuando las hojas alcanzan su máximo desarrollo, estas citoquininas son metabolizadas y los metabolitos resultantes son conducidos a través del floema a otros órganos, muy probablemente a los frutos.

Los glucósidos de citoquininas son muy abundantes en las plantas y se han encontrado prácticamente en casi todos los órganos (excepto exudados de xilema), cuando los niveles de citoquininas libres aumentan en forma acelerada, alcanza niveles tóxicos o cuando no son necesarias para el crecimiento del órgano en cuestión, las citoquininas forman glucósidos, los cuales tienen una función de almacenamiento como derivados inactivos. El nitrato potásico o el sulfato amónico aplicado al suelo durante la fertilización química, aumenta considerablemente el contenido de citoquininas en hojas y xilema de la planta de arroz, por otra parte, los niveles bajos de fósforo conllevan a niveles reducidos de citoquininas, por otro lado, las condiciones de estrés como sequías, bajo pH, fotooxidación, etc. Influyen en los niveles de actividad de la citoquinina en tejidos y exudados xilemáticos (Davies, 2004; Ferguson *et al.*, 2009).

## **Brasinoesteroides**

Los brasinoesteroides son moléculas pertenecientes al grupo de los triterpenoides estructuralmente similares a las hormonas esteroides de los humanos, ambas moléculas son sintetizadas a partir de un esterol como precursor. Los brasinoesteroides desempeñan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo vegetal, plantas con enanismo presentan menor fertilidad, hojas más redondeadas y rizadas, diferenciación vascular irregular y una escotomorfogénesis anormal, además de una reducción en la longitud de las raíces, peciolo, hojas y frutos (Davies, 2004).

## **Jasmonatos**

El ácido jasmónico es un ciclopentano derivado de ácidos grasos que se pueden encontrar en la mayor parte de los vegetales, actúan como regulador de procesos fisiológicos de algunos animales como los insectos, dado la expansión de este tipo de molécula en el mundo eucariota, los jasmonatos son moléculas de gran interés biológico. Los jasmonatos pertenecen a una familia de derivados de ácidos grasos oxigenados conocidos como oxilipinas, mismos que se producen a través de la vía de biosíntesis oxidativa de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente a partir del ácido linoleico y controlan los procesos tanto de desarrollo como de defensa de las plantas. Los jasmonatos desempeñan un papel esencial en los mecanismos de defensa de las plantas, protegiéndolas tanto de enfermedades como de ataques de insectos, actúan como señal para la expresión de inhibidores defensivos de proteasas (Fahad *et al.*, 2015).

## **Ácido Salicílico**

El ácido salicílico es una hormona vegetal perteneciente a los compuestos fenólicos y está presente en todos los órganos vegetales, participa en la regulación del crecimiento, desarrollo e interacción de las plantas con otros organismos patógenos además de inducir la defensa de las plantas a diferentes tipos de estrés ambiental como es el caso de las sequías, alta salinidad de los suelos, inundaciones o cambios bruscos de temperatura, entre otros. En el caso de ambientes salinos se ha demostrado que plantas bajo tratamiento de ácido salicílico pueden resistir a condiciones de salinidad, debido a que las plantas tienden a acumular solutos compatibles como la prolina y la glicina betaína. Esta biomolécula activa los mecanismos de defensa de las plantas ante la incidencia de cualquier patógeno a través del mecanismo de resistencia sistémica adquirida (RSA) gracias a la síntesis de diferentes compuestos como fitoalexinas, fitoanticipinas y proteínas relacionadas con la patogenicidad que proporcionan a la planta una defensa efectiva contra una gran cantidad de patógenos. La aplicación exógena del ácido salicílico ha demostrado que induce la expresión de genes antipatogénicos de tal manera que induce la resistencia contra virus, bacterias y hongos patógenos (Fahad *et al.*, 2015).

Otros efectos del ácido salicílico son de que incrementa la termogénesis, es decir que aumenta la temperatura en ciertos lugares de la planta o en ciertos órganos lo que fomenta a la formación de órganos o tejidos nuevos, también se ha demostrado que el ácido salicílico aplicado de forma exógena retrasa la senescencia de hojas y pétalos proceso muy utilizado en ornamentales (Vlot *et al.*, 2009).

## **Sisteminas**

Las sisteminas son fitohormonas-polipéptidos-fitorreguladores que liberan las planta (principalmente de la familia solanácea) cuando son atacadas por herbívoros o sufren un daño mecánico. La respuesta de las plantas ante daños mecánicos se da en dos niveles, el primer nivel de respuesta es local, esto implica la síntesis de fitoalexinas y posteriormente el efecto es sistémico, donde se manifiestan a distancia y viene instados por la señalización secundaria producida por las células apoptóticas o células que ha activado genes defensivos. Posteriormente las respuestas secundarias preparan a los tejidos y órganos para defenderse de un proceso, mediante la elevación de los niveles de toxinas defensivas constitutivas, de receptores de patógenos y de reforzamiento estructural de paredes celulares en tejidos. Esta respuesta dirigida contra patógenos se le conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR) o resistencia sistémica inducida (ISR) (Vlot *et al.*, 2009).

### **2.1.2.2. Pigmentos**

El termino pigmento es utilizado para describir una molécula que absorbe luz y presenta un color específico. Las plantas contienen una gran variedad de pigmentos que dan lugar a los colores específicos de cada una de ellas, prácticamente toda la planta contiene muchas moléculas orgánicas que absorben luz, principalmente las flores y los frutos contiene muchas de estas moléculas, sin embargo, también las hojas, tallos y raíces contiene pigmentos que incluyen las antocianinas, flavonoides, flavinas, quinonas y citocromos, sin embargo, estas moléculas no son consideradas como pigmentos fotosintéticos. Los pigmentos fotosintéticos son los únicos que tienen la capacidad de absorber la energía de la luz solar y hacerla disponible para el proceso fotosintético. En las plantas terrestres hay dos clases de pigmentos fotosintéticos: las clorofilas y los carotenoides.

Los pigmentos clorofílicos son el pigmento biológico más abundante en la tierra y debe su color verde a su capacidad de absorber las fracciones roja y azul de la luz solar, transmitiendo los demás colores cuya mezcla apreciamos en diversas tonalidades de verde, su función primordial de la clorofila es la de absorber la energía solar y esa capacidad está determinada por la concentración de la misma y de otros pigmentos accesorios, pero también depende obviamente de la cantidad de luz disponible y de la calidad de la misma.

Los carotenoides (carotenos y xantofilas) son derivados tetraterpénicos que presentan dobles enlaces conjugados y un anillo ciclohexano sustituido insaturado en cada extremo de la cadena lineal. El caroteno más importante en las plantas es el  $\beta$ -caroteno y la luteína es la principal xantofila,

su principal función es la disipación de la energía en exceso y en la detoxificación de las formas reactivas del oxígeno que se forma durante el proceso fotosintético (Demming *et al.*, 1992).

Las naftoquinonas son pigmentos naturales, que tiene como característica estructural poseer dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 y en ocasiones en 1,2 o 1,3 en el anillo del naftaleno de donde deriva su nombre común. Es muy amplia su distribución ya que se han aislado de las plantas, hongos, bacterias e inclusive de animales, sin embargo, están en una mayor proporción en plantas de determinadas familias de Angiospermas como la *Ebenaceae*, *Droseraceae*, *Bignoniaceae*, *Verbenaceae*, *Plumbaginaceae*, *Juglandaceae* y *Boraginaceae*. Además de resaltar sus propiedades como pigmento natural, las naftoquinonas poseen importantes actividades biológicas como agentes antiparasitarios, antibacterianos, antifúngicos y anticancerígenos (López *et al.*, 2011).

La síntesis de la 2-[trans-4-(4'-clorofenil) ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftoquinona (Figura 3) conocida como atovaquona ha sido ampliamente utilizado como un fármaco en contra del parásito *Plasmodium* causante de la malaria, cuyo mecanismo de acción actúa sobre la cadena respiratoria mitocondrial de los parásitos sensibles entre el citocromo B y el C1 del complejo III (Evans, 2000).

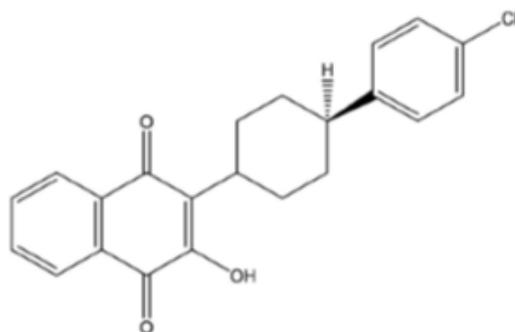


Figura 3. Estructura de la 2-[trans-4-(4'-clorofenil)ciclohexil]-3-hidroxi-1,4naftoquinona

Otros parásitos susceptibles a las naftoquinonas son *Leishmania*, *Tripanosoma* y *Toxoplasma*. Las sales de potasio y acetato del lapachol, isolapachol y dihidrolapachol han mostrado actividad contra *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, especies que se relacionan con la leishmaniasis tegumentaria. Derivados de 1,4-naftoquinona con sustitución 2 y 3 por diferentes aminas muestran actividad contra *Tripanosoma cruzi*. La naftoquinona hidroxilada 2-hidroxi-3-(1-propen-3-fenil)-1,4-naftoquinona se reporta con actividad antiparasitaria contra *Toxoplasma gondii*. Compuestos con estructura 2-hidroxi-3-alkil-1,4-naftoquinona, han demostrado actividad en contra *Biomphalaria glabrata*, quien es el huésped intermediario en el ciclo de infección del parásito *Schistosoma mansoni* que provoca la Schistosomiasis (Ferreira *et al.*, 2006; Salomon *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2001).

También se han reportado actividad antimicrobiana, antifúngica y anticancerígena entre otras actividades biológicas. Los compuestos hidroxilados como la 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona

presentan actividad en contra de *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. epidermidis*. Diversas especies de micobacterias también muestran susceptibilidad por derivados hidroxilados como la 5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona. Otros derivados azufrados de la naftoquinona muestran actividad contra *Streptococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* y los compuestos con sustitución o-anisidilo, fenilo y metilo, presentan actividad antimicrobiana para *Escherichia coli*. La 8-hidroxi-2-(1-hidroxietil)nafto[2,3-b]furano-4,9-diona, análogo cíclico del lapachol, se ha reportado como agente antibacteriano, mostrando actividad contra *Helicobacter pilori*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y *Clostridium* en un rango de 1.56 a 25 mg/MI 37,38. La quinona dimérica Newbouldiaquinona-A, presenta actividad contra diversas especies como *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, destacando la actividad contra *Enterobacter aerogens* de 24 veces más activo que el antibiótico de referencia gentamicina (Kueete *et al.*, 2007).

En relación a la actividad antifúngica, las partes aéreas de la planta *Impatiens balsamina* se ha aislado el compuesto 2-metoxi-1,4-naftoquinona, el cual presentó actividad antifúngica contra 4 cepas de *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes*. La actividad mostrada por este compuesto es aún mayor que la actividad del fármaco antifúngico anfotericina B. Los derivados aminados y azufrados de la naftoquinona también tienen efectos sobre otras variedades de hongos como son *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus* y *Sporothrix schenckii*, con un rango de actividad de 0.78 a 1.56 mg/mL, siendo estos valores de CMI comparables con los fármacos antifúngicos anfotericina B y miconazol. El lapachol también ha sido identificado como agente antifúngico contra *Candida elegans*. La actividad del lapachol contra *C. albicans*, *C. tropicalis* y *Cryptococcus neoformans* es similar a la anfotericina B. La actividad antifúngica del lapachol reside probablemente en su interacción con la membrana celular del hongo (Breger *et al.*, 2007; Tandon *et al.*, 2004; Tandon *et al.*, 2005.).

En cuanto a la actividad anticancerígena se refiere se ha demostrado que la  $\beta$ -lapachona tiene un efecto sobre el crecimiento de la línea celular HepG2 de tal manera que inhibe la viabilidad de las células por la inducción de la apoptosis, ya que se evidencia con la formación de cuerpos apoptóticos y la fragmentación del ADN. También la plumbagina ha demostrado su potencial como sustancia anticancerígena teniendo efecto sobre células tumorales del pulmón, su efecto se da sobre los microtúbulos, mostrando que la polimerización de la tubulina es inhibida por la plumbagina con una  $CI_{50}$  de  $38 \pm 0.5 \mu M$  (Bipul *et al.*, 2008).

### **2.1.2.2. Aceites esenciales.**

Muchas plantas, consideradas como aromáticas como es el caso del limón, menta, eucalipto, tomillo, ruda, entre otras, producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales, los cuales son responsables de los olores y sabores característicos de dichas plantas, esta mezcla denominada aceites esenciales posee propiedades que actúan como defensa de las plantas de tal manera que funcionan como repelentes de insectos o insecticidas. Los

terpenos que se encuentran en los aceites esenciales, son por lo general monoterpenos como es el caso del limoneno y el mentol, principales monoterpenos constituyentes de los aceites esenciales del limón y la menta respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Estructura química de los monoterpenos del limoneno y mentol

### 2.1.3. Alcaloides

Estos metabolitos secundarios forman la segunda familia más grande con más de 15000 metabolitos identificados, los cuales guardan tres características en común, la primera es que son solubles en agua, la segunda es que todos tienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y finalmente todos exhiben actividad biológica. En los humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas, la mayoría de ellas como resultado de su interacción con neurotransmisores. La mayoría de los alcaloides resultan ser muy tóxicos en dosis altas, sin embargo, en dosis bajas o controladas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes del sistema nervioso central, antitusivos o como analgésicos. Por lo regular, los alcaloides son sintetizados a partir de la lisina, la tirosina y el triptófano, aunque algunos alcaloides, como es el caso de la nicotina y sus compuestos relacionados derivan de la ornitina.

Debido a la gran cantidad de estructuras identificadas es difícil homogenizar una clasificación de los alcaloides, sin embargo, muchos autores coinciden en la siguiente clasificación:

1) De acuerdo a sus propiedades farmacológicas:

Modificadores del Sistema Nervioso Central que a su vez se clasifican en:

-Estimulantes nerviosos como el caso de los alcaloides de la iboga, iboganina, los alcaloides de la nuez vómica, etc.

-Alucinógenos como los alcaloides del peyote (mescalina) y los alcaloides del yage (harmalina).

Modificadores del Sistema Nervioso Autónomo:

- Parasintopatomiméticos entre los cuales se encuentran los de acción directa (Jaborandi: pilocarpina) y los Anticolinesterásicos (habas de Calabar: eserina)
  - Parasintopatolíticos (Belladona: atropina, efedras, efedrina, etc.)
- 2) De acuerdo a Su distribución botánica, donde encontramos a los alcaloides del tabaco (nicotina) y a los alcaloides de las Solanaceae midriáticas (atropina, hiosciamina, etc.)
- 3) De acuerdo a su origen biosintético:
- Alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos:
    - Derivados de la ornitina
    - Derivados de la lisina
  - Alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos:
    - Derivados del ácido nicotínico (piridinas)
    - Derivados de la fenilalanina y tirosina (isoquinoleinas)
    - Derivados del triptófano (indólicos y quinoleinas)
    - Derivados del ácido antranílico (quinoleinas)
    - Derivados de la histidina (imidazoles)
  - Alcaloides de origen diverso
    - Alcaloides terpénicos y esteroidales
    - Alcaloides diversos (purinas, macrociclos, etc).

Esta última clasificación nos permite agrupar a todos los alcaloides naturales conocidos debido a que todos derivan de un restringido número de aminoácidos o de precursores biogénicos, por tal motivo centraremos la revisión de la bibliografía en esta clasificación.

### 2.1.3.1. Alcaloides Alifáticos

Son básicamente dos aminoácidos que mediante su metabolismo dan lugar a los alcaloides alifáticos: la ornitina precursora de los alcaloides pirrolidínicos y la lisina precursora de los alcaloides piperidínicos (figura 5).

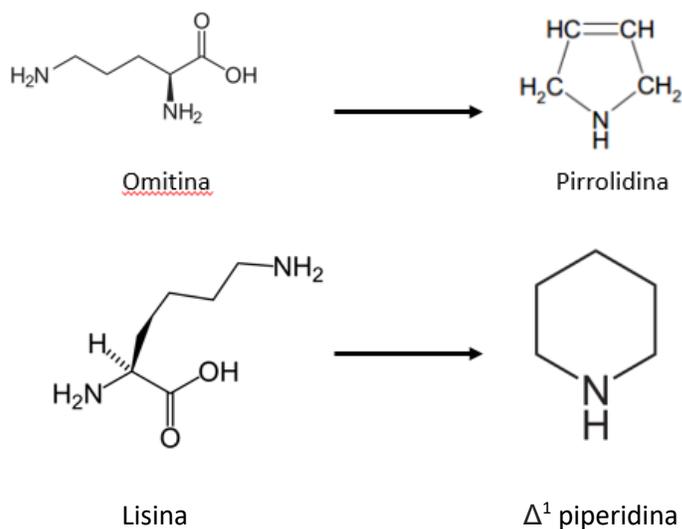


Figura 5. Alcaloides derivados de los aminoácidos alifáticos

#### Alcaloides derivados de la ornitina

Los alcaloides pirrolidínicos derivan del aminoácido ornitina, este tipo de alcaloide es menos abundante que sus análogos piperidínicos, estos alcaloides son biogenéticamente derivados del  $\Delta^1$  pirrolidina, algunos alcaloides adicionan cadenas laterales formadas por unidades de acetato y comprenden:

- Las pirrolidinas simples como la higrinas y los alcaloides tropánicos de ciertas Solanaceae y Erythroxylaceae (coca), los alcaloides del tabaco y la Stanchidrina de *Stachys officinalis*.
- Las pirrolicidinas de Baragínaceas y de algunas compuestas.
- Las indolicidinas (solo los encontrados en los géneros *Eleaocarpus* y *Tylofora*).

De este grupo y por su acción farmacológica, los alcaloides derivados del núcleo tropánico son los de mayor importancia. El tropanol o sus derivados son esterificados con ácidos orgánicos. El principal de estos ácidos es el ácido trópico el cual posee en su estructura un carbón asimétrico y se forma a partir de un reagrupamiento tipo Many de la fenil-alamina luego de una transaminación y posterior reducción.

Existen dos importantes grupos:

- Grupo de la Atropina. Hiosciamina, atropina, escopolamina o hioscina. Estos alcaloides son midriáticos (dilatan la pupila) con propiedades parasimpatoríticas y se encuentran en algunos géneros de la familia Solanaceae (*Atropa*, *Datura*, *Brugmansia*, *Hyoscyamus* y *Duboisias*). La Atropina y la hiosciamina tienen las mismas propiedades farmacológicas, la hiosciamina es entre 10 y 50 veces más activa que la atropina, solo que ésta es más estable, ambas, en dosis altas, estimula el sistema nervioso central (SNC) provocando una excitación que se traduce en un delirio llamado “delirio atropínico”, en el sistema nervioso autónomo (SNA) en dosis terapéuticas provoca midriasis, un aumento en el ritmo cardíaco, a niveles capilares una vaso constricción, en el tracto digestivo provoca un relajamiento del peristaltismo y una disminución en las secreciones de jugos gástricos además de poseer una acción espasmolítico neurotrópica. En el caso de la escopolamina en dosis terapéuticas es una sustancia sedativa del SNC y antiparkinsoniana, su efecto parasimpatorítico es más débil que los anteriores alcaloides y en dosis altas, la escopolamina es capaz de provocar una intoxicación con narcosis y en algunas ocasiones provoca alucinaciones.

- Grupo de la cocaína. Son alcaloides derivados del pseudotropanol, tienen propiedades anestésicas y es el principio activo de la coca (*Erythroxylacea*). Es el principal anestésico de superficie natural, potencializa la conducción de todo tipo de fibras nerviosas, y ha servido como modelo para la síntesis de los actuales anestésicos locales, posee propiedades simpatomiméticas que se manifiestan por una aceleración cardíaca y una vasoconstricción prolongando la acción anestésica, estimula el SNC aumentando la eficiencia muscular, al mismo tiempo que disminuye la sensación de hambre, también es usado como remedio para la tos, el alcoholismo, la adicción al opio, tónico sexual y asma entre otros (Dewick, 2002).

### **Alcaloides derivados de la lisina**

Los alcaloides derivados de la lisina comprenden estructuras simples como es el caso de los alcaloides de las Lobelias, de la granada, los alcaloides de las Piperaceae y algunas estructuras policíclicas como es el caso de los alcaloides quinilicídnicos y las indolicidinas de la familia Fabaceae.

La lisina como homólogo de la ornitina, produce alcaloides análogos a los producidos por la  $\Delta^1$  pirrolidina, por lo tanto, su biosíntesis, es similar a los de los alcaloides derivados de la  $\Delta^1$  piperidina, estos poseen anillos de seis miembros, mientras que los primeros poseen anillos de cinco miembros.

Los alcaloides de las Piperaceae poseen una porción que comprende el ácido pipérico, el cual proviene del ácido siquímico vía cinamil CoA más una extensión de cadena proveniente de la vía acetato/malonato (comparable a los flavonoides) y la condensación de una molécula de  $\Delta^1$  piperidina (Evans, 2000; Mecano y Hasegawa, 1991).

### 2.1.3.2. Alcaloides aromáticos

#### Alcaloides derivados del ácido nicotínico

El ácido nicotínico es el precursor de los alcaloides contenidos en las plantas del tabaco, la nuez de areca, de la ricinina de *Ricinus comunis*, entre otros.

En términos generales, los alcaloides provenientes del tabaco tienen una ruta metabólica a partir del ácido nicotínico, el cual se condensa con un ion N-metil  $\Delta^1$  pirrolidinium para dar la nicotina o con una molécula de  $\Delta^1$ - piperidina para producir la anabasina, (figura 6).

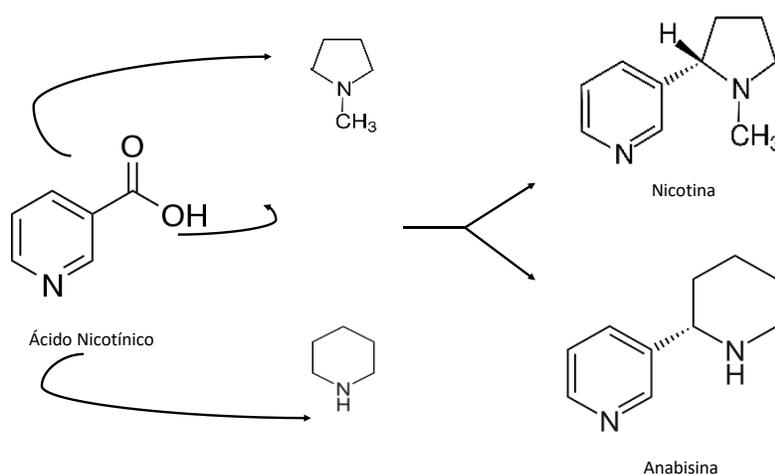


Figura 6. Biosíntesis de la nicotina y anabasina

Son muy variadas las drogas que pueden obtenerse a partir de los alcaloides derivados del ácido nicotínico, entre las principales tenemos las que se obtienen de las hojas del tabaco (*Nicotiana tabacum* y *Nicotiana rustica*) las cuales contienen un elevado porcentaje de material mineral (entre el 15 y 20%) además de un contenido de 1 a 10% de alcaloides donde el principal es la nicotina. En el caso de la higuera (*Ricinus comunaris*) los alcaloides se encuentran en mayoría en las semillas las cuales contienen 50% de lípidos de donde se extrae el aceite de ricino, rico en aceite ricinoleico y la ricina; una toxalbumina de constitución polipeptídica y la ricinina un cianoalcaloide derivado de la piridona que a su vez se deriva del ácido nicotínico. La nuez de areca (*Areca catechu*) también contiene su principio activo en las semillas, es un agonista de los receptores muscarínicos y nicotínicos de la acetilcolina. Es utilizado en forma de distintas sales como estimulante gangliónico, parasimpaticomimético y vermífugo. El polvo de la nuez de areca (arecolina) es usado como tenicida en medicina veterinaria. Sus semillas contienen entre 10 y 15% de lípidos, de 5 a 10% de prótidos y entre 50 y 60% de glúcidos; los principios activos están constituidos por taninos, aproximadamente 15% y alcaloides entre 0.3 y 0.5% donde el principal es la arecolina (Evans, 2000; Mecano y Hasegawa, 1991).

### **Alcaloides derivados de la fenilalanina y tirosina**

Los derivados de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y sus productos de descarboxilación, comprenden una variada y gran cantidad de estructuras alcaloideas como: Aminas simples, isoquinoleinas simples, derivados bencilisoquinoleinas (alcaloides de opio) y con participación del ácido mevalónico (emetina y cefalina). Las aminas simples o Fenil etil aminas, se encuentran principalmente en las partes aéreas de algunas especies vegetales como en el caso de las efedras (*Ephedra* spp) que son hierbas perenes, originarias de China, en sus partes aéreas se encuentran sus principios activos que son alcaloides de tipo fenil-etil-aminas (1.5%) donde el principal es la efedrina, además se encuentran la norefedrina y sus isómeros; estas estructuras se conocen como anfetaminas las cuales poseen un OH en el carbono bencílico. La efedrina es empleada contra el asma con acción más prolongada que la adrenalina. El té de los abisinios (*Catha edulis*) contiene estos alcaloides y es considerada como una droga estimulante vegetal que se masca, parecido al tabaco, usada tradicionalmente en Yemen y otros países árabes. Se trata de la planta con las propiedades psicoestimulantes más potentes que se conoce hasta el momento. Sus principios activos son los alcaloides psicotrópicos catina (norefedrina) y catinona. Ambas moléculas son psicoestimulantes derivadas de la feniletilamina y emparentadas química y funcionalmente con las anfetaminas, terapéuticamente son utilizadas para el tratamiento del déficit de atención en niños y más específicamente se utiliza en el síndrome de atención por hiperactividad, aunque se ha reportado que produce riesgos cardiovasculares. Esta planta originaria de África contiene 1% de catinona, sustancia que produce farmacodependencia, la masticación provoca euforia, sensación de bienestar, locuacidad, estimulación motriz e intelectual, seguida de una fase depresiva produciendo insomnio. El peyote o Botones de mezcal (*Lophophora wiliamsii*) es un cactus que posee entre el 3 y el 6% de alcaloides totales donde el principal es la mescalina, contiene también alcaloides de tipo tetrahidroisoquinoleina como la anhalanina y lofoforina. El peyote es una droga mágico-religiosa utilizada por los aztecas en ceremonias y rituales, su ingestión provoca efectos síquicos como alucinaciones, visiones coloreadas, distorsión en la percepción visual y de los sonidos, luego de una fase depresiva acompañada de hipotensión, náuseas, sudación y midriasis.

Los alcaloides morfinianos son exclusivos del género *Papaver*, a pesar de que este género cuenta con más de 100 especies, solo una docena biosintétiza la tebaína y la morfina es biosintetizada por *P. somniferum* y *P. setigerum* (Evans, 2000; Mecano y Hasegawa, 1991).

El opio es obtenido del látex desecado de las capsulas inmaduras de *P. somniferum*, esta pasta obtenida contiene cerca de 25 alcaloides en mayoría combinados con ácido mecónico el cual se puede detectar por la prueba del cloruro férrico.

### **Alcaloides derivados del triptófano**

El aminoácido L-triptófano contiene el grupo indólico y es sintetizado por la vía del ácido siquímico o por la vía del ácido antranílico. Existen alrededor de 800 alcaloides de este tipo distribuidos principalmente en la familia Apocynaceae, también se encuentran en una menor proporción en

hongos y familias como la Leguminosae, Malphigiaceae, Rubiaceae y Rutaceae. El triptófano es el precursor de estos alcaloides los cuales se clasifican en triptaminas y en no triptaminas, las triptaminas a su vez, se subdividen en  $\beta$ -carbolinas y en indoleninas y pueden ser triptaminas simples o triptaminas complejas y estas pueden ser isoprénicas o no isoprénicas.

Las triptaminas simples se obtiene por reacciones de descarboxilación, metilación y oxidación del triptófano, su uso data desde la época prehispánica, juegan un papel importante en la cultura indígena de América por sus efectos alucinógenos y extáticos en sus ceremonias religiosas, en los hongos del género *Psilocybe*, *Stropharia* y *Conocybe* se ha encontrado alcaloides alucinógenos (psilocibina y psilobina) que al ingerirlos produce diferentes sensaciones auditivas y visuales, relajación muscular, depresiones y euforias alternadas. La serotonina que juega un importante papel en la actividad neuronal, se encuentra también en vegetales, se ha aislado en el pericarpio del banano el cual seco es fumado y actúa como un alucinógeno ligero.

Entre las triptaminas simples se incluyen estructuras un poco más complejas como la ergina, que es un alcaloide extraído de las Convolvulaceae del nuevo mundo, consideradas plantas sagradas de México llamada “planta serpiente”, esta planta ha sido usada desde los tiempos del imperio Azteca por los “chamanes” durante las ceremonias religiosas para visualizar el futuro, curar enfermedades o en sacrificios humanos. La *Physostigma venenosum* es una liana de la familia de las Leguminosae, produce una vaina con 2 o 3 semillas que contienen fisostigmina o eserina y eserolina, se le conoce como haba de calabar, se utiliza en África en orjalías como alucinógenos orales, su ingestión produce hipersecreción de la saliva, de sudor, de lágrimas y de orina, trastornos visuales, sed temblor, contracciones y en ocasiones muerte por paro cardiaco (Rahama *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1996) (figura 7).

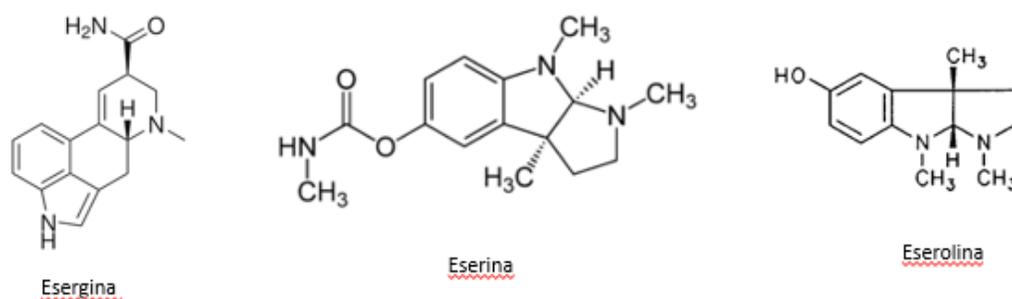


Figura 7. Estructura química de la esergina, eserina y eserolina

Tradicionalmente las especies del género *Muraya* se ha utilizado como analgésico y anestésico local, también ha sido utilizado como tratamiento contra el eczema, reumatismo, dolor abdominal, hidropesía, diarrea, edema, trombosis, éxtasis venoso, anticonvulsivante y expectorante, en su

estructura química se ha encontrado que este género presenta cumarinas, flavonoides, alcaloides de tipo carbazol (Rahama *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 1996).

Los indígenas del Amazonas han utilizado la corteza de diversas especies del género *Sttrychnos*, familia Longaniaceae, como curares, donde se ha encontrado dímeros indólicos como el caso de los curares de Menispermaceae.

Las triptaminas isoprénicas más importantes son las ergolinas, nombre que recibe debido al núcleo de los alcaloides del ergot (cornesuelo de centeno) y comprende el esclerocio desecado producido por el hongo del género *Claviceps*, de este género se tienen cerca de 50 especies, pero el principal es la *C. purpurea*, el cual se desarrolla en el ovario del centeno produciendo granos alargados en forma de un pequeño cuerno. Durante la primera guerra mundial se almacenaban una gran cantidad de alimentos perecederos en lugares poco apropiados para este fin, debido a esto, se presentaron diversas enfermedades en los habitantes que consumieron granos almacenados, el principal síntoma de estas enfermedades era manifestaciones dolorosas de tipo gangrenosa a nivel de estómago, a esta sintomatología se le llamo “fuego sagrado” o mal de los ardientes que producían delirio y alucinaciones.

Las amidas derivadas del ácido D-lisérgico terminan en **ina** las cuales son biológicamente activas, mientras que las derivadas del ácido D-isolisérgico terminan en **ininas** y a diferencia de las amidas derivadas del D-lisérgico son inactivas. El LSD es la dietil amida del ácido lisérgico, este compuesto hemisintético es un potente alucinógeno. Otro tipo de triptaminas isoprénicas que presenta gran complejidad estructural se encuentran en familias como Apocynaceae, Longaniaceae, Rubiaceae, en esta última familia se encuentran los alcaloides de las quinas, aunque no tienen el núcleo indol (núcleo quinoléico), estos alcaloides se derivan del aminoácido triptófano y poseen una potente actividad biológica. De la familia Apocynaceae, se han aislado cerca de 90 alcaloides donde alrededor de 20 son dímeros, los más importantes son la vinblastina (VLB o vinca leucoblastina) y la vincristina (VCR o vinca leurocristina). Dentro de esta familia también se encuentran los alcaloides de las raíces de las *Rauwolfias*, las cuales poseen marcada actividad biológica como neurosedante, y antihipertensivo y/o antiarrítmico.

Otros alcaloides provenientes del triptófano son los que contienen el núcleo quinoléico, las quinas son árboles originarios de la Cordillera de los Andes y pertenecen al género *Cinchona* familia Rubiaceae. Su corteza contiene alcaloides utilizados por sus propiedades tónicas, febrífugas, antimaláricas y antiarrítmicas. Su uso se documentó desde la época de la conquista, se dice que el conde de Chinchón Don Luis Jerónimo Fernández de Carrera Virrey del Perú en 1632, debía de dejar el nuevo mundo debido a las constantes fiebres que sufría su esposa la condesa Ana Osorio, justo antes de partir, un indígena mozo de su casa, le recomendó al conde que bebiera un brebaje de quina-quina, que se preparaba de una planta de la región, milagrosamente sus fiebres fueron controladas y se repuso de sus males, esto llevo a que se introdujera en Europa como planta medicinal. Debido a sus potentes efectos medicinales la demanda de quinina y de quinidina aumento considerablemente a tal grado que el árbol de quina se encuentra actualmente en vía de extinción (Evans, 2000; Mecano y Hasegawa, 1991).

### Alcaloides derivados del ácido antranílico (quinoleínas)

El ácido antranílico da origen a alcaloides variados como quinoleínas simples, 2, 4 quinolonas simples y preniladas y fura pirano quinoleínas. Estos alcaloides se encuentran en las familias Rutaceae, Acanthaceae, Zygophylaceae, Serophulariaceae, Fabaceae y Araliaceae.

### Alcaloides derivados de la histidina

La histidina origina un pequeño grupo de alcaloides conteniendo el núcleo imidazol (figura 8).

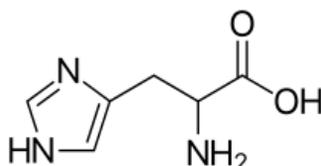


Figura 8. Estructura química de la histidina

El jaborandi o ruda del monte (*Pilocarpus microphyllus*) es un pequeño árbol con ramas hirtelas y hojas alternas, las cuales contienen entre 0.7 y 0.8% de alcaloides totales donde el principal es la pilocarpina. Las sales de pilocarpina se utilizan en la práctica oftálmica, producen contracción de la pupila, acción antagonista a la que posee la atropina. En el comienzo del glaucoma, sirve para incrementar la irrigación del ojo y disminuir la presión. Las hojas desecadas pierden rápidamente su actividad (Bruneton, 1987).

#### 2.1.3.3. Alcaloides de origen diverso

### Alcaloides terpénicos y esteroidales

Estos alcaloides tienen, por un lado, origen biogenético común, y por otro, estructuras, actividad biológica y distribución diversa. Este tipo de alcaloides tiene la particularidad de que primero se forma el terpenoide y posteriormente se incorpora el nitrógeno, esta condición hace que se consideren pseudoalcaloides o falsos alcaloides y su clasificación está más ligada a los y terpenoides. Los de mayor importancia son los alcaloides sesquiterpenos, diterpenos y esteroidales.

Este tipo de alcaloides se han aislado de la orquídea asiática *Dendrobium nobile*, usada como analgésico e hipotensor, el alcaloide aislado es la dendrobina. La deoxinufaridina es otro alcaloide sesquiterpénico que se encuentra presente en el rizoma del Loto amarillo (*Neuphar luteum*) y del loto blanco (*Nymphaea alba*) plantas acuáticas que tradicionalmente se han usado en infecciones dermatológicas y como sedativo y anafrodisiaco.

Los alcaloides diterpénicos son generalmente aislados de Ranunculaceas y de Rosaceas, se caracterizan por su alta toxicidad, su estructura comprende esqueletos C<sub>20</sub> y diterpenos y C<sub>19</sub>

norditerpenos. La aconitina y la delfinina son alcaloides norditerpenos, en las raíces de la planta *Aconitum napellus*, la aconitina es el alcaloide más abundante en esta planta ya que representa cerca del 99% de los alcaloides totales. La aconitina (figura 9) es una acetilbenzoilaconina (C<sub>34</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>11</sub>) es una sustancia poco soluble en agua, pero muy soluble en alcohol, éter y cloroformo. La vía de exposición más frecuente como veneno es la digestiva, aunque también se puede producir intoxicación a través de las mucosas o incluso a través de la piel por vía dérmica. La aconitina es capaz de producir la apertura de los canales de sodio en las células nerviosas y musculares, lo que origina una sensación de hormigueo y picor en la boca que se extiende hacia toda la cara y garganta; además de provocar la sensación de que la cabeza del intoxicado aumenta de tamaño desmesurado, una sensación que seguidamente se propaga al resto de su cuerpo y extremidades seguido de náuseas, malestar generalizado vértigo, calambres arritmia y hasta fibrilación ventricular y, finalmente con dosis de 2 a 3 mg provoca la muerte (Evans, 2000; Mecano y Hasegawa, 1991).

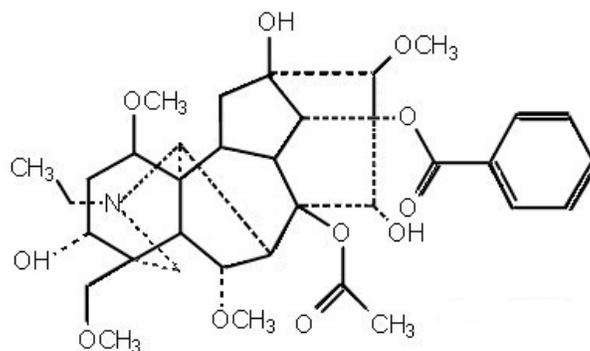


Figura 9. Estructura química de la aconitina

Los alcaloides esteroidales se clasifican de acuerdo a su número de carbonos y encontramos tres grupos:

Los C<sub>21</sub> denominados aminopregnanos,

Los C<sub>24</sub> denominados cicloartenol y

Los C<sub>27</sub> esteroidales.

Los alcaloides esteroidales C<sub>21</sub> son derivados del pregnano; donde el nitrógeno puede ser intra o extracíclico, estos alcaloides son característicos de ciertos géneros de Apocynaceae, específicamente de *Funtumia*, *Holorrhena*, *Kibatalia*, *Malouetia*, etc. Los alcaloides C<sub>24</sub>, son específicos de la Familia Buxaceae y son dinitrogenados en los carbonos 3 y 20, por otro lado, los alcaloides esteroidales C<sub>27</sub> están presentes en las familias Solanaceae y Liliaceae. En las Solanaceae se encuentran los alcaloides esteroidales verdaderos, estos alcaloides guardan una gran similitud con las sapogeninas esteroidales, encontrándose también como glicósidos. La solanidina y el

glicósido  $\beta$ -solanina se encuentra en la corteza de la papa *Solanun tuberosum* así como en *Solanun nigrum*.

El eléboro blanco *Veratrum álbum* Liliaceae contiene en el rizoma 1.55 de una mezcla compleja de alcaloides todos C-nor D-homo esteroidales como el caso de la jervina (Evans, 2000; Mecano y Hasegawa, 1991).

### Alcaloides derivados de bases puricas

Estos alcaloides son de suma importancia debido al gran consumo alrededor del mundo utilizados como excitantes del Sistema Nervioso Central donde el principal alcaloide es la cafeína. Estos alcaloides son considerados alcaloides imperfectos debido a que se derivan de aminoácidos modificados (figura 10) como la purina + la pirimidina, específicamente la xantina o dioxo-2,6 purina; poseen un carácter básico, pero no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides.

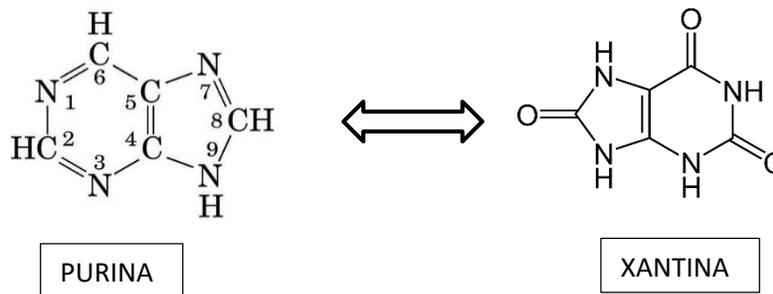


Figura 10. Estructura química de la Xantina, alcaloide derivado de la purina

Estos alcaloides son básicamente tres: la cafeína o trimetil 1,3,7 xantina, la Teofilina o dimetil 1,3 xantina y la Teobomina o dimetil 3,7 xantina. Estos alcaloides generalmente se encuentran en los vegetales en presencia con taninos. Las plantas que contiene alcaloides derivados de bases púricas son usadas para preparar bebidas estimulantes del sistema nervioso central los más representativos son el Café *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, el alcaloide que contiene es la cafeína y se encuentra en toda la planta excepto en la raíz, sin embargo en los granos se encuentra la mayor concentración, las semillas verdes del café son ricas en carbohidratos, ácido clorogénico, ácido cafeico y una betaina que es la trigonelina, además de contener trazas de teobromina y de teofilina (Pendell, 2002)

El Te (*Thea sinensis*) es un pequeño arbusto originario del sureste asiático mide entre 5 y 15 cm de alto con hermosas y aromáticas flores blancas, la mayor cantidad de droga se concentra en sus hojas, esta droga es rica en sales de potasio y ácidos orgánicos como málico, succínico, clorogénico, además de contener flavonoides sobre todo heterósidos del quercetol y derivados flavan 3 ol como catecol y sus ésteres gálico y taninos catéquínico. Las bases púricas se encuentran entre el 2 y 4% siendo la principal la cafeína además de contener trazas de teofilina.

El cacao (*Theobroma cacao*) es un árbol de las regiones tropicales cuyas hojas, raíces y semillas contienen bases púricas como la cafeína y trobromina, las semillas contienen 50% de lípidos donde el principal ácido graso es el linolol.

La Guarana (*Paullinia sorbilis*) es una liana de la familia Sapindaceae originaria de la zona amazónica, encontrada en Paraguay, Perú, Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela, sus semillas son ricas en taninos (10%) y en cafeína (4-5%), tradicionalmente se colectan los frutos y se separan las semillas, las cuales se almacenan hasta la fermentación. Posteriormente son tostadas y se les quita el tegumento para hacer un polvo fino de las semillas. El guaraná es usado como ingrediente de algunas gaseosas y bebidas energizantes. En América tropical se usa para tratar la diarrea, disminuir la fatiga, reducir el hambre y como coadyuvante en la artritis (Gupta, 1995).

#### 2.1.4. Compuestos Fenólicos

En el metabolismo tanto primario como secundario, los aminoácidos aromáticos juegan un papel importantísimo en la biosíntesis de diferentes productos. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol; el fenol es una molécula básica (figura 11) que se compone de un anillo aromático (fenol) unido a un grupo hidroxilo (OH). El anillo aromático hace que los ácidos débiles tengan un efecto inductivo en el hidrógeno del grupo hidroxilo. el anillo aromático juega un papel importante en las propiedades antioxidantes (Roos *et al.*, 2003).

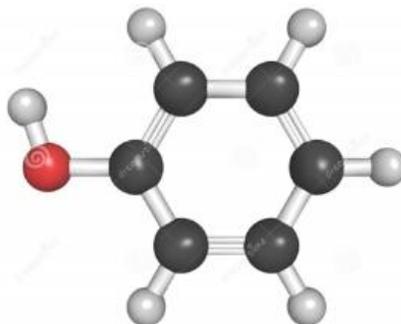


Figura 11. Estructura química del fenol

Desde el punto de vista de la estructura química, los polifenoles comprenden desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. Básicamente existen dos rutas metabólicas para la biosíntesis de los compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico, sin embargo, esta última, es la principal ruta metabólica para la síntesis de fenoles en el reino fungí y las bacterias, pero poco empleada en plantas superiores.

La ruta del ácido siquímico (figura 12) es la responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en las plantas, a partir de la eritrosa-4-P y del ácido fosfoenolpirúvico se inicia una serie de reacciones químicas que derivan a la síntesis del ácido

siquímico y diferentes derivados como los algunos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) que a su vez derivan en muchos compuestos secundarios catalogados como alcaloides.

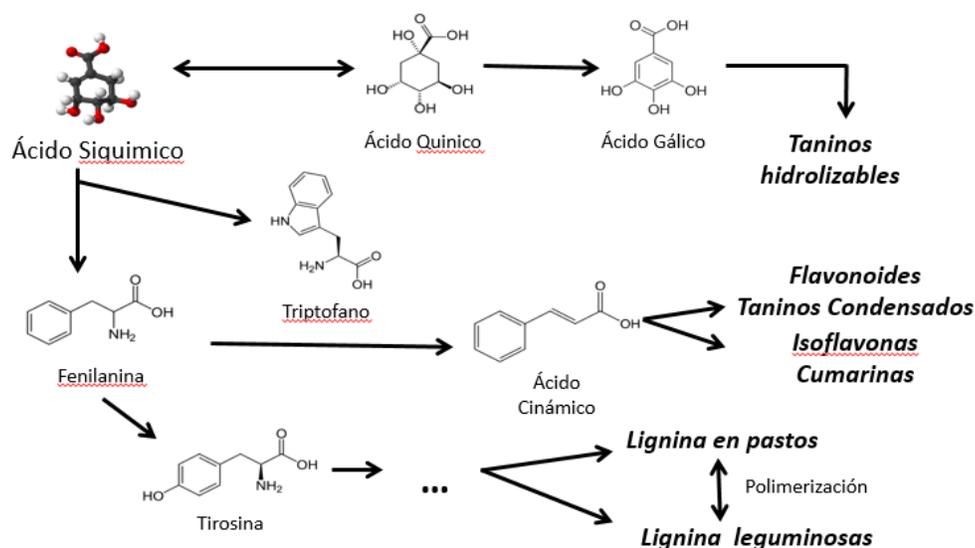


Figura 12. Ruta metabólica del ácido siquímico para la biosíntesis de polifenoles

La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina, que es a su vez parte de la ruta metabólica del ácido siquímico. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. La fenilalanina y el triptófano se catalogan como aminoácidos esenciales para los animales, ya que éstos no tienen la capacidad para sintetizarlos por sí mismos. La tirosina no es esencial en el sentido de que los animales pueden sintetizarla a partir de la hidroxilación de la fenilalanina (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de la fenilalanina. Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos (figura 13).

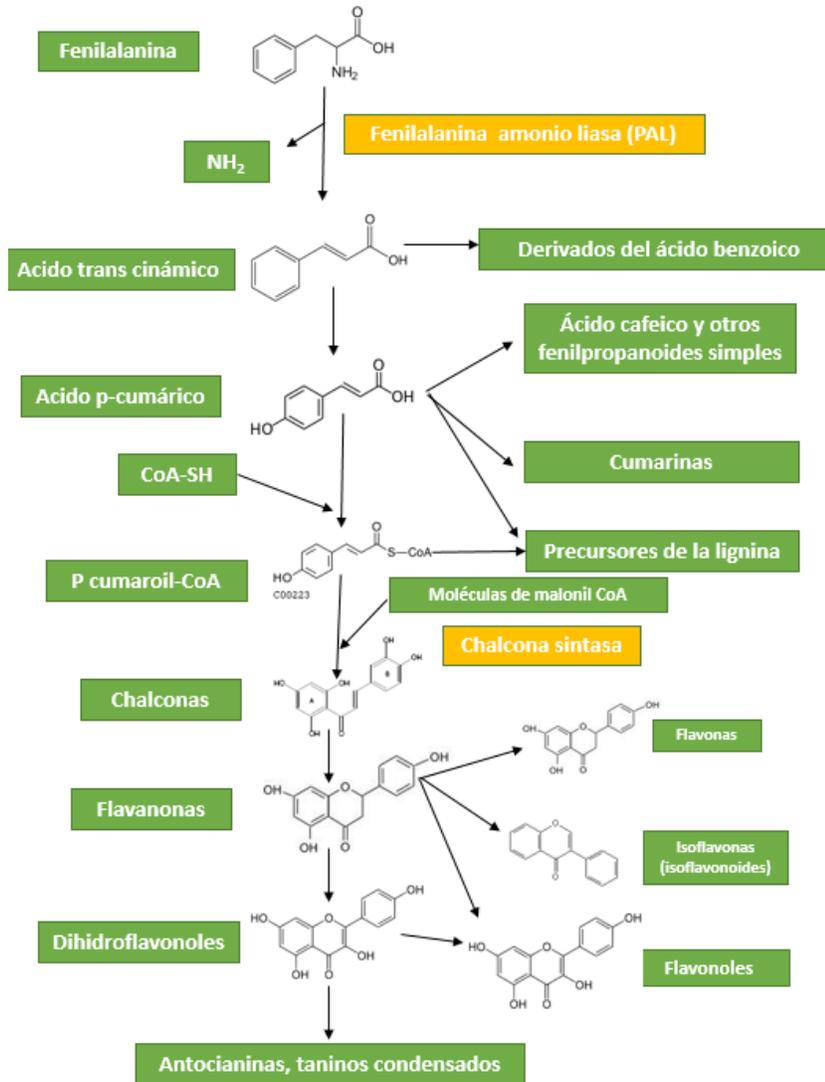
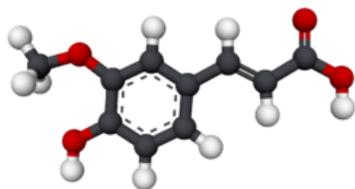
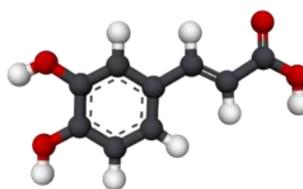


Figura 13. Ruta del ácido siquímico: desaminación de la fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de lignina, flaonas, isoflavonas y flavonoides

Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico (figura 14) cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides. Los ácidos cinámico y cumárico, así como sus derivados, son compuestos fenólicos simples llamados fenilpropanoides por contener un anillo de benceno y una cadena lateral de tres carbonos.



Ácido ferúlico



Ácido cafeico

Figura 14. Estructura química del ácido ferúlico y del ácido cafeico

#### 2.1.4.1. Cumarinas

Las cumarinas son una amplia familia de lactonas con más de 1500 compuestos identificados en más de 800 especies de plantas. Estos compuestos se encuentran en los tegumentos de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas y tallos. Su principal función es como mecanismo de defensa, ya que son supresoras del apetito. Además, actúan como antimicrobianos y como inhibidores de la germinación. Algunos compuestos muestran fototoxicidad frente a insectos tras activarse por luz UV, provocando la muerte celular. La cumarina tiene un sabor amargo por lo que los animales la evitan ya que también les produce hemorragias internas.

La cumarina más simple y más conocida es la que se encuentra en el aceite de la bergamota (*Citrus bergamia*), aceite esencial que aporta el aroma característico al tabaco de pipa, el té y a otros productos de consumo frecuente. Las cumarinas más tóxicas son producidas por hongos, por ejemplo, las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* (afectan al cacahuate y al maíz), quizás el cancerígeno más potente de las toxinas naturales (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

#### 2.1.4.2. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos cuyo esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos. Su principal función es la defensa de las plantas y la pigmentación, entre los principales flavonoides se encuentran las antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Las antocianinas son los flavonoides responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos, son glicósidos con un azúcar en la posición 3. Cuando las antocianinas carecen de azúcar se denominan antocianidinas. El color de las antocianinas depende del número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B y del pH de las vacuolas en las que se almacenan (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

La biosíntesis de los flavonoides consta de varias etapas, la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p.cumaril.CoA. Posteriormente

esta reacción es catalizada por calcona sintasa y da lugar a naringerina calcona, precursor de los flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la estilbeno sintasa conduce a la formación estilbenos implicados en mecanismo de defensa de las plantas frente a patógenos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

#### **2.1.4.3. Lignina**

La lignina es un polímero altamente ramificado de fenilpropanoides, solo la celulosa supera a la lignina como la sustancia orgánica más abundante de las plantas. se encuentra unida a la celulosa mediante un enlace covalente además de estar unida a otros polisacáridos de la pared celular. Es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos lo que hace muy difícil su extracción sin degradarla. Juega un papel fundamental en la estructura de las plantas, su naturaleza química es la base de su dureza mecánica y de su rigidez que se manifiesta en los tallos alargados altamente lignificados, los troncos de los árboles que imprimen la dureza de la madera. La lignina también se encuentra en varios tejidos de soporte y de transporte, en traqueidas y en los vasos del xilema. Principalmente se deposita en la pared secundaria, fortalece los tallo y tejido vasculares permitiendo el crecimiento vertical y la conducción de agua y minerales a través del xilema. su biosíntesis es a partir de tres derivados del fenilpropanoides: los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico, de manera que cada uno de ellos puede formar numerosos enlaces y ramificaciones haciendo que cada lignina pueda ser única. La lignina juega también un papel importante como función protectora de las plantas ya que, al dar resistencia en los tallos, evita que las plantas sean alimento para los animales y, además, su naturaleza química hace que sea difícil digerirla por los herbívoros (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

#### **2.1.4.4. Taninos**

Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que tienen la capacidad de unirse a proteínas desnaturalizándolas. Generalmente son considerados como toxinas debido a su capacidad de unirse a las proteínas. También actúan como protectores al evitar que muchos animales consuman las plantas o partes de las plantas que contienen altas concentraciones de taninos. Esto ocurre en los frutos inmaduros en los que se concentran altas cantidades de taninos en la piel. Sin embargo, los taninos del vino tinto tienen efecto benéfico en la salud humana al bloquear la formación de endotelina-1, una molécula señal que provoca la vasoconstricción.

Químicamente no se encuentran bien definidas, su agrupación de da debido a algunas características comunes, en términos generales, estos compuestos se dividen en dos grandes grupos, taninos hidrolizables y taninos condensados. (Hervás, 2001).

Los taninos hidrolizables están constituidos por un núcleo compuesto por un glúcido, cuyos grupos hidroxilos pueden esterificarse con ácidos fenólicos (ácido gálico, egálico, fecarboxílico o hexahidroxidifénico), cuando estos compuestos son consumidos por los animales, pueden ser degradados debido a que son hidrolizables en presencia de ácidos, bases o enzimas y a diferencia de los taninos condensados, los productos de su degradación pueden absorberse en el intestino delgado y ser potencialmente tóxico para los animales especialmente cuando son ingeridos en grandes cantidades (Waghom, 2008) (figura 15).

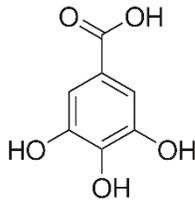


Figura 15. Representación gráfica de una molécula de tanino hidrolizable (ácido gálico)

Los taninos condensados (figura 16) son compuestos complejos de oligómeros y polímeros de unidades flavonoides unidos mediante enlaces C-4 y C-8. Los 3-flavonoles son comúnmente denominados catequinas, caracterizados por poseer dos carbonos asimétricos ligados mediante enlaces de carbono C-3 y C-4 dando lugar a cuatro isómeros, mientras que los 3,4-flavonodíoles pertenecen a los compuestos denominados leucoantocianinas, cada una de sus moléculas poseen tres átomos de carbono asimétricos (C-2, C-3, C-4) dando lugar a ocho isómeros que contienen grupos fenólicos donde el número de grupos funcionales en una molécula determina la formación de complejos con proteínas, formación de quelatos con iones metálicos y otras capacidades reductoras (Min *et al.*, 2003).

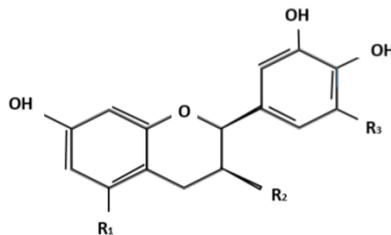


Figura 16. Representación gráfica típica de un tanino condensado (flavan-3-ol)

## 2.1.5. Glicósidos

### 2.1.5.1. Saponinas

Las saponinas son glicósidos que se encuentran distribuidos ampliamente en las plantas y están formadas por una aglicona de origen terpenico, esteroidal o esteroidal alcaloide; al cual se une por el hidroxilo del carbono, tiene también una cadena ramificada de azúcares que puede ser de hasta 5 moléculas, usualmente son glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa. Algunas saponinas tienen trazas de azúcar en el carbono 26 o 28 que por lo general es glucosa. Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en monocotiledóneas, mientras que las saponinas terpénicas se encuentran especialmente en dicotiledóneas. La gran diversidad de las saponinas se refleja en las diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas y en el uso que se hace de ellas en jabones, antimicrobianos, anticancerígenos y hemolíticos entre otros. A pesar de su gran aplicación industrial y farmacéutica, las saponinas glicoalcaloides, en determinadas concentraciones, son tóxicas para microorganismos, insectos, animales y humanos, por esa razón cuando están presentes en los alimentos son consideradas como factores anti nutricionales. Las saponinas ya sean terpenoides o esteroidales son sintetizadas a partir de la vía de los isoprenoides (terpenoides) (Díaz y Luz, 2009).

Las saponinas con una cadena de azúcares unida al carbono-3 tienen gran actividad microbicida. Esta actividad depende de la ramificación de los azúcares ya que cuando la saponina pierde un azúcar terminal, la cadena de azúcares queda linealizada y la saponina pierde la actividad microbicida (Armah *et al.*, 1999). Un posible mecanismo de acción de las saponinas es de que forman complejos con los esteroides de las membranas celulares y produce grandes poros en las mismas que alteran su permeabilidad y la célula se lisa. Los poros no se forman cuando una o más azúcares de la cadena de la saponina se eliminan. (Baumann *et al.*, 2000). La saponina SC-2 de *Lolium chrysotrichum* causa grandes cambios en las membranas celulares de numerosas especies de la levadura *Candida* y afecta también la morfología de la pared celular, la membrana citoplasmática se separa de la pared y se desintegra. Además de una degradación total de los componentes celulares, también se reporta que la saponina SC-2 tiene una actividad fungicida o fungistática según la especie de *Candida* de la que se experimente (Herrera *et al.*, 2007).

Las saponinas más estudiadas en relación al papel que juegan en la defensa de las plantas contra hongos fitopatógenos, son la tomatina de los tomates, la avenacina A-1 de la avena y la solanina y la chaconina de la papa (figura 17). Estas cuatro saponinas tienen una sola cadena de azúcares unida al grupo hidroxilo del carbono 3 de la aglicona; mientras que los avenacosidos A y B de las hojas de avena tienen dos cadenas de azúcares, una en el carbono-3 y otra en el carbono-26. Los avenacosidos son biológicamente inactivos, estos compuestos son convertidos en antifúngicos por una glucosilhidrolasa vegetal que hidroliza el azúcar unido al carbono-26 en respuesta al ataque de patógenos o al daño en el tejido (Morrissey y Ossbourn, 1999).

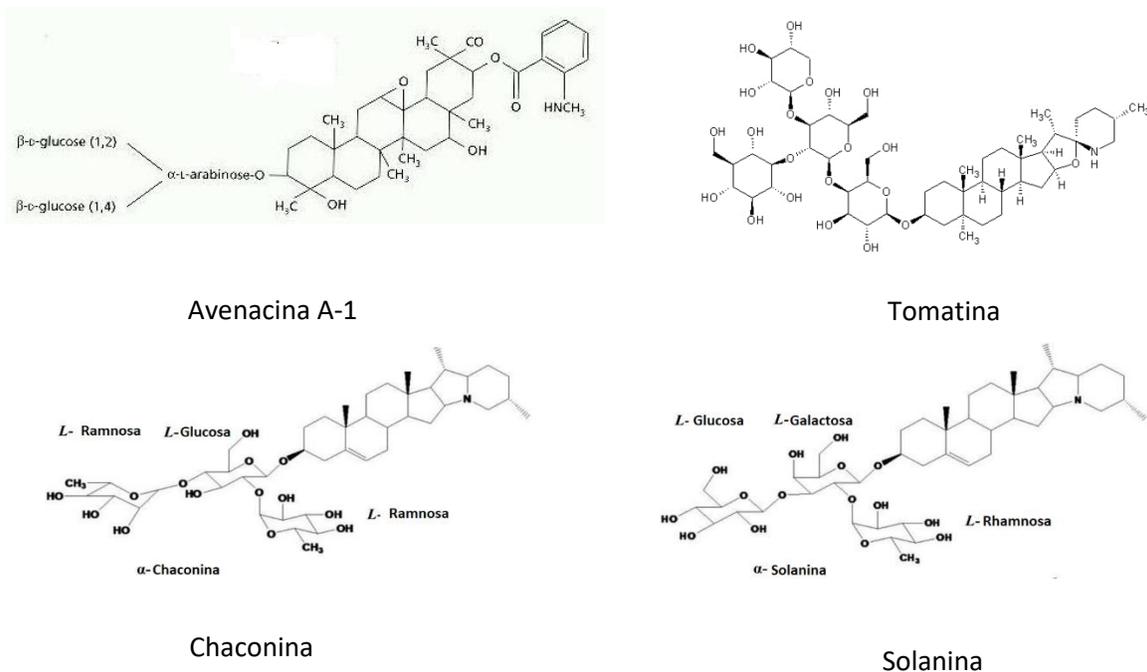


Figura 17. Estructura química de la tomatina y la avenacina A-1; saponinas presentes en los tomates y la avena, respectivamente, así como la solanina y la chaconina saponinas de la papa

### 2.1.5.2. Glicósidos cardiacos

Los glicósidos cardiacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de manera natural en forma de glicósidos o de agliconas. Quizá el más conocido sea la digitoxina o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva. Los glucósidos cardiacos son conocidos desde la antigüedad, siendo utilizados por los egipcios como veneno y por los romanos como tónicos cardíacos. La digitoxina se utiliza en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y para controlar el ritmo ventricular en la fibrilación auricular crónica. Aunque la digoxina aumenta la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, mejora la sintomatología de los pacientes con insuficiencia cardiaca y reduce las hospitalizaciones, no disminuye la incidencia de mortalidad entre estos enfermos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

### 2.1.5.3. Glicósidos cianogénicos

Los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es aplastada o dañada, liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN). La amigdalina (figura 18) es un glicósido cianogénico derivado del

aminoácido fenilalanina, se encuentra naturalmente en las semillas del damasco (albaricoque, chabacano), manzana, uva, sandías, ciertas nueces y en particular las almendras.

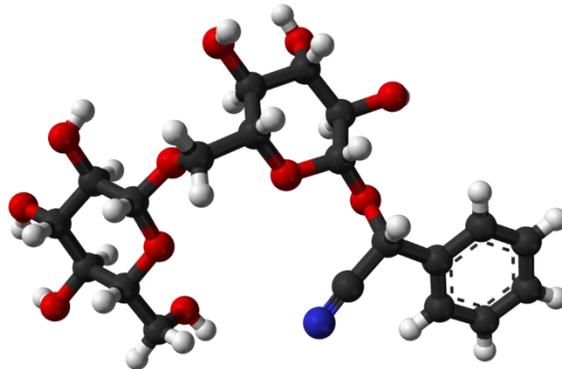


Figura 18. Modelo bidimensional de una molécula de amigdalina

Los glicósidos cianogénicos normalmente no se degradan cuando la planta está intacta. Tienen un papel protector frente a los herbívoros. El cianuro de hidrogeno es una toxina de acción rápida que inhibe metal proteínas como el citocromo oxidasa, enzima clave en la respiración mitocondrial. Sin embargo, algunos herbívoros llegan a adaptarse al alimentarse de plantas cianogénicas y tolerar más altas dosis de HCN.

Los tubérculos de mandioca o yuca, muy ricos en carbohidratos, contiene altos niveles de glicósidos cianogénicos y forman parte de la dieta de muchos países tropicales. Aunque el procesamiento tradicional de estos tubérculos elimina gran parte de los glicósidos cianogénicos, la detoxificación no es completa dando lugar a efectos nocivos en las poblaciones consumidoras (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

#### **2.1.5.4. Glucosinolatos**

Los glucosinolatos, al degradarse, desprenden sustancias volátiles, las cuales son responsables del aroma, el olor y el gusto de los condimentos como la mostaza y de algunos vegetales como el repollo, brócoli o coliflor (*Brassicaceae*). Uno de los glucosinolatos más representativo es el que se encuentra en las semillas de la mostaza negra (*Brassica negra*) la sinigrina (figura 19). Los glucosinolatos al igual que los glicósidos cianogénicos, están separados espacialmente de las enzimas hidrolíticas que los degradan y actúan también como repelentes de herbívoros (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

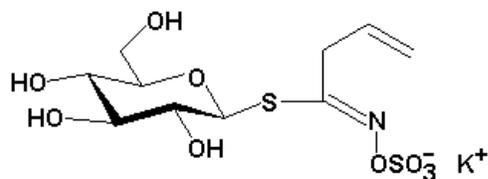


Figura 19. Estructura química de la sinigrina, glucosinolato presente en las semillas de la mostaza

Los isotiocianatos (ITC) originados a partir de la degradación enzimática de los glucosinolatos (GSL), exhiben propiedades anticarcinogénicas por sus habilidades de inducir genes citoprotectores. Los mecanismos de efectos citotóxicos y citostáticos de los ITC incluyen inducción de apoptosis, inhibición de la progresión del ciclo celular e inhibición de angiogénesis. La regulación de apoptosis por los ITC se logra principalmente a través de la liberación mitocondrial del citocromo c, regulación de la familia Bcl-2, señalización MAPK y subsecuente activación de caspasas. Parte importante de los efectos quimiopreventivos de los ITC puede estar asociada con la inhibición de la activación metabólica de carcinógenos por citocromo P450 (fase I), junto con la mayor inducción de las enzimas de detoxificación de la fase II.

El enfoque biológico se basa en la liberación de compuestos tóxicos derivados de GSL con la destrucción de tejido en presencia de agua. La defensa inducida por la ruptura de la GSL se activa por el daño tisular y la hidrólisis es iniciada por la enzima mirosinasa (MYR). El sistema glucosinolato-mirosinasa (GSL-MYR) se ha convertido en parte de un mecanismo de defensa evolucionado y sofisticado contra insectos herbívoros y patógenos (Andersson *et al.*, 2009), en el que GSL se hidroliza en una variedad de componentes tales como isotiocianatos (ITC), nitritos, tiocianatos, epithionitriles y oxazolidinas dependiendo de las condiciones de pH, iones metálicos y otros elementos proteínicos (Vaughn y Berhow, 2005).

Los mecanismos de los efectos citotóxicos y citostáticos de ITC incluyen la inducción de la apoptosis, la inhibición de la progresión del ciclo celular y la inhibición de la angiogénesis. La regulación de la apoptosis por ITC se logra principalmente a través de la liberación mitocondrial de citocromo C y posterior activación de caspasas, una familia de cisteína proteasas responsables del inicio y la ejecución de la apoptosis (Traka y Mithen, 2009). Los reguladores más importantes que se han caracterizado incluyen caspasas en apoptosis, la familia del receptor de TNF (factor de necrosis tumoral), proteínas adaptadoras y familia Bcl-2, entre otros (Boedefeld *et al.*, 2003).

### 2.1.6. Funciones biológicas de los principales compuestos secundarios de las plantas

Las plantas a diferencia de otros organismos, tienen la particularidad de destinar parte de la energía y del carbono asimilado a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no están directamente relacionadas a procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, estas moléculas orgánicas son derivados de un metabolismo secundario.

El papel que juegan los metabolitos secundarios dentro de la planta es muy variada, algunos tiene funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales, muchos otros son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos contribuyendo con la reproducción del reino vegetal de tal manera que sirven como atrayentes a insectos polinizadores o confiriendo color y olor a los frutos para que puedan ser consumidos por los animales y de esta manera contribuir con la dispersión de las semillas. Otros compuestos funcionan como protectores frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Básicamente se les atribuyen dos efectos fundamentales a las plantas utilizadas en investigaciones sobre su uso como antiparasitarias en pequeñas especies; estos efectos son:

1. Efectos directos, que están relacionados sobre la actividad antiparasitaria de algún metabolito secundario de las plantas (principalmente taninos condensados) y,
2. Efectos indirectos, que posee estrecho vínculo con un incremento del estado de resiliencia de los animales que se garantiza por el efecto directo de un mejor aprovechamiento de la dieta de esos animales.

Las plantas o sus extractos han sido usadas durante siglos en medicina veterinaria, tanto de forma interna como externa para el tratamiento de diversas patologías. Las plantas elaboran una gran variedad de moléculas orgánicas (glúcidos, lípidos, ácidos, sustancias pépticas, saponinas, alcaloides, polifenoles, Terpenos, Esteroides, vitaminas y elementos minerales). Estos metabolitos son necesarios para su funcionamiento y para su relación con el medio externo. Entre ellos, los metabolitos secundarios (saponinas, alcaloides, polifenoles, terpenos, esteroides, ácidos y aminos no proteicas, glucósidos cianogénicos y otros heterósidos) son como su denominación lo indica: compuestos que no son *sensu stricto* indispensables para las funciones principales de la planta. Estos metabolitos secundarios son actualmente asociados a la defensa de la planta, funcionan como medio de protección en contra de insectos herbívoros, actúan en contra de bacterias, hongos y virus, así como mecanismo de defensa en contra de otras plantas en la competencia por los nutrientes y la luz, también se ha documentado la acción de estos compuestos secundarios en contra de los efectos destructivos de los rayos ultravioleta, entre otros (Fraenkel, 1969; Wink, 1988).

En las últimas décadas, alrededor del mundo se han usado indiscriminadamente productos químicos con actividad antihelmíntica para el control de enfermedades gastrointestinales causadas por parásitos en pequeños rumiantes, este uso indiscriminado de fármacos, ha creado farmacoresistencia de las poblaciones de nematodos que causan infestaciones gastrointestinales además de que se pueden encontrar residuos de estos fármacos en los productos obtenidos de animales tratados (Jackson y Coop, 2000; Tsiboukis *et al.*, 2013).

Esta situación ha motivado a expertos parasitólogos a buscar alternativas para minimizar el uso indiscriminado de fármacos antihelmínticos para el control parasitario en pequeños rumiantes.

Los recientes estudios se han centrado en el uso de compuestos fenólicos derivados de plantas, especialmente taninos, que muestran una actividad antihelmíntica directa e indirecta para el control de parasitismo gastrointestinal en los rumiantes (Athanasiadou *et al.*, 2001, Ghithiori *et al.*, 2006; Marie-Magdeleine *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2014).

La presencia de los taninos en el reino vegetal es característico cuando percibimos el sabor astringente en algunas frutas y en el vino tinto, de igual manera podemos encontrarlos en las coloridas flores durante la primavera y las hojas en el otoño. La presencia de taninos depende de la especie de la que se trate sin embargo los podemos encontrar tanto en las plantas gimnospermas como en las angiospermas; en estas últimas las plantas dicotiledóneas como en el caso de algunas leguminosas, Anacardiaceae, Combretaceae, Rhizophoraceae, Myrtaceae y Polynoaceae son más notables por su contenido de taninos. Las plantas elaboran una multitud de moléculas orgánicas (glúcidos, lípidos, ácidos, sustancias pépticas, saponinas, alcaloides, polifenoles, terpenos, esteroides, vitaminas y elementos minerales. Estos metabolitos son necesarios para su funcionamiento y para su relación con el medio externo. Entre ellos, los metabolitos secundarios (saponinas, alcaloides, polifenoles, terpenos, esteroides, ácidos y aminos no proteicas, glucósidos cianogénicos y otros heterósidos) son como su denominación lo indica: compuestos que no son *sensu stricto* indispensables para las funciones principales de la planta. Estos metabolitos secundarios son actualmente asociados a la defensa de la planta, funcionan como medio de protección en contra de insectos herbívoros, actúan en contra de bacterias, hongos y virus, así como mecanismo de defensa en contra de otras plantas en la competencia por los nutrientes y la luz, también se ha documentado la acción de estos compuestos secundarios en contra de los efectos destructivos de los rayos ultravioleta, entre otros (Fraenkel, 1969; Wink, 1988).

El termino Tanino se utilizó en un principio para describir las sustancias orgánicas que se utilizaban para el curtido de pieles, este proceso es conocido en inglés como tanning, que su traducción en español es "curtido". Su uso es ampliamente distribuido en este sector debido a que los taninos reaccionan con las proteínas de colágeno presentes en las pieles de los animales, uniéndolas entre sí, de tal manera que provoca un aumento en la resistencia de la piel al calor, a la putrefacción por la humedad y al ataque de diversos microorganismos. Esta propiedad hace que por lo general los taninos resulten tóxicos para los animales que los consumen. Durante mucho tiempo se pensó que los taninos formaban complejos con las proteínas del intestino de los herbívoros formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los sitios electronegativos de la proteína, pero evidencia más reciente también avala una unión covalente entre los taninos (y otros compuestos fenólicos provenientes de las plantas) y las proteínas de los herbívoros que los consumen. El follaje de muchas plantas contiene enzimas que oxidan los fenoles a sus formas quinonas en los intestinos de los herbívoros. Las quinonas son altamente reactivas, electrofílicas, y reaccionan con los grupos de proteínas nucleofílicos  $-NH_2$  y  $-SH$ . Cualquiera que sea el mecanismo por el que ocurra la unión proteína-tanino, este proceso tiene un impacto negativo en la nutrición de los herbívoros. Los taninos pueden inactivar las enzimas digestivas de los herbívoros y crear complejos agregados de taninos y proteínas de plantas que son difíciles de digerir (Felton *et al.*, 1989).

Debido a su naturaleza química, los taninos condensados tienen un efecto bacteriostático y bactericida sobre los microbios del rumen, por tal motivo, afecta de diferentes formas el metabolismo de los nutrientes a nivel ruminal dependiendo del nivel de inclusión en las dietas. Los taninos condensados (TC) afectan a los microorganismos del rumen de tres formas: la primera, a través de la inhibición de la actividad enzimática, la segunda por la falta de sustrato al formar complejos con las proteínas y los carbohidratos, y la tercera, por la acción directa sobre la membrana de la pared celular y la falta de iones metálicos (Piñeiro *et al.*, 2015). Adicionalmente los complejos que se forma entre los TC y los nutrientes contenidos en las dietas, podrían dar lugar a una mayor eficiencia microbiana, fomentar el crecimiento de algunos de éstos y es posible que sean capaces de modificar la composición química del propio microorganismo, induciendo de esta manera cambios en toda la fracción microbiana (Castro *et al.*, 2011).

Algunos estudios han demostrado los efectos negativos del uso de forrajes con altas concentraciones de TC (Waghorn, 2008), estos forrajes utilizado en ovejas provocaron una reducción en la actividad enzimática de un 50 a un 70%, además de que pueden causar daños en el omaso y abomaso, reduciendo la producción de pepsina, además de provocar cambios en el tamaño de las vellosidades digestivas provocando con esto una disminución en la absorción de los nutrientes e incluso algunos tipos de taninos pueden causar lesiones en la mucosa intestinal.

Los efectos de los TC sobre la nutrición y producción animal están relacionados con varios factores tales como la composición de la dieta, el periodo de adaptación, el momento de la cosecha, el tipo y la concentración de los taninos, además del estado fisiológico de los animales al momento de consumirlos, que está íntimamente relacionado con los requerimientos nutricionales (Theodoridou *et al.*, 2010).

Los taninos condensados son normalmente considerados como compuestos antinutricionales y tóxicos para los herbívoros, especialmente cuando se encuentran en una alta concentración en los tejidos vegetales (más del 6% MS) (Aerts *et al.*, 1999; Butter *et al.*, 1999). Sin embargo, cuando se ingiere en dosis menores, la TC puede tener efectos benéficos sobre la nutrición de los rumiantes mediante la prevención del timpanismo, incremento en la utilización digestiva de proteínas de la dieta, y actuando como antihelmínticos y como antioxidantes (Makkar, 2003; Waghorn, 2008). Por otro lado, los taninos condensados también pueden tener cierto potencial para interferir con el metabolismo del rumen y modular la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados, así como para mejorar la estabilidad oxidativa de la carne (Vasta y Luciano, 2011). Si consideramos que los primeros aspectos que el consumidor toma en cuenta para comprar carne son el color y el contenido de grasa de cobertura e infiltrada (Risvik, 1994) y que el color está relacionado con el grado de oxidación de la mioglobina, que a su vez depende del grado de protección de la misma frente a los prooxidantes (Monahan *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995; McDowell *et al.*, 1996), los beneficios de incluir TC en la dieta representa una excelente estrategia nutricional para mejorar la calidad de la carne en ovinos. Por otro lado uno de los aspectos que recientemente ha cobrado especial interés entre los consumidores, es el aporte de grasas saturadas en los alimentos, las cuales repercuten directamente sobre la salud humana como es el caso de los ácido grasos polinsaturados de la serie n-3 (AGPI n-3) y el ácido linoleico conjugado (ALC) (Williams, 2000; Geay *et al.*, 2001), el contenido de estos ácidos en los productos obtenidos de los rumiantes (carne y leche) puede ser modificado a través de la manipulación de la nutrición de los animales de tal manera que se pueden

producir alimentos más sanos, sin embargo la modificación de estos ácidos repercute sobre el aroma, el sabor y la vida de anaquel de los productos (Wood *et al.*, 1999).

En otro estudio un grupo de investigadores reportaron que los patrones de biohidrogenación en el rumen fue modificado gracias a la inclusión de *Cistus ladanifer L.* (CL) en dietas altas en forraje suministradas a corderos en finalización, dando como resultado un importante incremento en el ácido linoleico conjugado contenido en la grasa intramuscular de los corderos (Jerónimo *et al.*, 2010). Las variables de peso de la canal caliente y peso de la canal fría no se vieron afectadas por la inclusión de diferentes niveles de CL, de igual manera tampoco se vio afectada la conformación de la canal por efecto de los tratamientos clasificándose un 40.8% como R (buena), un 53.1% como O (regular) y un 6.1% como P (pobre). Sin embargo, la deposición de grasa en la canal, se incrementó a medida que aumentaba el porcentaje de inclusión en la dieta de CL pasando de 1.94 (5% CL) a 2.38 (10% CL) y a 2.61 (20% CL); por otro lado, la suplementación con aceite disminuyó el porcentaje muscular en la paleta y los hombros de borregos y aumento la deposición de grasa del riñón y la deposición de la grasa en la canal. Los parámetros de ternesa y jugosidad de la carne se vieron afectados cuando hubo una interacción de CL con una mezcla de aceites vegetales, cuando los corderos fueron alimentados con el 5% de CL la ternesa disminuyó ( $P= 0.012$ ), sin embargo cuando la dieta aumento el nivel de inclusión de CL (10%) y disminuyó el nivel de inclusión de la mezcla de aceites vegetales (4%) registro el valor más bajo para la variable de ternesa de la carne, para la variable de jugosidad disminuyó este valor cuando hubo una interacción de la mezcla de aceites vegetales y las dietas con 5 y 10% de inclusión de CL, para las dietas con un 20% de inclusión de CL no hubo diferencias ni en jugosidad ni en ternesa (Francisco *et al.*, 2015).

En otro estudio que se realizó con borregos en finalización alimentados con dietas altas en forraje, sorprendentemente, no se vieron afectados los parámetros de ganancia diaria de peso, características de la canal y la calidad de la carne al sustituir el 25% de materia seca de heno de alfalfa por una mezcla de extracto de semilla de uva con *C. ladanifer L.* y aceites vegetales (Jerónimo *et al.*, 2012).

El trébol rojo (*Trifolium pratense L.*), es una leguminosa perenne de ciclo corto que crece durante el invierno en la región de los Apalaches en Estados Unidos y cuya principal característica es la de formar uniones de proteínas-quinona que alteran la deposición del tejido muscular lo que mejora la utilización de la proteína por los animales en pastoreo (Jones *et al.*, 1995), además de mejorar la resiliencia de los animales ante la infestación por nematodos gastrointestinales y mejorar los rendimientos de las cabras productoras de carne (Turner *et al.*, 2013), el loto corniculado (*Lotus corniculatus L.*) es una leguminosa perenne que crece en épocas frías, y contiene TC que reduce las infestaciones de nematodos gastrointestinales (Molan *et al.*, 2003). El forraje de achicoria (*Cichorium intybus L.*) es una planta herbácea perenne que contiene lactonas sesquiterpénicas (terpenoide) y TC que puede reducir infección NGI (Foster *et al.*, 2011; Molan *et al.*, 2003) y que han demostrado mejorar la ganancia de peso en corderos (Turner *et al.*, 1999). Estos tres forrajes fueron utilizados por Turner *et al.*, (2015) en un experimento para finalizar a 72 cabritos donde se observó que los animales suplementados con trébol rojo tuvieron un mayor peso vivo final así como canales más pesadas en comparación a los animales que recibieron suplementación con loto corniculado y achicoria, sin embargo no se registraron diferencias significativas en las variables de área de ojo de la cotilla, espesor de la grasa dorsal, grasa intramuscular (marmoleo), longitud de la canal y conformación de la canal. En cuanto a la velocidad de crecimiento, los corderos crecen más rápido

cuando pastorean achicoria que cuando pastorean trébol rojo, lo que no sucede con los cabritos, sin embargo en estos resultados se deben de considerar algunos factores que están influyen en los mismos, como por ejemplo, tiene que ver la selectividad de las plantas por el animal, la misma digestibilidad e ingesta del forraje que a su vez está influenciada por los cambios en la masa del forraje, el valor nutritivo y su concentración de metabolitos secundarios del forraje dependiendo de la época del año en que es consumida por el animal. Las diferencias en los parámetros productivos de las cabras pueden atribuirse también en parte a los metabolitos secundarios de los forrajes, en el caso del trébol rojo la mejor ganancia de peso se puede atribuir a la acción de los fitoestrógenos (Moorby *et al.*, 2004) y a un aumento de la polifenoloxidasas que permiten un escape mayor de las proteínas del rumen. El loto corniculado típicamente contiene TC que mejoró la eficiencia en el uso de las proteínas a través de un mayor escape de proteínas del rumen para mejorar el rendimiento de las ovejas. Achicoria puede mejorar el rendimiento debido a un mejor valor nutritivo del forraje por efecto de la época del año (Hall y Jung, 2008), además de que contiene lactonas sesquiterpénicas que pueden mejorar el rendimiento de los animales mediante la reducción en la infestación de NGI (Foster *et al.*, 2011).

En relación al peso de la canal se tienen resultados contradictorios, por un lado Hopkins *et al.*, (1995), reportaron que no se registraron diferencias significativas en ganado caprino para carne suplementados con achicoria o con heno de alfalfa (*Medicago sativa* L.), y por otro lado Turner; Cassida y Zerby, (2014) reportaron canales más pesadas cuando los cabritos fueron suplementados con trébol rojo en comparación con pasto orchard, de igual manera Hosking *et al.*, (1999) reportaron canales más pesadas en crías de ciervos destetados cuando se suplementaron con pasto sulla (*Hedysarum coronarium*, alto contenido de TC) comparado con chicory.

Hopkins *et al.*, (1995) no encontraron diferencias significativas en el espesor de grasa dorsal en corderos finalizados con pasto achicoria o alfalfa. Sin embargo, en otro estudio corderos que pastoreaba en praderas de lotera registraron mayor espesor de grasa dorsal en comparación con los corderos que pastoreaban en praderas de raygrass y trébol blanco (Ramírez *et al.*, 2005). Douglas *et al.*, (1995) trabajando con dos grupos de corderos en pastoreo reportaron que los corderos en pastoreo en praderas con lotera registraron canales más pesadas, pero no hubo diferencia en la grasa dorsal en comparación con los corderos que pastorearon en praderas de alfalfa.

Solaiman *et al.*, (2010) reportaron que los TC reduce la deposición de grasa en la canal de cabritos destetados cruce de cabra Kiko a los cuales se les ofrecieron niveles crecientes de Lespedeza serícea (*Lespedeza cutnatea*). Dependiendo de los niveles de consumo de los taninos condensados y del nivel de concentración en los forrajes será el nivel de impacto sobre el espesor de la grasa dorsal en los animales (Min y Hart, 2003). Min *et al.*, (1998) informaron que con una concentración de TC de 22 a 38 g por kg de MS en praderas de lotera beneficiaron rendimiento ovejas, pero se necesitaron 17 semanas de pastoreo para que se viera reflejado el beneficio en el crecimiento de lana.

## CAPÍTULO 2. Principales enfermedades parasitarias en ovinos

### 2.2.1. Nematodos

#### 2.2.1.1. Características generales

El Phylum Nematoda está constituido por metazoos protóstomos pseudocelomados de simetría bilateral, insegmentados, de cuerpo cilíndrico aguzado en ambos extremos, filiformes o fusiformes y sin apéndices (Fig. 20). Son conocidos vulgarmente como “gusanos cilíndricos”, y es un grupo muy numeroso, hay nematodos parásitos, de invertebrados, vertebrados y de plantas además de nematodos de vida libre (dulceacuícolas, marinos y terrestres).

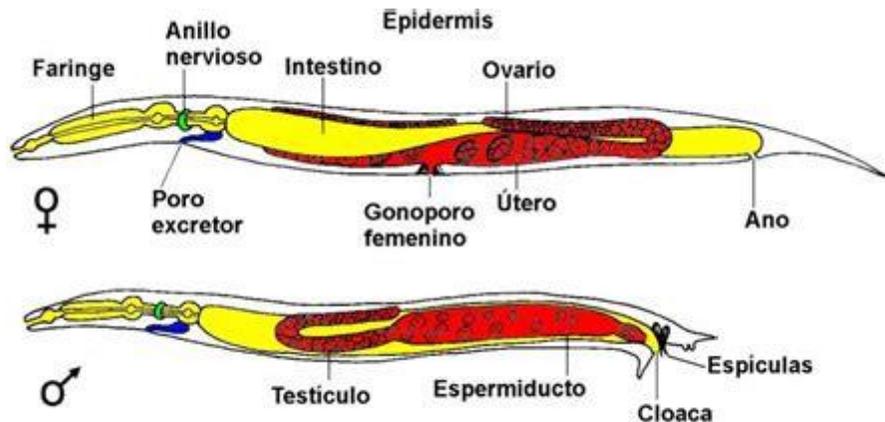


Figura 20. Representación anatómica del parasito nematodo

Son alargados con ambos extremos ahusados, presentan simetría bilateral y el compartimento del tejido conectivo fluido, cavidad corporal que derivó del blastocele embrionario. Tienen un sistema digestivo completo, con la boca en el extremo anterior y el ano cerca del extremo posterior. El cuerpo está recubierto con una cutícula no celular que es secretada por la hipodermis y es eliminada cuatro veces durante la ontogenia. Los músculos de la pared del cuerpo presentan un arreglo longitudinal, sin capa circular. El sistema excretor consiste en glándulas ventrales, canales laterales, o ambas, abriendo cerca del extremo anterior por un poro excretor ventral. Excepto por algunos órganos sensitivos que tienen cilias modificadas, no presentan cilias ni flagelos, incluso aún en el gameto masculino. La mayoría de los nematodos son dioicos y presentan un dimorfismo sexual considerable: las hembras son generalmente más grandes, y el extremo posterior del macho es más curvado. Algunas especies son hermafroditas y otras partenogenéticas. La mayoría son ovíparos, pero algunos son ovovivíparos. El sistema reproductor femenino abre en un poro genital ventral, mientras que el masculino abre en una cloaca, junto con el aparato digestivo. Los nematodos adultos varían en tamaño, desde 1 mm, como el género *Caenorhabditis*, a más de un metro como *Drancunculus*.

Son típicamente gonocóricos (sexos separados) y, especialmente en las formas parásitas, con acusado dimorfismo sexual, que se manifiesta tanto en las dimensiones como por la presencia de estructuras particulares situados en la extremidad posterior del cuerpo.

Su desplazamiento obedece al comportamiento del tejido conectivo fluido y esqueleto hidrostático, la musculatura somática y la pared del resto del cuerpo forman una cavidad llena de líquido el tejido conectivo fluido. Su función depende de la cantidad de líquido no compresible que haya encerrado, de la habilidad de las contracciones musculares para ejercer presión sobre el líquido, y de la transmisión de la presión en todas direcciones en el fluido como resultado de su incompresibilidad. Mientras los músculos de las regiones dorsal y ventral se contraen, comprimen a la cutícula de ese lado, y la fuerza de la contracción es transmitida (por el fluido del CTC) al otro lado del nematodo, estirando la cutícula del lado opuesto. La compresión y el estiramiento de la cutícula sirven para antagonizar al músculo, y son las fuerzas que retornan al cuerpo a la posición de reposo cuando los músculos se relajan. La alternancia de la contracción y de la relajación en los músculos ventrales y longitudinales llevan al cuerpo a una serie de curvas dando lugar al movimiento característico de los nematodos (Simón y Simón, 1999).

En la mayoría de los nematodos, el sistema digestivo es completo, poseen boca intestino y ano, en algunos mermítidos y filarias el ano está obliterado. La boca es circular y está rodeada de un máximo de seis labios. Presentan una cavidad bucal entre la boca y el esófago, que en algunas especies puede estar recubierta de una gruesa pared y formar la cápsula bucal, el alimento (sangre, tejidos, células, contenidos intestinales, etc.) ingresa por la boca y se dirige a una zona muscular conocida como el esófago o faringe, que succiona el alimento y lo introduce al intestino. El lumen del esófago es trirradiado. Algunas especies presentan glándulas en el esófago que secretan sustancias digestivas o anticoagulantes. El esófago es un carácter taxonómico muy importante en los niveles superiores de la clasificación. En la clase Enoplea el esófago tiene más de cinco glándulas, en el esófago especializado de Trichuridae y Mermithidae la porción anterior presenta una pared delgada, y luego un tubo muscular rodeado de una columna de células glandulares denominadas esticocitos, cuyo conjunto forma la estructura conocida como esticosoma. El intestino es simple, presenta forma de tubo y se extiende desde la boca hasta el proctodeo, está construido por una única capa de células intestinales. En los machos termina en una cloaca junto con los elementos del sistema reproductor. En las hembras termina en el ano. La región comprendida entre la cloaca y el extremo posterior en los machos y entre el ano y el extremo posterior en las hembras recibe el nombre de cola o cauda.

Los machos poseen testículos que pueden encontrarse en pares o no. Son telogónicos, las células germinales se encuentran en el extremo terminal de la gónada. Al testículo le sigue una vesícula seminal, de ésta sale un vaso deferente, que se divide en una región glandular anterior y en una región muscular posterior, el ducto eyaculador abre en una cloaca. Algunas especies tienen un par de glándulas de cemento cerca del ducto eyaculador que secretan un material duro que utilizan para tapar a la vulva después de la cópula. Los espermatozoides carecen de flagelos. En la mayoría de las especies existen dos (a veces una) espículas, una suerte de varillas quitinizadas simples o complejas, que nacen en una vaina espicular anexa a la cloaca y son protusibles al exterior y retráctiles por la acción de un músculo localizado en la base de esta vaina. La función de las espículas

es de mantener abierto el orificio genital de la hembra durante la cópula y formar una especie de canal conductor del esperma para asegurar la fertilización, ya que no existen órganos copuladores propiamente dichos (Simón y Simón, 1999).

En las hembras el número de ovarios puede variar de 1 a 6. Estos pueden ser telogónicos u hologónicos, en este último caso las células germinales proliferan a lo largo de toda la gónada. Los ovocitos se originan en el ovario y luego continúan por el oviducto, en la zona proximal de éste se distingue una espermateca, almacenadora de espermatozoides. El número de ovarios puede variar de 1 a 6 y estos pueden ser telogónicos u hologónicos, en este último caso las células germinales proliferan a lo largo de toda la gónada. Los ovocitos se originan en el ovario y luego continúan por el oviducto, en la zona proximal de éste se distingue una espermateca, almacenadora de espermatozoides. Cuando los oocitos entran al oviducto (espermateca) se produce la fecundación y la formación de la cáscara de del huevo. El oviducto es continuo con el útero, cuya pared tiene fibras musculares. El extremo distal del útero posee una musculatura más desarrollada y se lo denomina ovivector, a éste le sigue la vagina que se abre al exterior en la vulva. Esta puede localizarse en el extremo anterior, en la región ecuatorial o cerca del ano dependiendo de las especies (nunca se abre posteriormente al ano). Los huevos son expulsados al exterior por acción muscular del ovivector y de la vulva (figura 21).

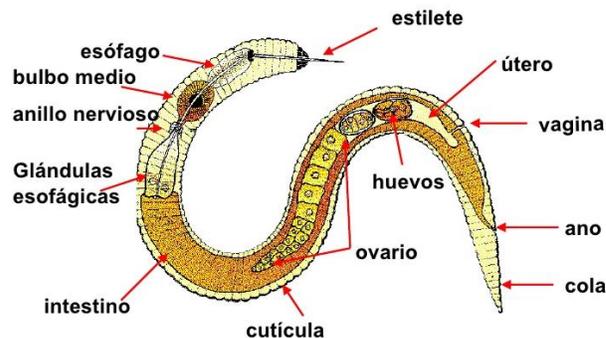


Figura 21. Esquema de un nematodo hembra

La cutícula del huevo consta de tres capas: una capa vitelina, normalmente no visible al microscopio óptico y formada por la antigua membrana plasmática del ovocito; una capa quitinosa que se forma entre la capa vitelina y el citoplasma retraído, y una capa lipídica, más interna, formada por la extrusión y fusión del contenido de glóbulos lipídicos que se hallan en el citoplasma y migran a la periferia del mismo durante la embriogénesis. La capa quitinosa tiene una proporción de quitina muy variable según las especies y también contiene proteínas. Su función es probablemente estructural o de soporte. La capa lipídica evita la desecación y la penetración de sustancias polares. En algunas especies (ej. *Ascaris*) existe una cuarta capa, externa, la capa proteínica que consiste en un complejo de proteína más mucopolisacáridos ácidos, y es aportada por secreciones de células

del útero. Algunos huevos poseen un opérculo, un área especializada de la pared por donde emerge el juvenil. En los huevos de los Oxyuridos hay un opérculo, en los de los Trichuridos, dos.

Posteriormente el huevo eclosiona y emerge las larvas que durante su desarrollo sufre cuatro mudas de su cutícula. Los estadios sucesivos se denominan larvas L<sub>1</sub> a larvas L<sub>4</sub> y el 5º estadio es el de adulto. En muchos nematodos parásitos existe una adaptación común: una detención en algún punto de su desarrollo, que les permite sobrevivir en condiciones adversas hasta encontrar el siguiente hospedador. Este fenómeno se denomina hipobiosis. Es muy común que los L<sub>3</sub> de varias especies detengan su desarrollo de esta manera, permaneciendo dentro de la cutícula del L<sub>2</sub> y exhibiendo ciertos comportamientos que facilitarían el acceso al siguiente hospedador. Los L<sub>3</sub> de *Haemonchus* o *Trichostrongylus*, parásitos de rumiantes, que migran a la vegetación para ser consumidos más fácilmente por aquéllos (Simón y Simón, 1999).

### **2.2.1.2. Descripción del género *Haemonchus***

La descripción taxonómica de *Haemonchus spp.* es la siguiente:

Reino: Animalia  
Filo: Nematoda  
Clase: Secernentea  
Orden: Strongylida  
Superfamilia: Trichonstrongyloidea  
Familia: Trichostrongylidae  
Género: *Haemonchus*  
Especie: *contortus*  
*placei*

El género *Haemonchus* aparentemente se originó en África, donde hubo una colonización y diversificación inicial en antílopes, posteriormente, estas cepas incipientes colonizaron y se desarrollaron en otros rumiantes de vida salvaje, con el paso del tiempo y la domesticación de algunas especies estas cepas colonizaron a los rumiantes domésticos, más tarde con las migraciones humanas este género se propago a otros continentes colonizando a los rumiantes alrededor del mundo (Hober *et al.*, 2004).

*Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei* son nematodos gastrointestinales que infectan a bovinos, ovinos, caprinos y a otros rumiantes prácticamente en todo el mundo, sobre todo en regiones cálidas y húmedas. Son los parásitos intestinales más frecuentes y dañinos de los hatos ganaderos, principalmente para los ovinos, en ocasiones, sobre todo cuando se tiene rebaños en pastoreo, se presentan con otros gusanos intestinales provocando infecciones mixtas (*Cooperia spp.*, *Ostertagia spp.*, *Trichostrongylus spp.*) la enfermedad causada por las infecciones con estos nematodos se denomina hemonquiiasis, hemoncosis o haemonchosis (Angulo, *et al.*, 2007).

Los nematodos en su fase adulta se localizan en el abomaso, son de color rojizo y miden de 1 a 3 cm de longitud. En las hembras los ovarios son de color blanco enrollados en forma de espiral alrededor del intestino, el cual está lleno de sangre lo que le da el estriado característico de las hembras (figura 22). La cavidad bucal tiene una lanceta dorsal que sirve para perforar la mucosa gástrica y succionar la sangre. La bolsa copuladora de los machos tiene un lóbulo dorsal asimétrico y las espículas terminan en forma de espolón, en las hembras normalmente la vulva está cubierta por la solapa bulbar (Jacquiet, *et al.*, 1997).



Figura 22. Estriado característico de las hembras de *Haemonchus contortus*

Generalmente las hembras son más grandes (1850  $\mu\text{m}$ ) que los machos (1350  $\mu\text{m}$ ). las hembras son extremadamente prolíficas ovopositando hasta 5000 huevos/hembra/día (Le Jambre. 1995)

Como la mayoría de los nematodos gastrointestinales, el *Haemonchus* tiene un ciclo de vida directo (Figura 23) con una fase exógena y una endógena. La fase exógena comprende el desarrollo del huevo hasta el estadio L<sub>3</sub> y la fase endógena abarca desde la ingesta de la L<sub>3</sub> hasta el desarrollo del parásito adulto, la cópula y la producción de huevos. El desarrollo de la fase exógena, ocurre en las praderas donde, dependiendo de las condiciones medioambientales (humedad y temperatura) puede durar de 4 a 8 días. El hospedero adquiere la infección al ingerir la L<sub>3</sub> directamente del pasto. Esta fase comprende desde la eliminación de los huevos a través de las heces, hasta el desarrollo del estadio infectante L<sub>3</sub> pasando por el desarrollo de L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>. Los estadios L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub> se alimentan de bacterias y detritus de las heces, para después transformarse en L<sub>3</sub> la cual se encuentra cubierta por la cutícula desprendida de la L<sub>2</sub> por lo tanto este estadio no puede alimentarse y depende únicamente de las reservas energéticas para su supervivencia (Angulo, 2007; Onyiah y Arslan. 2005).

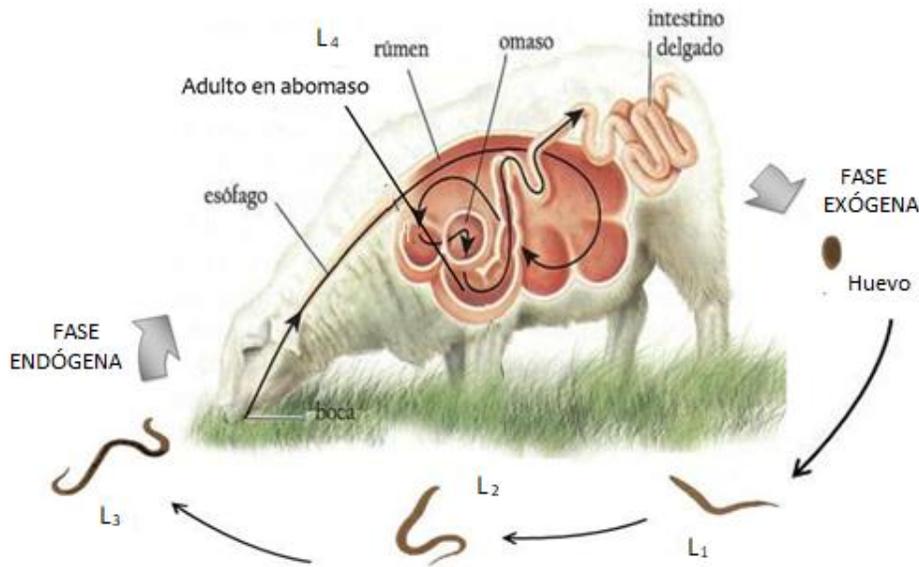


Figura 23. Ciclo Biológico de *Haemonchus contortus*

Son varios los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad, entre los más importantes es el grado de virulencia del parásito y la respuesta del hospedero ante la enfermedad. Debido a que es un endoparásito hematófago, provoca lesiones en la mucosa gástrica y hemorragias internas además de alterar los parámetros sanguíneos al disminuir considerablemente el volumen celular aglomerado (VCA) y disminuye su capacidad para absorber a nivel intestinal los nutrientes necesarios para su óptimo desarrollo del hospedero. Un parásito adulto puede ingerir hasta 0.05 ml de sangre por día causando una notable pérdida de sangre (anemia) además de una baja en el VCA ya que además de alimentarse de sangre el parásito libera un anticoagulante en la herida lo que agrava los síntomas (Williamson *et al.*, 2003). Los daños provocados en la mucosa por las larvas y los adultos provocan inflamación de la mucosa gástrica (gastritis) y ulceración de la pared estomacal. En infecciones crónicas también provocan hígado graso, hipoproteinemia y emaciación. En infecciones agudas puede ocasionar muertes repentinas sobre todo en corderos y cabritos jóvenes, también provoca edema abdominal, torácico y submandibular (cuello de botella), anemia por deficiencia de hierro, caída progresiva de lana o pelo, falta de apetito, pérdida de peso y muerte (Fox y Jacobs 1991; Rowe *et al.*, 1988.).

En infecciones crónicas se ha encontrado una reducción de las concentraciones de proteínas plasmáticas debido a la pérdida de sangre y la gastritis hemorrágica que sufre el hospedero, además, la filtración de proteínas al lumen gástrico se produce como resultado de la alteración de las uniones intercelulares y el aumento de la pérdida de células epiteliales de la mucosa gástrica lo que afecta su permeabilidad, el hospedero se ve forzado a incrementar la producción de moco y una mayor síntesis proteica por parte del sistema inmunitario en respuesta a esta pérdida de proteínas. Además, muchos factores evitan que tales pérdidas de proteínas sean reemplazadas por la alimentación. Los animales infectados reducen la ingesta de alimentos debido a la anemia; la

gastritis reduce el paso de alimentos a través del tracto gastrointestinal provocando el Síndrome de mala digestión, esto conlleva inevitablemente a un aumento del valor del pH en el abomaso, lo que evita la síntesis de pepsina y reduce la absorción de aminoácidos y péptidos. Este aumento de pH en el abomaso proviene de una disminución en la producción y excreción de ácido clorhídrico por parte de las células parietales de la mucosa gástrica, generadas por su secreción y / o excreción. El número reducido de células parietales se debe a la lesión del tejido, la infiltración celular causada por la presencia de etapas parasitarias o sus productos de secreción-excreción liberados en el medio, y el reemplazo celular por células inmaduras no funcionales (Schallig, 2000).

### **2.2.1.3. Descripción del género *Trichostrongylus***

La descripción taxonómica de *Trichostrongylus spp.* es la siguiente:

Reino: Animalia  
Filo: Nematoda  
Clase: Secernentea  
Orden: Strongylida  
Superfamilia: Trichonstrongyloidea  
Familia: Trichostrongylidae  
Género: *Trichostrongylus*  
Especie: *colubriformis*  
*axei*  
*vitrinus*  
*capricola*

*Trichostrongylus* es un género de parásito nematodo gastrointestinal que afecta a numerosos mamíferos y aves domésticas y salvajes en todo el mundo.

Las especies de mayor importancia veterinaria son:

*Trichostrongylus colubriformis*, *vitrinus* infectan a menudo al ganado bovino, ovino, caprino y otros rumiantes casi siempre en infecciones mixtas con otros nematodos gastrointestinales (*Ostertagia*, *Cooperia*, *Haemonchus*, etc.).

*Trichostrongylus axei* infecta a bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y caballos en todo el mundo.

*Trichostrongylus tenuis* parasita a las aves en todo el mundo: gallináceas, pavos, gansos, etc.

La localización de *Trichostrongylus* en el hospedero depende de la especie tal como se muestra en la tabla 1:

	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Ovinos, caprinos y bovinos	Intestino delgado
Trichostrongylinae	<i>Trichostrongylus axei</i>	Ovinos, caprinos y bovinos	Abomaso
	<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	Cerdos y caballos	estomago
	<i>Trichostrongylus capricola</i>	Ovinos y caprinos	Intestino delgado

Tabla 1. Lugar de alojamiento en el hospedero del parásito *Trichostrongylus* de acuerdo a la especie

#### Descripción de *Trichostrongylus*

Los adultos son esbeltos de color pardo rojizo y alcanzan 11 mm de longitud. Las espículas de *T. colubriformis* son iguales, las de *T. axei* y *T. tenuis* son de longitud diferente. La bursa de los machos tiene lóbulos laterales. Los huevos miden unas 40 x 80 micras.

#### Ciclo biológico

Las especies de *Trichostrongylus* tienen un ciclo vital directo. Tras abandonar el hospedador a través de las heces, los huevos eclosionan en el entorno y dan lugar a larvas infectivas entre 5 y 7 días dependiendo de las condiciones climatológicas, en climas fríos la eclosión puede retardarse considerablemente. Estas larvas infectivas pueden entrar en un estado de hipobiosis y sobrevivir hasta 6 meses en los pastos, hasta que las condiciones medioambientales sean las óptimas para poder ser ingeridas por el hospedador final al pastar, las larvas migran al intestino delgado y ahí se alojan en las criptas de la mucosa y completan su desarrollo a adultos. El periodo de prepatencia es de unas 3 semanas.

Al igual que otros parásitos gastrointestinales, el, *Trichostrongylus* daña la mucosa intestinal o estomacal (en el caso de *T. axei*) de los hospedadores lo que puede provocar enteritis o gastritis, diarrea o estreñimiento, debilitación general y pérdida de apetito y peso que pueden ser agudos si la infección es masiva y se desarrolla en un tiempo breve. Puede haber muerte repentina en animales jóvenes con altas cargas parasitarias (Simón y Simón, 1999).

El diagnóstico de las infecciones de *Trichostrongylus spp.* es difícil de determinar, pues se asemejan mucho a otras especies próximas. Los síntomas clínicos más comunes son diarrea (a veces mucosa, líquida o sangrienta), estreñimiento, debilitación, inapetencia y a veces también anemia.

La detección de huevos típicos en las heces confirma el diagnóstico. La identificación de la especie exige el examen post-mortem de los gusanos adultos.

#### 2.2.1.4. Descripción del género *Ostertagia*

La descripción taxonómica de *Ostertagia spp.* es la siguiente:

Reino: Animalia  
Filo: Nematoda  
Clase: Secernentea  
Orden: Strongylida  
Superfamilia: Trichonstrongyloidea  
Familia: Trichostrongylidae  
Género: *Ostertagia*  
Especie: *circumcincta*  
*Ostertagi*  
*trifurcata*  
*occidentalis*

La *Ostertagia* es un género de nematodos estrogilidos de la familia Trichostrongylidae. Son nematodos atenuados que se encuentran en forma de quistes incrustados en las paredes del abomaso de los rumiantes. El nematodo adulto tiene una coloración parduzca y poseen un esófago claviforme. Los machos miden de 7 a 9 mm y tiene una bolsa copuladora en conjunto de lóbulos dorsales y apicales y espículas en forma de gancho trifurcado, además de un gobernáculo, las hembras miden de 10 a 12 mm y poseen una vulva con pliegue (Simón y Simón, 1999).

Los nematodos del género *Ostertagia* tienen la particularidad de actuar sobre las células funcionales de las glándulas gástricas. Ingeren el contenido abomasal lo que conlleva a una baja en el nivel de producción de los animales ya que se ve afectado el metabolismo de las proteínas. Interfiere en la conversión del pepsinógeno a pepsina y se pierde el efecto bacteriostático ruminal. El mayor daño y gravedad de la ostertagiosis es en el momento en que la larva sale de la glándula fúndica.

Su ciclo biológico de la *Ostertagia* es directo, los huevecillos fértiles expulsados a través de las heces del animal, se transforman en larva de primer estadio ( $L_1$ ), que madura y se desarrolla en larva de segundo estadio ( $L_2$ ) y finalmente se desarrolla en larva de tercer grado o larva infectante ( $L_3$ ). Estos cambios pueden ocurrir entre 5 y 7 días bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad. La  $L_3$  puede migrar desde el estiércol al forraje dependiendo de las condiciones medio ambientales. Una vez que la  $L_3$  ha sido ingerida por el ganado, esta se transforma en  $L_4$  y  $L_5$  dentro de las glándulas abomasales en aproximadamente 18 a 21 días, al cabo del cual, el parasito adulto joven, emerge de las glándulas hacia el lumen abomasal en donde puede entrar en un estado de hipobiosis o madura hasta el estadio adulto (Simón y Simón, 1999).

En la ostertagiosis existen dos formas clínicas de la enfermedad que son la Tipo I y la Tipo II además de una presentación subclínica.

Tipo I: Esta forma clínica ocurre después de la ingestión de grandes cantidades de L<sub>3</sub>. Los signos clínicos ocurren aproximadamente tres semanas después de la ingestión de las L<sub>3</sub>, las larvas se introducen en las glándulas estomacales y permanecen por 20 o 21 días, alcanzando su estado adulto y volviendo al lumen. Este tipo de infección tiene una alta morbilidad (75%) y baja mortalidad (0%). Los signos principales son anorexia, pérdida de peso, diarrea y mortalidad. Comúnmente se ve afectada una alta proporción del hato.

Tipo II: en este tipo de infección, la larva permanece en el interior de la glándula fúndica alrededor de 3 meses, manteniéndose hipobiótica y saliendo sincrónicamente con una gran cantidad de parásitos por lo que se genera un gran daño a nivel de la mucosa gástrica. Puede haber diarrea intermitente que coincide con la salida de grandes cantidades de larvas, anorexia, pérdida de peso, hipoalbuminemia, anemia moderada y edema submandibular. Los signos clínicos generalmente se presentan en un no más del 10% del ganado. Esta presentación es observada en ganado en pastoreo, ganado estabulado y corrales de engorda y más comúnmente en ganado entre dos y cuatro años de edad. Por lo general este cuando se presenta en comienzos de la primavera y es de baja morbilidad (30%) pero de alta mortalidad (20%) si no reciben tratamiento.

Enfermedad Subclínica: Se presenta en vaquillas de reemplazo, ganado en crianza en pastoreo en donde la desparasitación, ha demostrado un beneficio en términos de ganancia de peso, porcentajes de concepción en ganado de carne e incrementos en la producción en ganado lechero (Herd y Zajac, 1999).

#### **2.2.1.5. Descripción del género *Cooperia***

La descripción taxonómica de *Cooperia spp.* es la siguiente:

Reino: Animalia  
Filo: Nematoda  
Clase: Secernentea  
Orden: Strongylida  
Superfamilia: Trichonstrongyloidea  
Familia: Trichostrongylidae  
Género: *Cooperia*  
Especie: *curticel*  
*oncophora*  
*punctata*

La *Cooperia* es un género de nematodo estrogilido de la familia Trichostrongylidae. Miden de 5 a 8 mm alcanzando una longitud máxima de 10 mm, son de coloración rojiza y poseen una vesícula cefálica y en la cutícula posee numerosas estrías transversales con aristas longitudinales. Los machos poseen una bolsa caudal desarrollada, además de espículas cortas, gruesas y retorcidas (Figura 24). Sus huevos tienen paredes paralelas y alcanzan un tamaño de 40 a 80 micras. Se localiza dentro del

intestino delgado y en menor frecuencia en el abomaso, es hematófago, forma nódulos que destruyen las glándulas que segregan ácidos, dependiendo de la especie parasitan a bovinos, ovinos y caprinos (Cordero del Campillo *et al.*, 1990, Sumano y Ocampo, 2006).

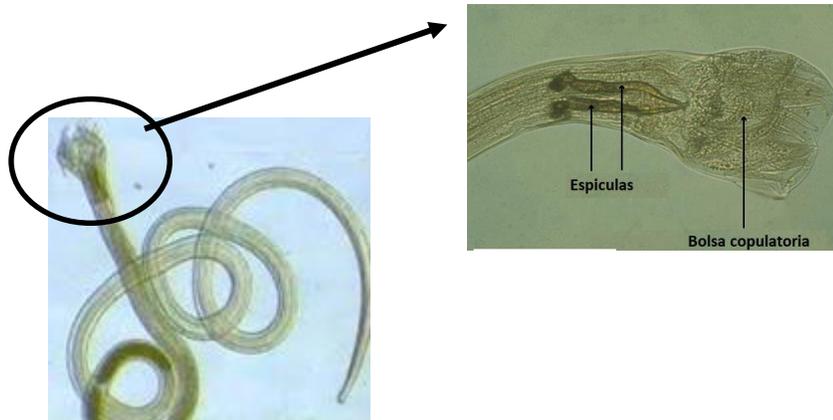


Figura 24. Representación morfológica del nematodo *Cooperia spp*

Al igual que otros nematodos su ciclo biológico de *la Cooperia* es directo. Los huevos en las heces eclosionan dentro de las 24 horas de su expulsión y en su fase exógena, se desarrollan pasando por los estadios L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> hasta su estadio infeccioso L<sub>3</sub>, proceso que dura alrededor de 4 días. Las larvas infecciosas pueden sobrevivir entre 5 y 12 meses en el medio ambiente mediante el proceso de hipobiosis. El hospedero final se infecta mediante el pastoreo. El periodo de prepatencia, antes de alcanzar su madurez sexual, es de 2 a 3 semanas, pero las larvas L<sub>4</sub> inhibidas pueden permanecer en el hospedero final hasta 5 meses antes de completar su desarrollo hasta la madurez sexual.

Las larvas L<sub>4</sub> y los adultos penetran en la mucosa intestinal, especialmente en el duodeno, causando daños generales al tejido y a los vasos sanguíneos. Los primeros síntomas clínicos aparecen al inicio del verano sobre todo en forma de diarreas acuosas, verde oscuro o negras que evolucionan a deshidratación y pérdida de peso como consecuencia del escaso aprovechamiento de los nutrientes. También puede darse hipoproteinemia. Otros síntomas típicos son apatía, falta de apetito bajas ganancias de peso y bajo o escaso rendimiento, infestaciones masivas pueden afectar gravemente a animales jóvenes que sufren de anemia (Cordero del Campillo *et al.*, 1990).

#### **2.2.1.6. Descripción del género *Nematodirus***

La descripción taxonómica de *Nematodirus spp.* es la siguiente:

Reino: Animalia  
Filo: Nematoda  
Clase: Secernentea  
Orden: Strongylida

Superfamilia: Trichonstrongyloidea  
Familia: Trichostrongylidae  
Género: *Nematodirus*  
Especie: *spathiger*  
*helvetianus*  
*filicollis*  
*battus*

Estos nematodos del género *Nematodirus* son parasitosis gastrointestinales que afectan a los bovinos, ovinos, caprinos, además de otros rumiantes alrededor del mundo, pero principalmente en las regiones del clima templado, esta infección por lo general está acompañada con otros nematodos gastrointestinales. La enfermedad causada por la infección de estos nematodos se le conoce como nematodirosis (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

Los nematodos adultos de este género alcanzan entre 1 y 2.5 cms de longitud, los machos son más pequeños que las hembras. El extremo distal del cuerpo de las hembras es más grueso lo que hace que visualmente la cabeza parezca hinchada. Los huevos son especialmente grandes alcanzan un tamaño de 90 X 200 micras, el doble de la mayoría de los gusanos estrongílicos.

Siendo también un nematodo, los *nematodirus* tienen un ciclo de vida directo, sin embargo, en esta especie existe una diferencia en comparación con los demás estrongílicos, ya que el desarrollo de los estadios hasta la L<sub>3</sub> (estadio en el que las larvas son infecciosas) tiene lugar dentro del huevo en lugar de desarrollarse en el exterior. Esto ocurre entre 1 y 3 meses después de la oviposición dependiendo de las condiciones medio ambientales. Las L<sub>3</sub> tanto en el interior del huevo como después de que emergen son muy resistentes a las condiciones climáticas adversas, puede sobrevivir hasta más de 10 meses, y son capaces de hibernar. También pueden completar el desarrollo en el interior de los establos, donde las larvas pueden sobrevivir largos periodos de tiempo. Una vez ingeridas por el hospedero final, el periodo de prepatencia es de 2 a 4 semanas. Las larvas del estadio L<sub>4</sub> de algunas especies pueden entrar en hipobiosis durante varios meses antes de completar su desarrollo (Muñoz *et al.*, 2003).

Aunque no es un nematodo tan agresivo como otros nematodos, los *Nematodirus* pueden ocasionar notables efectos en la disminución del crecimiento y pueden ocasionar muertes en infestaciones masivas, sobre todo en animales jóvenes, este género no es hematófago, sin embargo, también causan daño en la mucosa intestinal llegando a atravesar la misma, la infección se complica cuando se presentan casos mixtos con *Haemonchus contortus*. En infecciones masivas de *Nematodirus* pueden causar enteritis, diarrea negra o verde oscura, hipoproteinemia, edema periférico (mandíbula de botella), pelo hirsuto, apatía, pérdida de apetito y crecimiento reducido. El diagnóstico

se confirma mediante estudios coproparasitológico mediante la identificación de huevos en heces típicamente mayores que los de otros estrombolidos (figura 25), (Muñoz *et al.*, 2003).

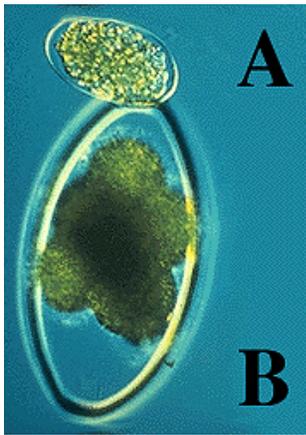


Figura 25. Huevo típico de

estrombolido (A) y huevo de

*Nematodirus* (B)

#### 2.2.1.7. Descripción del género *Chabertia*

La descripción taxonómica de *Chabertia spp.* es la siguiente:

Reino: Animalia  
Filo: Nematoda  
Clase: Chromadorea  
Orden: Rhabditida  
Superfamilia: Strongyloidea  
Familia: Chabertiidae  
Género: *Chabertia* Railliet & Henry, 1909  
Especie: *ovina*

La *Chabertia ovina* es un nematodo que parasita el intestino de ovinos y caprinos en todo el mundo, ocasionalmente también infecta a bovinos y muy raramente a porcinos.

La extremidad anterior del verme está truncada oblicuamente y tiene la boca abierta anteroventralmente. Presenta una débil concavidad cervical, precedida por una ligera protuberancia de una vesícula cefálica. El macho mide de 13 a 14 mm de longitud mientras que las hembras ligeramente mayores, miden entre 17 y 20 mm. Las espículas miden de 1.3 a 1.7 mm de largo. Sus huevos son ovoides y miden 90 X 50 micras. Los vermes se alojan en el intestino grueso de los rumiantes provocando Chabertiosis epizoótica de graves consecuencias sobre todo cuando se tienen altas cargas parasitarias (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

El ciclo biológico es directo con una fase pre-parasitaria similar a los *Trichostrongylus*. Después de su ingestión por el huésped, las larvas L<sub>3</sub> desenvainan en el intestino delgado, penetran

la mucosa y mudan a L<sub>4</sub>. Entonces migran, congregándose en el ciego, mudando a adultos inmaduros (L<sub>5</sub>) y pasando al colon para madurar. El período prepatente es aproximadamente de 6 semanas. Los efectos patógenos son causados por adultos que se pegan a la mucosa y atraen una porción de mucosa dentro su cápsula bucal que entonces es digerida. Esto provoca un área de ulceración de la mucosa y hemorragia local con pérdida de proteínas del intestino. En infecciones graves, los efectos de 200 a 300 lombrices adultas provocan un colon edematoso y engrosado con áreas locales hemorrágicas donde se instalaron estas lombrices. Algunos autores indican que larvas y adultos inmaduros son hematófilos. Tiene hábitos hematófagos lo que provoca anemia en los hospederos, la anemia se agrava debido a que el parasito secreta venenos hemolíticos. Los parásitos se adhieren a la mucosa intestinal mediante sus ganchos bucales causando múltiples heridas que son la puerta de entrada a numerosas bacterias causando infecciones secundarias lo que debilita considerablemente a los hospederos. Altas cargas parasitarias provocan diarreas crónicas, el enflaquecimiento progresivo, la anemia severa y finalmente la caquexia (Heinz. 2016).

#### **2.2.1.8. Descripción del género *Oesophagostomum***

*Oesophagostomum* es un nematodo que parasita a bovinos, ovinos y caprinos además de porcinos en todo el mundo, sin embargo, es más frecuente en regiones cálidas y húmedas tropicales y subtropicales.

Estos helmintos provocan infecciones denominadas Oesophagostomiasis o esofagostomiasis, las principales especies son:

- *Oesophagostomum brevicaudum*, parasita a los porcinos sobre todo en América del Norte.
- *Oesophagostomum columbianum*, parasita a ovinos y caprinos en todo el mundo.
- *Oesophagostomum dentatum*, parasita a porcinos domésticos y salvajes en todo el mundo.
- *Oesophagostomum multifoliatum*, parasita a ovinos y caprinos en África del este y oeste.
- *Oesophagostomum radiatum*, parasita principalmente a bovinos, pero también infecta a ovinos, caprinos y rumiantes salvajes en todo el mundo.

El órgano predilecto de los adultos es el intestino grueso (colon); las larvas se encuentran en nódulos entre el estómago y el intestino grueso. Los gusanos adultos alcanzan entre 15 y 20 mm de longitud, aunque las hembras tienen mayores dimensiones. Poseen una gran vesícula cefálica.

Su ciclo biológico es directo. Los huevos son excretados a través de las heces y una vez fuera del hospedero, los huevos eclosionan a larvas estadio 1 (L<sub>1</sub>), las cuales se desarrollan rápidamente en el transcurso de una semana para convertirse en L<sub>3</sub> (larvas infectivas).

Una vez ingeridas a través del pastoreo, las larvas penetran en la pared intestinal y forman nódulos en cualquier lugar entre el intestino delgado y el intestino grueso. Posteriormente abandonan los nódulos y emigran al colon donde completan el desarrollo a adultos y se reproducen. El periodo de prepatencia es de 5 a 6 semanas. Los huevos son sensibles a la sequedad y a las temperaturas bajas

o altas, pero pueden sobrevivir hasta 3 meses en el pasto en condiciones adecuadas de humedad y temperatura (Nwosu *et al.*, 2012).

El *Oesophagostomum radiatum* es muy nocivo para los bovinos, sobre todo para los animales jóvenes menores de 2 años para los que una infección masiva puede ser fatal, lo mismo que para los corderos con el *Oesophagostomum columbianum*. Las larvas infectivas perforan la pared intestinal del hospedero el cual responde produciendo nódulos del tamaño de un guisante. Esto trae como consecuencia una notable disminución en la capacidad de absorción de nutrientes y líquidos los que desencadena en diarreas. En ocasiones, los nódulos revientan al interior de la cavidad abdominal provocando infecciones bacterianas mortales. Las infecciones agudas causan fiebre, pérdida de apetito y de peso, fuertes diarreas acuosas con presencia de mucosa, de color verde oscura o negra. Las infecciones crónicas producen anemia y edema, además de diarrea, lo que resulta en un debilitamiento notable de animales (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

#### **2.2.1.9. Fase de vida libre**

Los nematodos son los organismos más numerosos dentro del reino Metazoa. Algunos de ellos son parásitos de insectos, plantas o animales, incluyendo humanos. Las especies de vida libre son abundantes en ambientes acuáticos, ya sea aguas dulces o saladas, y suelos. Los nematodos son estructuralmente simples, su tracto digestivo va desde la boca en la parte anterior y finaliza en la posterior cerca de la cola, siendo caracterizado como un tubo dentro de un tubo. Los nematodos encontrados en sistemas de agua potable alcanzan un tamaño de 0.1 a 0.6 mm. Alrededor de 20 órdenes diferentes han sido distinguidas dentro del Phylum Nematoda. Cuatro de estos órdenes (Rhabditida, Tylenchida, Aphelenchida y Dorylaimida) son particularmente frecuentes en el suelo. Los nematodos de vida libre no patogénicos que han sido encontrados en aguas potables incluyen *Cheilobus*, *Diplogaster*, *Tobrilus*, *Aphelenchus* *Rhabditis*. Gran número de nematodos son normalmente encontrados en pozos y en sistemas de tuberías de agua potable, sobre todo huevos o larvas infectivas de especies parásitas a humanos (*Ascaris*, *Trichuris*, *Ancylostoma*, *Necator* y *Strongyloides*) y la mayoría de especies de nematodos no patógenas por lo general, no están presentes en aguas subterráneas protegidas o son generalmente removidas durante los procesos de tratamiento. En algunas circunstancias, cuando el agua contiene un alto nutriente o contenido orgánico y la temperatura ambiente es apropiada, podría ser posible que los nematodos de vida libre puedan alimentarse del crecimiento microbiano del biofilm (o biopelícula) o del limo en procesos de tratamiento o en las tuberías de agua y así multiplicarse dentro del sistema. Esto es particularmente cierto si las fuentes de aguas no han sido adecuadamente protegidas, los sistemas de tratamiento no son adecuados o no operan o se mantienen adecuadamente, el sistema de distribución tiene escapes o existen algunas áreas estancadas o “zonas muertas” en el mismo. Por lo que sería factible de asumir que si un gran número de nematodos (vivos o muertos) son detectados en el agua de consumo, existe un problema que necesitaría ser resuelto, sin forzosamente implique un riesgo directo para la salud.

La presencia de nematodos de vida libre en el agua potable no necesariamente indica una amenaza directa a la salud. Sin embargo, la presencia de nematodos de vida libre en los sistemas de agua potable reduce su aceptabilidad al consumidor. Esto ha sugerido que los nematodos de vida libre podrían ser portadores de bacterias patógenas en su intestino. Tales bacterias serían protegidas de la desinfección por cloro y, por ende, presentar un riesgo para la salud. Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae han sido aisladas de la microflora intestinal de los nematodos colectados de un suministro de agua tratada y de la fuente de abasto de agua de ésta. Sin embargo, ellos fueron de un género no patógeno. Además, algunos patógenos oportunistas tales como *Nocardia* y *Mycobacterium* podrían ser transportados en el intestino de los nematodos de vida libre. No existe ninguna razón para suponer que los patógenos serían favorecidos selectivamente. Los microorganismos presentes en el intestino de los nematodos de vida libre son mucho más similares a aquellos presentes en los sedimentos y biopelículas donde ellos se alimentan. En algunos casos, las larvas móviles de patógenos tales como las de los gusanos redondos (*Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*) y gusanos intestinales (*Strongyloides stercoralis*) son capaces de moverse a través de filtros de arena y quizás ser introducidos durante la distribución del agua de consumo como resultado de una contaminación fecal. También existen algunas especies de nematodos que teóricamente pueden infectar a humanos a través de la ingestión de agua contaminada, sin embargo, tal fuente de infección es difícil de probar, *Dracunculus medinensis* es un nematodo parásito que puede estar en los sistemas de agua potable.

## **2.2.2. Trematodos y Cestodos**

### ***2.2.2.1. Características generales de la clase Trematodos y cestodos***

Los trematodos son metazoos triblásticos, acelomados, protóstomos y con simetría bilateral. Son endoparásitos cuyos hospederos intermediarios son casi siempre invertebrados (sobre todo moluscos) y cuyo huésped definitivo son vertebrados.

Estos endoparásitos tienen cuerpo sin segmentar en forma de hoja, poseen dos ventosas una oral y una ventral que son órganos de fijación, tienen un tubo digestivo poco desarrollado, con una cavidad bucal rodeada por la ventosa oral, una faringe, un corto esófago y dos ciegos intestinales que pueden ser ramificados o no dependiendo de la especie. No poseen un aparato circulatorio ni respiratorio. Su sistema excretor es protonefridial, la mayoría son hermafroditas, pero con fecundación cruzada; la autofecundación es rara. Los miembros del género *Schistosoma* (esquistosomas) tienen sexos separados.

El aparato genital masculino consta de dos testículos en donde se producen los espermatozoides. De ellos salen dos conductos eferentes que se unen en un conducto deferente que desemboca en una vesícula seminal, que actúa como reservorio de espermatozoides. De allí, los espermatozoides pasan al cirro u órgano copulador que está alojado en la bolsa del cirro, la cual encierra también a la vesícula seminal y a las glándulas prostáticas. El cirro y la vesícula seminal faltan en algunos grupos (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

El aparato genital femenino está formado por un ovario donde se producen los óvulos, que son conducidos por el oviducto a una cavidad, el ootipo, donde se forma la cubierta del huevo. En algunos grupos existe un corto canal que parte del ootipo, denominado canal de Laurer; se trata de una vagina vestigial que ha perdido su función a lo largo del proceso evolutivo. En algunos grupos existe un divertículo que funciona como receptáculo seminal, donde se almacenan los espermatozoides hasta el momento de la fecundación. En el ootipo también desembocan los conductos vitelógenos procedentes de las glándulas vitelógenas que producen las sustancias de reserva del futuro huevo, así como el material que va a formar la cubierta del mismo. Rodeando el ootipo, existen una serie de células glandulares, denominadas glándulas de Mehlis, que participan con sus secreciones en la elaboración del huevo. Por otra parte, del ootipo sale el útero que es un largo conducto durante cuyo recorrido maduran los huevos. Los huevos maduros salen por el gonoporo, que es el mismo orificio por donde se evagina el cirro (García *et al.*, 2009) (figura 26).

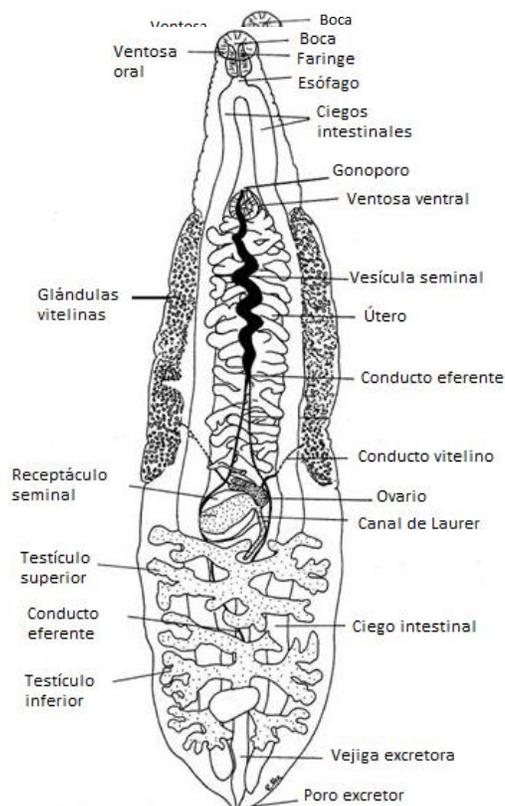


Figura 26. Esquema general de un trematodo adulto

Los Cestodos (tenias) son metazoos triblásticos, acelomados, protóstomos y con simetría bilateral. Son parásitos intestinales de Vertebrados.

En las tenias típicas (orden Ciclofilídeos) el cuerpo es largo, aplanado, anillado y blanquecino. En él se diferencian tres regiones (Figura 27):

- Escólex: parte anterior del cuerpo, con elementos de fijación (ventosas, ganchos, etc.)

- Cuello: región situada a continuación del escólex. Parte proliferativa sin segmentar que produce, en sentido posterior, los anillos, y
- Estróbilo: resto del cuerpo que comprende el conjunto de anillos o proglótides.

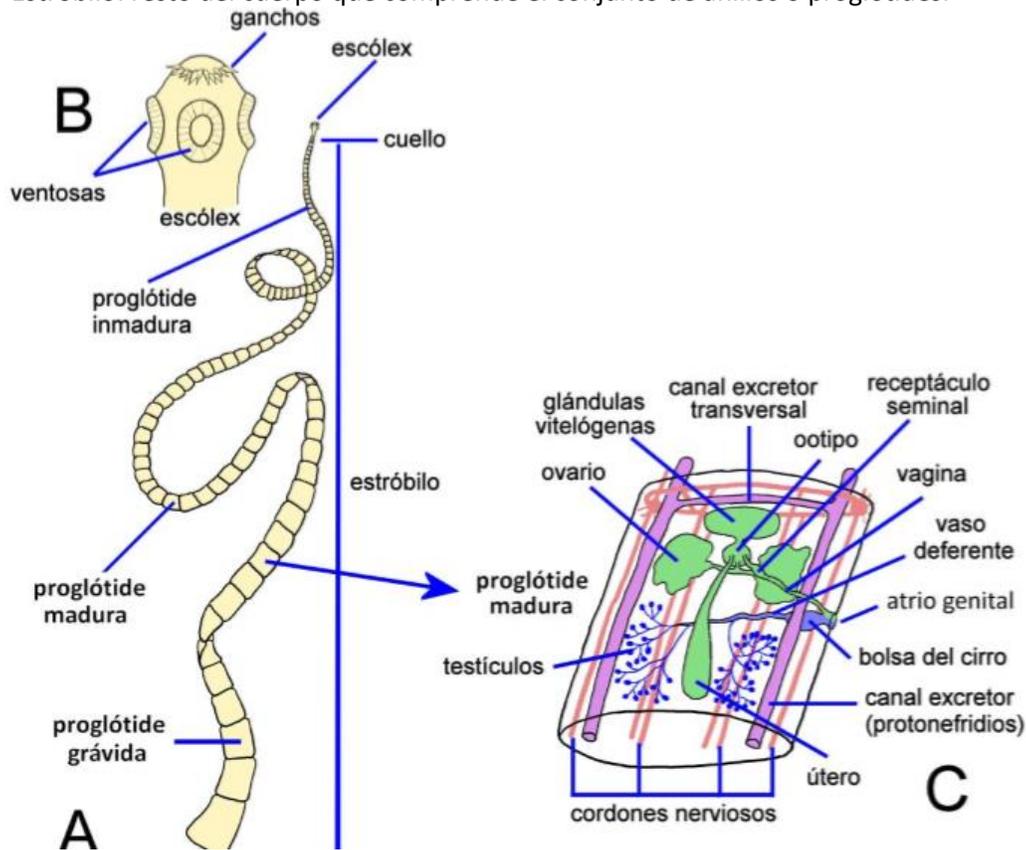


Figura 27. Morfología general de una tenia: (A) Esquema general con las regiones características, (B) Detalle de escólex y (C) Detalle de las proglótides maduras

Los cestodos están especializados para la vida parasitaria, ya que, su sistema digestivo se ha perdido, pues solo tienen que tomar lo que necesitan de los intestinos del anfitrión por transporte pasivo o activo de sus pieles, al no competir o preocuparse por depredadores, pueden invertir la mayor parte de la energía y biomasa que capturan a generar propágulos.

Como todos los platelmintos, los cestodos son hermafroditas y practican fertilización mutua cuando es posible encontrar compañeros sexuales. Sin embargo, muchos cestodos típicos, llamados formalmente como los eucestodos son conocidos por autofertilizarse, por algo los llaman comúnmente como “solitarias”. En general los cestodos poseen un sistema reproductor simple, pero los eucestodos poseen sistemas reproductores completos en cada uno de sus proglótides. Existe gran variabilidad en los detalles de estos sistemas, sin embargo, se puede generalizar un sistema masculino y uno femenino de un eucestodo como las tenias (García *et al.*, 2011).

Los testículos son numerosos, algunos se encuentran disgregados en el mesenquima, pero la mayoría se encuentran concentrados a lo largo de los márgenes laterales. Tubos colectores

transportan el material reproductivo desde los testículos a un tubo espermático común que se extiende lateralmente y se denomina vesícula seminal, hasta llegar a un cirro almacenado en un saco cirrótico. El sistema masculino abre en una cavidad genital común llamada atrio.

El sistema reproductor femenino usualmente incluye dos ovarios desde los cuales se extiende un oviducto hasta el ootipo rodeado por las glándulas generadoras de la cáscara. El receptáculo seminal es un saco ramificado y ciego que se extiende desde el ootipo. El canal se extiende desde el gonoporo femenino en el atrio genital hasta el oviducto. Su unión con el oviducto es cercana y funciona como un receptáculo seminal. La porción del conducto cerca al atrio genital se denomina vagina. Una glándula vitelina difusa segrega el vitelio a través de un conducto vitelino en el oviducto.

Durante la fertilización el cirro de cada conjugante es insertado en la vagina de su compañero. Muchos cestodos se doblan de manera que dos proglótidos del mismo individuo múltiple puedan fertilizarse. En algunas especies la autofertilización cruzada ocurre en un solo proglótido. El esperma es inyectado en el conducto vaginal y almacenado en el receptáculo seminal. Los huevos son fertilizados a medida que se mueven desde los ovarios hasta el ootipo. El material capsular y el vitelio se depositan alrededor del cigoto, y los cigotos se mueven al interior del útero para un almacenamiento temporal.

El sistema reproductivo maduro se hace funcional a medida que el proglótido se aleja del escólex. Los proglótidos que han realizado la fertilización más de una vez se hacen más grandes a medida que producen más huevos que hace que sus tejidos se expandan. Los proglótidos se rompen eventualmente y se pierden del anfitrión por las heces, aunque en algunos casos, los proglótidos liberan embriones al interior de los anfitriones y son transportados por las heces. La gran mayoría de cestodos viven al interior del sistema digestivo de anfitriones vertebrados y usualmente requieren uno o más anfitriones intermediarios para completar sus complejos ciclos de vida, aunque al igual que con *Toxoplasma*, generalmente se aprovecha la relación depredador-presa como vehículo determinista de infección (García *et al.*, 2011).

#### **2.2.2.2. Descripción del género *Dicrocoelium***

*Dicrocoelium dendriticum* mide de 5 a 10 mm y vive en los conductos biliares del ganado vacuno y ovino de todo el mundo. El adulto puede vivir hasta 6 años dentro del hospedero, ocasionalmente se ha encontrado parasitando al ser humano.

El ciclo vital (figura 28) es peculiar y en él intervienen un caracol terrestre que es el 1<sup>er</sup> hospedero intermediario por lo regular de los géneros *Nebrina* o *Delicilla*, y una hormiga el 2<sup>do</sup> hospedero intermediario, existen alrededor de 17 especies de hormigas hospedadoras, la más representativa es la *Formica fusca* en el continente americano.

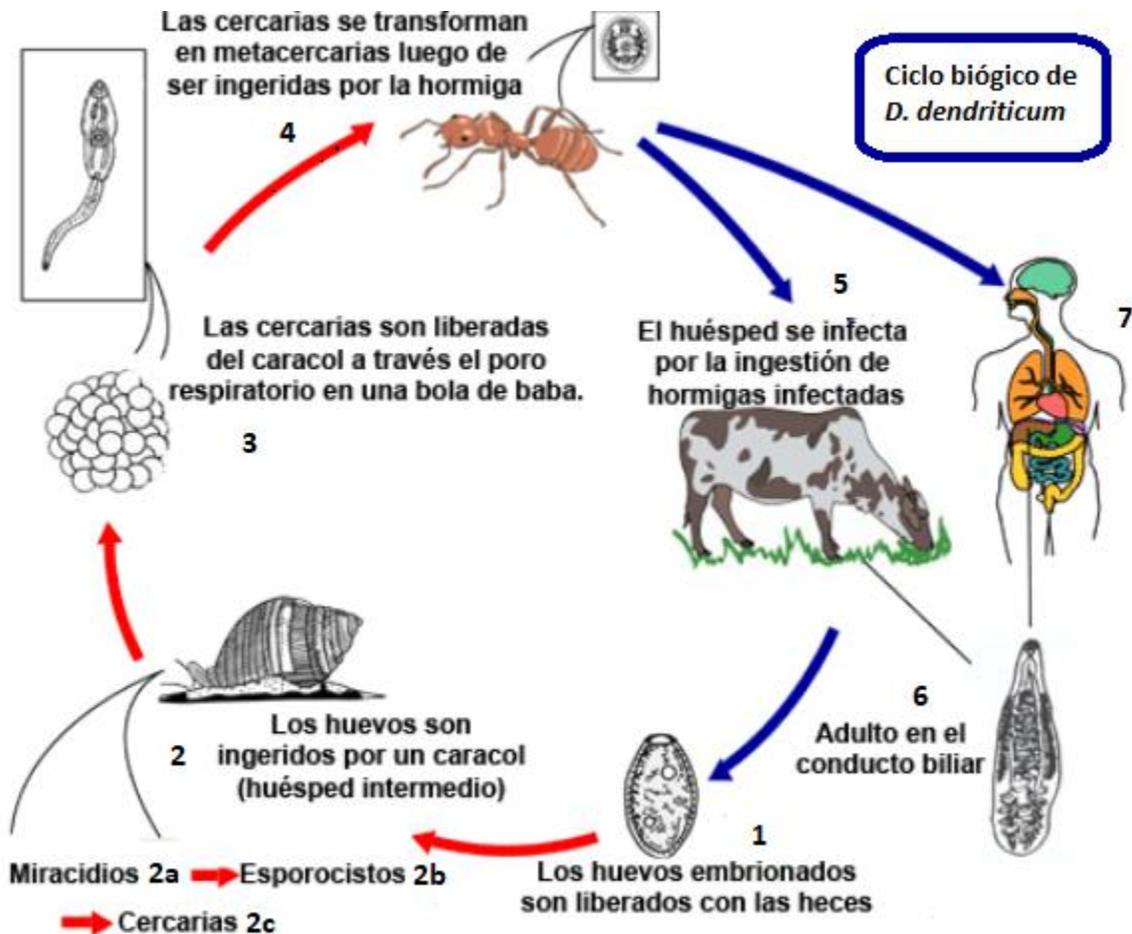


Figura 28. Ciclo biológico de *Dicrocoelium dendriticum*

Los huevos operculados completamente embrionados con una dimensión de  $40 \times 25 \mu\text{m}$  son expulsados con las heces del hospedero, el primer huésped intermediario (los caracoles de tierra), ingieren los huevos, que eclosionan una vez en los intestinos y se convierten en miracidios. Estos miracidios migran al hígado donde se vuelven esporocistos. Los esporocistos luego migran a la glándula digestiva, donde se producen esporocistos hijas. Los esporocistos a su vez producen cercarias, que migran a la cámara respiratoria del caracol. En un mecanismo de defensa, el caracol forma una bola de limo alrededor de los parásitos, bloqueándolos (García *et. al.* 2011).

Los caracoles arrojan los parásitos al toser las bolas de baba. Los segundos huéspedes intermediarios (las hormigas), ingieren las bolas de baba que dejan los caracoles. Una vez dentro de la hormiga, las cercarias se convierten en metacercarias en el hemocoel de la hormiga. A partir de ahí, las metacercarias migran a través del cuerpo hasta los nervios que controlan la mandíbula. Solo una metacercaria permanece en el nervio mientras que el resto regresa al abdomen y se enquistas. La metacercaria que queda en el nervio controla el funcionamiento de la mandíbula de la hormiga, lo que la obliga a exhibir un comportamiento poco característico. A medida que la temperatura baja por la noche, en lugar de regresar a la colonia, las hormigas infectadas ascienden hacia la parte

superior de los pastos y hierbas, donde se sujetan a la punta del pasto para aumentar la probabilidad de ingestión por parte de un rumiante en pastoreo. Si la noche pasa sin ingestión, la hormiga volverá al suelo y se reunirá con la colonia para evadir la exposición a la luz solar y al calor, lo que puede matar a las metacercarias. La hormiga repetirá este ciclo hasta que se ingiera.

Una vez ingerido por el huésped definitivo, las metacercarias excretan en el intestino delgado. Las metacercarias migran al árbol biliar, donde maduran hasta convertirse en adultos y producen óvulos y se repite el ciclo. (Zimmer, 2000).

Los humanos solo pueden infectarse por la ingestión accidental de una hormiga infectada. Sin embargo, una vez infectados, también pueden servir como huéspedes definitivos. Debido a que los cuerpos de estos parásitos son largos y angostos, las infecciones generalmente se confinan a las partes más distales de los conductos biliares. Como resultado, la mayoría de las infecciones por *D. dendriticum* en el sistema renal solo producen síntomas leves, estos síntomas pueden incluir cólicos biliares y trastornos digestivos generales, incluyendo hinchazón y diarrea. Sin embargo, en infecciones más severas, los conductos biliares y el epitelio biliar pueden inflamarse, además de la generación de tejido fibroso que rodea los conductos, y como resultado, puede producirse hepatomegalia e inflamación del hígado (cirrosis) (Jack *et al.*, 2004).

### **2.2.2.3. Descripción del género *Fasciola***

La descripción taxonómica de *Fasciola hepatica* es la siguiente:

Reino:	Animalia
Filo:	Platyhelminthes
Clase:	Trematoda
Orden:	Echinostomida
Familia:	Fasciolidae
Género:	<i>Fasciola</i>
Especie:	<i>F. hepatica</i> (Linnaeus, 1758)

La *Fasciola hepatica* es un platelminto trematodo de la subclase Digenea, caracterizado por su forma lanceolada, con dos ventosas, una bucal y otra ventral, y un ciclo biológico digeneo (dos generaciones) en dos hospederos: un molusco gasterópodo anfibio del género *Lymnaea* spp. como hospedero intermediario y un mamífero como hospedero definitivo. Es un parásito con distribución cosmopolita que parasita los canales biliares y la vesícula biliar de herbívoros y omnívoros, incluido el ser humano, es el agente causal de una de las parasitosis más difundidas del ganado, la fascioliasis o fasciolosis, que es considerada como una de las enfermedades parasitarias más importantes del mundo de los rumiantes domésticos.

Los adultos de esta especie son gusanos planos, sin segmentos, carnosos, que mide de 2 a 3.5 cm de largo por 1 a 1.5 cm de ancho. Es de color blanquecino y posee tonalidades que van desde el cenizo

hasta coloraciones parduzcas. La porción anterior o cefálica presenta una ventosa bucal que mide 1 mm aproximadamente y otra de mayor tamaño en la zona ventral, de aproximadamente 1.6 mm.

La superficie del tegumento es muy plegada e invaginada, mostrando numerosas espinas que le ayudan a aumentar la superficie para la absorción e intercambio molecular entre el tegumento y el hospedero definitivo. El aparato digestivo de la *Fasciola hepatica* es incompleto, formado por una cavidad bucal pequeña que se continua por una faringe, esófago que se bifurca formando dos ramas laterales, las cuales se dirigen hacia la porción posterior del cuerpo del gusano para terminar en ciegos intestinales (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

Es hermafrodita, el útero es corto y los diversos componentes del huevo se juntan en el segmento proximal del útero; las células vitelinas son abundantes, en forma de racimos de uvas y distribuidas por todas las porciones laterales; de ellas se desprenden gránulos vitelógenos. El ovario se encuentra situado a la derecha de la línea media, en una posición anterior con respecto a los dos testículos, uno detrás del otro, muy ramificados y situados en los dos tercios anteriores del cuerpo (figura 29).

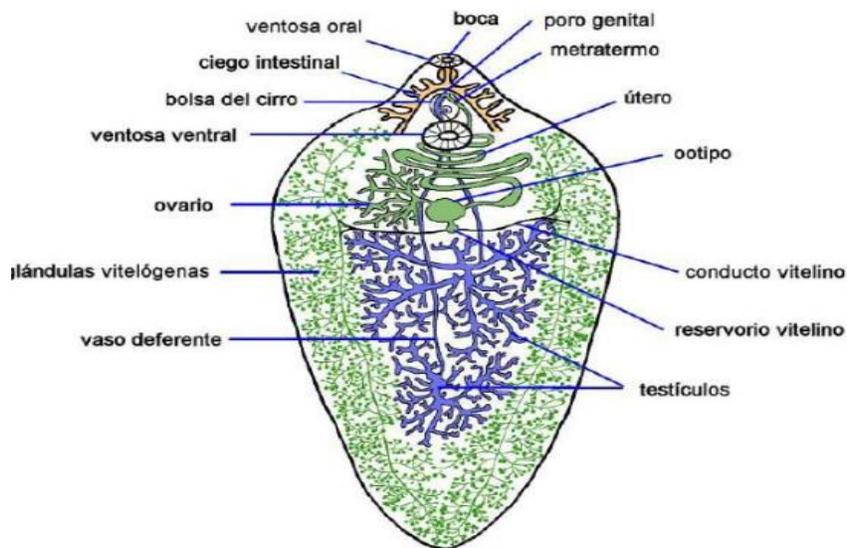


Figura 29. Estructura morfológica de *Fasciola hepatica*

El ciclo biológico de este parásito presenta cuatro fases:

- Fase de embriogonía: Inicia desde que sale el huevo al medio, madura y desarrolla, hasta formarse el miracidium.
- Fase de partenogonía: Es todo el desarrollo que el parásito realiza dentro del caracol hasta que sale la cercaria.

- Fase de cistogonia: Inicia desde que sale la cercaria hasta que se enquistas.
- Fase de maritogonia: Desde que el quiste es ingerido por el hospedador definitivo hasta que termina su desarrollo y comienza a producir huevos.

Una *Fasciola* adulta puede poner un promedio de 3 500 huevos al día (Cordero del Campillo *et. al.*, 1990). Su ciclo biológico (figura 30) comienza cuando los huevos son expulsados junto con las heces fecales del hospedador definitivo. Los huevos de la *Fasciola* son relativamente grandes y presentan una coloración dorado-amarillenta característica. Los huevos de *Fasciola hepatica* son influenciados por la temperatura, humedad, el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el oxígeno (O<sub>2</sub>) para lograr su eclosión, después de un periodo de incubación que puede durar entre los 9 y 15 días (si las condiciones son favorables), o hasta 90 o más días. Durante la incubación se produce en el interior del huevo numerosas divisiones celulares hasta la formación de un embrión móvil, ciliado, llamado miracidio el cual es un excelente nadador y en las 24 horas posteriores a su salida del huevo debe encontrar el hospedador intermediario (caracol), o si no morirá; si no hay suficiente agua el ciclo puede quedar interrumpido. Seguidamente el miracidio penetra dentro del hospedador intermediario, a la vez que entran van perdiendo los cilios hasta formar una masa redondeada llamada esporocisto, estos últimos tienen la propiedad que a partir de sus membranas internas forman las llamadas redias (1-3 mm). Las primeras se nombran redias hijas y dan lugar a otras generaciones hasta llegar a las redias nietas y así sucesivamente (multiplicación asexual). De un miracidio se pueden originar 600 cercarias, todas estas están dentro del caracol. Luego las cercarias salen del caracol, se ha demostrado que la temperatura ambiente modula el tiempo transcurrido entre la infestación de los caracoles y la salida de las cercarias, de esta manera cuando la temperatura es baja (6-8 grados C) dicho periodo es de 67-69 días y a temperaturas más altas (20 grados C) es de 48-50 días. En un plazo de 1-2 horas las cercarias deben fijarse a alguna superficie lisa (hierbas, piedras), que son consideradas por algunos autores como hospedadores intermediarios secundarios. La fijación la logran por medio de su ventosa ventral de manera tal que la mitad de su cuerpo quede inmersa en el agua. Una vez enquistadas pierden la cola y segregan una sustancia que las protege. Tras sufrir una serie de transformaciones, en un periodo que oscila entre 5 horas y 2-3 días adquiere la capacidad infestante, pasando a llamarse adolecercarias o metacercarias que pueden sobrevivir en el medio de 6-10 meses en dependencia de la humedad. Se necesita un periodo de aproximadamente 3 meses, desde que sale el huevo por las heces fecales del hospedador intermediario, hasta la formación de metacercarias. Los quistes son ingeridos por el hospedador definitivo junto con las hierbas llegando al aparato digestivo y por la acción de las enzimas que se encuentran en el jugo entérico quedan las *Fasciolas* jóvenes en libertad, penetrando la pared intestinal, siguiendo hacia el peritoneo parietal derecho (aquí puede estar hasta 7 días). Por último, llega al hígado y penetra a través de la cápsula de Glisson y empieza a migrar por todo el parénquima hepático (esto puede durar hasta 6 semanas). Posteriormente profundiza hacia el interior del hígado, entrando e implantándose en los conductos biliares. Dos semanas después el hospedador definitivo elimina los huevos al medio ambiente. Algunos autores consideran que los roedores y lagomorfos son importantes reservorios naturales de *Fasciola hepatica* en el medio, por lo que no deben ser ignorados en el establecimiento de un efectivo plan de control de la *Fasciola hepatica* (Cordero del Campillo *et al.*, 1990; Dreyfuss *et al.*, 1999).

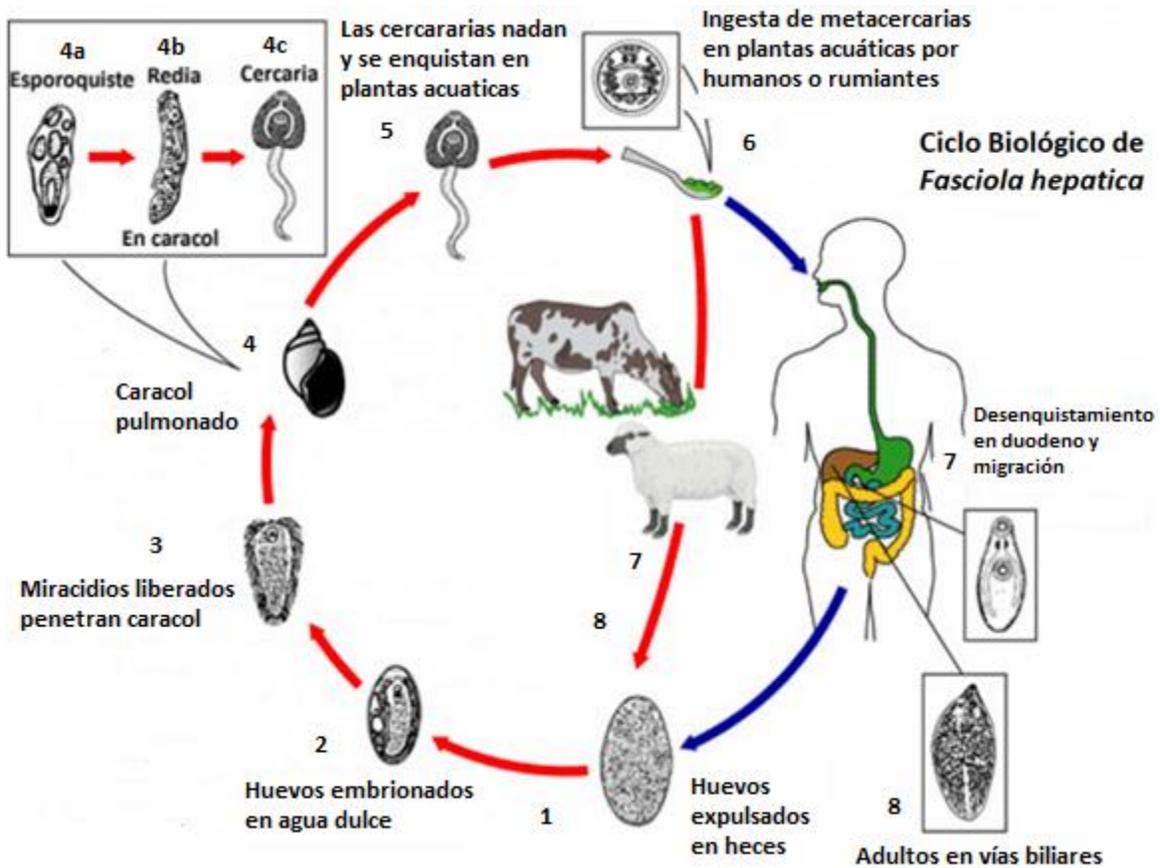


Figura 30. Ciclo biológico de la *Fasciola hepatica*

#### 2.2.2.4. Descripción del género *Paramphistomum*

*Paramphistomum* es un trematodo que infecta a los ruminantes tanto domésticos como salvajes alrededor del mundo.

Los adultos tienen el cuerpo en forma de pera con la cabeza en el extremo más estrecho. Alcanzan los 13 mm de largo y 5 mm de ancho y son de color de grisáceo a rojizo. La sección es casi cilíndrica. Tienen dos ventosas: la abdominal está cerca del extremo posterior y es especialmente grande y una ventosa ventral denominada acetábulo en posición terminal y carecen de una armadura de espinas en el cuerpo, la cual es reemplazada frecuentemente por unas papilas tegumentales.

El ciclo biológico y la epidemiología del *Paramphistomum* es semejante al de la *Fasciola hepatica*, su ciclo es siempre indirecto y tiene en común la existencia de un primer hospedador intermediario; un molusco, en el que el parásito se multiplica mediante reproducción asexual, lo que permite que un solo miracidio produzca un gran número de cercarias. Sin embargo, la metacercaria no se produce en el hospedador intermediario, mientras que el adulto se reproduce sexualmente en el hospedador definitivo (figura 31) (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

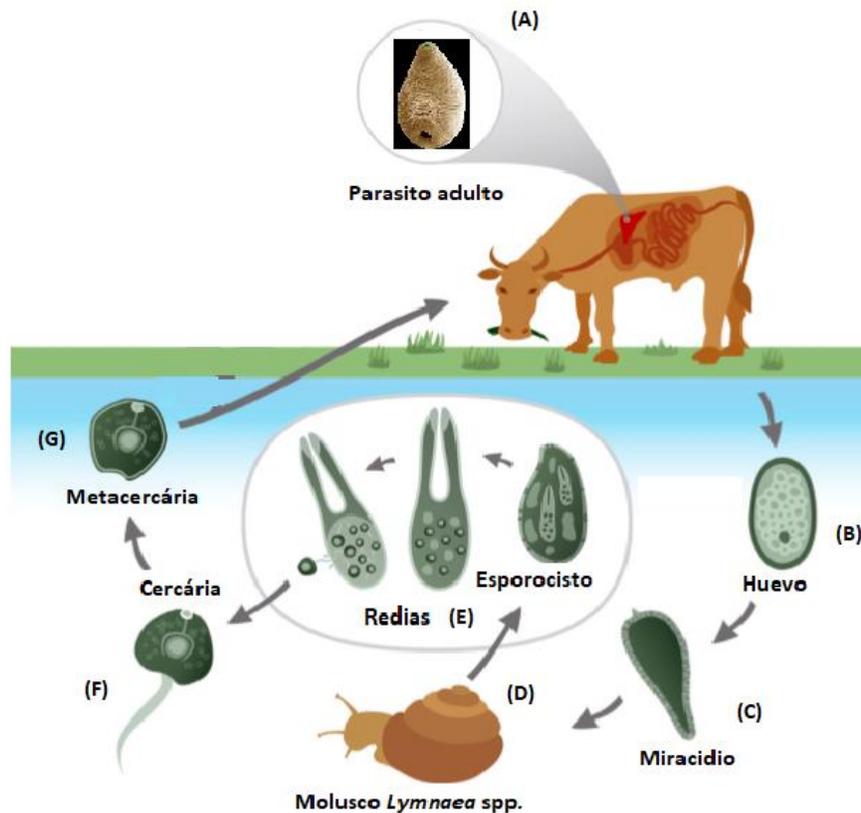


Figura 31. (A) El parásito adulto en el hospedador final (Rumiantes). (B) Huevo en heces. (C) Miracidios. (D) Hospedero intermediario. (E) Esporocisto, redias hijas, redias nietas y cercarias transformadas dentro del hospedero intermediario. (F) Cercarias libres en el medio. (G) Metacercaria lista para ser ingerida por el hospedero definitivo

Se han identificado claramente tres fases durante el ciclo biológico de *Paramphistomum* spp. La primera fase es la etapa de ovoposición y eliminación de huevos en donde los parásitos adultos producen huevos no embrionados en el rumen, los mismos que son evacuados con las heces y que en el ambiente llegan hasta pastos húmedos. En condiciones de humedad y temperatura se desarrolla un miracidio dentro del huevo. Los huevos son de color claro lo que diferencia a los huevos de *Fasciola hepática*; son operculados y, en el momento de ser eliminados, se encuentran en los primeros estadios de la segmentación (Soulsby, 1987; FAO, 1994).

La segunda fase se desarrolla fuera de los hospederos, el huevo embrionado al cabo de 17 días en promedio eclosiona el miracidio a un medio líquido a temperaturas de 15-24°C, el miracidio permanece activo en el medio no más de cuatro horas. Penetra en la cavidad respiratoria de los hospedadores intermediarios. El tiempo de desarrollo hacia esporocisto dentro del hospedador intermediario varía según la temperatura y la especie de que se trate y es, aproximadamente, de 12 a 21 días. El desarrollo larvario y la multiplicación, vía esporocistos y redias, tiene lugar en 4-10 semanas. Dentro de los esporocistos, al cabo de una o dos semanas, se desarrollan las redias, las cuales, después de 20 días, se liberan y producen redias hijas y, hacia los 39 días en las glándulas del

intestino medio, redias nietas. Estas originan cercarias todavía no plenamente desarrolladas las cuales abandonan las redias y completan su crecimiento en el caracol en el plazo de dos semanas. Al cabo de dos meses en total acaba por desarrollarse completamente la cercaría que posee una sola cola propulsora más larga que el cuerpo. Las cercarías abandonan los caracoles en los momentos de gran claridad, en condiciones óptimas durante las horas de mayor intensidad solar. Nadan cerca de la superficie del agua de un lado para otro propulsadas por la cola y se fijan a las plantas del entorno, formando quistes que son ingeridos por los animales que pastan. Los quistes, llamados metacercarias, están rodeados de unas membranas resistentes, una externa de estructura fibrosa y otra interna (Cordero del Campillo, *et al.*, 1990).

La tercera fase ocurre dentro del hospedero definitivo cuando la metacercaria es ingerida al momento de pastar o beber agua contaminada con la fase infestante (metacercarias). Después de la ingestión por el hospedador definitivo, el desenquistamiento ocurre a través del paso por rumen, abomaso e intestino delgado por medio de la acción de líquido ruminal, pepsina, ácido clorhídrico seguido por tripsina y sales biliares en un medio alcalino. El desenquistamiento concluye en los seis primeros metros del intestino delgado y alrededor de 24 horas. Las formas juveniles de *Paramphistomun* spp. se fijan en los primeros tres metros del intestino delgado. El parásito una vez liberado se fija durante algún tiempo a la mucosa, submucosa y muscularis mucosae del intestino delgado y grueso sin producir trastornos en el caso de infestaciones débiles. Al cabo de 6-8 semanas regresan al abomaso y posteriormente emigran hacia el rumen, donde se asientan definitivamente entre las micro vellosidades, para hacerse sexualmente maduros a las 3-4 semanas; de tal manera que el periodo de prepatencia oscila entre los 96 y 130 días para bovinos y 96 a 107 días para los pequeños rumiantes (Cordero del Campillo, *et al.*, 1990; Quiroz, 2005).

### **CAPÍTULO 3. Principales métodos de control parasitario**

#### **2.3.1. Resistencia, resiliencia y tolerancia**

La resistencia antihelmíntica en la ganadería de bovinos, ovinos y caprinos, se ha convertido en un problema de talla mundial y de gran incidencia, debido a un uso inadecuado de estos productos químicos lo que conlleva a serias pérdidas económicas debido a los altos costos de los mismos así como el costo por concepto de asesoría técnica de los profesionales, esto ha orillado a los productores a autodiagnosticar las parasitosis y al abuso en el uso de los diferentes fármacos existentes en el mercado trayendo como consecuencia una baja efectividad de los fármacos debido a una subdosificación o una mala elección del fármaco. El desarrollo de la resistencia está influenciado por factores del clima, prácticas de manejo, edad de los animales y peso corporal de los animales, aunado a esto tenemos que los productores tradicionalmente usan un mismo producto durante tiempos prolongados, subdosificados y con intervalos de tiempo muy cortos para el control de los endoparásitos gastrointestinales, estrategias ineficientes ya que carecen de un criterio técnico y concede al parásito una ventaja, ya que puede no afectar de forma eficiente y

pueden en cambio exponerse a dosis muy bajas que no lo matan pero si le permiten desarrollar resistencia al producto (Torres *et al.*, 2007).

La resistencia ha sido definida como la capacidad heredable que tiene cierta fracción de una población para tolerar dosis tóxicas de sustancias químicas que son letales para otras poblaciones de la misma especie, siendo la heredabilidad de la resistencia la característica más importante de este fenómeno. La resistencia puede ser intrínseca y adquirida. En la resistencia intrínseca un parásito es naturalmente insensible a una droga, debido a la ausencia de receptores o a la imposibilidad del fármaco para entrar a la célula y desarrollar su mecanismo de acción.

La resistencia adquirida se presenta en los parásitos gastrointestinales que inicialmente son susceptibles a la acción terapéutica de un antihelmíntico y posteriormente dejan de serlo luego de la ocurrencia de modificaciones genéticas que son heredables de generación en generación (Torres *et al.*, 2007).

Los parásitos adultos dentro del hospedador, seleccionan sus genes de resistencia cuantas veces tengan contacto con un antiparasitario en un proceso hereditario e irreversible. Con la continua selección y reproducción de los nematodos resistentes aumenta la frecuencia de genes resistentes en la población tratada por lo que las futuras generaciones de nematodos resistentes sobreviven a los tratamientos antihelmínticos (Sangster, 1999).

Las diferentes modificaciones genéticas que se encuentran en el proceso de la resistencia adquirida son:

- Mutación. El ADN de la célula susceptible es alterado afectando la función normal de este, impidiendo que la droga produzca su acción farmacológica. La mutación siempre selecciona la población resistente y por esto las demás generaciones provendrán de las poblaciones resistentes.
- Amplificación genética. Es causada por la producción exagerada de genes que conllevan a una producción incrementada de ciertas sustancias cruciales en la acción de un fármaco convirtiéndolas en resistentes a las concentraciones normales de la droga que son efectivas en condiciones normales.
- Transferencia genética, las células de los parásitos gastrointestinales susceptibles pueden adquirir un material genético de otro ambiente u organismo, introduciéndolo en su cromosoma, induciendo así resistencia a los antihelmínticos o a una droga específica. En la transferencia genética se dan tres mecanismos distintos, el primero es la Transformación, la cual consiste en que algunas piezas de ADN conteniendo los genes para la resistencia de ciertas drogas, son captados por una célula sensible la cual incorpora el ADN en su cromosoma. El segundo mecanismo es la Transducción la cual consiste en que algunos genes de resistencia son transportados desde una célula bacteriana a la otra por medio de bacteriófagos, y finalmente, la Conjugación la cual se da cuando los genes de resistencia a drogas están contenidos a un plásmido por una conexión directa formada en la bacteria por un Pili sexual.

Los cambios genéticos que conducen a la resistencia antihelmíntica y que conllevan a una serie de modificaciones bioquímico-moleculares determinantes en la disminución del efecto de una droga en el parásito gastrointestinal resistente, pueden ser:

- Cambios estructurales y/o funcionales de las células que modifican la captación de la droga al sitio de acción, produciendo modificaciones en su metabolismo principalmente en la inactivación y/o eflujo celular afectando la capacidad de la droga para acumularse intracelularmente.
- Alteración del sistema enzimático necesario para la acción farmacológica de la droga.
- Alteración de los receptores celulares por disminución en el número o en su afinidad, lo cual afecta la unión del fármaco con su sitio de acción y, por lo tanto, su efecto farmacológico.
- Variaciones en diferentes procesos celulares que compensan o contrarrestan el efecto inducido por un fármaco.

Rubilar *et al.*, (2001), agrupan los antihelmínticos de la siguiente forma:

- Pírazinas.
- Organofosforados Diclorvos, Haloxano, Triclorfon.
- Tetrahydropirimidinas (Morantel y Pyrantel).
- Imidazothiazoles (Tetramisol y Levamisol).
- Bencimidazoles (Thiabendazol, Mebendazol, Fenfendazole. Oxfendazol. Oxibendazol y Albendazol).
- Pro-bencimidazoles (Fabantel).
- Lactonas macrocíclicas (Ivermectina, Eprinomectrina, Doramectina, Moxidectina, Milbemycina y Selamectina).

La resistencia no debe confundirse con la resiliencia o la tolerancia. La resiliencia es la habilidad del animal de mantener niveles productivos aceptables a pesar de la infección parasitaria. Los animales resilientes tienen la capacidad de mantener su producción en forma independiente del grado de infección parasitaria, mientras que la tolerancia es la capacidad del hospedador para limitar los daños causados por una cierta carga parasitaria, la tolerancia es también la capacidad del hospedador para mantener la homeostasis, incluso en la presencia de la replicación del patógeno, con la consiguiente limitación de la agresión. El aumento de la resistencia del hospedador puede inducir la aparición de patógenos más virulentos, mientras que el aumento de la tolerancia impone poca o ninguna presión de la selección sobre el patógeno. Los mecanismos de resistencia a enfermedades suelen ser específicos para un patógeno en particular, mientras que los mecanismos de tolerancia tienden a ser más genéricos.

### **2.3.2. Rotación de potreros**

La dependencia total en un solo método de control parasitario ha demostrado ser poco sustentable, efectivo y rentable a lo largo del tiempo. La prevalencia de infestaciones parasitarias en los hatos

ganaderos depende de diversas variables como el estrés ambiental, la resistencia a fármacos, la tolerancia, la condición corporal del hospedero, las cepas presentes, el sistema de producción y de alimentación y el manejo zootécnico de los hatos entre otros, estos factores deben de considerarse al momento de planificar una estrategia de control parasitario. En términos de resistencia antiparasitaria, el Control Integral de Parásitos combina adecuadamente varias herramientas de control, a efectos de desestabilizar la formación de aquellas poblaciones parasitarias con mayor proporción de individuos genéticamente resistentes, manteniendo un nivel adecuado de producción, este manejo Integral conlleva una drástica disminución de la frecuencia de tratamientos convencionales con drogas antiparasitarias.

El manejo de potreros es una de esas herramientas de control Integral de parásitos basado en conocimientos epidemiológicos, donde las variaciones estacionales y la disponibilidad de larvas en las praderas son elementos clave para poder establecer una adecuada rotación de potreros y obtener un control parasitario. El objetivo de toda esta estrategia consiste en obtener pastura segura que presente bajos niveles de contaminación parasitaria y por lo tanto no representan un riesgo para los animales que ahí pastorean. Para una correcta implementación de la rotación de potreros es necesario contar con un adecuado conocimiento sobre los ciclos biológicos de los parásitos en cuestión, el ciclo productivo de la pradera que se trate, así como el amplio conocimiento de los ecosistemas de los que se trate, es decir que el descanso de praderas no es igualmente eficaz en distintos climas, estaciones del año, suelos y topografías. Por ejemplo, el período requerido de descanso es sensiblemente superior en climas tropicales, en épocas de lluvias que, durante el período seco, en suelos de mayor permeabilidad y drenaje y en áreas fuertemente onduladas de buena infiltración. En la rotación de potreros los animales no ocupan siempre toda el área de pastoreo, sino que, en momentos determinados, existen áreas que se mantienen libres de animales. Los tiempos de pastoreo y descanso son variables y en general ajustados a la calidad y disponibilidad de forraje. Si bien en estos sistemas la carga parasitaria instantánea aumenta debido a la presión de pastoreo, los periodos de descanso suficientemente largos, pueden hacer declinar considerablemente los niveles de contaminación de la pastura. Esto último varía sustancialmente de acuerdo a la región ya que en climas templados la disponibilidad de L<sub>3</sub> es relativamente lenta, la supervivencia larvaria es mayor y por consiguiente la contaminación de la pradera es más prolongada. Esta metodología se hace un poco complicada cuando el criterio del máximo aprovechamiento del forraje difiere del criterio para disminuir cargas parasitarias. Sin embargo, cuando ambos criterios son compatibles, es muy probable que al haber retirado al ganado de un área dada justo antes de que una población larvaria esté disponible en grandes cantidades, los animales tengan el privilegio de no haber sido infectados. Por otro lado, el periodo de descanso del área de pastoreo provocará que las larvas que estén disponibles en el forraje en espera de ser ingeridas, por acción del tiempo y la exposición por muchos días a la radiación solar y a muchos depredadores naturales en el suelo, disminuyen sustancialmente su viabilidad y su capacidad infectiva (Mendoza y López, 2004).

### **2.3.3. Manejo de la nutrición para mejorar la resistencia de los hospederos**

La nutrición es la principal limitante productiva en las diferentes explotaciones pecuarias, si consideramos que la respuesta inmunológica del hospedero ante una infección parasitaria depende de múltiples factores, el aspecto nutricional es el más relevante de estos factores; por definición, los antiparasitarios no han sido desarrollados para solucionar problemas nutricionales sino para eliminar poblaciones parasitarias, cuya acción se confunde con la subnutrición. Una vez suministrado el antiparasitario, es de vital importancia mejorar la condición corporal de los animales a través de un buen manejo alimenticio mejorando tanto la cantidad como la calidad de la dieta del rebaño. Es bien sabido, que un adecuado manejo alimenticio es un factor clave en la respuesta de los animales al parasitismo, afectando el desarrollo y establecimiento de los parásitos y también influyendo en la magnitud de sus efectos patogénicos. La incorporación en la dieta de proteínas de alto valor biológico puede influir en la resistencia o tolerancia del huésped a la infección parasitaria, afectando favorablemente grado de expresión de la respuesta inmune en estas fases. Sin embargo, la inmunidad contra los parásitos podría quedar relegada cuando debe competir por los nutrientes en circunstancias de exigencia del huésped tales como el crecimiento, gestación o lactancia (Waller, 1999).

El "efecto antiparasitario" de la suplementación proteica aumentando la resistencia, dependerá de cuán deficitario sea el estado de los ovinos ya que la función inmunitaria parece ser prioritaria con respecto al crecimiento. Por otra parte, en un reciente estudio en ovinos en crecimiento se demostró, que el plano de nutrición no poseía efecto sobre los recuentos de huevos en materia fecal ni en la carga parasitaria, pero que el tamaño de las hembras de parásitos internos y su fecundidad disminuían con el aumento del nivel de nutrición; esto fue acompañado de un aumento en la concentración de eosinófilos circulantes, sugiriendo que la respuesta inmune mejoraba en corderos consumiendo altos niveles de energía (Valderrábano *et al.*, 2002).

### **2.3.4. Terapias alternativas en el control parasitario de ovinos**

A partir de los años 60's, cuando aparece el primer antihelmíntico (tiabendazol) con buena eficacia, amplio espectro contra nematodos y de baja toxicidad, nace una nueva era en el control de los nematodos gastrointestinales. La rápida aceptación de los bencimidazoles y su amplia frecuencia en su utilización, marcaron el inicio de la química moderna para el ataque a los helmintos que se basó en el empleo exclusivo de antihelmínticos y la ausencia de un método de diagnóstico adecuado, lo que originó su uso indiscriminado. Como consecuencia de lo anterior, a partir de ese momento y hasta la actualidad, se han reportado numerosos casos de resistencia antihelmíntica en el mundo. En México, en 1988 se reportó por primera vez la detección de una cepa de *H. contortus* resistente a bencimidazoles, específicamente al albendazol. Posteriormente González *et al.*, (2012) documentaron una reducida efectividad (62%) de Albendazol en el control de los principales géneros de nematodos gastrointestinales en la sierra de Tabasco. Este aumento en la resistencia antihelmíntica de los nematodos ha originado nuevas estrategias en el control de nematodos gastrointestinales, el uso de hongos con actividad nematófaga se basa en el principio de que los hongos están destinados a combatir los estados libres de los nematodos gastrointestinales que se encuentran en la materia fecal, estos poseen la capacidad de capturar larvas de los nematodos por

medio de trampas adherentes, el hongo penetra al interior de su presa perforándole su cutícula y desarrollando un bulbo a partir del cual las hifas tróficas invaden progresivamente al parásito y absorbe su contenido provocando su muerte (González *et al.*, 2012).

El sulfato de cobre en algún momento se empleó para el control de los nematodos gastrointestinales en los rumiantes, sin embargo, para su correcto funcionamiento el sulfato necesita llegar directo al abomaso para encontrarse en un medio ácido donde los compuestos letales del Cu puedan ser liberados. Las partículas o agujas de óxido de Cu, al ser colocadas en cápsulas de gelatina y administradas por vía oral, pasan a través del rumen y se alojan en los pliegues del abomaso donde liberan los iones de Cu, los cuales tiene efecto antiparasitario. Las agujas de óxido de Cu pueden representar una opción estratégica para el control de los nematodos gastrointestinales que permite reducir las pérdidas causadas por los nematodos en los ovinos, especialmente cuando se asocia a otro tipo de control. Evaluando el efecto de las partículas de óxido de Cu sobre la capacidad depredadora del hongo nematófago *D. flagrans* en ovinos de pelo, encontraron que las partículas de Cu no afectaron la habilidad de *D. flagrans* para atrapar larvas residuales, existiendo un efecto aditivo benéfico para los corderos tratados (Burke *et al.*, 2005).

Sin duda alguna todos estos métodos de control parasitario serían mucho más eficientes si se hicieran de manera selectiva, de tal manera que se atacara a los animales con altas cargas parasitarias y disminuyendo su uso en rebaños con poca o nula carga parasitaria. El Dr. **FAffa MALan CHArt**, desarrollo un método que consiste en evaluar clínicamente a los animales de un rebaño para que indirectamente pueda conocerse el efecto de la parasitosis y, en base a eso, se tome la decisión de aplicar el tratamiento antihelmíntico, este método de diagnóstico se le denominó FAMACHA<sup>®</sup>.

Malan y Van WYK, (1992) encontraron una correlación entre la coloración de la conjuntiva ocular, el valor del volumen celular aglomerado (VCA) y la presencia de *H. contortus*. Estas coloraciones fueron preestablecidas con auxilio de la computación gráfica, representando cinco grados de anemia, incluyendo pequeñas variaciones para cada grado, estos grados presentaron una correlación de 0.8 con un grado de confiabilidad superior a 95% para las infecciones causadas por *H. contortus*. El objetivo de este método es identificar clínicamente animales resistentes, resilientes y susceptibles a las infecciones parasitarias, optimizando el tratamiento de forma selectiva en situaciones reales en el campo sin la necesidad de llevar a cabo pruebas de laboratorio. Cabe mencionar que el sistema FAMACHA<sup>®</sup> solo debe ser utilizado en infecciones por *H. contortus* y se recomienda emplearlo en conjunción con otras medidas de control de helmintos (Figura 42).

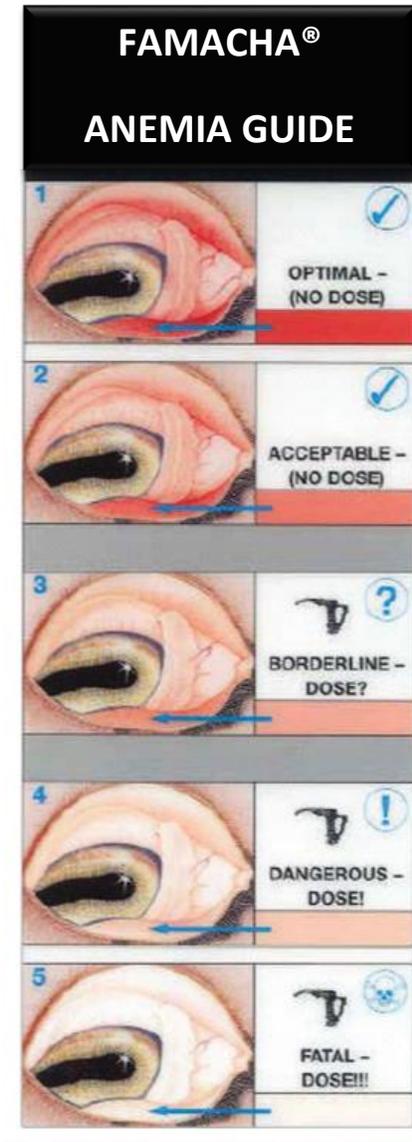


Figura 32. Escala gráfica de la coloración de la conjuntiva del ojo, método FAMACHA®

A su vez FAMACHA® también permite distinguir a aquellos animales que a pesar de estar contaminados con Haemonchosis, logran reaccionar favorablemente a la infección y así mantener su perfil productivo.

### 2.3.5. Uso de plantas y extractos sobre el control parasitario en ovinos

En las últimas décadas, se han usado indiscriminadamente productos químicos con actividad antihelmíntica para el control de enfermedades gastrointestinales en pequeños rumiantes causadas por endoparásitos, este uso indiscriminado de fármacos, ha creado farmacoresistencia de las poblaciones de nematodos que causan infestaciones gastrointestinales, esta situación ha motivado a numerosos investigadores a buscar formas alternativas de control de estos nematodos. Estas investigaciones se han centrado en el estudio de metabolitos secundarios de algunas leguminosas arbóreas con propiedades antihelmínticas (von Son-de Fermex *et al.*, 2012; Olmedo-Juárez *et al.*, 2014). Dentro de dichos compuestos se tienen a los taninos condensados (TC), terpenos, saponinas y flavonoides (Williams *et al.*, 2014). Algunos trabajos de investigación han demostrado que los flavonoides presentan actividad nematicida y que en conjunto con otros compuestos (taninos), tienen un sinergismo que potencializa su efecto contra los nematodos gastrointestinales (Klongsiriwet *et al.*, 2015).

García *et al.*, (2005) evaluando seis extractos de la especie *Morera alba* var. Cubana encontraron propiedades antihelmínticas frente a larvas L<sub>3</sub> de los géneros de parásitos gastrointestinales *Trichostrongylus* y *Haemonchus* en condiciones de laboratorio. Los extractos se obtuvieron a partir de las hojas, pecíolos y tallos tiernos de *Morera*, los extractos acuoso crudo (EAC) y Extracto Acuoso Fraccionado (EAF) fueron de mayor acción antilarvicida, con una mortalidad superior al 80% a los 60 minutos. En los extractos obtenidos se pudieron identificar la presencia de polifenoles mayoritarios, tales como Quercetina, Rutina, Umbeliferona y Resveratrol. En este sentido, las especies investigadas recientemente como control fitoquímico del parasitismo gastrointestinal han sido *Acacia nilotica*, *Acacia karro*, *Albizia stipulata*, *Albizia antihelmintica* (Githiori *et al.*, 2003). Estas plantas leguminosas presentan considerables niveles de TC y la actividad antiparasitaria ha sido atribuida directamente a estos polifenoles. Por otra parte, en estudios *in vitro* e *in vivo* se ha podido demostrar la efectividad de los TC en la disminución de la vitalidad de las larvas L<sub>3</sub> y la población de parásitos en el tracto gastrointestinal (Molan *et al.*, 2003). Estos resultados presentan mayor importancia por la posibilidad que tienen los TC de no ser degradados cuantitativamente en el sistema digestivo de los rumiantes y los monogástricos. No obstante, se ha demostrado que otras especies no leguminosas que carecen de TC o presentan bajas concentraciones, tales como *Azadirachta indica* (Meliaceae), *Ananas comosus* (Bromeliaceae), *Vernonia anthelmintica* (Asteraceae), *Embelia ribes* (Myrsinaceae), *Fumaria parviflora* (Fumariaceae) y *Caesalpinia crista* (Caesalpiniaceae), presentan propiedades helmínticas relacionadas con la presencia de otras estructuras activas (Hordegen *et al.*, 2003).

Pelegrine *et al.*, (2010) trabajaron con corderos de la raza Santa Inés, los cuales fueron infectados experimentalmente con larvas L<sub>3</sub> de *Trichostrongylus colubriformis* formaron 5 grupos, dos de ellos sirvieron como controles uno positivo y otro negativo, otro grupo fue suplementando con sorgo taninífero (*Sorgum bicolor*) y los otros dos grupos con diferentes niveles de un extracto de *Acacia* de tal manera que los grupos experimentales recibieron 7-0, 7-2 y 14.0 g/animal/día. Los resultados obtenidos indicaron una reducción importante en el conteo de huevos por gramo de heces (HPG), lo que demuestra su efecto antihelmíntico.

García *et al.*, (2017), trabajando con ovejas Pelibuey se infestaron experimentalmente con una mezcla de nematodos gastrointestinales (95% *Haemonchus contortus*, 2% *Trichostrongylus colubriformis* y 3% de *Oesophagostomum columbianum*) donde se probaron 3 niveles de taninos condensados libres (FCT) de *Lysiloma acapulcensis* sobre el conteo fecal de huevos (FEC), volumen celular aglomerado (PCV) y coloración de la mucosa ocular (OMC). A pesar de que las tres dosis de FCT disminuyeron ( $P < 0.05$ ) la FEC, la mayor reducción se obtuvo con  $37.5 \text{ mg kg}^{-1}$  de BW. No se observaron diferencias en PCV y OMC. El recuento de nematodos adultos (hembras y machos) en la dosis más alta de FCT fue similar a tratamiento químico con ivermectina. Este estudio demostró que la dosis más alta de FCT ( $37.5 \text{ mg / kg}^{-1}$  de BW) tuvo mayor eficacia en la reducción de FEC, con respecto al grupo de control. Además, se observó una tendencia similar en el grupo químico a partir del día 27 posterior a la infección. Las dosis bajas administradas disminuyeron la cantidad de huevos eliminados en las heces con valores más bajos. Es probable que las dosis más altas de FCT tengan mejores efectos sobre los parásitos ya establecidos en el abomaso; sin embargo, también es posible que haya interferido con la absorción de nitrógeno. García *et al.*, (2017) también observaron un aumento del efecto de la dependencia de la concentración, es decir que mientras la concentración aumentaba se registraba una mayor actividad del HAE. El contenido de taninos del HAE se determinó mediante espectrofotometría (UV-visible) y los otros fenoles mayoritarios, se identificaron mediante procesos cromatográficos. el análisis químico de HAE mostró la presencia de taninos, cafeína y derivados cumarólicos y quercetina como compuestos principales, fenoles a los que se les atribuyen propiedades antihelmínticas.

### 3.- JUSTIFICACIÓN

Una de las problemáticas que más aqueja a la ganadería a nivel mundial, sobre todo en las regiones tropicales es la prevalencia de parasitosis que afectan la productividad del ganado, esta problemática ha llevado a los ganaderos al uso indiscriminado de fármacos para el control de las parasitosis, sin embargo, estas acciones lejos de mejorar la situación la han agravado debido a la farmacorresistencia originada a nivel mundial. Dentro de las enfermedades causadas por los parásitos gastrointestinales, los nematodos son uno de los principales parásitos que ocasionan las mayores pérdidas económicas en la industria ganadera. *Haemonchus contortus* es uno de los principales parásitos prevalentes en ovinos y caprinos de todo el mundo, sobre todo en regiones cálidas y húmedas. Este parásito es el gusano intestinal de hábitos alimenticios más dañinos, ya que es un nematodo hematófago lo que limita severamente la capacidad productiva de los animales, además de ser uno de los parásitos más prevalentes en la ganadería, sobre todo en pequeños rumiantes.

Toda esta problemática anteriormente expuesta, ha motivado a expertos parasitólogos a buscar nuevas alternativas de control para minimizar el uso indiscriminado de fármacos antihelmínticos en pequeños rumiantes. Las investigaciones realizadas se han centrado en el estudio de los metabolitos secundarios de las plantas, sobre todo en algunas leguminosas arbóreas las cuales han demostrado tener propiedades antihelmínticas. Las plantas tienen la capacidad de producir diferentes sustancias derivadas del metabolismo secundario, mismas que son utilizadas como defensa contra algunos agentes fito-patógenos. Dentro de dichos compuestos se tienen a los taninos condensados, terpenos, saponinas y flavonoides. En el sur del Estado de México se tiene varias especies de estas leguminosas en forma endémica. La *Acacia cochliacantha* es una leguminosa comúnmente conocida como “cubata” que se utiliza ampliamente en el sur del Estado de México, sus usos son muy variados, sirve como cercos vivos para delimitar potreros, se usa como fuente de forraje en pastoreo, se usa como leña y también se ha utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Diversos trabajos han reportado actividad nematocida *in vitro* a partir de extractos de sus hojas, también se han identificado compuestos fenólicos tales como taninos, quercetina, ácido cafeico, cumárico y ferúlico los cuales se han aislados de esta leguminosa y son los responsables de la actividad nematocida. Todo esto nos da la pauta para generar la presente investigación para poder contribuir en la búsqueda de nuevas alternativas de control parasitario que conlleven a la mejora de la productividad de la ganadería local y regional, así como un manejo integral del ganado para disminuir el uso de fármacos tradicionales.

#### 4.- PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Los compuestos secundarios de la *Acacia cochliacantha*, poseen propiedades antihelmínticas?

¿Es posible inhibir la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* mediante el uso de un extracto hidroalcohólico de *Acacia cochliacantha*?

¿Es posible reducir la tasa de eliminación de huevos de *Haemonchus contortus* en heces mediante la inclusión de hojas de *Acacia cochliacantha* en las dietas de mantenimiento de cabritos de la raza Boer?

## 5.- HIPÓTESIS

La *Acacia cochliacantha* posee metabolitos secundarios con propiedades antihelmínticas capaces de reducir la eclosión de huevo del parásito nematodo *Haemonchus contortus*.

## 6.- OBJETIVOS

### 6.1. General

Evaluar las propiedades antihelmínticas de un extracto hidroalcohólico de *Acacia cochliacantha*.

### 6.2. Específicos

Evaluar el efecto sobre la inhibición de la eclosión de huevo de *Haemonchus contortus* del extracto hidroalcohólico de la leguminosa *Acacia cochliacantha*.

Identificar compuestos secundarios con propiedades antihelmínticas a partir de un extracto hidroalcohólico de *Acacia cochliacantha*.

Evaluar el efecto de la suplementación de hojas de *Acacia cochliacantha* en una dieta de mantenimiento para cabritos de la raza Boer sobre la tasa de eliminación de huevos de *Haemonchus contortus*.

## **7.- RESULTADOS.**

Los resultados de la presente investigación son presentados en un capítulo de libro y dos artículos científicos, mismos que son mostrados en los capítulos cuatro cinco y seis.

**CAPÍTULO 4. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE *Acacia cochliacantha* Y SU EFECTO CONTRA HUEVOS DEL PARÁSITO NEMATODO *Haemonchus contortus*.** Capítulo de libro publicado en: Innovación Tecnológica para la Seguridad Alimentaria / editores: Jorge Martínez Herrera, Miguel Ángel Ramírez Guillermo, Julio Cámara-Córdova; prólogo C. Hernández Reyéz. -- Primera edición. -- Villahermosa, Tabasco : Universidad Juárez Autónoma de Tabasco : Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2016.



XXVIII Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria  
Tabasco 2016  
V Simposio Internacional en Producción Agroalimentaria Tropical

10 y 11 de noviembre, Villahermosa, Tab.

Huimanguillo, Tab., 22 de agosto del 2016.

2\*Castillo Mitre GF,  
3Zamilpa A,  
2Rojo Rubio R,  
3Cortázar González M,  
1Reyes Guerrero DE,  
1Mendoza de Gives P,  
1López Arellano ME,  
1Ramírez Vargas G,  
1Olmedo Juárez A

**Trabajo 02**

Se les informa que su trabajo: "FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE *Acacia cochliacantha* Y SU EFECTO CONTRA HUEVOS DEL PARÁSITO NEMATODO *Haemonchus contortus*" "HIDRO-ALCOHOLIC EXTRACT FRACTION FROM *Acacia cochliacantha* AND ITS EFFECT AGAINST NEMATODE PARASITE *Haemonchus contortus* EGGS.", propuesto para ser presentado en la XXVIII Reunión Científica y V Simposio Internacional, ha sido APROBADO para su presentación ORAL, en la mesa de GANADERIA.

Se les recuerda que el pago de la inscripción solo permite la presentación de dos trabajos al mismo autor, siendo la cuota de recuperación de \$ 500.00 si efectúan su pago antes del 27 de septiembre, después de esa fecha, es de \$ 600.00.

**BENEFICIARIO:** R08 SAGARPA INIFAP C. E. HUIMANGUILLO CONCENTRAD  
**BANCO:** BANCOMER.  
**SUCURSAL:** 4430  
**CUENTA:** 01103441652  
**CLABE INTERBANCARIA:** 012798001034416529

Una vez realizado su depósito favor de enviar copia de la ficha a este correo, **informando el número del trabajo que están pagando**, para que el mismo pueda ser publicado en la memoria y en caso de que requieran factura favor de indicar los datos para su elaboración.

**ATENTAMENTE**

**DR. JORGE MARTÍNEZ HÉRRERA**  
**DICOVI DEL INIFAP EN TABASCO Y**  
**COORDINADOR DEL COMITÉ ORGANIZADOR**

SAGARPA Delegación Estatal  
Boulevard del Centro No. 202, Teapa Esq. Tacotalpa,  
Col. Prados de Villahermosa, Villahermosa, Tab.,  
Tel: (993)3-58-18-00; 3-58-18-09  
E-mail: carlos.hreyez@tbs.sagarpa.gob.mx

INIFAP  
Dirección de Coordinación y Vinculación INIFAP en Tabasco  
Km 1 carret. Huimanguillo-Cárdenas, Huimanguillo, Tab.  
Tel: 01 800 088 22 22 Ext 87559  
E-mail: inifap.tabasco@inifap.gob.mx



# Innovación Tecnológica para la Seguridad Alimentaria



Villahermosa, Tabasco, México.

Editores:  
Jorge Martínez Herrera  
Miguel Ángel Ramírez Guillermo  
Julio Cámara-Córdova

18 de noviembre de 2016.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

**Dr. José Manuel Piña Gutiérrez**  
Rector

Dra. Dora María Frías Márquez  
Secretaria de Servicios Académicos

C.D. Arturo Díaz Saldaña  
Secretario de Investigación, Posgrado y Vinculación

M.A. Rubicel Cruz Romero  
Secretario de Servicios Administrativos

L.C.P. Marina Moreno Tejero  
Secretaria de Finanzas

Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

**Dr. Luis Fernando Flores Lui**  
Director General

Dr. Raúl Gerardo Obando Rodríguez  
Coord. de Investigación, Innovación y Vinculación

M.C. Jorge Fajardo Guel  
Coord. de Planeación y Desarrollo

Mtro. Eduardo Francisco Berterame Barquin  
Coord. de Administración y Sistemas

M.C. Sergio Alberto Curti Díaz  
Director Regional del  
Centro de Investigación Regional Golfo Centro

Innovación Tecnológica para la Seguridad Alimentaria / editores: Jorge Martínez Herrera, Miguel Ángel Ramírez Guillermo, Julio Cámara-Córdova; prólogo C. Hernández Reyez. -- Primera edición. -- Villahermosa, Tabasco : Universidad Juárez Autónoma de Tabasco : Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2016.

XVII, 564 páginas : Ilustraciones. -- (Colección: José N. Rovirosa. Biodiversidad, desarrollo sustentable y trópico húmedo).

Incluye referencias bibliográficas al final de cada capítulo e índice.

ISBN 978-607-606-324-8.

1. Agricultura – Ganadería – Manejo y Conservación de Recursos Naturales. I. Martínez Herrera, Jorge, editor. II. Ramírez Guillermo, Miguel Ángel, editor. III. Cámara-Córdova, Julio, editor. IV. Carlos Hernández Reyez, prologuista

L.C. TP368 I56 2016

Elaboró: Esmeralda Cobos Jiménez

Primera edición, 2016

D. R. © Universidad Juárez Autónoma de Tabasco  
Av. Universidad s/n, Zona de la Cultura  
Col. Magisterial, C. P. 86040  
Villahermosa, Centro, Tabasco.  
www.ujat.mx

Esta obra fue dictaminada mediante el sistema de pares ciegos, por un Comité Científico interinstitucional que contó con el apoyo de evaluadores de diferentes Instituciones y dependencias públicas, así como por el Consejo Divisional Editorial de Ciencias Agropecuarias de la UJAT. Las denominaciones empleadas y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la UJAT, juicio alguno sobre la delimitación de fronteras o límites y la mención de empresas o productos de fabricantes en particular, estén o no patentados, no implica que la UJAT los apruebe o recomiende de preferencia a otros de naturaleza similar que no se mencionan. Aunque la UJAT fomenta la reproducción y difusión parcial o total del material contenido, queda prohibida su reproducción total sin contar previamente con la autorización expresa y por escrito del titular, en términos de la Ley Federal de Derechos de Autor. Su uso para fines no comerciales se autorizará de forma gratuita previa solicitud. La reproducción para la reventa u otros fines comerciales, incluidos fines educativos, podría estar sujeta a pago de derechos o tarifas.

ISBN: 978-607-606-324-8

Revisión de la edición: Jorge Martínez H., Miguel A. Ramírez G. y Bertha Mejía J.

Responsable de la edición: Julio Cámara Córdova.

Diseño de portada: Oficinas Centrales INIFAP.

Compilado y hecho en Villahermosa, Tabasco, México.

# CONTENIDO

FERTILIZACIÓN DEL AGUACATE 'CARMEN HASS' CON KNO <sub>3</sub> BAJO DOS CONDICIONES DE HUMEDAD. Guerrero Polanco F, Alejo Santiago G, Sánchez-Hernández R, Aburto González CA, Sánchez Monteon AL	315
IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO ASOCIADO CON LA MANCHA FOLIAR EN <i>Oryza sativa</i> . Ramírez-Guillermo MA, Jiménez Chong JA, López Domínguez I, García Ramírez LM, De los Santos Ricardez BL	319
EVALUACIÓN DE XUTA ( <i>Jatropha curcas</i> L.) ASOCIADA CON OTROS CULTIVOS. Martínez-Herrera J, Argüello-García E, Zavala-Gasca R	324
POLÍMEROS PARA ELABORAR LA SEMILLA ARTIFICIAL CP-54 DE CAÑA DE AZÚCAR. Álvarez Sánchez GF, Salgado García S, Córdova Sánchez S, Castelán Estrada M, García de la Cruz R	329
<b>Sección Tercera: Ganadería</b>	
NIVELES DE IgA EN CORDEROS DE PELO EN SU PRIMERA INFECCIÓN NATURAL CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN TABASCO. González Garduño R, Zaragoza Vera M, Zaragoza Vera C, Arjona Jiménez G, Navarro Martínez F	335
FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE <i>Acacia cochliacantha</i> Y SU EFECTO CONTRA HUEVOS DEL PARÁSITO NEMATODO <i>Haemonchus contortus</i> . Castillo Mitre GF, Zamilpa A, Rojo Rubio R, Cortázar González M, Reyes Guerrero DE, Mendoza de Gives P, López Arellano ME, Ramírez Vargas G, Olmedo Juárez A	336
CONOCIMIENTO DE LOS PRODUCTORES DE GANADO BOVINO EN EL CONTROL DE BABESIOSIS Y ANAPLASMOSIS EN EL MUNICIPIO DE RÍO LAGARTOS, YUCATÁN. Solís Calderón JJ	342
FERTILIZACIÓN Y FRECUENCIAS DE CORTE EN LA PRODUCCIÓN DEL CLON CUBANO OM-22 EN QUINTANA ROO, MÉXICO. Sosa Rubio EE, Pérez Rodríguez JD, Cabrera Torres JE	347
EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE 20 MATERIALES DE <i>Moringa oleifera</i> , CULTIVADOS EN SUELO LUVISOL. López Herrera MA, Basulto Graniel J, Lozano Contreras MG	351
EFFECTO DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO Y ÁCIDO PALMÍTICO SOBRE EL CONSUMO DE FORRAJE DE VACAS EN LACTACIÓN. De la Cruz-Velázquez S, Granados-Rivera LD, Granados-Zurita L, Oliva-Hernández J, López-Noverola I, Quiroz-Valiente J	355
PRODUCCIÓN DE FORRAJE DE LOS PASTOS ESTRELLA Y <i>Dictyoneura</i> CON FERTILIZACIÓN Y RIEGO VS MANEJO TRADICIONAL, EN VERACRUZ. Enríquez Quiroz JF, Villanueva Avalos JF, Cab Jiménez FE, Montero Lagunes M	359
EVALUACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DE <i>Stevia rebaudiana</i> VAR. BERTONI COMO ANTIHELMÍNTICO EN OVINOS DE PELO. Murguía Olmedo ML, Rojas Rodríguez O, Silva Erosa PG	365
PRODUCCIÓN Y VALOR NUTRITIVO DEL PASTO CUBA CT-115 ( <i>Pennisetum purpureum</i> ) EN TRES ÉPOCAS CLIMÁTICAS. De Dios León GE, Ramos Juárez JA, Osorio Arce MM, Hernández Mendo O, Meléndez Nava F	370
CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS Y CALIDAD DE LA CARNE DE CORDEROS CRUZADOS KATAHDIN CON PELIBUEY ALIMENTADOS CON DIETAS A BASE DE FORRAJE Y CONCENTRADO. Cantón Castillo J, Alcaraz Romero A, Moguel Ordoñez Y, Piña CB, Betancourt Ancona D, Sainz RD	375
	381

## FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE *Acacia cochliacantha* Y SU EFECTO CONTRA HUEVOS DEL PARÁSITO NEMATODO *Haemonchus contortus*

HIDRO-ALCOHOLIC EXTRACT FRACTION FROM *Acacia cochliacantha* AND ITS EFFECT AGAINST NEMATODE PARASITE *Haemonchus contortus* EGGS

<sup>2</sup>Castillo Mitre GF, <sup>3</sup>Zamilpa A, <sup>2</sup>Rojas Rubio R, <sup>3</sup>Cortázar González M, <sup>1</sup>Reyes Guerrero DE, <sup>1</sup>Mendoza de Gíves P, <sup>1</sup>López Arellano ME, <sup>1</sup>Ramírez Vargas G, <sup>1</sup>Olmedo Juárez A

<sup>1</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID PAVET). Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534 / Col. Progreso. C.P. 62550 Jiutepec, Morelos / A.P. 206-CIVAC.

<sup>2</sup>Gastón Federico Castillo Mitre. Centro Universitario UAEM-Temascaltepec, Universidad Autónoma del Estado de México, km 67.5. Carr. Fed. Toluca-Tejupilco, Temascaltepec, Estado de México, CP 51300.

<sup>3</sup>Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social. Argentina No. 1. Col. Centro. CP 62790 Xochitepec, Morelos, México.  
Autor para correspondencia: aolmedoj@gmail.com.

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue fraccionar un extracto hidro- alcohólico de *Acacia cochliacantha*, para evaluar su efecto sobre la inhibición de eclosión de huevos (IEH), del nematodo *Haemonchus contortus*. Las fracciones fueron obtenidas a partir del extracto integro mediante una bipartición con acetato de etilo, con la finalidad de separar por polaridad los compuestos bio-activos e identificarlos cualitativamente mediante cromatografía de capa fina. Tanto al extracto integro, como a las fracciones se les determinó un tamizaje fitoquímico cualitativo, para revelar la presencia de flavonoides o terpenos. Los tratamientos fueron: fracción acuosa (FAq) y fracción orgánica (FACeT) a concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.2 y 3.1 mg/ ml. Se utilizó ivermectina al 0.05% como control positivo (C<sup>+</sup>), agua destilada y dimetilsulfoxido al 2.5% como controles negativos (C<sup>-</sup>). Los huevos de *H. contortus* fueron expuestos con las fracciones y los controles en placas de 96 pozos durante 48 horas. Los datos de la prueba de IEH, fueron analizados mediante un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar y la comparación de medias se determinó por la prueba de Tukey al 0.05 de significancia. Los resultados del análisis fitoquímico revelan la presencia de flavonoides en la FACeT. En la prueba de IEH se observó que la actividad ovicida de la FACeT, fue contundente en todas las concentraciones, inhibiendo la eclosión al 100 %. Mientras que en la FAq solo se alcanzó a obtener un 40% de IEH en su máxima concentración (50 mg/ ml). Se concluye que la leguminosa *A. cochliacantha* tiene propiedades nemátocidas y podría utilizarse en futuros experimentos para ser evaluada bajo un modelo *in vivo* con ovinos experimentales y su posible validación en una prueba de campo. Asimismo, se sugiere someter la FACeT a cromatografía de alta resolución (HPLC) para identificar de forma cuantitativa los compuestos o flavonoides involucrados en la actividad ovicida contra el nematodo *H. contortus*.

**Palabras clave:** Leguminosa, flavonoides, actividad antihelmíntica

### INTRODUCCIÓN

Debido a la resistencia generada de algunos nematodos gastrointestinales (NGI) hacia diferentes familias de antiparasitarios químicos, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas para el control de estos nematodos. Actualmente, existen estudios sobre metabolitos secundarios de algunas leguminosas arbóreas que tienen propiedades antihelmínticas (von Son-de Fernex et al., 2012; Olmedo-Juárez et al., 2014). Las plantas producen muchos compuestos secundarios que utilizan para defenderse contra algunos agentes Fitopatógenos. Dentro de dichos compuestos se tienen a los taninos condensados, terpenos, saponinas y flavonoides (Williams et al., 2014). Algunos trabajos de investigación han demostrado que los flavonoides presentan actividad nemátocida y que en conjunto con otros compuestos (taninos), tienen un sinergismo que potencializa su efecto contra NGI (Klongsiriwet et al., 2015). Las hojas y frutos de la leguminosa *A. cochliacantha* son una fuente de proteína para los rumiantes (Rojas-Hernández et al., 2016), que son aprovechadas como parte de su dieta en condiciones de pastoreo. El objetivo de este trabajo fue obtener dos fracciones del extracto

hidro-alcohólico de *A. cochliacantha* y evaluarlas sobre la inhibición de la eclosión de huevo del parásito nematodo *Haemonchus contortus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Zona de estudio.** Este trabajo fue llevado a cabo en las instalaciones del departamento de Helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Jiutepec, Morelos, México.

**Material vegetal.** Las hojas de *A. cochliacantha* fueron colectadas en la comunidad de el Salitre Palmarillos municipio de Amatepec, Estado de México con una altitud de 800 metros sobre el nivel del mar. Se colectaron hojas frescas (jóvenes y maduras) considerando árboles con una edad aproximada de tres años. Se almacenaron y trasladaron en termos a una temperatura de 4°C. Posteriormente se sometieron a un proceso de secado bajo la sombra durante una semana y finalmente las hojas fueron separadas con tamiz del número 14.

**Obtención del extracto hidro-alcohólico (HA).** Se utilizaron 200 g de hojas secas y se sometieron a un proceso de maceración con una mezcla de agua y metanol (70:30 v/v) durante 24 horas, en seguida se filtró la solución mediante diferentes filtros (gasa, algodón y papel filtro) con la finalidad de obtener un extracto libre de material vegetal.

**Obtención de fracciones.** Se hizo una bipartición, a partir de 150 ml de extracto Hidro-alcohólico, se adicionaron 150 ml de acetato de etilo y ambos fueron colocados en un embudo de separación; y por polaridad se obtuvieron dos fracciones: una acuosa (FAq) y una orgánica (FAcEt). Ambas fracciones fueron concentradas en un rotoevaporador (50°C, R-3 Heidolph, Alemania) y finalmente fueron llevadas a sequedad total mediante un proceso de liofilización.

**Identificación cualitativa de compuestos.** Tanto al extracto y sus fracciones fueron sometidos a un tamizaje cualitativo, mediante cromatografía de capa fina usando cromatoplasmas de sílica gel fase reversa (60 F254). En estas placas se utilizaron dos reveladores, uno para flavonoides (polietileno glicol) y otro para terpenoides (anisaldehído-sulfúrico). Se utilizó al flavonoide rutina como patrón de referencia en la identificación de flavonoides. La determinación de los compuestos se realizó según el procedimiento de Wagner y Bladt (1996).

### Material biológico

**Obtención de huevos de *Haemonchus contortus*.** Se utilizaron huevos de *H. contortus* obtenidos a partir de un ovino infectado de manera artificial. Los huevos de *H. contortus* fueron concentrados mediante el paso de diferentes tamices (200, 100, 75 y 37 mm de diámetro) y fueron lavados con sacarosa al 40 %, para su posterior uso.

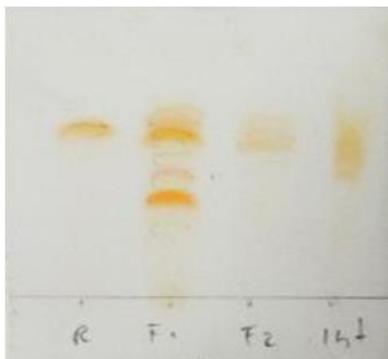
**Procedimiento experimental.** Se utilizaron placas de micro-titulación de 96 pozos, con cuatro repeticiones (n=4). Los tratamientos fueron las concentraciones de las fracciones del extracto hidro-alcohólico de *A. cochliacantha* (FAq y FAcEt, 50, 25, 12.5, 6.15, y 3.12 mg/ ml), ivermectina al 0.5 % control positivo (C<sup>+</sup>), agua y Dimetilsulfoxido (DMSO 2.5%) como control negativo (C<sup>-</sup>). A cada pozo se le depositaron 100 ± 10 huevos/ 50 µL y 50 µL de los tratamientos, según corresponda, utilizando un volumen total de 100 µL. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 28 °C, durante 48 horas y en seguida se procedió a contar cada pozo tomando 10 alícuotas de 5 µL vistas en un microscopio óptico. El porcentaje de inhibición de huevos fue calculado mediante la siguiente fórmula: ((número de larvas/ (número de larvas + número de huevos)) \* 100).

**Análisis estadístico.** Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar por el procedimiento GLM. Finalmente se determinó la comparación de medias con el procedimiento Tukey a un nivel de confianza del 95 %. Se usó el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS, 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Identificación de compuestos.** La producción de metabolitos secundarios por parte de las plantas es un sistema complejo que depende de múltiples factores, tales como la familia a la que pertenece la planta, época del año y edad. Las plantas que se encuentran en la familia Leguminosae, regularmente producen gran cantidad de metabolitos con propiedades medicinales (Olmedo-Juárez et al., 2014; Sibaja-Hernández et al., 2015). En la figura 1, se observa la identificación de flavonoides en el extracto integro (Int) y en la fracción orgánica (F1, FAcEt), mientras que la fracción acuosa (F2, FAq) no reveló la presencia de flavonoides. En este estudio se identificó la presencia de flavonoides en la leguminosa

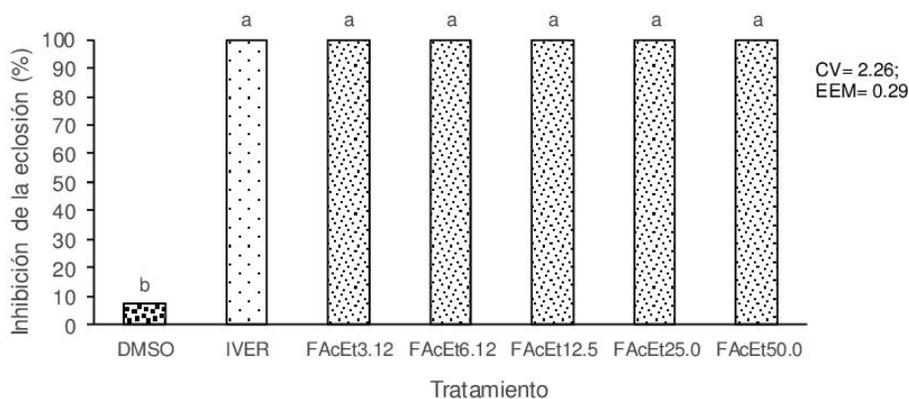
*Acacia cochliacantha* mediante la bipartición se aislaron estos compuestos (Figura 2), comprobando que la fracción FAcEt, tuvo los mejores efectos ovicidas en todas las concentraciones utilizadas. En la literatura se ha encontrado que *A. cochliachanta* contiene metabolitos secundarios como taninos y algunos flavonoides (quercertina y kaempferol) (Olivares-Pérez et al., 2013; Sibaja-Hernández et al., 2015)



R= Rutina, F1= Fracción orgánica (FAcEt), F2= Fracción acuosa (FAq), Int= Extracto integro

**Figura 1. Identificación de flavonoides del extracto hidro- alcohólico y fracciones de la leguminosa *Acacia cochliacantha*, mediante cromatografía de capa fina.**

**Confrontación de las fracciones contra huevos de *H. contortus*.** En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos de la FAcEt, todas las concentraciones evaluadas inhibieron la eclosión de huevos al 100% ( $P < 0.05$ ) y fueron similares al control positivo (Ivermectina). Para el caso de la FAq (figura 3), solo se logró inhibir la eclosión de huevos hasta en un 40 % con la máxima concentración utilizada (50 mg/ ml).



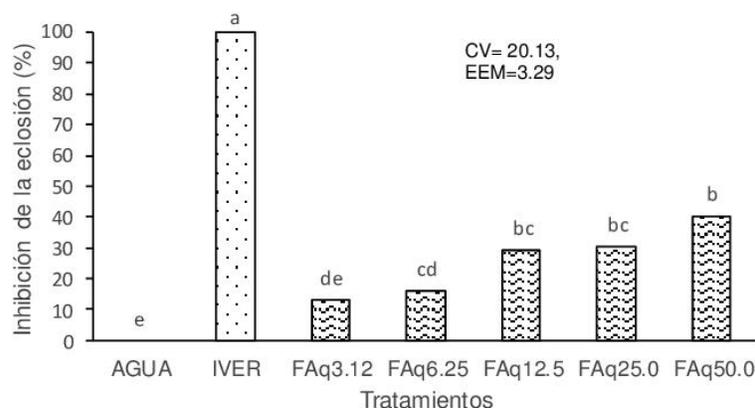
CV= coeficiente de variación; EEM= error estándar de la media; IVER= ivermectina; FAcEt= fracción orgánica.

Medias en la misma figura con distinta literal estadísticamente difieren ( $P < 0.05$ )

**Figura 2. Porcentajes de inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* confrontados con la fracción orgánica (FAcEt), a partir del extracto hidro-alcohólico de la leguminosa *A. cochliacantha***

De acuerdo a la identificación realizada en la fracción AcEt, la actividad ovicida podría estar relacionada con los flavonoides. Cabe mencionar que al momento de observar los huevos de *H. contortus* en el microscopio que estuvieron expuestos a la FAcEt; tuvieron un daño en el interior de su estructura, afectando el desarrollo embrionario y por consecuencia su eclosión. Un posible mecanismo de acción que ejercen los flavonoides con otros compuestos (taninos), sobre la inhibición de la eclosión de huevos, es su afinidad de adherirse a la cutícula que es rica en glicoproteína. Los resultados del presente estudio se relacionan con lo encontrado por Von Son-de Fernex et al., (2015), quienes aislaron algunos flavonoides (ejemplo, quercertina) a partir de fraccionamientos de la leguminosa *Leucaena leucocephala*, demostrando que la quercertina (1.1 mg/ ml de fracción orgánica), tuvo hasta 90.49 %  $\pm$  2.85 de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo *Cooperia* spp. En el presente estudio similares fraccionamientos se hicieron para obtener la fracción acuosa y la fracción orgánica, demostrando que la FAcEt, contiene los metabolitos activos en contra de los huevos de *H. contortus*.

Este tipo de estudios bio-dirigidos podría ser una herramienta importante para el descubrimiento de moléculas activas que se encuentran en las plantas ricas en metabolitos secundarios (leguminosas arbóreas). Es importante señalar que este estudio es derivado de ensayos previos evaluando al extracto integro de *A. cochliacantha*, en contra de huevos de *H. contortus* y se obtuvo el 100% de inhibición de la eclosión de huevos con una concentración de 100 mg/ mL [Rodríguez-Gómez et al., (2016) datos no publicados]. En este bioensayo, mediante la bipartición realizada con acetato de etilo; se potencializo el efecto ovicida con la fracción AcEt; inhibiendo la eclosión huevos en un 100% con la concentración de 3.12 mg/ mL (figura 2). Los compuestos secundarios con actividad antihelmíntica de las leguminosas arbóreas han sido aislados de diversas formas con el objeto de identificar su actividad en contra de algunos nematodos gastrointestinales de los rumiantes (Vargas-Magaña et al., 2014; Marie-de Magdeleine et al., 2014). Recientemente un grupo de investigadores franceses han demostrado que existe un sinergismo entre compuestos, por ejemplo: en un estudio realizado por Klongsiriwet et al., (2015), demostraron que los taninos condensados tienen mejor efecto antihelmíntico cuando están adicionados con flavonoides como la luteolina y quercertina. Con respecto a estos antecedentes, la FAcEt, además de flavonoides podría contener otros compuestos fenólicos que probablemente tengan un efecto sinérgico en contra de los huevos de *H. contortus*. Por lo tanto, es necesario realizar una identificación cuantitativa de las moléculas para conocer el tipo de compuestos o flavonoides que tienen la fracción orgánica (FAcEt), para poder elucidar si existe un efecto sinérgico entre los compuestos de dicha fracción o comprobar si hay un efecto nemátocida independiente de los flavonoides.



CV= coeficiente de variación; EEM= error estándar de la media; IVER= ivermectina; FAq= fracción acuosa

Medias en la misma figura con distinta literal estadísticamente difieren (P<0.05)

**Figura 3. Porcentajes de inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* confrontados con una fracción acuosa (Fq) a partir del extracto hidro-alcohólico de la leguminosa *Acacia cochliacantha***

### CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación se concluye que la leguminosa *Acacia cochliacantha* tiene propiedades nematocidas. Asimismo, mediante el fraccionamiento a partir de una bipartición del extracto hidro- alcohólico se pueden aislar los metabolitos que tienen la actividad antihelmíntica. Esta leguminosa podría utilizarse en futuros experimentos para ser evaluada bajo un modelo *in vivo* con ovinos experimentales y su posible validación en una prueba de campo. Se sugiere, someter la fracción AcEt en cromatografía de alta resolución para identificar de forma cuantitativa los compuestos o flavonoides involucrados en la actividad ovicida contra el nematodo *H. contortus*.

### LITERATURA CITADA

- 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, 17-134.
- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philbert, L., Bocage, B., Archimede, H. 2014. *In vitro* effects of *Musa x paradisiaca* extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. 96, 127-132.
- Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Arece, G.J., Mohamed, A. Z. S., Kholif, E. A., Morales, A.E. 2014. *In vitro* of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Italian Journal of Animal Science*. 13, 303-307.
- Olivares-Pérez, J., Avilés-Nova, F., Albarran-Portillo, B., Catelan-Ortega, O., Rojas-Hernández, S. 2013. Nutritional quality of *Pithecellobium dulce* and *Acacia cochliacantha* fruits, and its evaluation in goats. *Livestock Production Science*. 154, 74-81.
- Rojas-Hernández, S., Olivares-Pérez, J., Quiroz-Cardoso, F., Villa-Mancera, A., Cipriano-Salazar, M., Camacho-Díaz, L.M., Reynoso-Palomar, A. 2016. Diagnosis of the palatability of fruits of three fodder trees in ruminants. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 3 (7), 121-127.
- Sibaja-Hernández, R., Román-Guerrero, A., Sepúlveda-Jiménez, G., Rodríguez-Monroya, M. 2015. Physicochemical, shear flow behaviour and emulsifying properties of *Acacia cochliacantha* and *Acacia farnesiana* gums. *Industrial Crops and Products*. 67, 161–168.
- Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Chan-Perez, J.I. 2014. Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology*. 206, 322–327.
- von Son-de Fernex, E., Alonso, D.M.A., Valles, M.B., Capetillo, L.C.M. 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*. 131, 413-418.
- von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M.A., Mendoza-de-Gives, P., Valles-de la Mora, B., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Castillo-Gallegos, E. 2015. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Veterinary Parasitology*. 214, 89-95.
- Wagner, H., Bladt, S. 1996. Plant drug analysis. In: *A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd edn. Springer, Germany. 352 p.
- Williams, A.R., Ropiak, H.M., Frygas, C., Desrués, O., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2014. Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasitology Vectors*. 7, 518-527.
- SAS Institute, 2006. *SAS User's Guide: Statistics*. Ver 9.0. SAS Institute. Cary, N.C. USA. 956 p.

# CAPÍTULO 5. Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*

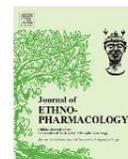
Journal of Ethnopharmacology 204 (2017) 125–131



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jep](http://www.elsevier.com/locate/jep)



## Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*



G.F. Castillo-Mitre<sup>a</sup>, A. Olmedo-Juárez<sup>b,\*</sup>, R. Rojo-Rubio<sup>a</sup>, M. González-Cortázar<sup>c</sup>, P. Mendoza-de Gives<sup>b</sup>, E.E. Hernández-Beteta<sup>c</sup>, D.E. Reyes-Guerrero<sup>b</sup>, M.E. López-Arellano<sup>b</sup>, J.F. Vázquez-Armijo<sup>a</sup>, G. Ramírez-Vargas<sup>b</sup>, A. Zamilpa<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro Universitario UAEM-Temascaltepec, Universidad Autónoma del Estado de México, km 67.5. Carr. Fed. Toluca-Tejupilco, CP 51300 Temascaltepec, Estado de México, Mexico

<sup>b</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID PAVET-INIFAP), Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534/ Col. Progreso, A.P. 206-CIVAC, C.P. 62550 Jiutepec, Morelos, Mexico

<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Argentina No. 1. Col. Centro, CP 62790 Xochitepec, Morelos, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Chemical compounds:

Caffeic acid (PubChem CID: 689043)  
*p*-coumaric acid (PubChem CID: 637542)  
Ferulic acid (PubChem CID: 445858)  
Methyl caffeate (PubChem CID: 689075)  
Methyl-*p*-coumarate (PubChem CID: 5319562)  
Methyl ferulate (PubChem CID: 5357283) and  
quercetin (PubChem CID: 5280343)

#### Keywords:

*Acacia cochliacantha*  
Caffeic acid  
*p*-coumaric acid  
Ferulic acid  
Quercetin  
Anthelmintic activity

### ABSTRACT

**Ethnopharmacology relevance:** *Acacia cochliacantha* is a small tree whose foliage is traditionally used in Mexico for treatment of kidney pain, gastrointestinal illnesses and to kill intestinal parasites. In recent decades, the study of vegetal extracts has offered other possible alternatives for the control of *Haemonchus contortus*. Considering that this nematode affects dramatically the health and productivity of small ruminants, the aim of this study was to identify the anthelmintic compounds from *A. cochliacantha* hydro-alcoholic extract (HA-E) through an ovicidal test.

**Material and methods:** In vitro egg hatch assay was conducted to determinate the anthelmintic effects of a HA-E (60 g). Liquid-liquid ethyl acetate/water extraction gave two fractions (EtOAc-F, 1.92 g; Aq-F; 58.1 g). The less polar compounds from ethyl acetate fraction were extracted by addition of dichloromethane offering a precipitate phase (Mt-F, 1.25 g) and a soluble mixture (DCMt-F 1.15 g). All fractions were evaluated for ovicidal activity obtaining the egg hatching inhibition (EHI, 0.07–25 mg/mL). Ivermectin (0.5 mg/mL) was used as a reference drug (positive control), and distilled water, 2.5% DMSO and 2% methanol were used as negative controls. The isolated compounds from the most active fractions were subjected to spectroscopic (<sup>1</sup>H NMR) Spectrometric (MS) and UV HPLC analysis in order to identify the bioactive compounds.

**Results:** The less polar treatments (AcOEt-F, DCMt-F, DCMt-P) showed the highest ovicidal activities (98–100% EHI; at 0.62–1.56 mg/mL) and the major compounds found in these fractions were identified as caffeoyl and coumaroyl derivatives, including caffeic acid (**1**), *p*-coumaric acid (**2**), ferulic acid (**3**), methyl caffeate (**4**), methyl-*p*-coumarate (**5**), methyl ferulate (**6**) and quercetin. In case of the less active fractions (Aq-F, Mt-F) were constituted principally by glycosylated flavonoids.

**Conclusion:** These results show that caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* leaves had promising anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. This leguminous may offer an alternative source for the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants.

### 1. Introduction

Infections caused by gastrointestinal nematodes (GIN) are some of the major concerns for livestock producers since these parasites affect dramatically the health of animals and their productivity (Jackson et al., 2012). *Haemonchus contortus* is one of the most frequent pathogenic nematodes in small ruminants, causing high levels of mortality of these animals (Arosemena et al., 1999). The excessive

use of synthetic nematocidal generates a great monetary cost worldwide. On the other hand, *H. contortus* has produced an important drug resistance problem mainly in goats and sheep (Kaplan and Vidyashankar, 2012; Crook et al., 2016; Learmount et al., 2016). Additionally, the health and ecological risk produced by remnants of synthetic nematocides had increased the necessity to evaluate other alternative methods for control of helminthiasis (Waller, 1997; Waller and Thamsborg, 2004). Several medicinal plants used for treatment of

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [aolmedoj@gmail.com](mailto:aolmedoj@gmail.com), [olmedo.agustin@inifap.org.mx](mailto:olmedo.agustin@inifap.org.mx) (A. Olmedo-Juárez), [azamilpa\\_2000@yahoo.com.mx](mailto:azamilpa_2000@yahoo.com.mx) (A. Zamilpa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.010>

Received 17 March 2017; Received in revised form 12 April 2017; Accepted 13 April 2017

Available online 14 April 2017

0378-8741/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

gastrointestinal illnesses have showed anthelmintic effect (Hammond et al., 1997; von Son-de Fernex et al., 2012; Olmedo-Juárez et al., 2014). Some secondary metabolites like tannins, terpenoids, saponins, flavonoids, hydroxycinnamic derivatives and other polyphenolic compounds have been related to this anthelmintic activity (Williams et al., 2014; von Son-de Fernex et al. 2015). Several of these compounds acted synergistically to achieve higher anthelmintic activity (Klongsiriwet et al., 2015).

Several *Acacia* species (fruits and leaves) are traditionally used in Mexico for treatment of gastrointestinal illnesses (diarrhoea, gastritis), urinary infections, throat inflammation and headaches (Argueta et al., 1994; Bañuelos, 1999; Yetman and Van Devender, 2002). In case of *Acacia cochliacantha* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rudd, 1966), flowers and leaves of this legume displayed antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria (Manríquez-Torres et al., 2007). On the other hand, aqueous extracts from foliage of this plant displayed anthelmintic effects against ruminant parasitic nematodes through the reduction in the eggs per gram of faeces (EPG) in goats artificially infected with *H. contortus* (León-Castro et al., 2015). The objective of this study was to identify the major anthelmintic compounds from *A. cochliacantha* against *H. contortus*.

## 2. Material and methods

### 2.1. General

All chemicals used in this work were analytical-reagent grade. Dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol, water, acetonitrile, 2-aminoethyl diphenylborinate, caffeic acid ( $\geq 98\%$ ), *p*-coumaric acid ( $\geq 98\%$ ) and ferulic acid ( $\geq 99\%$ ) were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA). Materials and reagents for biological models (EHI %) were purchased from Corning® (New York, USA).  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded on Varian INOVA-400 at 400 MHz. in  $\text{CDCl}_3$ . Chemical shifts are reported in ppm relative to TMS. Spectrometric analysis was performed on a Waters Xevo TQD mass spectrometer with ESI ion source (Waters Milford, USA). The UV spectra were obtained using a Waters array detector (Waters Co. 2996, Milford, USA). Thin-layer chromatography was performed using TLC Silica gel 60 F254, aluminium sheets 20×20 cm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

### 2.2. Plant material

Leaves of *Acacia cochliacantha* (Cubata) were collected from its natural habitat in Salitre Palmarillos village, Amatepec Municipality, State of Mexico, Mexico (18°43'28.4" N, 100°17'03.5" W). This species was collected between March and April 2016. The plant material was identified by Prof. Rafael Torres-Colin, and a voucher specimen was deposited at the National Herbarium of Mexico in Universidad Nacional Autónoma de México, México, City (under the voucher code number OD07042016). Fresh plant was washed and dried at room temperature in the dark conditions for one week, and then the dry material was ground using an electrical miller (Wiley mill, TS3375E15 model) to reduce the leaf size to 4–6 mm.

### 2.3. Preparation of hydroalcoholic extract

The milled leaves (1 kg) were extracted by maceration using an aqueous methanol solution (70%, 1:10 ratio, w/v) at room temperature for 24 h. The liquid extract was filtered and the residual solvent was evaporated under low pressure conditions using a rotary evaporator (50–55 °C, Heidolph Laborota 4000, Germany) to obtain a semisolid extract, which was finally freeze-dried giving 120 g (12%) of a brown powder. This integrate extract was stored at –40 °C until pharmacological or phytochemical analysis.

### 2.4. Hydroalcoholic extract fractionation

The hydroalcoholic extract (HAE, 60 g) was partitioned by liquid-liquid chromatography using immiscible water/ethyl acetate solvents (600 mL each, Merck, Germany). Solutions in both fractions were concentrated by low-pressure distillation to obtain an aqueous fraction (Aq-F, 58.1 g) and an organic phase (AcOEt-F 1.92 g). The less polar mixture was precipitated by addition of dichloromethane (60 mL). After low pressure distillation process, the dichloromethane phase (DCMt-F, 0.83 g) was purified using an open chromatographic column (silica gel 60, 0.04–0.06 mesh, 25 g, 2.0×60 cm, Merck, Germany). The mobile phase consisted of a dichloromethane/methanol gradient system, and 50-mL samples were collected. These fractions were grouped according to their chemical similarity, resulting in 6 final sub-fractions that were labelled as follows: C1F1, C1F2, C1F3, C1F4, C1F5, C1F6. In the case of fraction DCMt-P (0.94 g), this mixture was purified in a chromatographic open column previously packed with 10 g of reverse phase silica gel (Polygoprep 60-50, C-18) and stabilized with methanol. A water/acetonitrile gradient system was used as mobile phase, starting with 100% of  $\text{H}_2\text{O}$  and ending with 100%  $\text{CH}_3\text{CN}$ . 21 samples of 10 mL were obtained which were grouped according to their chemical composition in 4 sub-fractions C2F1 (0.021 g), C2F2 (0.014 g), C2F3 (0.069 g) and C2F4 (0.44 g).

All samples of these two-chromatographic process were analysed by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel 60 F254 (Merck, Germany) under UV light at 254 and 360 nm. The natural products-polyethylene glycol reagent (NP-PEG; 1% methanol solution of diphenylboryloxethylamine, followed by 5% ethanol polyethylene glycol) was used as a chemical detection reagent (Wagner and Bladt, 2001).

### 2.5. Biological material

#### 2.5.1. *Haemonchus contortus* eggs recovery test

*Haemonchus contortus* eggs were obtained from an egg-donor sheep (20.3 kg of bodyweight) previously subjected to a monospecific infection (350 infective larvae/kg, INIFAP strain, Mexico). Sheep were housed indoors on a metabolic floor, feed hay and commercial concentrate and had free access to water. Egg recovery was performed according to the technique described by von Son-de Fernex et al. (2015).

#### 2.6. Eggs hatching inhibition (EHI) bio-guided test

The assay was carried out in 96-well micro-titration plates. In the assay, 4 wells were set up for each treatment in four experimental units. Treatments were administered in the indicated concentrations as follows: Step 1) hydroalcoholic extract (at 100 mg/mL); Step 2) ethyl acetate fraction (EtOAc-F) and aqueous fraction (Aq-F) at 0.39–25 mg/mL; Step 3) soluble dichloromethane fraction (DCMt-F) and the precipitate dichloromethane fraction (DMt-P) at 0.07–0.62 mg/mL; Step 4) methanolic fraction (Mt-F) at 1.56–25 mg/mL. First column sub-fractions: C1F1, C1F2, C1F3, C1F4, C1F5, and C1F6 as well as reversed phase column sub-fractions C1F1, C2F2, C2F3 and C2F4 were tested at concentration of 0.25–1 mg/mL. For each treatment, three proper negative controls were included as follows: 2.5% dimethyl sulfoxide (DMSO), distilled water and 2% methanol. Ivermectin (0.5 mg/mL) was used as the positive control. A total of 50 microliters of an aqueous suspension containing one hundred *H. contortus* eggs was seeded into each well. Then, 50- $\mu\text{L}$  aliquots of the extract, fractions or control were deposited to each well. The plates were then incubated at room temperature for 48 h. The egg hatching process was stopped using Lugol's solution. The criteria for estimating the egg hatching inhibition included counting either the eggs present or the hatched larvae contained in 5- $\mu\text{L}$  aliquots (n=10). The percentage of hatched eggs was estimated for each treatment group using the following formula: % EHI=[(number of eggs)/(number of larvae+number

eggs)]\*100.

### 2.7. HPLC analysis

Chromatographic analysis was performed on a Waters 2695 Separation module system equipped with a Waters 996 photodiode array detector and Empower Pro software (Waters Corporation, USA). Chemical separation was achieved using a Supelcosil LC-F column (4.6 mm×50 mm i.d., 5- $\mu$ m particle size, (Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA). The mobile phase consisted of 0.5% trifluoroacetic acid aqueous solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient system was as follows: 0–1 min, 0% B; 2–3 min, 5% B, 4–20 min, 30% B; 21–23 min, 50% B 14–15 min; 24–25 min, 80% B; 26–27 100% B; 28–30 min, 0% B. The flow rate was maintained at 0.9 mL min<sup>-1</sup>, and the sample injection volume was 10  $\mu$ L. Absorbance was measured at 330 nm, caffeic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid and quercetin were identified by direct comparison of the retention times and UV spectra with those of reference standards (Sigma-Aldrich, St Louis Mo, USA). Methyl esters of caffeic, coumaric and ferulic acids derivatives were established based on their <sup>1</sup>H-HMN spectroscopy and spectrometry analysis.

### 2.8. Statistical analysis

Egg hatching inhibition data were analysed based on a completely random design using ANOVA through a general linear model (GLM) and SAS program. The dependent variables were: hydroalcoholic extract, column 1 sub-fractions, column 2 sub-fraction. A Tukey test was performed to identify significant differences among treatments. Likewise, the lethal concentrations (LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub>) were calculated using Probit analysis in SAS 9.0 (SAS, 2006).

## 3. Results

### 3.1. Egg hatching inhibition test

Table 1 and Fig. 1 shows the inhibition of *H. contortus* egg hatching and lethal concentration (LC<sub>50</sub>, <sub>90</sub>) produced by *A. cochiacantha* hydroalcoholic extract and its first derived fractions. The integrate extract (HA-E, 100 mg/mL) displayed a total *H. contortus* egg hatching inhibition (initial step; Fig. 1A). While the organic fraction (second step, EtOAc-F; Fig. 1C) showed 100% EHI at 3.12 to 25 mg/mL and EHI of 84–98% at 0.78 and 1.56 mg/mL respectively. In case of aqueous fraction (Aq-F; Fig. 1B), this polar mixture displayed only 30% of EHI at the highest tested concentration (25 mg/mL). After bipartition of fraction EtOAc-F (1.5 g) by dichloromethane precipitation (20 mL, third step), the soluble phase (DCMt-F, 0.68 g; Fig. 1D) displayed 95–100% EHI at a concentration range of 0.15–0.62 mg/mL, and precipitated phase (DCMt-P, 0.82 g) showed 91–100% EHI at the same concentrations (0.15–0.62 mg/mL). In all studies, 100% EHI was observed with Ivermectin (0.5 mg/mL). Regarding the lethal concentrations, the LC<sub>50</sub> for the EtOAc-F was found to be 0.33 mg/mL, while for the dichloromethane fraction (DCMt-F) and the precipitate (DCMt-P), the LC<sub>50</sub> was 0.06 and 0.04 mg/mL, respectively. The LC<sub>50</sub> for Aq-F was not estimated due its low anthelmintic effect (30% EHI, 25 mg/mL). The LC<sub>90</sub> for EtOAc-F was 0.85 mg/mL, and derivative fraction from this mixture displayed better values of nematocidal effect (LC<sub>90</sub>=0.12 and 0.13 mg/mL for DCMt-F and DCMt-P respectively).

### 3.2. Bioguided fractionation of EtOAc-F

Fingerprints and anthelmintic activity (1 mg/mL) of sub-fractions from dichloromethane soluble mixture are shown in Fig. 2 and Table 2. Fractions with the highest ovidical effects were C1F1, which is principally constituted by caffeic acid (1, 98.25% EHI) and C1F2

**Table 1**

Results of the *Haemonchus contortus* egg hatching inhibition effect caused by an *Acacia cochiacantha* hydroalcoholic extract and five aqueous and organic fractions and its lethal concentration (LC<sub>50</sub>, <sub>90</sub>).

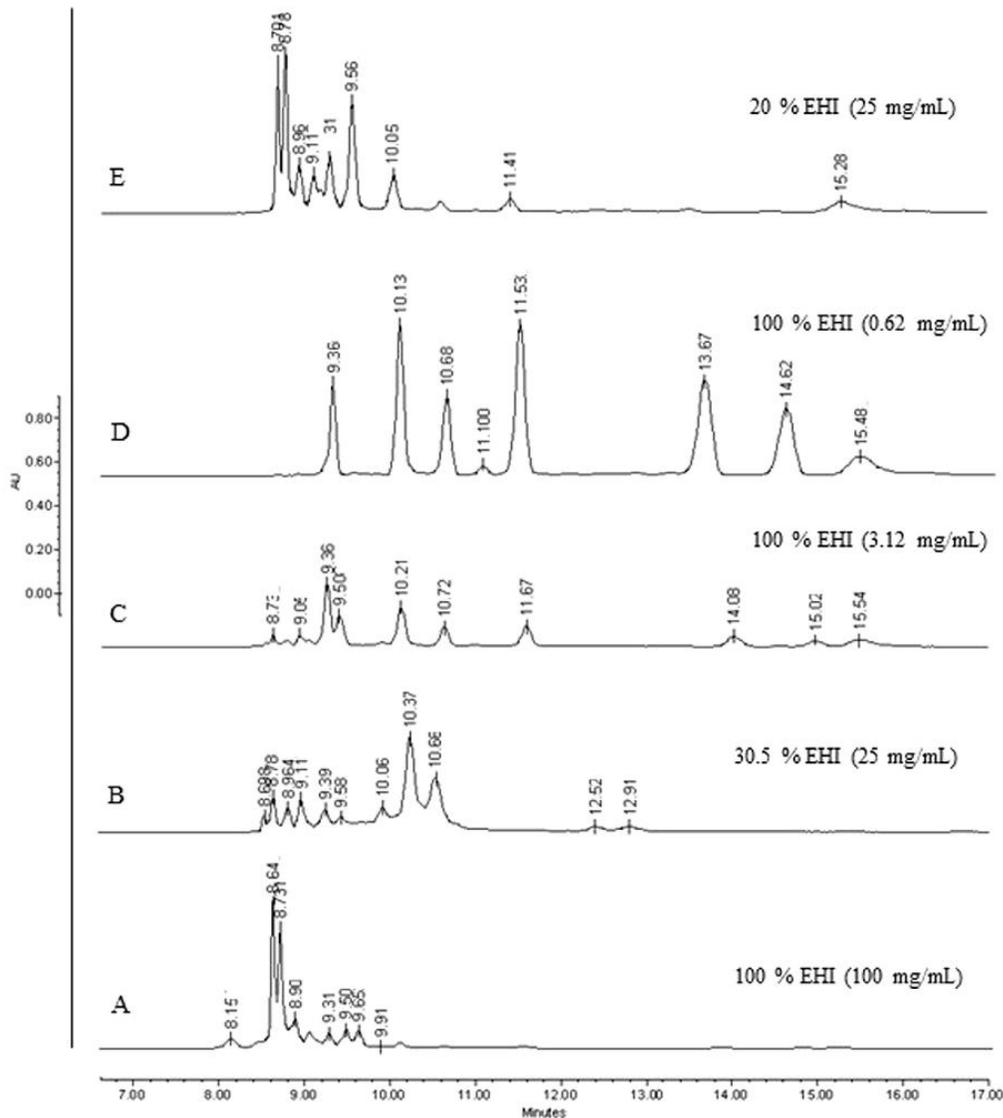
Initial step	Hydroalcoholic extract (HA-E 100 mg/mL) as a whole extract=100% <sup>a</sup> EHI		
Second step	HA-E bipartition with ethyl acetate		
Fraction (mg/mL)	Egg hatching Inhibition %	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>
<b>Organic fraction (EtOAc-F)</b>			
25.00	100.00 <sup>a</sup>	0.33 mg/mL	0.85 mg/mL
12.50	100.00 <sup>a</sup>		
6.25	100.00 <sup>a</sup>		
3.12	100.00 <sup>a</sup>		
1.56	98.00 <sup>a</sup>		
0.78	84.00 <sup>a</sup>		
0.39	67.25 <sup>b</sup>		
<b>Aqueous fraction (Aq-F)</b>			
25.00	30.50 <sup>c</sup>	–	–
12.50	29.25 <sup>cd</sup>		
6.25	16.00 <sup>def</sup>		
3.12	13.25 <sup>def</sup>		
DMSO 2.5%	3.00 <sup>ef</sup>		
Distilled water	0.00 <sup>f</sup>		
Ivermectin (0.5 mg/mL)	100.00 <sup>a</sup>		
<b>Third step</b>			
EtOAc-F bipartition with dichloromethane			
<b>Dichloromethane fraction (DCMt-F)</b>		0.06 mg/mL	0.13mg/mL
0.62	100.00 <sup>a</sup>		
0.31	99.24 <sup>a</sup>		
0.15	95.63 <sup>a</sup>		
0.07	71.67 <sup>b</sup>		
<b>Precipitate (DCMt-P)</b>		0.04 mg/mL	0.12 mg/mL
0.62	100.00 <sup>a</sup>		
0.31	99.47 <sup>a</sup>		
0.15	91.30 <sup>a</sup>		
0.07	71.60 <sup>b</sup>		
Methanol at 4%	0.00 <sup>d</sup>		
Ivermectin (0.5 mg/mL)	100.00 <sup>a</sup>		
<b>Fourth step</b>			
Aq-F bipartition with methanol			
<b>Methanolic fraction (Mt-F)</b>			
25.0	20.00 <sup>b</sup>		
12.5	8.00 <sup>c</sup>		
6.25	4.75 <sup>cd</sup>	–	–
3.12	5.25 <sup>cd</sup>		
1.56	8.00 <sup>c</sup>		
Methanol at 4%	0.00 <sup>d</sup>		
Ivermectin (0.5 mg/mL)	100.00 <sup>a</sup>		

Means with different letters within each fractionation step represent significant differences  $P < 0.05$ .

(97% EHI), which contains a mixture of *p*-coumaric (2) acid and ferulic acid (3). The methyl ester derivatives: methyl caffeate (4, C1F3), methyl-*p*-coumarate (5, C1F4) and methylferulate (6, C1F5) displayed values of EHI of 88.2%, 88.2% and 71.5% respectively at 1 mg/mL. The mixture al methyl ferulate and quercetin (C1F6, 1 mg/mL) displayed a 94% of EHI. Finally, the chemical separation of fraction DCMt-P gave three non-active fractions C2F1 (flavone, 5.2% EHI), C2F2 (flavonol, 6.2% EHI), C2F3 (flavones and flavonols, 7.0% EHI) and a bioactive mixture of compounds 1–6 (C2F4, 98% of EHI)

### 3.3. Identification of bioactive compounds

Fingerprints comparison of bioactive fractions with those commercial references (caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, and quercetin, allowed to identify these polyphenols. Methyl caffeate, methyl-*p*-coumarate and methylferulate (Fig. 3) were identified by comparison of their <sup>1</sup>H NMR and mass spectrometry previously described (Hatfield et al., 2008; Jazly et al., 2013; Znati et al., 2014) HPLC analysis of the 4 fractions derived from DCMt-P chromatographic fractionation indicated that non-active fractions C2F1, C2F2 and C2F3 were constituted



**Fig. 1.** Results of the HPLC analysis showing *Haemonchus contortus* egg hatching inhibition (EHI) of 5 different fractions from *Acacia cochliacantha* leaves: A) hydroalcoholic extract (HA-E), B) Aqueous fraction (Aq-F), C) Ethyl acetate fraction (EtOAc-F), D) dichloromethane fraction (DCMt-F) and E) methanolic fraction (Mt-F).

by glycosylated flavonoids principally (Table 2). While the C2F4 contained a mixture of all hydroxycinnamic derivatives (1–6) and displayed a high nematode inhibition (98% EHI).

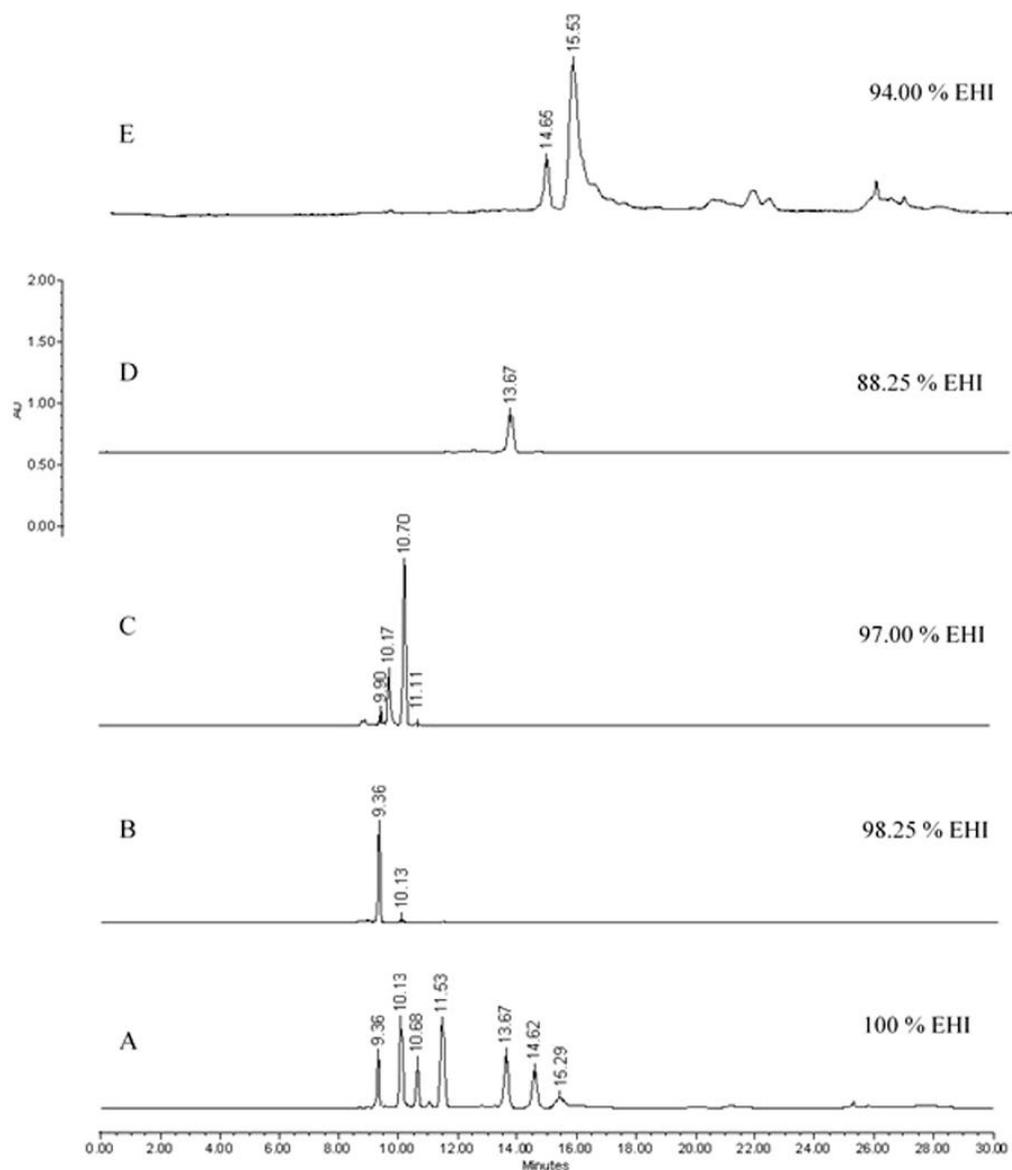
#### 4. Discussion

The Leguminosae family comprises a group of plants that are well known as producers of secondary metabolites with medicinal properties (Olmedo-Juárez et al., 2014; Sibaja-Hernández et al., 2015). Several species from genus *Acacia* have been described as antiparasitic traditional herbals and recently it has been demonstrated that goat kids previously fed with *A. cochliacantha* leaves were protected against the artificial infection with *H. contortus*, generating a significant reduction in egg count per gram of faeces elimination (Akkari et al., 2008; León-Castro et al., 2015). In this case, the anthelmintic effect was attributed to tannins content. (Costa-Júnior et al., 2014; León-Castro

et al., 2015).

In this work, the nematocidal activity of the hydroalcoholic extract from *A. cochliacantha* (100 mg/mL, Table 1) was confirmed using free living stages of *H. contortus* nematode. This pharmacological tool, allowed to identify the major bioactive compounds through a bio-guided chemical fractionation of the integrate extract.

The liquid-liquid fractionation of hydroalcoholic extract produced a non-polar ovicidal phase (EtOAc-F, 100% EHI, 3.12 mg/mL) and an inactive aqueous phase (Aq-F, 13.25% EHI, 3.12 mg/mL). It is interesting that DCMt-F showed sixfold higher ovicidal activity than EtOAc-F ( $LC_{50}=0.33$  and  $LC_{90}=0.85$  mg/mL, Table 1). This finding indicates that the non-polar compounds from the hydroalcoholic extract may be responsible for this biological activity. Even if a previous chemical analysis established that *A. cochliacantha* contains polyphenols: tannins and flavonoids (Olivares-Pérez et al., 2013). This investigation allowed to confirm that caffeoyl and coumaroyl derivatives including their



**Fig. 2.** Results of the HPLC analysis showing *Haemonchus contortus* egg hatching inhibition (EHI) of 6 different fractions from *Acacia cochliacantha* leaves assessed at 1 mg/mL: A) dichloromethane fraction (DCMt-F), B) fraction C1F1, C) fraction C1F2, D) fraction C1F4, and E) fraction C1F6.

methyl esters as well as quercetin were responsible for anthelmintic effect of this organic fraction (DCMt-F, 0.62 mg/mL, EHI 100%,  $LC_{50}=60$  and  $LC_{90}=130$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively). Pharmacological analysis of these compounds: caffeic acid (**1**), *p*-coumaric acid (**2**) and ferulic acid (**3**), methyl caffeate (**4**), methyl-*p*-coumarate (**5**), methylferulate (**6**) and quercetin (**7**) indicated that in general, the hydroxycinnamic derivatives were more active than quercetin. On the other hand, the carboxylic free compounds (**1**, **2**, **3**) displayed a higher nematocidal effect than those methyl ester derivatives (**4**, **5**, **6**). All compounds tested at 0.39–1 mg/mL displayed ovicidal activity in the range of 67.25–100% in the *H. contortus* egg hatching inhibition. Even though these compounds displayed a high level of bioactivity, none of them (evaluated at 1 mg/mL) produced a better anthelmintic effect than fractions which they were obtained (DCMt-F and DCMt-P, 1 mg/mL). This observation allows to suppose that there may be an additive

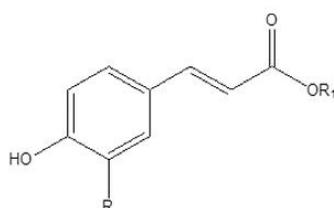
biological effect of each hydroxycinnamic compound. Despite the evidence of several plants from *Acacia* genus have shown anthelmintic activity in vitro and in vivo, these effects were lower than those produced by commercial drugs (Kahiya et al., 2003; Minho et al., 2008). *A. cochliacantha* produced a reduction of *H. contortus* eggs in goats previously feed with foliage of this legume (León-Castro et al., 2015). This finding is relevant because the identification of the chemical structure of the anthelmintic compounds allow to propose the use of a standardized extract of *A. cochliacantha* (more practical than isolated polyphenols) as adjuvant in the control of parasites in ruminants. Although there is no information about the mechanism of action of these compounds or the damage that each exerts on the egg hatching process, when *H. contortus* eggs were exposed to the most active fractions, these treatments produced damage to the egg affecting the embryo and larva development process (Fig. 4). In this study caffeic

**Table 2**

Results of the *Haemonchus contortus* egg hatching inhibition test using *Acacia cochliacantha* dichloromethanolic sub-fractions and precipitate, major identified compounds.

Evaluated fractions (1 mg/mL)	Major identified compounds (retention time, min)	% EHI
C1F1	Caffeic acid ( <b>1</b> ; 9.36)	98.25 <sup>a</sup>
C1F2	<i>p</i> -coumaric acid, Ferulic acid ( <b>2,3</b> ; 10.1, 10.7)	97.00 <sup>a</sup>
C1F3	Methyl caffeate ( <b>4</b> ; 11.52)	88.25 <sup>b</sup>
C1F4	Methyl- <i>p</i> -coumarate ( <b>5</b> ; 13.6)	88.25 <sup>b</sup>
C1F5	Methylferulate ( <b>6</b> ; 14.6)	71.5 <sup>c</sup>
C1F6	Quercetin ( <b>6</b> , 14.6, 15.5)	94.00 <sup>ab</sup>
C2F1	Flavonoids	5.25 <sup>d</sup>
C2F2	flavonoids	6.25 <sup>d</sup>
C2F3	flavonoids	7.00 <sup>d</sup>
C2F4	<b>1, 2, 3, 4, 5, 6</b> (9.36, 10.1, 10.7, 11.52, 13.6, 14.6)	98 <sup>a</sup>
Methanol 4%	–	3.00 <sup>d</sup>

Means with different letters in the same column represent statistically differences  $P < 0.05$ .



R	R <sub>1</sub>
<b>1</b> OH	H
<b>2</b> H	H
<b>3</b> OH	H
<b>4</b> OH	CH <sub>3</sub>
<b>5</b> H	CH <sub>3</sub>
<b>6</b> OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

**Fig. 3.** Chemical structure of anthelmintic hydroxycinnamic derivatives from *A. cochliacantha* leaves.

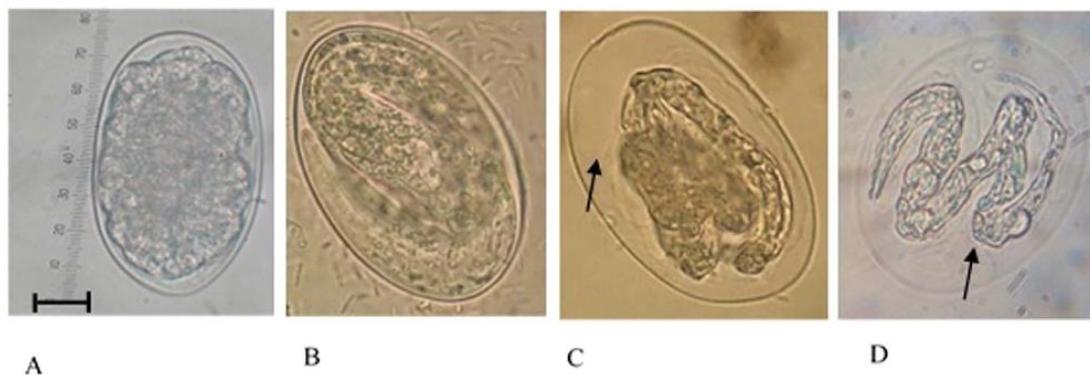
acid and methyl caffeate (fractions: C1F1, C1F3; Table 2) were the most active against eggs of *H. contortus*. These results are similar to those reported by von Son-de Fernex et al. (2015), who identified quercetin and caffeic acid from an aqueous extract of *Leucaena leucocephala*. The mixture of these compounds (85% of caffeic acid) showed a  $90.49\% \pm 2.85$  EHI on *Cooperia* spp eggs generating ultra-

structural damage of *Cooperia* spp eggs. On the other hand, fractions with high amounts of glycosyl flavonoids (Aq-F, Met-F, C2F1, C2F2 and C2F3) showed lowest ovicidal effect (7.0–20%, Tables 1 and 2) and less polar fraction C2F4 (constituted by compounds **1–6**) showed 97% and 88% EHI corroborating the ovicidal activity of these polyphenolic compounds. Therefore, the nematocidal activity against other exogenous and endogenous stages of *H. contortus* and other nematodes could be essential for use of this plant or its isolated compounds as antiparasitic agents. Up to now the anthelmintic effect of Fabaceae species (*Onobrychis vicifolia*, *Acacia nilotica* and *Lysiloma acapulcensis*) has been related to the tannins content principally (Desrués et al., 2016; Paswan et al., 2016; García-Hernández et al., 2017) or a mixture of quercetin and caffeic acid in *Leucaena leucocephala* (von Son-de Fernex et al., 2015). Recently it was found that caffeic and *p*-coumaric acids found in *Ipomea batatas* were responsible for the antioxidant and anti-carcinogenic activities (Nasr et al., 2015; Peng et al., 2015; Zhang et al., 2016). On the other hand, a synergic anthelmintic effect (*H. contortus* larvae exsheathment inhibition) between a mixture of tannins when commercial flavonoids (luteolin and quercetin) were added (Klongsiriwet et al., 2015). Although the tannins have been considered as responsible for this nematocidal activity (Williams et al., 2014; Saric et al., 2015; García-Hernández et al., 2017), this is the first time that hydroxycinnamic derivatives group (caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, methyl caffeate, methylcoumarate and methyl ferulate) are described as anthelmintics from *A. cochliacantha*.

## 5. Conclusions

The results of this work show an anthelmintic that a hydroalcoholic extract of *A. cochliacantha* leaves contains compounds with high in vitro ovicidal activity against *H. contortus*. The bio-guided separation demonstrated that the organic fraction (AcOEt-F, 1 mg/mL) had higher activity than the aqueous soluble compounds. Selective extraction of the less polar compounds with dichloromethane produced the highest bioactive mixture (DCMt-F, 1 mg/mL). The main constituents in this fraction were caffeoyl and coumaroyl derivatives as well as quercetin. All isolated compounds from this mixture, exhibited a high level of nematocidal activity. Studies focused on identifying potential anthelmintic compounds from plants used to feed small ruminants can generate new ecologically friendly alternatives for the control of livestock parasitic nematodes.

This chemical identification of the anthelmintic compounds from *A. cochliacantha* leaves, will allow to obtain standardized extracts useful in the developing of new veterinary (fodder, dried extracts, fractions or isolated compounds) or pharmacological treatments for the control of helminthiasis.



**Fig. 4.** Images taken through an optical microscope showing *Haemonchus contortus* eggs (40 $\times$ ): A) morulated egg; B). embryonated egg (control), C and D) *H. contortus* eggs after exposure to a *Acacia cochliacantha* DCMt-F fraction. Bar scale (40  $\mu$ M).

## Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgements

This work was supported by the Universidad Autónoma del Estado de México (Project UAEM 1026/2014RIFC) and Red Temática de Fitoquímicos, CONACYT (Project number 271520, 2016). Our gratitude also goes to CONACYT and Fundación IMSS, A.C. for the grants received by Gaston Federico Castillo-Mitre and Alejandro Zamilpa, respectively.

## References

- Akkari, H., Darghouth, Salem, H.B., 2008. Preliminary investigations of the anti-nematode activity of *Acacia cyanophylla* Lindl; Excretion of gastrointestinal nematode eggs in lambs browsing *A. cyanophylla* with and without PEG or grazing native grass. *Small Ruminant Res.* 74, 78–83.
- Argüeta, V.A., Cano, A.L.M., Radoarte, M.E., 1994. Atlas de plantas de la medicina tradicional mexicana. México, D.F., p. 552.
- Arosemena, N.A.E., Bevilacqua, C.M.L., Girão, M.D., Melo, A.C.F.L., 1999. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. *Rev. Med. Vet.* 150, 873–876.
- Bañuelos, F.N., 1999. Medicina Doméstica Mayo: de plantas, mujeres y salud. CIAD, A.C. Press, Hermosillo, Sonora, Mexico.
- Costa-Júnior, L.M., Costa, J.S., Lôvo, I.C.P.D., Soares, A.M.S., Abdala, A.L., Chares, D.P., Batista, Z.S., Louvandini, H., 2014. Long-term effects of drenches with condensed tannins from *Acacia mearnsii* on goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 205, 725–729.
- Crook, E.K., O'Brien, D.J., Howell, S.B., Storey, B.E., Whitley, N.C., Burke, J.M., Kaplan, R.M., 2016. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the mid-Atlantic region and comparison of *in vivo* and *in vitro* detection methods. *Small Ruminant Res.* 143, 89–96.
- Desrués, O., Peña-Espinoza, M., Hansen, V.A.T., Enemark, L.H., Thamsborg, M.S., 2016. Anti-parasitic activity of pelleted sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) against *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Parasit. Vectors* 9, 329. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1617-z>.
- García-Hernández, C., Arece-García, J., Rojo-Rubio, R., Mendoza-Martínez, G.D., Albarrán-Portillo, B., Vázquez-Armijo, J.F., Avendaño-Reyes, L., Olmedo-Juárez, A., Marie-Magdeleine, C., López-Leyva, Y., 2017. Nutraecutic effect of free condensed tannins of *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) benth on parasite infection and performance of Pelibuey sheep. *Trop. Anim. Health Prod.* 49, 55–61.
- Hammond, J.A., Fieding, D., Bishop, S.C., 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res. Commun.* 2, 213–228.
- Hatfield, R., Ralph, J., Grabber, J.H., 2008. A potential role for sinapyl *p*-coumarate as a radical transfer mechanism in grass lignin formation. *Planta*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-008-0791-4>.
- Jackson, F., Varaday, M., Bartley, D.J., 2012. Managing anthelmintic resistance in goats – can we learn lessons from sheep? *Small Ruminant Res.* 103, 3–9.
- Jazly, L., Gangan, V.D., Chakraborty, C.T., Tamahankar, A.V., Kadam, J.J., Bhalekar, S.M., 2013. Methyl caffeate ether derivatives as future potential drug. *J. Chem. Biol. Phys. Sci.* 4, 139–146.
- Kahiya, C., Mukaratirwa, S., Thamsborg, S.M., 2003. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet. Parasitol.* 115, 265–274.
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70–78.
- 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. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 5, 17–134.
- Learmount, J., Stephens, N., Boughtflower, V., Barrecheuren, A., 2016. The development of anthelmintic resistance with best practice control of nematodes on commercial sheep farms in the UK. *Vet. Parasitol.* 229, 9–14.
- León-Castro, Y., Olivares-Pérez, J., Rojas-Hernández, S., Villa-Mancera, A., Valencia-Almazán, M.T., Hernández-Castro, E., Córdova-Izquierdo, A., Jiménez-Gillén, R., 2015. Effect of three fodders tree on *Haemonchus contortus* control and weight variations in kids. *Eco. Rec. Agro.* 2, 193–201.
- Manríquez-Torres, J.J., Zuñiga-Estrada, A., González-Ledezma, M., Torres-Valencia, J.M., 2007. The antibacterial metabolites and proacacipetalin from *Acacia cochliacantha*. *J. Mex. Chem. Soc.* 51, 228–231.
- Minho, A.P., Bueno, I.C.S., Louvandini, H., Jackson, F., Gennari, S.M., Abdalla, A.L., 2008. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 172–181.
- Nasr, N.B., Kilani, S.J., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., Luis, J., 2015. The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* 766, 99–105.
- Olivares-Pérez, J., Aviles-Nova, F., Albarrán-Portillo, B., Catelan-Ortega, O., Rojas-Hernández, S., 2013. Nutritional quality of *Pithecellobium dulce* and *Acacia cochliacantha* fruits, and its evaluation in goats. *Livest. Prod. Sci.* 154, 74–81.
- Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Arece, G.J., Mohamed, A.Z.S., Kholif, E.A., Morales, A.E., 2014. *In vitro* of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Ital. J. Anim. Sci.* 13, 303–307.
- Paswan, J.K., Kumar, K., Kumar, S., Chandramoni, Kumar, A., Kumar, D., Kumar, A., 2016. Effect of feeding *Acacia nilotica* pod meal on hematobiochemical profile and fecal egg count in goats. *Vet. World* 9 (12), 1400–1406.
- Peng, Wei, Wu, Jian-Guo, Jiang, Yun-Bin, Liu, Yu-Jie, Sun, Tao, Wu, Na, Wu, Chun-Jie, 2015. Antitumor activity of 4-O-(2'-O-acetyl-6''-p-coumaroyl-β-D-glucopyranosyl)-p-coumaric acid against lung cancers via mitochondrial-mediated apoptosis. *Chem. Biol. Interact.* 233, 8–13.
- Rudd, V.E., 1966. *Acacia cochliacantha* or *Acacia cymbispina* in Mexico 10. Leaflets of Western Botany, Howell J.T., 257–262.
- Saric, T., Rogosic, J., Zupan, I., Beck, R., Sikic, Z., Skobic, D., Tkalcic, S., 2015. Anthelmintic effect of three tannin-rich Mediterranean shrubs in naturally infected sheep. *Small Ruminant Res.* 123, 179–182.
- SAS Institute, 2006. SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, N.C. USA, 956.
- Sibaja-Hernández, R., Román-Guerrero, A., Sepúlveda-Jiménez, G., Rodríguez-Monroy, M., 2015. Physicochemical, shear flow behaviour and emulsifying properties of *Acacia cochliacantha* and *Acacia farnesiana* gums. *Ind. Crop. Prod.* 67, 161–168.
- von Son-de Fernex, E., Alonso, D.M.A., Valles, M.B., Capetillo, L.C.M., 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Exp. Parasitol.* 131, 413–418.
- von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M.A., Mendoza-de-Gives, P., Valles-de la Mora, B., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Castillo-Gallegos, E., 2015. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Vet. Parasitol.* 214, 89–95.
- Wagner, H., Bladt, S., 2001. *Plant Drug Analysis* 2nd ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Waller, P.J., 1997. Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 72, 391–412.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M., 2004. Nematode control in green ruminant production systems. *Trends Parasitol.* 20, 493–497.
- Williams, A.R., Ropiak, H.M., Frygas, C., Desrués, O., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., 2014. Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasitol. Vectors* 7, 518–527.
- Yetman, D., Van Devender, T.R., 2002. Mayo Ethnobotany: Land, History, and Traditional Knowledge in Northwest Mexico. University of California Press, Oakland, California, United States of America, 257–262.
- Zhang, Lu, Tu, Zong-cai, Yuan, Tao, Wang, Hui, Xie, Xing, Fu, Zhi-feng, 2016. Antioxidants and α-glucosidase inhibitors from *Ipomea batatas* leaves identified by bioassay-guided approach and structure-activity relationships. *Food Chem.* 208, 61–67.
- Znati, M., Jannet, H.B., Cazaux, S., Souchard, J.P., Skhiri, F.H., Bouajila, J., 2014. Antioxidant, 5-lipoxygenase inhibitory and cytotoxic activities of compounds isolated from the *Ferula lutea* flowers. *Molecules* 19, 16959–16975.

**CAPÍTULO 6. El consumo de hojas de Acacia cochliacantha reduce la eliminación de huevos de *Haemonchus contortus* en heces de cabritos Boer.**

RV: [RMCP] Envío recibido

---

De: OLMEDO JUAREZ AGUSTIN (olmedo.agustin@inifap.gob.mx)

Para: dr\_rojo70@yahoo.com.mx; mitre71@yahoo.com

Fecha: domingo, octubre 28, 2018 11:55 AM CST

---

---

De: MVZ. Arturo García Fraustro <[cienciaspecuarias@inifap.gob.mx](mailto:cienciaspecuarias@inifap.gob.mx)>

Enviado: domingo, 28 de octubre de 2018 11:54 a. m.

Para: OLMEDO JUAREZ AGUSTIN

Asunto: [RMCP] Envío recibido

AGUSTÍN OLMEDO-JUÁREZ:

Hemos recibido y agradecemos el envío de su manuscrito: "El consumo de hojas de Acacia cochliacantha reduce la eliminación de huevos de *Haemonchus contortus* en heces de cabritos Boer" a la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. A través del sistema de gestión de revistas online usted podrá seguir su progreso del proceso editorial identificándose en el sitio web de la revista:

URL del manuscrito:

<http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/author/submission/5131> Nombre de usuario/o: aolmedoj

Si tiene cualquier pregunta no dude en contactar con nosotros/as a [cienciaspecuarias@inifap.gob.mx](mailto:cienciaspecuarias@inifap.gob.mx). Gracias por tener en cuenta nuestra revista para difundir su trabajo.

MVZ. Arturo García Fraustro

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias

---

Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias  
<http://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/>

**El consumo de hojas de *Acacia cochliacantha* reduce la eliminación de huevos de *Haemonchus contortus* en heces de cabritos Boer**  
**Consumption of *Acacia cochliacantha* leaves reduce elimination of *Haemonchus contortus* eggs in faeces of Boer kids**

**RESUMEN**

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación de hojas de *Acacia cochliacantha* en una dieta de mantenimiento para cabritos de la raza Boer sobre la tasa de eliminación de huevos de *Haemonchus contortus*, consumo de agua y materia seca. Diez cabritos recién destetados ( $16.850 \pm 1.630$  kg de peso vivo inicial y 3 meses de edad), fueron infectados con larvas infectantes (L3) de *H. contortus* (350 L3 por kilogramo de peso vivo). Se establecieron dos tratamientos: T1: control (animales infectados con larvas L3 de *H. contortus* y sin suplementación con hojas de *A. cochliacantha*) y T2: animales infectados con larvas L3 de *H. contortus* y suplementados con 5% hojas de *A. cochliacantha* en la dieta. Los animales previamente fueron bloqueados de acuerdo a la eliminación de huevos por gramo de heces (HPG) y asignados aleatoriamente a uno de los dos tratamientos descritos previamente. Las variables medidas fueron HPG, consumo de agua y MS. Los resultados encontrados demostraron reducción ( $p < 0.05$ ) en la eliminación de huevos de *H. contortus* en los cabritos que consumieron las hojas de *A. cochliacantha*, el consumo de agua y materia seca fue similar en toda la fase experimental. Se concluye que la adición de hojas de *A. cochliacantha* en dietas para cabritos tienen actividad antihelmíntica, lo cual esta leguminosa arbórea podría representar una opción para integrarla en la alimentación de cabritos Boer bajo un enfoque nutracéutico.

**Palabras clave.** Cabritos, antihelmíntico, *Acacia cochliacantha*, *Haemonchus contortus*.

**ABSTRACT**

The aim of this study was to assay the effect of *A. cochliacantha* supplementation of a maintenance diet for Boer goats kids on the *Haemonchus contortus* eggs elimination and the dry matter intake. Ten kids of the three months of age, and  $16.850 \pm 1.630$  kg of bodyweight (BW) were orally infected with *H. contortus* infective larvae (L3, 350 L3 per kg/BW). Two treatments were established as follow: T1: Control (animals infected with *H. contortus* L3 and without supplementation of *A. cochliacantha* leaves); T2: Animals infected with *H. contortus* and supplemented with 5% of *A. cochliacantha* leaves. The goats previously were randomized and grouped according their parasite egg elimination per gram of faeces (EPG). The response variables were the EPG, water consumption and dry matter intake (DMI). The results found in the present study showed a clear evidence in the *H. contortus* eggs elimination in the group of animals that consumed the *A. cochliacantha* leaves, indicating a statistical difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ). Water consumption and DMI values were similar between two diets in all experimental phase. It concluded that the addition of *A. cochliacantha* leaves in diets to goat kids contain anthelmintic effect, which this arboreal leguminous could be an option in the feeding of goats under a nutraceutical approach.

**Keywords:** Goat kids, anthelmintic, *Acacia cochliacantha*, *Haemonchus contortus*.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por los parásitos gastrointestinales representan un problema a nivel mundial, ya que afecta la producción de pequeños rumiantes. Los nematodos gastrointestinales (NGI) son uno de los principales parásitos que ocasionan las mayores pérdidas económicas en la industria ganadera, en México se estiman pérdidas de \$445.1 millones de dólares atribuidas a los NGI de ganado <sup>(1)</sup>. *Haemonchus contortus* es uno de los principales parásitos prevalentes en ovinos y caprinos de todo el mundo, sobre todo en regiones cálidas y húmedas. Este parásito es el gusano intestinal más frecuente y dañino, causante de las principales pérdidas económicas para los productores <sup>(2,3)</sup>. En las últimas décadas, derivado al uso indiscriminado de antiparasitarios para el control de nematodos gastrointestinales (NGI's), ha ocasionado resistencia antihelmíntica; aunado al efecto residual que tienen algunos fármacos en el organismo y medio ambiente <sup>(4,5)</sup>. Esta situación ha motivado a expertos parasitólogos a buscar alternativas de control para minimizar el uso indiscriminado de fármacos antihelmínticos en pequeños rumiantes. Las investigaciones realizadas al respecto han sido encaminadas al estudio de los metabolitos secundarios de algunas leguminosas arbóreas las cuales tienen propiedades antihelmínticas <sup>(6-9)</sup>. Las plantas tienen la capacidad de producir diferentes sustancias derivadas del metabolismo secundario, mismas que son utilizadas como defensa contra algunos agentes fito-patógenos. Dentro de dichos compuestos se tienen a los taninos condensados, terpenos, saponinas y flavonoides <sup>(10)</sup>. Algunos trabajos de investigación han demostrado que los flavonoides presentan actividad nematocida y que en conjunto con otros compuestos (taninos), tienen un sinergismo que potencializa su efecto contra nematodos gastrointestinales <sup>(11,12)</sup>. *Acacia cochliacantha* es una leguminosa comúnmente conocida como "cubata" que se ha utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales <sup>(13)</sup>. Diversos trabajos han reportado actividad nematocida *in vitro* a partir de extractos de sus hojas <sup>(8, 12)</sup>, inclusive compuestos fenólicos tales como taninos, quercertina, ácido cafeico, cumarico y ferulico se han aislados de esta leguminosa y son los responsables de la actividad nematocida <sup>(12)</sup>. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de hojas de *A. cochliacantha* en la dieta de cabritos Boer en crecimiento infectados con *H. contortus*, así como el consumo de agua y materia seca.

## Material y métodos

### Zona de estudio.

El presente trabajo fue desarrollado en la unidad experimental de pequeños rumiantes del Centro Universitario UAEM Temascaltepec, este lugar presenta una altura media sobre el nivel del mar de 1740 m, con un clima del tipo cálido sub-húmedo con lluvias en verano (Aw) <sup>(14)</sup>.

### Material vegetal

Se recolectaron hojas frescas de *Acacia cochliacantha* en la localidad de El Salitre Palmarillos, municipio de Amatepec, Estado de México, México (18 ° 43'28.4 " N, 100 ° 17'03.5 " W). El material vegetativo fue colectado de marzo a abril de 2016, durante las primeras horas de la mañana, las hojas fueron depositadas en una hielera para evitar cambios en su estructura química por efectos de fotooxidación, posteriormente fue transportada a los laboratorios de nutrición animal del Centro Universitario UAEM Temascaltepec, donde se seleccionó un ejemplar para su identificación en el Herbario Nacional de México de la Universidad Nacional Autónoma de México el material vegetal

fue identificado por el Prof. Rafael Torres-Colin y depositado en el Herbario Nacional bajo el código de colecta OD07042016. La planta fresca fue secada a temperatura ambiente bajo la sombra durante dos semanas, posteriormente el material vegetal se molió en un molino eléctrico Wiley Mod. TS3375E15 para reducir el tamaño de la partícula entre 4 y 6 mm.

### **Análisis químico de dietas experimentales y de *Acacia cochliacantha***

Se realizó análisis bromatológico de las dietas experimentales, así como para las hojas de *A. cochliacantha* mediante los siguientes métodos: Materia seca (MS), Materia orgánica (MO), Proteína cruda (PC), Extracto etéreo (EE)<sup>(15)</sup>, Fibra detergente neutro (FDN) y Fibra detergente ácido (FDA) se determinaron de acuerdo a la técnica descrita por Van Soest *et al.*<sup>(16)</sup> para los tratamientos. Para poder determinar el nivel de inclusión de hojas de *Acacia cochliacantha* de determinaron los taninos condensados totales (TCT), de acuerdo a la técnica descrita por Terrill *et al.*<sup>(17)</sup>, modificada por López *et al.*<sup>(18)</sup>, los taninos condensados ligados a proteína y a fibra se determinaron utilizando el método de Porter *et al.*<sup>(19)</sup> con las modificaciones realizadas por Hagerman<sup>(20)</sup>.

### **Material biológico**

Se obtuvieron larvas infectantes de *Haemonchus contortus* (L3, cepa INIFAP) a partir de un ovino donador [22.3 kg de peso vivo (PV)] infectado con una dosis oral única de 350 L3 por kg de PV. El cordero fue cuidado acorde a la norma de cuidado y bien estar animal (NOM-062-ZOO-1999). Las larvas infectantes de *H. contortus* fueron obtenidas a partir de cultivos mediante la técnica de Baermann<sup>(21)</sup>.

### **Animales experimentales**

Se utilizaron catorce cabritos machos de la raza Boer ( $16.850 \pm 1.6$  kg PV, 3 meses de edad) procedentes del rancho el Salitre, perteneciente al Centro Universitario UAEM Temascaltepec. Todos los animales fueron desparasitados con ivermectina comercial a una dosis única de 0.22 mg/kg PV, antes de iniciar el experimento para eliminar cualquier infección natural de nematodos gastrointestinales (NGI). Después de aplicar el antiparasitario, los cabritos fueron separados por 15 días en un corral equipado con sombra, comederos y bebederos. Pasado ese periodo, se corroboró que los animales estuvieran negativos a infección de NGI mediante la técnica de McMaster<sup>(22)</sup> y al día 16 se inocularon de forma individual con una dosis única de 350 L<sub>3</sub> por Kg de PV de *H. contortus* (cepa INIFAP). Una vez que los cabritos fueron diagnosticados como positivos a la presencia de huevos de *H. contortus* (día 30), se agruparon en dos grupos (n=7) acorde a su eliminación de huevos por gramo de heces (HPG) y a su peso corporal. Previo a la infección, los animales recibieron una dieta de adaptación sin hojas de *A. cochliacantha* (Cuadro 1). Las dietas fueron balanceadas basándose a los requerimientos para cabritos en crecimiento mediante las tablas del NRC del 2007 para pequeños rumiantes<sup>(23)</sup>.

### **Diseño experimental**

Durante el desarrollo del experimento y debido a que los cabritos estaban bajo un estrés pos destete, se puso en peligro la vida de cuatro de ellos ya que los valores de volumen celular aglomerado (VCA) eran muy bajos lo que nos indica un estado grave de anemia de los animales y los conteos fecales de huevos eran demasiados altos (HPG > 12500), por lo que fue necesario sacar

del experimento a 4 cabritos quedando solo 10 de ellos los cuales fueron asignados a los dos tratamientos previamente establecidos. Se establecieron dos tratamientos: T1: control (animales infectados con larvas L3 de *H. contortus* y sin suplementación con hojas de *A. cochliacantha*) y T2: animales infectados con larvas L3 de *H. contortus* y suplementados con 5% hojas de *A. cochliacantha*. Las variables medidas fueron el HPG, consumo de materia seca y cambio de peso vivo. Semanalmente se realizaron muestreos de heces directamente del recto del animal. El material fecal fue procesado para estimar el HPG a través de la técnica de McMaster <sup>(22)</sup>. Por otra se estimó el consumo de agua y materia seca de cada animal con la finalidad de monitorear algún posible cambio de comportamiento de rechazo del alimento atribuido al nivel de inclusión de *A. cochliacantha*. La eficacia antiparasitaria fue estimada mediante la fórmula de Abbott:  
*Eficacia (reducción de HPG, %)= [(HPG del grupo control – HPG de grupo tratado) / HPG del grupo control]\*100*

### **Análisis estadístico**

Todos los datos colectados fueron procesados mediante análisis de varianza utilizando el procedimiento GLM del SAS <sup>(24)</sup>. Bajo un diseño completamente al azar y las medias fueron separadas mediante la prueba PDIFF, STDERR statement). La significancia fue declarada a un nivel de  $p \leq 0.05$  y la tendencia de  $0.05 < p \leq 0.10$  <sup>(25)</sup>.

### **Resultados**

#### **Análisis químico de dietas experimentales y de *Acacia cochliacantha***

Los resultados de la composición química de las dietas experimentales, así como el contenido de taninos en las hojas de *A. cochliacantha* son mostrados en el cuadro 1 y 2.

#### **Conteo fecal de huevos**

Los resultados del HPG y porcentaje de eficacia de la dieta que contenía hojas deshidratadas de *A. cochliacantha* son mostrados en el cuadro 3. El porcentaje de reducción causado por esta leguminosa estuvo en intervalos de 32.8-70.8 a partir del día 14 al 28 respectivamente.

#### **Consumo de agua y materia seca**

Los resultados del consumo de agua y materia seca correspondiente a los dos tratamientos son mostrados en el cuadro 4. Tanto el consumo de agua y de materia seca no se observó un efecto negativo ( $P > 0.05$ ) en los cabritos que recibieron la dieta adicionada con hojas de *A. cochliacantha* respecto a la dieta control.

### **Discusión**

El presente estudio mostró efecto antiparasitario atribuido al consumo de hojas de *A. cochliacantha* en los cabritos, de tal forma que el que el consumo prolongado de esta leguminosa tiene beneficios sobre la salud de los animales. Recientemente esta leguminosa fue evaluada contra parásitos gastrointestinales de bovinos y ovinos bajo condiciones *in vitro*, y se encontraron resultados positivos <sup>(8,12)</sup>. En esos trabajos se demostró la actividad ovicida y larvicida en contra de diferentes NGI, entre ellos a *Haemonchus contortus*. En este contexto, el presente trabajo corrobora el efecto antiparasitario *in vivo* contra este parásito de importancia en la salud de los pequeños rumiantes. Existen algunos estudios *in vivo* con otras leguminosas arbustivas y arbóreas que han demostrado su efecto nutracéutico y antiparasitario en ovinos alimentados con diferentes niveles de hoja; por

ejemplo, se ha reportado que la administración de hojas deshidratadas de *Lysiloma acapulcensis* reducen hasta un 67.7% de huevos de NGI <sup>(9)</sup>. En otro trabajo realizado en Brasil se reportan reducciones cercanas al 70% al suministrar hojas de *Mimosa caesalpinifolia* en ovinos infectados con *H. contortus* <sup>(26)</sup>. Es conocido que las leguminosas arbóreas representan una fuente importante de proteína y materia seca para la alimentación del ganado que se encuentra en condiciones de pastoreo <sup>(27)</sup>. Existen diversas investigaciones que han demostrado el aporte nutricional de algunas leguminosas arbustivas, indicando que los animales que las ingieren de forma natural, tienen la capacidad de consumir las cantidades que requieran según su necesidad; por ejemplo, en un trabajo realizado por Méndez-Ortíz et al. <sup>(28)</sup> observaron que ovinos infectados por *H. contortus* consumían mayor cantidad de una leguminosa arbórea rica en metabolitos secundarios (*Havardia albicans*). Sin embargo, si este tipo de leguminosas son suministradas en las dietas de los animales pueden tener efectos positivos o negativos sobre el consumo voluntario, dependiendo por ejemplo de su cantidad de taninos condensados por gramo de materia seca <sup>(29)</sup>. En el presente estudio no se observaron efectos negativos en el consumo de agua y materia seca en los animales que estuvieron consumiendo la dieta adicionada con hojas de *A. cochliacantha*, lo cual demostró que la ingesta de taninos condensados totales no fueron suficientes para deprimir el consumo de materia seca, esto porque, estudios previos reportan que cuando la dieta contienen altos niveles de compuestos secundarios y de manera particular taninos condensados libres superiores a los 50 g kg<sup>-1</sup> de MS, se podría inhibir la actividad microbiana afectando la digestibilidad de la fracción potencialmente digestible de los nutrientes y por consecuencia deprimir el consumo de materia seca al aumentar el tiempo medio de retención en el rumen <sup>(30)</sup>. Aunque este fenómeno podría tener un efecto positivo en el metabolismo de los compuestos nitrogenados al disminuir la proteólisis ruminal, lo que derivaría en un aumento de la proteína de sobrepaso e incrementar el flujo de aminoácidos a duodeno aumentando el pool de proteína metabolizable para fines productivos en los animales <sup>(31)</sup>. Los resultados del análisis en taninos condensados presentes en *A. cochliacantha*, (Cuadro 2) revelaron que es una planta que podría tener efectos como los explicados anteriormente ya que tiene 20.2% de taninos condensados totales y 14.0 % de taninos condensados libres (TCL), los cuales son los compuestos bioactivos y pueden secuestrar a los carbohidratos y proteínas de la dieta. Sin embargo, debido a que sólo se incluyó el 5% de las hojas de *A. cochliacantha* en la dieta total el consumo de taninos condensados totales (TCT) fue el 5.70 g y de estos solo sólo 3.9 g fueron de TCL, concentración que no fue suficiente para deprimir el consumo de materia seca en los animales que se les incluyó la *A. cochliacantha* en su dieta. Estos resultados están relacionados con un estudio realizado por León-Castro et al. <sup>(32)</sup> donde reportaron importantes reducciones de HPG de *H. contortus* en cabritos infectados de forma artificial que estuvieron alimentados con un 10% de inclusión de follaje de *A. cochliacantha* sin observar efectos negativos en la salud de los animales. No obstante, futuros estudios serán considerados como la dosis respuesta sobre el consumo, digestibilidad de la materia seca y orgánica de dietas basales con diferentes niveles de hojas de *A. cochliacantha*. Se conoce que las plantas ricas en metabolitos secundarios como los taninos contienen propiedades nutraceuticas <sup>(7)</sup> y en muchos trabajos de nutrición animal se ha comprobado que los taninos son los poli-fenoles responsables de mejorar el valor nutricional de las dietas para el ganado. Del mismo modo se ha reportado que extractos de plantas ricas en taninos pueden contener propiedades antiparasitarias <sup>(32-35)</sup>. Sin embargo, pese a que *A. cochliacantha* contiene altas cantidades de taninos condensados se podría inferir que estos compuestos son los probables responsables de la actividad antiparasitaria; no obstante Castillo-Mitre et al. <sup>(12)</sup>, reportaron que los compuestos responsables de la actividad fueron derivados del ácido hidroxicinámico (ácido cafeico, cumarico, ferulico y metil cafeatos). Por lo tanto, la actividad antiparasitaria de esta leguminosa podría deberse a estos compuestos y los taninos podrían colaborar de forma secundaria sobre el control de *H. contortus* mediante la protección de proteína de la dieta a los

microorganismos del rumen. En este sentido, los resultados del presente trabajo (*in vivo*) y los de otros estudios *in vitro* <sup>(12)</sup> con *A. cochliacantha* podrían ser importantes para realizar futuros estudios sobre sus propiedades nutraceuticas en pequeños rumiantes.

### Conclusiones

Los resultados del presente trabajo muestran que *Acacia cochliacantha* contiene propiedades antiparasitarias y puede ser una fuente de alimento importante para cabritos infectados con NGI, ya que no se deprime el consumo de agua y alimento.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses

### Agradecimientos

Parte de este trabajo fue financiado por INIFAP (proyecto SIGI 8215734475) y la Universidad Autónoma del Estado de México (Proyecto UAEM 4585/2018/CIP) y la Red Temática de Fermoquímicos, CONACYT (Proyecto número 294727, 2018). Este estudio fue parte de tesis doctoral de Gastón Federico Castillo-Mitre bajo la dirección del Dr. Rolando Rojo-Rubio y el Dr. Agustín Olmedo-Juárez.

### Literatura citada.

1. Rodríguez-Vivas RI, Grisi L, Pérez-de León AA, Silva-Villela H, Torres-Acosta JFJ, Fragoso-Sánchez H., *et al.* Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos del ganado bovino en México. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu* 2017; 8(1):61-74.
2. Marume U, Chimonyo M, Dzama K. A preliminary study on the responses to experimental *Haemonchus contortus* infection in indigenous goat genotypes. *Small Rumin Res* 2011; 95: 70–74.
3. Githiori J, Athanasiadou S, Thamsbprg S. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminthes in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol* 2006; 139:308-320.
4. Jackson F, Coop RL. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitol* 2000; 120, 95-107.
5. Tsiboukis D, Sazakli E, Jelastopulu E, Leotsinidis M. Anthelmintics residues in raw milk. Assessing intake by a children population. *Pol J Vet Sci* 2013; 16:85-91.
6. Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, Arece-García J, Mohamed AZS, Kholif EA, Morales AE. *In vitro* of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Ital J Anim Sci* 2014; 13:303-307.
7. García-Hernández C, Arece-García J, Rojo-Rubio R, Mendoza-Martínez GD, Albarrán-Portillo B, Vázquez-Armijo JF, *et al.* Nutraceutic effect of free condensed tannins of *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) Benth on parasite infection and performance of Pelibuey sheep. *Trop Anim Health Prod* 2017; 49:55-61.
8. Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, Zamilpa A, Mendoza-de Gives P, Arece-García J, López-Arellano ME, *et al.* *In vitro* larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. *Vet Res Commun* 2017; 41:227-232.
9. González-Cortazar M, Zamilpa A, López-Arellano ME, Aguilar-Marcelino L, Reyes-Guerrero DE, Olazarán-Jenkins S, *et al.* *Lysiloma acapulcensis* leaves contain anthelmintic metabolites that reduce the gastrointestinal nematode egg population in sheep faeces. *Comp Clin Pathol* 2018; 27:189-197.

10. Williams AR, Ropiak HM, Fryganas C, Desrues O, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM. Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasit Vectors* 2014; 7:518-527.
11. Klongsiriwet C, Quijada J, Williams AR, Mueller-Harvey I, Williamson EM, Hoste H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International J Parasitol Drugs Drug Resist* 2015; 5:17-134.
12. Castillo-Mitre GF, Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, Cortázar-González M, Mendoza-de Gives P, Hernández-Beteta EE, *et al.* Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *J Ethnopharmacol* 2017; 204:125-131.
13. Argueta VA, Cano ALM, Radoarte ME. Atlas de plantas de la medicina tradicional mexicana. México, D.F., 1994: 552 p.
14. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 1987: 246 p.
15. AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Official Methods of Analysis, 16th edition. AOAC, Arlington, VA, USA. 1997.
16. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991; 74:3583-3597.
17. Terrill TH, Rowan AM, Douglas GB, Barry TN. Determination of extractable and bound condensed tannins concentration in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J Sci Food Agric* 1992; 58:321-329.
18. López J, Tejada I, Vásquez C, Garza JD, Shimada A. Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their in vitro biological activity: part 1. *J Sci Food Agric* 2004; 84:291-294.
19. Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochem* 1986; 25:223-230.
20. Hagerman AE, Butler, LG. In *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites Volume I*. Academic Press: New York, 1991; pp. 355-388.
21. Mesquita JR, Mega C, Coelho C, Cruz R, Vala H, Esteves F, *et al.* ABC series on diagnostic parasitology part 3: The Baermann technique. *The Veterinary Nurse* 2017; 8:10. doi.org/10.12968/vetn.2017.8.10.558
22. Arece J, Mahieu M, Archimède H, Aumont G, Fernández M, González E, *et al.* Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. *Small Rumin Res* 2004; 5(1-2):61-67.
23. NRC. Nutrient requirements of small ruminants, sheep, goats, cervids, and new world camelids. The National Academy Press, Washington, DC, 2007.
24. SAS Institute SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, N.C., USA, 2006.
25. Steel RGD, Torrie JH *Bioestadística: Principios y procedimientos*. McGraw-Hill. México, 1980. pp 181-184.
26. Brito DRB, Costa-Júnior LM, Garcia JL, Torres-Acosta JFJ, Louvandini H, Cutrim-Júnior JAA, *et al.* Supplementation with dry *Mimosa caesalpiniiifolia* leaves can reduce the *Haemonchus contortus* worm burden of goats. *Vet Parasitol* 2018; 252:47-51.
27. Hoste H, Torres-Acosta JFF, Quijada J, Chan-Pérez I, Dakhel MM, Kommuru DS, *et al.* Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Adv Parasitol* 2016; 93:239-351.
28. Méndez-Ortíz FA, Sandoval-Castro CA, Torres-Acosta JFJ. Short term consumption of *Havardia albicans* tannin rich fodder by sheep: Effects on feed intake, diet digestibility and excretion of *Haemonchus contortus* eggs. *Anim Feed Sci Technol* 2012; 176:185-191.

29. Frutos P, Hervás G, Giráldez FJ, Mantecón AR. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span J Agric Res* 2004; 2:191–202.
30. Waghorn, G.C., McNabb, W.C. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc* 2003; 62: 383–392.
31. Barry T.N. Condensed tannins: their role in ruminant protein and carbohydrate digestion and possible effects upon the rumen ecosystem. In: Nolan, J.V., Leng, R.A., Demeyer, D.I. (Eds.), *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*. Pernambol Books, Armidale, NSW, Australia 1989; pp. 153–167.
32. León-Castro Y, Olivares-Pérez J, Rojas-Hernández S, Villa-Mancera A, Valencia-Almazán MT, Hernández-Castro E, *et al.* Effect of three fodders tree on *Haemonchus contortus* control and weight variations in kids. *Eco Rec Agro* 2015; 2:193–201.
33. Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitol* 2005; 131(4):531-538.
34. Brunet S, Hoste H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J Agric Food Chem* 2006; 54(20):7481-7487.
35. Quijada J, Frygas C, Ropiak HM, Ramsay A, Mueller-Harvey I, Hoste H. Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *J Agric Food Chem* 2015; 63(28): 6346-6354.

**Cuadro 1.** Dietas experimentales de mantenimiento utilizadas en la fase experimental en cabritos infectados con *Haemonchus contortus*

<i>Ingrediente</i>	<i>Tratamiento 1</i>	<i>Tratamiento 2</i>
	% INCLUSION	% INCLUSION
<i>Acacia cochliacantha</i>	0.00	5.00
<i>Heno de alfalfa</i>	33.00	28.00
<i>Maíz molido</i>	5.00	5.00
<i>Sorgo molido</i>	17.50	17.50
<i>Pasta de soya</i>	7.00	7.00
<i>Salvado de trigo</i>	10.00	10.00
<i>Paja de avena</i>	25.00	25.00
<i>Melaza</i>	0.00	0.00
<i>Premezcla Vit y Min</i>	2.50	2.50
<b>TOTALES</b>	100.00	100.00
<b>APORTE PC</b>	12.78	12.76
<b>APORTE EM (MJ/kg MS)<sup>1</sup></b>	2.84	2.83

<sup>1</sup> Calculado de acuerdo a los contenidos individuales de energía de cada alimento incluido en la dieta <sup>(23)</sup>

**Cuadro 2.** Resultados del análisis químico proximal de hojas deshidratadas de *Acacia cochliacantha* y su contenido de taninos

<b>Especie</b>	<b>MO</b>	<b>PC</b>	<b>FDN</b>	<b>FDA</b>	<b>TCL</b>	<b>TCP</b>	<b>TCF</b>	<b>TCT</b>
<b><i>Acacia cochliacantha</i></b>	937.0	163.0	698.6	581.7	140.0	26.0	36.0	202.0

***MO materia orgánica, PC proteína cruda, FDN fibra detergente neutro, FDA fibra detergente ácido, TCL taninos condensados libres, TCP taninos condensados ligados a proteína, TCF taninos condensados ligados a fibra***

1

2 **Cuadro 3.** Resultados del conteo fecal de huevos de *Haemonchus contortus* (HPG, media  $\pm$   
3 desviación estándar) y porcentaje de eficacia de la dieta adicionada con hojas de *Acacia*

Tratamientos		Días de muestreo				
		1	7	14	21	28
Control Negativo	HPG	1100 $\pm$ 120	3250 $\pm$ 735 <sup>b</sup>	2980 $\pm$ 345 <sup>a</sup>	5300 $\pm$ 435 <sup>a</sup>	6850 $\pm$ 1432.90 <sup>a</sup>
	%Eficacia	----	----	----	----	----
Hojas de A. <i>cochliacantha</i>	HPG	1100 $\pm$ 133	6850 $\pm$ 828 <sup>a</sup>	2000 $\pm$ 367 <sup>b</sup>	2050 $\pm$ 432 <sup>b</sup>	2000 $\pm$ 178 <sup>b</sup>
	%Eficacia	----	<b>-110.7</b>	<b>32.8</b>	<b>81.1</b>	<b>70.8</b>
Valor de P						
4	<i>cochliacantha</i> .					

5 (P<0.05); n=5

6

**Cuadro 4.** Resultados del consumo de agua y materia seca de los cabritos que recibieron las dietas experimentales con y sin hojas de *Acacia cochliacantha*

Tratam	Días de muestreo									
	1		7		14		21		28	
	Agua	MS	Agua	MS	Agua	MS	Agua	MS	Agua	MS
Control	1.7±0.3	436.3±47.6	1.6±0.1	530.0±80.4	1.8±0.1	650.4±173.2	1.7±0.08	647.7±206.7	1.8±0.2	651.5±211.0
Negativo										
Hojas de A. <i>cochliacantha</i>	1.6±0.3	448.7±100.0	1.5±0.4	559.7±141.3	1.8±0.5	625.0±216.6	1.7±0.4	745.1±272.5	1.7±0.4	694.5±194.2
Valor de P=	0.71	0.80	0.69	0.69	0.76	0.84	0.90	0.52	0.75	0.76

Agua (L), Consumo de materia seca (g)

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

La producción de metabolitos secundarios por parte de las plantas es un sistema complejo que depende de múltiples factores, tales como la familia a la que pertenece la planta, época del año y edad. Las plantas de la familia Leguminosae, por lo regular producen gran cantidad de metabolitos secundarios con propiedades medicinales (Olmedo-Juárez *et al.*, 2014; Sibaja-Hernández *et al.*, 2015). Además, estas leguminosas arbustivas y arbóreas han demostrado tener un efecto nutracéutico además de su efecto antiparasitario ya que representan una importante fuente de proteína y materia seca para la alimentación del ganado cuando se encuentran bajo un sistema extensivo de producción (Hoste *et al.*, 2016). Diversas investigaciones complementan la afirmación anterior, dejando de manifiesto la capacidad que tiene los animales de ingerir de forma natural las cantidades que requieran según su necesidad, por ejemplo, las investigaciones realizadas por Méndez *et al.*, (2012) quienes observaron que ovinos infectado con *H. contortus* consumían mayores cantidades de una leguminosa arbórea rica en metabolitos secundarios (*Havardia albicans*). Por otro lado, el poder antiparasitario que tiene algunas plantas de esta familia queda de manifiesto con los trabajos realizados por González *et al.*, (2018) quienes reportaron que la suplementación con hojas deshidratadas de *Lysiloma acapulcensis* en dietas de ovinos, reducen hasta un 67.7% de huevos de NGI. En otro trabajo realizado en Brasil se reportan reducciones cercanas al 70% al suministrar hojas de *Mimosa caesalpinifolia* en ovinos infectados con *H. contortus* (Brito *et al.*, 2018). Resultados similares fueron reportados por León-Castro *et al.*, (2015) al registrar una importante reducción en el conteo de huevos por gramo de heces (HPG) de *H. contortus* en cabritos infectados de forma artificial cuando se les suplemento con un 10% de inclusión de follaje de *A. cochliacantha*.

Frutos *et al.*, (2004) señalaron que suministrar este tipo de leguminosas en las dietas de los animales puede tener efectos tanto positivos como negativos sobre el consumo voluntarios, esto va a depender del contenido de taninos condensados totales por gramo de materia seca; en el experimento realizado en la presente investigación (*in vivo*) no se observaron efectos negativos en el consumo de agua ni de materia seca en los animales que se les suministro hojas de *A. cochliacantha* en su dieta, esto se debió a que sólo se incluyó el 5% de las hojas de *A. cochliacantha* en la dieta, en base a esto el consumo de taninos condensados totales (TCT) fue el 5.70 g y de estos solo sólo 3.9 g fueron de taninos condensados libres (TCL), concentración que no fue suficiente para deprimir el consumo de materia seca en los animales. Waghorn y McNabb, (2003), mencionaron que; cuando la dieta contienen altos niveles de compuestos secundarios y de manera particular taninos condensados libres superiores a los 50 g kg<sup>-1</sup> de MS, se podría inhibir la actividad microbiana afectando la digestibilidad de la fracción potencialmente digestible de los nutrientes y por consecuencia deprimir el consumo de materia seca al aumentar el tiempo medio de retención en el rumen, sin embargo, este fenómeno podría tener un efecto positivo en el metabolismo de los compuestos nitrogenados al disminuir la proteólisis ruminal, lo que derivaría en un aumento de la proteína de sobrepaso e incrementar el flujo de aminoácidos a duodeno aumentando el pool de proteína metabolizable para fines productivos en los animales (Barry, 1989). Esto es particularmente interesante ya que los análisis realizados a las hojas de *A. cochliacantha* utilizadas en el presente experimento, revelaron que la planta contiene 20.2% de taninos condensados totales y 14.0 % de taninos condensados libres (TCL), los cuales son los compuestos bioactivos y pueden secuestrar a los carbohidratos y proteínas de la dieta originando un efecto como el anteriormente citado, esto abre una posibilidad para futuros estudios donde se incremente los niveles de inclusión de hojas

154 de *Acacia cochliacantha* en dietas para cabritos y se evalúan las dosis de respuesta sobre el consumo voluntario, digestibilidad de la materia seca y se evalúan parámetros productivos.

Los compuestos secundarios con actividad antihelmíntica de las leguminosas arbóreas han sido aislados de diversas formas con el objeto de identificar su actividad en contra de algunos nematodos gastrointestinales de los rumiantes (Vargas-Magaña *et al.*, 2014; Marie-de Magdeleine *et al.*, 2014). Recientemente un grupo de investigadores franceses han demostrado que existe un sinergismo entre compuestos, por ejemplo: en un estudio realizado por Klongsiriwet *et al.*, (2015), demostraron que los taninos condensados tienen mejor efecto antihelmíntico cuando están adicionados con flavonoides como la luteolina y quercetina. Con respecto a estos antecedentes, se realizaron análisis cromatográficos de capa fina (TLC) y por HPLC, a las fracciones FAcEt, FDCMt y el precipitado PDCMt; donde se identificaron principalmente al ácido cafeico, ferúlico, cumárico, derivados de cafeoilos y cumaroilos y quercetina. Estos compuestos mostraron una evidente actividad antihelmíntica (67.25-100% de inhibición), contra los huevos de *H. contortus*. Por otra parte, los compuestos de tipo flavonoles y flavonas tuvieron una baja actividad ovicida (7.0% de inhibición). En lo que respecta a las concentraciones letales, de la fracción FDCMt ( $CL_{50}=0.06$  y  $CL_{90}=0.13$  mg/mL) y el precipitado DCMt ( $CL_{50}=0.04$  y  $CL_{90}=0.12$  mg/mL), su efecto se potencializó al hacer la separación cromatográfica de la fracción FAcEt ( $CL_{50}=0.33$  y  $CL_{90}=0.85$  mg/mL), indicando que los compuestos tanto del precipitado como de la fracción diclorometanoica fueron los responsables de la actividad ovicida contra *H. contortus*. Desafortunadamente en este estudio no se identificó el mecanismo de acción o daño que ejercen las moléculas activas aisladas de la leguminosa bajo estudio. Sin embargo, es importante mencionar que los huevos de *H. contortus* expuestos a las fracciones anteriormente mencionadas, al momento de ser observados bajo el lente de 40X de un microscopio óptico; se apreciaba un daño en el interior de su estructura, afectando el desarrollo embrionario y por consecuencia su eclosión. Un posible modo de acción que ejercen los fenoles con otros compuestos (taninos), sobre la inhibición de la eclosión de huevos, es su afinidad de adherirse a la cutícula que es rica en glicoproteína. Los resultados del presente estudio se relacionan con lo encontrado por von Son-de Fernex *et al.*, (2015), quienes aislaron algunos fenoles (quercetina y ácido cafeico) a partir de fraccionamientos de la leguminosa *Leucaena leucocephala*, demostrando que la quercetina (1.1 mg/mL de fracción orgánica), tuvo hasta  $90.49\% \pm 2.85$  de IEH del nematodo *Cooperia* spp. Asimismo, en nuestro estudio se encontraron resultados similares con la fracción C1F57-60 (94% de IEH con 1mg/mL), la cual tuvo quercetina como compuesto mayoritario. Por otra parte nuestro estudio biondirigido en *A. cochliacantha*, al igual que von Son-de Fernex *et al.*, (2015), similares fraccionamientos se hicieron para obtener la fracción acuosa y la fracción orgánica, demostrando que los compuestos identificados en la fracción poco polar (FAcEt), tuvieron los metabolitos activos en contra de los huevos de *H. contortus* (figura 3 y 4). Asimismo, von Son-de Fernex *et al.*, (2016), observaron bajo microscopía de barrido, daños estructurales sobre la cutícula de huevos del nematodo *Cooperia* spp, que estuvieron expuestos con quercetina y ácido cafeico aislados de la leguminosa *L. leucocephala*. Actualmente, salvo los autores citados anteriormente no hay reportes que indiquen las propiedades AH del ácido cafeico, por lo que en nuestro estudio se evidencia que los derivados cafeoilos (Fracciones: C1F39-42, C1F56 y C1F64-83) y ácido cafeico de *A. cochliacantha* actúan contra los procesos de inhibición de la eclosión de *H. contortus*, demostrando una fuerte actividad nematicida. Por otra parte, la fuerte actividad ovicida (97 y 88 % de inhibición), encontrada en la fracción que contenía derivados de cumaroilos (C1F29-33, C1F47-52) indica su potencial AH de estos compuestos. Estas fracciones, de acuerdo a su perfil cromatográfico, contenían ácido cumárico y derivados de cumaroilos. 155

Con respecto a estos compuestos en la literatura solo se ha encontrado actividades antioxidantes (Lu Zhang *et al.*, 2016), anticancerígenos (Nasr *et al.*, 2015; Wei Peng *et al.*, 2015), por lo que la actividad AH reportada en nuestro estudio, puede ser importante para seguir evaluando este tipo de compuestos sobre las otras fases exógenas y endógenas de *H. contortus* y otros NGI.

## 9. CONCLUSIÓN GENERAL

Las fracciones FAcEt, FDCMt y el precipitado PDCMt obtenidas a partir del extracto hidroalcohólico de hojas de *Acacia cochliacantha* mostraron una fuerte actividad antihelmíntica ya que inhibieron entre el 67.25 y el 100% la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus*, en dichas fracciones pudieron identificarse los compuestos mayoritarios mediante un fraccionamiento a partir de una bipartición y posterior elucidación y HPLC quedando de manifiesto los compuestos secundarios responsables de la actividad antihelmíntica siendo estos: la quercetina, los derivados de cafeoilos, los derivados cumaroilos así como los ácidos cafeico, ferúlico, cumárico.

En otro sentido, las hojas de *Acacia cochliacantha* suplementadas en dietas de cabritos, puede ser consideradas como un ingrediente nutracéutico, toda vez que la inclusión de la misma en la dietas de cabritos Boer infectados artificialmente con larvas de *Haemonchus contortus*, no afectó el consumo de materia seca ni el consumo de agua durante el periodo experimental; pero si registro hasta un 70.8 en el porcentaje de reducción del conteo de huevos en heces (HPG) en el grupo al que recibieron el suplemento de hojas de *A. cochliacantha*.

Por tal motivo se concluye que tanto el extracto integro de hojas de acacia cochliacantha así como las fracciones obtenidas a partir de una bipartición u osterior elucidación pueden seguir validándose sobre estudios biodirigidos sobre diferentes parasitos gastrointestinales.

## 10. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Aerts, R.J., Barry, T.N., McNabb, W.C. (1999). Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in 5. Agriculture, Ecosystems and Environment. 75, 1–12.
- Andersson, D., R. Chakrabarty, S. Bejai, J. Zhang, L. Rask, and J. Meijer. (2009). Myrosinases from root and leaves of *Arabidopsis thaliana* have different catalytic properties. *Phytochemistry* 70(11-12), 1345-1354.
- Angulo C. F. J., García C. L., Cuquerella M., Fuente C., Alunda J. M. (2007). *Haemonchus contortus*- SHEEP RELATIONSHIP: A REVIEW. *Revista Científica*. Vol. XVII. 6. Pp. 577-587.
- Armah, C. N., Mackie, A. R., Roy, C., Price, K., Osbourn, A. E., Bowyer, P. and Ladha, S. (1999). The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophysical Journal*, 76(1), 281-290.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R. L., (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet. Parasitol.* 99, 205-219.
- Avalos G. A., Pérez U. C. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología. Serie Fisiología Vegetal.* 2 (3): 119-145.
- Barry T.N. (1989). Condensed tannins: their role in ruminant protein and carbohydrate digestion and possible effects upon the rumen ecosystem. In: Nolan, J.V., Leng, R.A., Demeyer, D.I. (Eds.), *The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion*. Pernambul Books, Armidale, NSW; pp. 153–167.
- Baumann, E., Stoya, G., Volkner, A., Richter, W., Lemke, C. and Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica*, 102(1), 21-35.
- Bipul R., Acharya B.R., Bhattacharyya B., Chakrabarti G. (2008). The natural naphthoquinone Plumbagin exhibits antiproliferative activity and disrupts the microtubule network through tubulin binding. *Biochemistry*, 47(30):7838-7845.
- Boedefeld, W.M., K.I. Bland, and M.J. Heslin. (2003). Recent insights into angiogenesis, apoptosis, invasion, and metastasis in colorectal carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 10(8), 839-851.
- Borchert A. (1981). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Acribia, Zaragoza España. Pp. 543-574.
- Breger J., Fuchs B. B., Aperis G., Mor T., Ausubel F. M. (2007). Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathogens*, 3:168-178.
- Brito DRB, Costa-Júnior LM, Garcia JL, Torres-Acosta JFJ, Louvandini H, Cutrim-Júnior JAA. (2018). Supplementation with dry *Mimosa caesalpinifolia* leaves can reduce the *Haemonchus contortus* worm burden of goats. *Veterinary Parasitology*; 252:47-51.
- Bruneton J. (1987). “*Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie*” Ed. Technique et Documentation Lavoisier.
- Burke J. M., Miller J. E., Larsen M., Terrill T. H. (2005). Interaction between copper oxide wire particles (COWP) and *Duddingtonia flagrans* in hair breed lambs. *Proc. Novel*

Approaches to the Control of Helminths Parasites Livestock. Worm control or worm management: New paradigms in integrated control. Merida, Yucatán, México.

- Butter, N.L., Dawson, J.M., Buttery, P.J. (1999). Effects of dietary tannins on ruminants. In J.C. Caygill, & I. Mueller-Harvey (Eds.), Secondary plant products: Antinutritional and beneficial actions in animal feeding (pp. 51–70). Nottingham, UK: Nottingham University Press.
- Castro M. J. M., Makkar H. P. S., Becker K. (2011). Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an in vitro rumen fermentation system. Canadian Journal Animal Science. 91: 433-448.
- Chen, Y. F., Etheridge N., Schaller E. (2009). Ethylene signal transduction. Annals of Botany. 95: pp. 901-915.
- Cordero del Campillo, M. Rojo M., Martínez, A. (1990). Parasitología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill Intermédica. Madrid, España. pp. 155-192.
- Cordero del Campillo., Rojo M., Martínez, A. (1999). Parasitología Veterinaria. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. España. p96.
- Davies P. J. (2004). Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Ed. Springer. ISBN: 10-1-4020-2685-4
- Demmig, A. B., Adams, W. W. III. (1992). Photochemical and other responses of plants to high light stress. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43:599-626.
- Dewick P. M. (2002). "Medicinal Natural Products –A Biosynthetic Approach–", 2a ed. Ed. John Wiley and Sons Ltd. England.
- Díaz P., Luz N. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Revista de Estudios Transdisciplinarios. 1(2): 32-55.
- Douglas, G. B., Wang, Y., Wanghorn, G. C., Barry, T. N., Purchas, R. W., Foote, A. G., Wilson, G. F. (1995). Liveweight gain and wool production of sheep grazing Lotus corniculatus and lucerne (Medicago sativa). New Zealand Journal of Agricultural Research, 38, 95–104.
- Dreyfuss G., Rondelaud D., Vareille M. C. (1999). Oviposition of Lymnaea truncatula infected by Fasciola hepatica under experimental conditions. Parasitology Research. 85(7): p589-593
- Evans, W. C. (2000). Trease and Evans-Pharmacognosy, 15<sup>TH</sup> ed. Ed. Saunders, Edinburgh.
- Fahad, S., Hussain, S., Matloob, A., Ahmed, K. F., Khaliq, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F., Ullah, N., Faiq, M., Rafiullah, K. M., Khan, T. A., Khan, A., Ullah, A., Huang, J. (2015). Phytohormones and Plant Responses to Salinity Stress: a review. Plant Growth Regulation, 75 (2):391-404.
- Fayer, R., Moran, U, Upton, SJ. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. Int. Journ. for Parasitol 30:1305-1322.
- Felton, G.W., Donato, K., Del Vecchio, R.J., Duffey, S.S. (1989). "Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores". Journal of Chemical Ecology 15: 2667-2694.
- Ferguson B. J., Beveridge, Christina A. (2009). Roles for Auxin, Cytokinin, and Strigolactone in Regulating Shoot Branching. Plant Physiol. Vol. 149.

- Ferreira R. A., Oliveira A. B., Ribeiro M. F. B., Tafuri W. L., Vitor R. W. A. (2006). *Toxoplasma gondii*: in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Experimental Parasitology*, 113:125-129.
- Food and Agriculture Organization, FAO, (1994). Enfermedades de los animales domésticos causadas por dístomas, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Red de Helminología para América Latina y el Caribe.
- Foster, J. G., Cassida, K. A., Turner, K. E. (2011). In vitro analysis of the anthelmintic activity of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) sesquiterpene lactones against a predominantly *Haemonchus contortus* egg population. *Veterinary Parasitology*, 180, 298–306.
- Foster, J. G., Cassida, K. A., Sanderson, M. A. (2011). Seasonal variation in sesquiterpene lactone concentration and composition of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) cultivars. *Grass and Forage Science*, 66, 424–433.
- Fox M T. Jacobs D. E. (1991). Blod gastrin and pepsinogen responses of native village goats in Malaysia to infection with *Haemonchus contortus*. *Animal Tropical Medicinal Parasitology*. 85: 263-267.
- Fraenkel, G. (1969). Evaluation of our thoughts on secondary plant substances. *Entomol. Exp. Appl.* 12, 473-486.
- Francisco, A., Dentinho, M. T., Alves, S. P., Portugal, P. V., Fernandes, F., Sengo, S., Jerónimo, E., García A. M., Outerelo R., Ruiz E., Aguirre J. I., Almodóvar A., Alonso J. A., Benito J., Arillo A., Berzosa J., Buencuerpo V. Francisco J. Cabrero-Sañudo. Eduardo de Juana. D. J. Díaz C., Díaz J. A., Elvira B., Fernández G. L., García I. M., Gómez J. F., González M. D. M., Gutiérrez M. L., Jesús J. B., Martínez M. D. I., Mínguez M. E., Monserrat V., Muñoz A. B., Ornos C., Parejo P. C., Pardos F. Pérez T. J., Pérez Z. J., Pulido D. F., Ramírez A., Refoyo R. P. Roldán C., Santos T. Subías L. S., Tellería J. L., Trigo D., Vázquez M. A., Martín C. A., Arriero E. . Cano J. (2011). Prácticas de Zoología. Estudio y diversidad de los Platelminotos, Nematodos, Nematomorfos y Acantocéfalos. *Reduca (Biología). Serie Zoología*. 4 (2): 37-60.
- Frutos P, Hervás G, Giráldez FJ, Mantecón AR. (2003). Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span Journal Agriculture Research*; 2:191–202.
- García, D.E., Soca, Mildrey., Medina, María G. (2015). Acción antihelmíntica de seis extractos de morera en la viabilidad de larvas infestantes (L<sub>3</sub>) de nemátodos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes*. 28, 4, 319-328.
- García, H. C., Arece, G. J., Rojo, R. R., Mendoza, M. G. Albarrán, P. B., Vázquez, A. J. F., Avendaño R. L., Olmedo J. A., Marie-Magdeleine, C. López, L. Y. (2017). Nutraceutic effect of free condensed tannins of *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) benthon parasite infection and performance of Pelibuey sheep. *Tropical Animal Health Production*. 49:55-61. 1157.
- García, M., Cruz-Vazquez, C., Quezada, T., Silva, E., Valdivia, A, Vazquez-Flores, S., Ramos, M. (2009). Cryptosporidiosis in Dairy Calves from Aguascalientes, Mexico: Risk infection in relation with the season and months of sampling. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8(8):1579-1583.

- Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J.F., Culioli, J. (2001). Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod. Nutr. Dev.* Vol. 41, p. 1-26.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet. Parasitol.* 139, 308-320.
- Githiori, J.B., Høglund, J., Waller, P.J., Leyden, R. 2003. The anthelmintic efficacy of the plant *Albizia anthelmintica* against the nematode parasite *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. *Veterinary Parasitology.* 116:23.
- González G. R., Torres H. G., López A. M. E. Mendoza de Gives P. (2012). Resistencia antihelmíntica de nematodos parásitos en ovinos. *Revista de Geografía Agrícola.* 48-49. Pp. 63-74.
- González-Cortazar M, Zamilpa A, López-Arellano ME, Aguilar-Marcelino L, Reyes-Guerrero DE, Olazarán-Jenkins S. (2018). *Lysiloma acapulcensis* leaves contain anthelmintic metabolites that reduce the gastrointestinal nematode egg population in sheep faeces. *Comp Clinical Pathology;* 27:189-197.
- Gupta, M. P. (1995). Editor “270 Plantas Medicinales Iberoamericanas” CYTED-CECAB.
- Hall, M., Jung, G. 2008. Forage chicory. *Agronomy facts* 45 (Available at <http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/pdfs/uc116.pdf>. Accessed 14 April 2015).
- Hallam, D. (1985). Transmission of *Damalinea ovis* and *Damalinea caprae* between sheep and goats. *Australian Veterinary Journal.* 62. 344-345.
- Harper, C., Cowell, N. A., Adams, B. C., Lanbgle, A. J., Wohlsen, T. D. (2002). Outbreak of *Cryptosporidium* linked to drinking unpasteurised milk. *CDI* 26(3):449-450.
- Heinz M. (2016). *Encyclopedia of Parasitology.* Ed. H. Mehlhorn. 1007/978-3-662-43978-4.
- Herd RP, Zajac AM. (1999). Helminth Parasites of the Gastrointestinal Tract. In Howard JL and Smith RA. *Current Veterinary Therapy* 4. Philadelphia. W.B. Saunders Company. 545-550
- Herrera A. A., Martínez R. M. D., Hernández C. M., López V. E. O., Rodríguez T. A. V., Álvarez L., Marquina B. S., Navarro G. V. M., Tortoriello J. (2007). Mycological and electron microscopic study of *Solanum chrysotrichum* saponin SC-2 antifungal activity on candida species of medical significance. *Planta Medica,* 73(15), 1568-1573.
- Hervás G. (2001). Los taninos de quebracho en la nutrición de ovejas, efecto sobre la fermentación en el rumen y la digestibilidad, toxicidad y utilización como protectores frente a la degradación ruminal. Tesis Doctoral, pp.
- Hober E., Lichtenfels J., Gibbons L. (2004). Phylogeny for species of the genus *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): Considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). *Journal of Parasitology.* 90 (6): 1378-1386.
- Hopkins, D. L., Holst, P. J., Hall, D. G., Atkinson, W. R. (1995). Carcass and meat quality of second-cross cryptorchid lambs grazed on chicory (*Cichorium intybus*) or Lucerne (*Medicago sativa*). *Australian Journal of Experimental Agriculture,* 35, 693–697.

- Hordegen, P.; Hertzberg, H.; Heilmann, J.; Langhans, W. & Maurer, V. (2003). The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal *thichostrongylids* in artificially infected lambs. *Veterinary Parasitology*. 117:51.
- Hoskin, S. O., Barry, T. N., Wilson, P. R., Charleston, W. A. G., Kemp, P. D. (1999). Growth and carcass production of young farmed deer grazing sulla (*Hedysarum coronarium*), chicory (*Cichorium intybus*), or perennial ryegrass (*Lolium perenne*)/white clover (*Trifolium repens*) pasture in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42, 83–92.
- Hoste H, Torres-Acosta JFF, Quijada J, Chan-Pérez I, Dakhel MM, Kommuru DS. (2016). Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Adv Parasitol*; 93:239-351.
- Jack J., Adusu E., Jelinek T. (2004). Human infection with *Dicrocoelium dendriticum*. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 129: 2538-40.
- Jackson, F., Coop R. L. (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, 120, S95–S107.
- Jacquiet PH., Cabaret J., Cheikh D., Thiam E. (1997). Identification of *Haemonchus* species in domestic ruminants base don morphometrics of spicules. *Parasitology Research*. 83: 82-86.
- James, PJ; Carmichael, IHC; Pfeffer, CA; Martin, RR; O'Callaghan, MG. (2002). Variation among Merino sheep in susceptibility to lice (*Bovicola ovis*) and association with susceptibility to trichostrongylid gastrointestinal parasites *Veterinary Parasitology*, 103 (4): 355-365.
- Jerónimo E., Alves S. P., Dentinho M. T. P., Martins S. V., Prates J. A. M., Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B. (2010). The effect of grape seed extract and *Cistus ladanifer* L. and vegetable oil supplementation on fatty acid composition of abomasal digesta and intramuscular fat of lambs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58, 10710–10721.
- Jerónimo, E., Alfaia, C.M.M., Alves, S.P., Dentinho, M.T.P., Prates, J.A.M., Vasta, V., Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B. (2012). Effect of dietary grape seed extract and *Cistus ladanifer* L. in combination with vegetable oil supplementation on lamb meat quality. *Meat Science*, 92, 841–847.
- Jones B. A., Hatfield R. D., Muck R. E. (1995). Crop quality and utilization: Characterization of proteolysis in alfalfa and red clover. *Crop Science*, 35, 537–541.
- Kettle, DS. (1995). *Medical and Veterinary Entomology*. 2nd Edition. CAB. International, Wallingford, Oxon, UK. 658 pp.
- 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, 17-134.
- Kuete V., Eyong K. O., Beng V. P., Folefoc G. N., Hussain H., Krohn K., Nkengfack A. E. (2007). Antimicrobial activity of the methanolic extract and the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. *Pharmazie*, 62:552-556.

- Le Jambre L. F. (1995). Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep. *International Journal for Parasitology*. 25: 269-273.
- León-Castro Y, Olivares-Pérez J, Rojas-Hernández S, Villa-Mancera A, Valencia-Almazán MT, Hernández-Castro E (2015). Effect of three fodder tree on *Haemonchus contortus* control and weight variations in kids. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*; 2:193–201.
- Lincoln T., Zeiger E. (2006). *Secondary Metabolites and Plant Defense*. Plant Physiology. Fourth Edition. Sinauer Associates. Capítulo 13.
- Liu, Q., Lanari, M. C., Schaefer D. M. (1995). A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *Journal Animal Science*, vol. 73, p. 3131-3140.
- Lopez, L., Lluvia, I. E., García, C., Ramón, F. (2011). Naphthoquinones: more than natural pigments. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 42:6-17.
- Makkar, H. P. S. (2003). 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, 241–256.
- Malan F. S. Van Wyk J. A. (1992). The packed cell volume and color of the conjunctivae as aids for monitoring *Haemonchus contortus* infestations in sheep. In: *Proceedings of the South Africa Veterinary Association Biennial National Veterinary Congress*. Grahamstown, FAO. 139.
- Marie-Magdeleine, Carine., Udimo, L., Philibert, L., Bocage, B y Archimede H. (2010). In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stage of *Hemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. Doi:10.1016/j.vetpar.2010.06.017.
- Márquez Lara, Dildo. (2003). Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, vol. 4, núm. 1, pp. 55-71.
- Marume, U., Chimonyo, M., Dzama, K. (2011). A preliminary study on the responses to experimental *Haemonchus contortus* infection in indigenous goat genotypes. *Small Ruminant Research*, 95, 70–74.
- McDowell, L. R., Williams, S. N., Hidiroglou N., Njeru C. A., Hill G.M., Ochoa L., Wilkinson N. S. (1996). Vitamin E supplementation for the ruminant. *Animal Feed Science Technology*, vol. 60, p. 273-196.
- Mecano, D., Hasegawa, M. (1991). *Fitoquímica Orgánica*. Ed. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Méndez-Ortíz FA, Sandoval-Castro CA, Torres-Acosta JFJ. (2012). Short term consumption of *Havardia albicans* tannin rich fodder by sheep: Effects on feed intake, diet digestibility and excretion of *Haemonchus contortus* eggs. *Animal and Feed Science and Technology*; 176:185-191.
- Mendoza de Gives, P., López. A. M. E. (2004). Diagnostico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México. *Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria*. 173. 158-173.
- Min B. R., Hart S. P. (2003). Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*, 81 (E. Suppl. 2), E102–E109.

- Min B. R., Barry T. N., Attwood G. T., McNabb W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 106: 3–19.
- Min, B. R., Barry, T. N., McNabb, W. C., Kemp, P. D. (1998). The effect of condensed tannins on the production of wool and on its processing characteristics in sheep grazing *Lotus corniculatus*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 49, 597–605.
- Molan, A. L., Duncan, A., Barry, T.N., McNabb, W. C. (2003). Effect of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lung worm and gastrointestinal nematodes. *Parasitology International*, 52, 209–218.
- Monahan, F.J., Asghar, A., Gray, J.I., Buckley, D.J. (1994). Effect of oxidized dietary lipid and vitamin E on the colour stability of pork chops. *Meat Science*, vol. 37, p. 205-215.
- Moorby J. M., Fraser M. D., Theobald V. J., Wood J. D., Haresign W. (2004). The effect of red clover formonnetin content on liveweight gain, carcass characteristics, and muscle equol content of finishing lambs. *Animal Science*, 79, 303–313.
- Morrissey, J. P. Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 708.
- Müller N, y von Allmen N, 2005. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Veterinary Parasitology*. 35,1339-1347.
- Muñoz F., Angulo C. F., Ramírez B. R. (2003). *Farmacología y terapéutica de parasitosis internas en bovinos*. 1ª Edición. Pp. 70.
- Nwosu C. O., Okon E. D., Chiejina S. N., Igbokwe I. O., Mbaya A. W., Columbus P. K., Chagwa L. L., Daniel-Igwe G. (2012). Natural *Oesophagostomum columbianum* infection of Sahel goats in northeastern Nigeria. *Comparative Clinical Pathology*. 1618-5641.
- Olaechea, FV; Larroza M; Corley, J; Cabrera, R; Raffo, F. (2006). Ingreso y evolución del parasitismo por *Melophagus ovinus* en una majada Corriedale en la Patagonia argentina. *Parasitología Latinoamericana*, 61. 86-89
- Olmedo, J. A., Rojo, R.R., Arece, G. J., Mohamed, A. Z. S., Morales, A. E., Albarrán, P. B., Aarón H. L. R., Vázquez, A. J. (2015). Extracto de *Lysiloma acapulcensis* en la digestibilidad y fermentación ruminal de una dieta para ovinos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 2 (5), 173-182.
- Olmedo-Juárez, A, Rojo-Rubio, R., Arece, G.J., Mohamed, A. Z. S., Kholif, E. A., Morales, A.E. (2014). In vitro of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Italian Journal of Animal Science*. 13, 303-307.
- Onyiah L. C., Arslan O. (2005). Simulating the development periodo of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. *Journal Thermal Biology*. 30: 203-211.
- Papadopoulos, E. 2008. "Anthelmintic resistance in sheep nematodes". *Small Ruminant Research* 76:99–103.
- Pelegrine, M., Alessandro., Gennari, S. M., Talamine do A., Alessandro F., Luiz A. A. 2010. Anthelmintic effects of condensed tannins on *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected sheep *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 4. 1009-1016.

- Pendell D. (2002). *Pharmakodynamis: Stimulating Plants, Potions and Herbcraft: Excitantia and Empathogenica*. San Francisco: Mercury House.
- Piñeiro V. A .T., Canul S. J. R., Alayón G. J. A., Chay C. A. J., Ayala B. J. A., Aguilar P. C. F., Solorio S. F. J., Ku V. J. C. (2015). Potential of condensed tannins for the reduction of emissions of enteric methane and their effect on ruminant productivity, *Arch Medicinal Veterinary*. 47: 263-272.
- Quiroz R. H., Figueroa C. J. A. Ibarra V. F., López A. M. E. (2011). *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*. Primera edición. Versión electrónica. ISBN:978-607-00-4015-3
- Quiroz, H. (2005). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. México, D.F. pp. 273-274.
- Radostits O. M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. (2002). *Medicina Veterinaria, Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. Vol. II, novena Edición, Mc Graw Hill, Interamericana España.
- Rahman. M. Mukhlesur. G., Alexander. I. A. (2005). Benzoisofuranone derivative and carbazole alkaloids from *Murraya koenigii* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 66 1601–1606.
- Ramírez R., Barry T. N., Pomroy W. E., López V. N., McNabb W. C., Kemp P. D. (2005). Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase summer lamb growth under commercial dryland farming conditions with minimal anthelmintic drench input. *Animal Feed Science Technology*, 122, 197–217.
- Ramos G. P., Frutos F. J., Giraldez A. R., Mantecon. (1998). Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Archivos de Zootecnia*. 47: 597-620.
- Risvik E. (1994). Sensory properties and preferences. *Meat Science*, 36, p. 67-77.
- Rodríguez-Vivas RI, Grisi L, Pérez-de León AA, Silva-Villela H, Torres-Acosta JFJ, Fragoso-Sánchez H. (2017). Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos del ganado bovino en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 8(1):61-74.
- Roos A. B., Kamal-Eldin A., Lundin E. A., Zhang J. K., Hallmans G., Åman P. (2003). Cereal alkylresorcinols are absorbed by humans. *Journal of Nutrition*. 133:2222-2224.
- Rowe J. B., Nolan J. V. De Channet G., Teleni E. (1988). The effect of haemonchosis and blood los into the abomasum on digestión in sheep. *British Journal Nutrition*. 59: 125-139.
- Rubilar L., Donoso S., Díaz L., Godoy C., Muñoz L., Perez R. (2001). Eficacia antihelmíntica de tres endectocidas administrados por vía oral en caballos. *Archivos de Medicina Veterinaria*. ISSN 0301-732.
- Salmon-Chemin L., Buisine E., Yardley V., Kohler S., Debreu M. A., Landry V., Sergheraert Ch., Croft S. L., Krauth-Siegel R. L., Davioud-Charvet E. (2001). 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenasa from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44:548-565. 32.

- Salunkhe D. K., Chavan J. K., Kadam S. S. (1990). Dietary Tannins: Consequences and Remedies. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp 1-200.
- Sangster, N. (1999). ¿Pharmacology of Anthelmintic Resistance in Cyathostomes: will it occur with the avermectine/milbemycis? *Veterinary Parasitology*. 85: 189-204.
- Schallig H. D. F. H. (2000). Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 120: S63-S72.
- Simón V. F., Simón M. F. (1999). Nematodos. En: *Parasitología Veterinaria*. Cordero del Campillo, M. and Rojo Vázquez, F. A. (Eds.) McGrawHill-Interamericana, 968 pp.
- Slifko, T., Smith, HV, Rose, JB. 2000. Emerging parasitic zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol* 30:1379-1393
- Small, RW. (2005). A review of *Melophagus ovinus* (L.), the sheep ked. *Veterinary Parasitology*, 130: 141-155.
- Solaiman S., Thomas J., Dupre Y., Min B. R., Gurung N., Terill T. H., Haenlein G. F. W. (2010). Effect of feeding sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) on growth performance, blood metabolites, and carcass characteristics of Kiko crossbred male kids. *Small Ruminant Research*, 93, 149–156.
- Soulsby, E.J.L. (1987). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los animales domésticos*. 7 Ed. Interamericana. México, D.F. Pp. 8-13, 63-68.
- Squeo F. A., Cardemi L. (2006). *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena. Serena, Chile.
- Strong, L.; Wall, R.; Woolford, A. and Djeddour, D. 1996. The effect of faecally excreted ivermectin and fenbendazol on the insect colonization of cattle dung following the oral administration of sustained-release boluses. *Veterinary Parasitology*. Vol.62, No.3-4. p. 253-266.
- Sumano, H. Ocampo, L. (2006). *Farmacología Veterinaria*. 3ra. Ed. México, México DF. pp. 454-537.
- Szostakowska B., Kruminis-Lozowska W., Racewicz M., Knight R., Tamang L., Myjak P. and Graczyk K., (2004). *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* recovered from flies on a cattle farm and in a Landfill, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, 6: 3742-3744.
- Taiz L., Zeiger E. (2006). *Fisiología Vegetal*, Volumen 2. Publicacions de la Universitat Jaume. Castelló de la Plana.
- Tandon V. K., Chor R. B., Singh R. V., Raib S., Yadava D. B. (2004). Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14:1079-1083.
- Tandon V. K., Yadav D. B., Singh R. V., Chaturvedic A. K., Shuklac P. K. (2005). Synthesis and biological evaluation of novel (L)α-amino acid methyl ester, heteroalkyl, and aryl substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and antibacterial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15:5324-5328.
- Teixeira M. J., Almeida Y. M., Viana J. R., Holanda J. G., Rodríguez T. P., Prata J. R. C. Jrs., Coelho I. C. B., Rao V. S., Pompeu M. M. L. (2001). In vitro and in vivo leishmanicidal activity

of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytotherapy Research*, 15:44-48. 31.

- Theodoridou K., Aufrere J., Andueza D., Pourrat J., Morvan A. L., Stringano E., Mueller-Harvey I., Baumont R. (2010). Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on in vivo and in situ digestion in sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 160 23–38.
- Torres V. P., Alonso Prada S. G., Márquez L. D. (2007). Resistencia antihelmíntica en los nemátodos gastrointestinales del bovino. *Revista de Medicina Veterinaria*. 13: 56-76.
- Traka, M. and R. Mithen. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochem. Rev.* 8, 269-282
- Tsiboukis, D., Sazakli, E., Jelastopulu, E., Leotsinidis, M. (2013). Anthelmintics residues in raw milk. Assessing intake by a children population. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16, 85–91.
- Turner, K. E., Belesky, D. P., Fedders, J. M. (1999). Chicory effects on lamb weight gain and rate of in vitro organic matter and fiber disappearance. *Agronomy Journal*, 91, 445–450.
- Turner, K. E., Cassida K. A., Zerby H. N., Brown M. A. (2015). Carcass parameters and meat quality in meat-goat kids finished on chicory, birdsfoot trefoil, or red clover pastures. *Meat Science*. 105. 68–74.
- Turner, K. E., Cassida, K. A., Zerby, H. N. (2014). Meat goat kids finished on alfalfa, red clover or orchardgrass pastures: Carcass merit and meat quality. *Meat Science*, 98, 629–636.
- Turner, K. E., Cassida, K. A., Zajac, A. M. (2013). Weigh gains, blood parameters, and faecal egg counts when meat-goat kids were finished on alfalfa, red clover and orchardgrass pastures. *Grass and Forage Science*, 68, 245–259.
- Valderrábano, J., Delfa, R., Uriarte, J. (2002). Effect of level of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. *Veterinary Parasitology* 104: 327-338.
- Vargas R., Fabián C. (2006). FAMACHA<sup>®</sup> Control de Haemonchosis en caprinos. *Agronomía Mesoamericana*. 17-1. pp. 79-88.
- Vargas-Magaña, J. J., Torres-Acosta, J. F. J., Aguilar-Caballero, A. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Chan-Pérez, J. I. (2014). Anthelmintic activity of acetone–water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology*, 206, 322–327.
- Vasta, V., Luciano, G. (2011). The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research*, 101, 150–159.
- Vaughn, S.F. Berhow, M.A. (2005). Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: ph effects, isolation, and purification. *Ind. Crop. Prod.* 21, 193-202.
- Vlot, A.; Amick, D.; Klessig, D. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Revi. Phytopathol*, 47: 177 – 206.
- von Son-de Fernex, E., Alonso, D. M. A., Valles, M. B., Capetillo, L. C. M. 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*. 131, 413-418.

- Waghorn, G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production, Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 116–139.
- Waghorn, G.C., McNabb, W.C. (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*; 62: 383–392.
- Waller, P.J. 1999. International approaches to the concept of integrated control of nematodes parasites of livestock. *International Journal for Parasitology* 29: 155-164.
- Williams, A.R., Ropiak, H.M., Frygas, C., Desrues, O., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., (2014). Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasitology Vectors*. 7, 518-527.
- Williams, C.M. (2000). Dietary fatty acids and human health. *Animal. Zootechnology*. Vol. 49, p. 165-180.
- Williamson A. L., Brindley P. J., Knox D. P., Hotez P. J., Loukas A. (2003). Digestive proteases of blood feeding nematodes. *Trends Parasitology*. 19 (9): 417-423.
- Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* 75, 225-233.
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Hughes, S. I., Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A Review. *Meat Science*. 78, 343–358.
- Wu T., Wang M., Wu P. (1996). Seasonal variations of carbazole alkaloids in *Murrays euchrestifolia*. *Phytochemistry*, Vol. 43, No. 4, pp. 785-789.
- Xiao, L. (2009). Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology*. Rev 17(1):72-97.
- Zimmer C. (2000). *Parasite Rex Inside The Bizarre World Of Natures Most Dangerous Creatures*. New York: Free P. 87-88.