

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



**EFFECTO NEMATICIDA *in vitro* DE *Larrea tridentata* D.C Y *Gliricidia sepium*
(*Jacq.*) CONTRA LARVAS INFECTANTES ENVAINADAS Y
DESENVAINADAS DE *Haemonchus contortus***

Tesis

Que presenta **Leonides Gómez Narváez**

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Torreón, Coahuila

Diciembre 2016.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EFFECTO NEMATICIDA *in vitro* DE *Larrea tridentata* D.C Y *Gliricidia sepium*
(Jacq.) CONTRA LARVAS INFECTANTES ENVAINADAS Y DESENVAINADAS
DE *Haemonchus contortus*

Tesis

Que presenta LEONIDES GÓMEZ NARVÁEZ como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria

Firma manuscrita de Dr. José Eduardo García Martínez.

Dr. José Eduardo García Martínez
Director Principal (UAAAN)

Firma manuscrita de Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés.

Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés
Director Externo

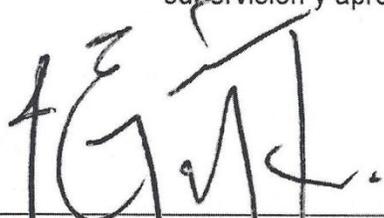
Torreón, Coahuila.

Diciembre, 2016

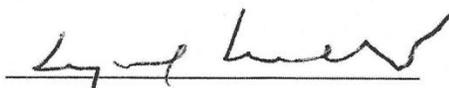
EFFECTO NEMATICIDA *in vitro* DE *Larrea tridentata* D.C Y *Gliricidia sepium*
(Jacq.) CONTRA LARVAS INFECTANTES ENVAINADAS Y DESENVAINADAS
DE *Haemonchus contortus*

Tesis

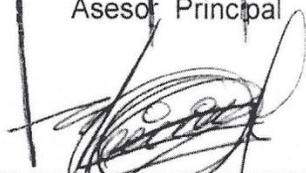
Elaborada por LEONIDES GÓMEZ NARVÁEZ como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria con la
supervisión y aprobación del comité de asesoría



Dr. José Eduardo García Martínez
Asesor Principal



Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque
Asesor

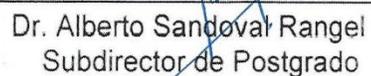


Dr. Jair Milán Orozco
Asesor



Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés
Asesor Externo

Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado

MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADÉMICA

El suscrito, MVZ Leonides Gómez Narváez, estudiante del Programa de Posgrado en Producción Agropecuaria, con matricula 62151233 y autor de la presente Tesis, manifiesto que:

1.- Reconozco que el plagio académico constituye un delito que está penado en nuestro país.

2.- Las ideas, opiniones datos e información publicadas por otros autores y utilizadas en la presente Tesis, han sido debidamente citadas reconociendo la autoría de la fuente original.

3.- Toda la información consultada ha sido analizada e interpretada por el suscrito y redactado según su criterio y apreciación, de tal manera que no se ha incurrido en el "copiado y pegado" de dicha información.

4.- Reconozco la responsabilidad sobre los derechos de autor de los materiales bibliográficos consultados por cualquier vía y manifesté no haber hecho mal uso de ninguno de ellos.

5.- Entendiendo que la función y alcance de mi Comité de Asesoría, está circunscrito a la orientación y guía respecto a la metodología de la investigación realizada por la siguiente Tesis, así como del análisis e interpretación de los resultados obtenidos, y por lo tanto eximo de toda responsabilidad relacionado al plagio académico a mi Comité de Asesoría y acepto que cualquier responsabilidad al respecto es únicamente por parte mía.



Leonides Gómez Narváez
Tesisista de Maestría/UAAAN

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría. Al programa de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria de la UAAAN, por la oportunidad de realizar mi formación académica.

Al Dr. José Eduardo García por su apoyo invaluable en la revisión de este trabajo. Al Dr. Miguel Mellado por su apoyo en los análisis estadísticos y la revisión de la tesis. Al Dr. Jair Millán por su apoyo en el montaje y lectura de los bioensayos, creo que la parte más complicada de este trabajo, sobre todo cansado (estar más de 8 horas haciendo lecturas al microscopio no es tarea fácil)... Ánimo!!. Al Dr. Juan Alberto Ascacio por su apoyo en la elaboración de los extractos acuosos y la identificación de compuestos.

A los integrantes de mi H. comité de asesoría, Dr. José Eduardo García, Dr. Miguel Ángel Mellado, Dr. Jair Millán, Dr. Juan Alberto Ascacio, Dr. Pedro Mendoza, Dr. Antonio Aguilera, por el apoyo incondicional, por el tiempo dispuesto en la revisión de este trabajo, sobre todo por la confianza.

Al Dr. José Luis Rivera de la Universidad Politécnica del Estado de Morelos, por la oportunidad de realizar los extractos en sus laboratorios.

Al laboratorio de Helmintología (CENID-PAVET) por abrirme sus puertas para poder llevar a cabo gran parte de los experimentos, por el apoyo.

Los encargados de laboratorios de nutrición animal, Carlos Arévalo y la MC. Maricela Lara, por su apoyo en la parte del análisis químico proximal.

Al Dr. Miguel Medina, por su apoyo en la elaboración de las estructuras de los compuestos químicos identificados.

A mis padres Juan y Reyna, por el apoyo en todos los aspectos, consejos y sugerencias, a mis hermanos Adonái, espero ser un buen ejemplo para ti, y Yoni (†) porque tu ausencia me ha enseñado a valorar y a aceptar algunas situaciones, ÁNIMO!!!... A Iris Adriana, en las malas y en las peores, gracias por todo, te amo. En general a los que directa, pero sobre todo indirectamente, influyeron para finalizar con éxito este proyecto.

DEDICATORIA

A un dios, que me recuerda a diario que tengo un propósito en esta vida.

A mi padre, Juan Gómez y mi madre, Reyna Narváez, por su apoyo incondicional.

A LE. Iris Adriana, eres parte de mi vida, de este proyecto, por nuestro Leoncito, por todo... por lo que fue y lo que vendrá.

A mis hermanos: Ado, espero que este logro sea un aliciente para tu desarrollo profesional, échale ganas, no olvides que cuentas con mi apoyo, a mi hermano Yoni en tu memoria...donde estés.

A los que creyeron en mi, a mis tíos Juan y Carmen, Ramón e Inés, Rufino y Saira, Isabel y Toño, German e Isabel, los faltantes, mis primos, a mis abuelos...a toda la familia, el principio de muchos logros, animo!!...

**La constancia... *gutta cavat lapidem* (la gota que perfora la piedra)... Ovidio Ex
Ponto**

Con cariño y admiración Leonides Gómez Narváez

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.2. OBJETIVOS GENERALES.....	4
1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.3. HIPOTESIS.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1. METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS.....	6
2.2. FENOLES VEGETALES.....	7
2.2.1. Los taninos.....	7
2.3. PLANTAS USADAS EN ESTE ESTUDIO.....	9
2.3.1. <i>Larrea tridentata</i>	10
2.3.2. <i>Gliricidia sepium</i>	12
2.4. LA HEMONCOSIS EN PEQUEÑOS RUMIANTES.....	14
2.4.1. Ciclo de vida del nemátodo <i>Haemonchus contortus</i>	17
2.5. TRATAMIENTO ANTIHELMÍNTICO.....	20
2.6. RESISTENCIA A LOS NEMATOCIDAS CONVENCIONALES.....	20
2.7. ESTRATEGIAS DE CONTROL ALTERNATIVO CONTRA LAS PARÁSITOSIS EN LOS RUMIANTES.....	23
2.8. USO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS, COMO TRATAMIENTO A LAS NEMATODIASIS EN RUMIANTES.....	28
2.8.1. Estudios <i>in vitro</i>	28
2.8.2. Estudios <i>in vivo</i>	29
2.8.3. Modo de acción de los taninos sobre los diferentes estadios de los nemátodos.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1. MATERIAL VEGETATIVO.....	32

3.1.1. <i>Larrea tridentata</i>	32
3.1.2. <i>Gliricidia sepium</i>	33
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	35
3.2.1. Análisis químico proximal	35
3.2.2. Elaboración de extractos acuosos	35
3.2.3. Determinación de la concentración de polifenoles condensados, hidrolizables y totales	36
3.2.4. Obtención de larvas infectantes.	39
3.2.5. Elaboración del extracto hidro-metanólico, montaje de bioensayos y confrontación extracto- larvas envainadas y desenvainadas.....	42
3.2.6. Cromatografía líquida en columna y cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a masas	47
3.3. TÉCNICAS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES CONDENSADOS, HIDROLIZABLES Y TOTALES	50
3.3.1. Extracto acuoso.....	50
3.3.2. Polifenoles hidrolizables, usando Folin-ciocalteau.....	50
3.3.3. Polifenoles condensados, usando HCl-butanol	51
3.4. TÉCNICAS DE CULTIVO DE LARVAS, CONTEO Y DESENVAINA DE LARVAS DE <i>Haemonchus contortus</i>	51
3.4.1. Técnica de cultivo de larvas	51
3.4.2. Técnica de migración larvaria o de Baermann en embudo	52
3.4.3. Técnica de gradientes de densidad con sacarosa para la limpieza de larvas infectantes (L ₃) de <i>Haemonchus contortus</i>	52
3.4.4. Técnica de desenvaine de larvas infectantes (L ₃) por medio de hipoclorito de sodio	54
3.4.5. Técnica de conteo de larvas infectantes (L ₃) de <i>Haemonchus contortus</i>	54
3.5. BIOENSAYOS	54
3.5.1. Extracto hidro-metanólico	54
3.5.2. Ensayo con larvas envainadas.....	55
3.5.3. Ensayo con larvas desenvainadas	55
3.5.4. Determinación de la concentración letal 50	56

3.6. TÉCNICAS PARA IDENTIFICAR LOS PRINCIPALES COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES	56
3.6.1. Cromatografía en columna utilizando amberlita XAD-16	56
3.6.2. Cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a espectrómetro de masas (HPLC/MS)	56
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
4.1. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL	58
4.2. POLIFENOLES CONDENSADOS, HIDROLIZABLES Y TOTALES	60
4.3. BIOENSAYOS CON LARVA ENVAINADA Y DESENVAINADA	62
4.3.1. Concentración letal 50	69
4.3.2. Hallazgos importantes encontrados al realizar las lecturas	71
4.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, ACOPLADO A ESPECTRÓMETRO DE MASAS (HPLC/MS)	75
4.6. RENDIMIENTO DE LA FRACCIÓN VEGETAL EN EXTRACTO HIDROMETANÓLICO	84
5. CONCLUSIONES	85
6. LITERATURA CITADA	87

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 4.1.** Composición proximal (%) de fracción vegetal (hojas) de *L. tridentata* y *G. sepium* (M+ECM). **58**
- Cuadro 4.2.** Concentración cuantitativa de polifenoles condensados, hidrolizables y totales, en extractos acuosos de material vegetativo de *L. tridentata* y *G. sepium*. **60**
- Cuadro 4.3.** Porcentaje de mortalidad de larvas infectantes envainadas de *H. contortus*, expuesta a cinco concentraciones de extractos hidro-metanólicos de *G. sepium* y *L. tridentata*, con lecturas a 24, 48 y 72 horas. **65**
- Cuadro 4.4.** Porcentaje de mortalidad de larvas desenvainadas de *H. contortus*, expuesta a cinco concentraciones de extractos hidro-metanólicos de *G. sepium* y *L. tridentata*, con lecturas a 24, 48 y 72 horas. **66**
- Cuadro 4.5.** Concentración letal 50 expresada en mg/ml^{-1} de ambas plantas, en contra de larvas infectantes envainadas de *H. contortus*, en los tres tiempos de lecturas. **70**
- Cuadro 4.6.** Concentración letal 50 expresada en mg/ml^{-1} de ambas plantas, en contra de larvas infectantes desenvainadas de *H. contortus*, en los tres tiempos de lecturas. **70**
- Cuadro 4.7.** Compuestos bioactivos identificados en cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a masas (HPLC/MS) del extracto acuoso de *L. tridentata*. **76**
- Cuadro 4.8.** Compuestos bioactivos identificados en cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a masas (HPLC/MS) del extracto acuoso de *G. sepium*. **80**

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura 2.1.</u> Cápsula bucal de <i>Haemonchus contortus</i> , se observa el diente o lanceta.	17
<u>Figura 2.2.</u> Vulva y bolsa copulatriz (100x) de <i>Haemonchus contortus</i> .	18
<u>Figura 2.3.</u> Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i> .	19
<u>Figura 3.1.</u> Arbusto de <i>Larrea tridentata</i> con flores y frutos.	32
<u>Figura 3.2.</u> Arbusto de <i>Gliricidia sepium</i> .	34
<u>Figura 3.3.</u> Elaboración del extracto acuoso.	36
<u>Figura 3.4.</u> Técnica para la obtención de la concentración de polifenoles condensados.	37
<u>Figura 3.5.</u> Espectrofotometro de masas.	38
<u>Figura 3.6.</u> Técnica para la obtención de la concentración de polifenoles hidrolizables.	38
<u>Figura 3.7.</u> Ovino de la raza pelibuey infectado con el nemátodo <i>H. contortus</i> .	39
<u>Figura 3.8.</u> Maceración de las heces para el cultivo de larvas.	40
<u>Figura 3.9.</u> Filtración del sobrenadante por medio de la técnica de Baermann en embudo.	41
<u>Figura 3.10.</u> Sacarosa al 40% (izquierda), larvas infectantes limpias (L ₃) (en medio) y caja de cultivo con larvas adultas (derecha).	42
<u>Figura 3.11.</u> Confrontación entre, material vegetativo y agua/metanol (30:70) y proceso de filtrado (derecha).	43
<u>Figura 3.12.</u> Eliminación del solvente (arriba), agua (abajo izquierda) y los extractos hidro-metanólicos (abajo derecha).	44
<u>Figura 3.13.</u> Pipeta multicanal para la distribución del extracto a cinco concentraciones (izquierda), adición de larvas infectantes (derecha).	45
<u>Figura 3.14.</u> Placa de Elisa con 96 pozos, se observa el control y las cinco concentraciones (izquierda), y el rotulo que se coloca antes de incubar (derecha).	46
<u>Figura 3.15.</u> Portaobjetos con 10 alicuotas de 10 µL, para realizar las lecturas, con un enfoque de 4x.	47
<u>Figura 3.16.</u> Columna de vidrio empaquetada con amberlite XAD-16 (izquierda) y columna empaquetada con amberlite XAD-16 en confrontación con el extracto acuoso (derecha).	48

- Figura 3.17.** Obtención de los polifenoles purificados en estado líquido (metanol) 49
(arriba izquierda), evaporación del solvente a temperatura ambiente en
cajas de cultivo, obtención del polvo fino en viales de plástico para su
conservación.
- Figura 3.18.** Cromatógrafo líquido de alta resolución, acoplado a masas. 49
- Figura 4.1.** Lesiones observadas en el cuerpo y porción anterior, sobre larvas 73
envainadas después de la confrontación con el extracto hidro-metanólico
de *L. tridentata*, con lecturas a 48 horas (10x) y concentraciones de 50
mg/mL.
- Figura 4.2.** Adherencias observadas en la cutícula de larvas infectantes 73
desenvainadas de *H. contortus* después del contacto *in vitro*, con el
extracto hidro-metanólico de *L. tridentata* en concentraciones de 100
mg/mL, con lecturas a 72 horas (10x).
- Figura 4.3.** Cutícula de una larva envainada de *H. contortus*, después del 74
contacto con la ivermectina 1% (izquierda) y con el extracto hidro-
metanólico de *G. sepium* (derecha), en concentraciones a 200 mg/mL con
lecturas a 72 horas (10x).
- Figura 4.4.** Daños en cutícula sobre larvas desenvainadas de *H. contortus*, 75
después del contacto *in vitro* con el extracto hidro-metanólico de *G.*
sepium en concentraciones de 100 (arriba) y 200 mg/mL (abajo) con
lecturas a las 48 horas (10x).
- Figura 4.5.** Estructura química de los compuestos bioactivos identificados en el 77
extracto acuoso de *L. tridentata*.
- Figura 4.6.** Estructura química de los compuestos bioactivos identificados en el 81
extracto acuoso de *G. sepium*.

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivos generales, evaluar la actividad nematocida *in vitro* de extractos hidro-metanólicos de *Larrea tridentata* D.C. y *Gliricidia sepium* (jacq.), y determinar la concentración (mg/g) de polifenoles condensados, hidrolizables y totales. Se realizó un análisis químico proximal en ambas plantas, posteriormente se determinó la concentración cuantitativa (mg/g) de polifenoles condensados (HCl-butanol), hidrolizables (Folin ciocalteau) y totales, donde se observó diferencia estadística ($P \leq 0.05$) para los extractos acuosos de *L. tridentata* comparado con *G. sepium*. Se evaluó la actividad nematocida (%), por medio de dos técnicas *in vitro* (larva envainada y larva desenvainada) en confrontación con extractos hidro-metanólicos de ambas plantas, donde se observó diferencia estadística ($P \leq 0.05$) de *G. sepium* sobre larva envainada a concentraciones de 200 mg/mL, con lecturas a 72 hrs (61.5 ± 20.4), con relación a la ivermectina (99.6 ± 0.7). Con larva desenvainada, *L. tridentata* presentó diferencia estadística ($P \leq 0.05$) a 24 y 48 hrs (74 ± 19.2 y 73 ± 6.1 , respectivamente) con relación a la ivermectina (100 ± 0.0 a 24 h y 99.6 ± 0.7 a 48 h), mientras que *G. sepium* a 200 mg/mL y lecturas a 72 hrs (93.8 ± 2.9), con relación a la ivermectina (99.3 ± 1.2), se calculó la concentración letal 50 (CL_{50}), para *L. tridentata* y *G. sepium*, con larva infectante envainada y desenvainada. Finalmente, se identificaron nueve compuestos bioactivos en el material vegetativo de *G. sepium*, mientras que en *L. tridentata* se identificaron seis compuestos bioactivos, posiblemente los responsables del efecto nematocida encontrado.

Palabras clave: Extracto acuoso, Extracto hidro-metanólico, *Gliricidia sepium*, *Larrea tridentata*, Larva infectante, *Haemonchus contortus*.

ABSTRACT

The objectives of this study, was to assess the nematicide activity *in vitro* of extract hydro-methanolic of two plants *Larrea tridentata* D.C. and *Gliricidia sepium* (Jacq.), and determine the concentration (mg/g) of condensed, hydrolyzable and total polyphenols. A proximal chemical analysis was performed on both plants, subsequently to identify the main bioactive compounds responsible the effect found. Statistical differences were observed ($P \leq 0.05$) for aqueous extracts of *L. tridentata* and *G. sepium*. The nematicide activity was evaluated (%) using two *in vitro* techniques (sheathed and unsheathed larva) of hydro-methanolic extracts of both plants. A statistical difference ($P \leq 0.05$) of *G. sepium* on sheathed larva at concentrations of 200 mg/mL was observed with readings at 72 hrs (61.5 ± 20.4) with respect to ivermectin (99.6 ± 0.7). With unsheathed larva, *L. tridentata* presented statistical difference ($P \leq 0.05$) at 24 and 48 hours (74 ± 19.2 and 73 ± 6.1 , respectively) relative to ivermectin (100 ± 0.0 at 24 hr and 99.6 ± 0.7 hr at 48 h), while *G. sepium* at 200 mg/ml and 72 hr readings (93.8 ± 2.9) compared to ivermectin (99.3 ± 1.2). The lethal concentration 50 (LC_{50}) for *L. tridentata* and for *G. sepium*, with sheated and unsheathed infective larvae was calculated. Finally, nine bioactive compounds responsible for the nematicide action were indentified for *G. sepium*, and six for *L. tridentata*.

Keywords: Aqueous extract, Hidro- alcoholic extract, *Gliricidia sepium*, *Larrea tridentata*, infective larvae, *Haemonchus contortus*.

1. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios, se secretan en la planta cuando ésta se encuentra en peligro, durante el ataque de bacterias, hongos e insectos o la defoliación por herbívoros, provocando una toxicidad aparente. Estos compuestos bioactivos no están involucrados en el metabolismo esencial de la planta, por lo tanto no son indispensables para ella ([Ramírez-Lozano, 2003](#); [Nabors, 2006](#)). Entre estos metabolitos secundarios se encuentran los polifenoles y los taninos, estos últimos son compuestos fenólicos poliméricos, con un sabor agrío astringente, los cuales se dividen en hidrolizables y condensados ([Church, 1988](#); [Santacoloma-Varón y Granados, 2012](#)). A estos compuestos se les han atribuido diversas cualidades como, antioxidantes, antivirales, antibacterianas, anticancerígenas, actividad antienzimática, antitímpanicas, antimutagénicas ([Ruiz-Martínez et al., 2011](#)) y efectos antiparasitarios ([Wolstenholme et al. 2004](#)).

Por otra parte, los nemátodos son gusanos que se encuentran ampliamente distribuidos, algunos son de vida libre, otros parasitan plantas y animales. Estos, son de gran importancia debido a la frecuencia y elevada morbilidad, generalmente son de curso crónico y la mayoría interfieren con el crecimiento ([Quiroz-Romero, 1990](#)). Estos son tratados con nematicidas los cuales, con el paso del tiempo, se ha observado que dejaron de ser efectivos, debido a que los organismos parásitos desarrollaron mecanismos de adaptación permanente y heredable ([Montalvo-Aguilar et al., 2006](#)), la dispersión y severidad de los mismos, se está incrementando rápidamente ([Anziani y Fiel, 2015](#)), ocasionando grandes pérdidas a los productores pecuarios.

Aunado a este problema, se optó por emplear alternativas, entre estas se encuentra el uso de los recursos naturales, para contener infecciones de parásitos nemátodos ([Hoste et al., 2008](#)).

Actualmente, existe evidencia de la efectividad de los metabolitos secundarios sobre los nemátodos gastrointestinales de rumiantes, aunque aún es necesario realizar otros estudios para dilucidar completamente el efecto de estos sobre el nemátodo, sobre el huésped ([Athanasiadou *et al.*, 2004](#); [Martínez-Ortiz de Montellano, 2010](#)) y sobre el consumidor final.

Finalmente, está claro el efecto antihelmíntico de varias plantas, contra los parásitos gastrointestinales más comunes de los rumiantes, efecto debido a los compuestos bioactivos presentes principalmente los taninos condensados, sin embargo, es necesario entender los modos de acción *in vivo* antes de patentar un producto y así mismo reducir la dependencia de los productos comerciales existentes ([Molan Abdul *et al.*, 2000](#); [Sandoval-Castro *et al.*, 2012](#)), al mismo tiempo ayudar a disminuir la resistencia de los animales a los nematicidas comerciales y sus efectos.

1.1. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades parasitarias, especialmente las ocasionadas por parásitos del género *Haemonchus spp.*, ocasionan grandes pérdidas al año en todos los ámbitos en animales destinados a la producción, al mismo tiempo el uso indiscriminado de los antiparasitarios tratando de solucionar estos problemas, ha ocasionado que estos parásitos adquieran mecanismos de adaptación permanente y heredable, a los antiparasitarios comerciales.

Ante esto se ha optado por utilizar tratamientos alternativos para combatir estos parásitos y tratar de controlar la resistencia adquirida a los diferentes antiparasitarios. Una de estas alternativas es el uso de plantas taniníferas en forma de extractos con potencial antihelmíntico.

Actualmente, existen pocas investigaciones referentes al uso de extractos de plantas para el control de parásitos de importancia en la producción pecuaria, así mismo, es necesario dilucidar el modo de acción de los compuestos bioactivos sobre los nemátodos, sobre el huésped y sobre el consumidor final.

1.2. OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la concentración cuantitativa de polifenoles condensados, hidrolizables y totales, presentes en extractos acuosos de *L. tridentata* y *G. sepium*.
- Evaluar el efecto nematicida *in vitro* de los extractos hidro-metanólicos de *L. tridentata* y *G. sepium*, en contra del nemátodo *H. contortus*.

1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el contenido nutricional de *L. tridentata* y *G. sepium*, mediante un análisis químico proximal.
- Evaluar el efecto nematicida *in vitro* de los extractos hidro-metanólicos de *L. tridentata* y *G. sepium*, en contra de larvas infectantes envainadas del nemátodo *H. contortus*.
- Evaluar el efecto nematicida *in vitro* de los extractos hidro-metanólicos de *L. tridentata* y *G. sepium* en contra de larvas infectantes desenvainadas del nemátodo *H. contortus*.
- Identificar, por medio de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a cromatógrafo de masas (HPLC/MS), los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos acuosos de *L. tridentata* y *G. sepium*, como responsables de la posible actividad nematicida.

1.3. HIPOTESIS

- ✓ Los extractos acuosos de *L. tridentata* y *G. sepium*, con mayor concentración de polifenoles condensados, hidrolizables y totales, tienen mayor efecto nematicida.

- ✓ Los extractos acuosos de *L. tridentata* y *G. sepium*, tienen altos contenidos de polifenoles totales.

- ✓ Los extractos hidro-metanólicos de *L. tridentata* y *G. sepium*, tienen efecto nematicida contra larvas infectantes envainadas y desenvainadas del nemátodo *H. contortus*.

- ✓ Los extractos acuosos de *L. tridentata* y *G. sepium*, contienen una amplia variedad de compuestos bioactivos, procedentes de diferentes familias.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS

Al conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo, se le conoce como metabolismo. Los metabolitos primarios, incluyen a los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, necesarios para el buen funcionamiento de la planta ([Ávalos García y Urría Carril, 2009](#)).

Muchas plantas sintetizan compuestos deletéreos, metabolitos secundarios, los cuales las protegen de la depredación de bacterias, hongos e insectos, provocando una toxicidad aparente, efectos causados por agentes secundarios, no involucrados en el metabolismo esencial (taninos, glucósidos cianógenos, saponinas, aminoácidos no proteínicos, lectinas, alcaloides, ácido oxálico, entre otros, [Nabors, 2006](#); [Ramírez-Lozano, 2003](#)). La biosíntesis de estos metabolitos secundarios se ve afectada por el estado acuífero y la temperatura ambiental ([Santacoloma-Varón y Granados, 2012](#)). Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases, terpenos (hormonas, pigmentos), compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos), glicósidos (saponinas, glicosidos cardiacos, glicosidos cianogénicos y glucosinolatos) y alcaloides ([Ávalos García y Urría Carril, 2009](#)).

En el grupo de los taninos condensados e hidrolizables, se engloban compuestos tales como, el ácido elágico que es un potente antioxidante, antiviral, antibacteriano y anticancerígeno; éste se obtiene de nueces, bayas, granadas, nueces y cascaras de uva, otro compuesto es el ácido tánico, es una molécula con propiedades antibacteriales, antienzimática, antioxidante, astringente, antimutagena, no es posible obtenerlo en grandes cantidades ([Ruiz-Martínez et al., 2011](#)). El ácido gálico es un poderoso antioxidante, antimicrobial y antiviral, encontrado en el té verde, ajo, frutas, patatas y nueces.

El metil galato y propil galato, antioxidante empleado en la síntesis de trimetropim ([Ruiz-Martínez et al., 2011](#)). La catequina, es un potente antioxidante, antiviral y antimicrobial en forma de galato de epigalocatequina, presente en vinos, frutas y algunos tés. La quercetina es un antioxidante bioactivo, antihistamínico y antiinflamatorio, encontrado en frutos, granos, vegetales, se utiliza para hacer tés. Los ácidos cinámico y el 2-hidroxicinámico, poderosos antioxidantes extraídos de las manzanas y las cascarras de cebollas rojas, tienen propiedades antihistamínicas, antiinflamatorias y anticancerígenas, los lignanos como el ácido nordihydroguaiarético, tienen propiedades antimicrobianas, antitumorales, antivirales y la inhibición de sistemas enzimáticos ([Vargas-Arispuro et al., 2005](#); [Ruiz-Martínez et al., 2011](#)).

2.2. FENOLES VEGETALES

Los compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides, derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo, en este grupo se encuentran las cumarinas, flavonoides, lignina y taninos ([Avalos García y Urría Carril, 2009](#)).

2.2.1. Los taninos

Existe un amplio grupo de compuestos secundarios que desempeñan diversas funciones de protección del ataque de patógenos o de organismos herbívoros, llamados polifenoles ([Santacoloma-Varón y Granados, 2012](#)). Entre los polifenoles se encuentran los taninos, un tanino es un glucósido de polipéptidos solubles en agua, son compuestos fenólicos poliméricos, con un sabor agrio astringente, confiere sabor y olor indeseable a los alimentos, afectan la utilización de las proteínas debido a que ligan a la lisina, haciéndola indisponible para los monogástricos, existen dos tipos de taninos, los hidrolizables y los condensados, diferenciados mediante sus estructuras y la

reactividad hacia los agentes hidrolíticos ([Church, 1988](#); [Ávalos García y Urria Carril, 2009](#)).

Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, los cuales no pueden ser hidrolizados, pero sí oxidados, por un ácido fuerte, para rendir antocianidinas. En concentraciones bajas precipitan las proteínas vegetales solubles, protegiéndolas contra la digestión en el rumen, pero si están firmemente ligadas no son digeridas en el intestino delgado, aumentando la absorción de aminoácidos y modifican la producción de gases (antitimpánico) ([McDonald *et al.*, 2011](#); [Santacoloma-Varón y Granados, 2012](#)). Los taninos hidrolizables, son polímeros heterogéneos, contienen ácidos fenólicos (ácido gálico y azúcares simples); más pequeños que los condensados, y estos se hidrolizan fácilmente ([Ávalos García y Urria Carril, 2009](#)).

Los taninos en grandes cantidades inhiben la actividad de algunas enzimas con lo que reducen la digestibilidad de las plantas ([Shimada, 2003](#)). Éstos reducen el valor nutritivo de la sustancia seca de los vegetales al reducir el consumo voluntario de pienso como la digestibilidad de los nutrientes ([Church, 1988](#)). También se le han atribuido efectos antiparasitarios, antimicrobianos, inhibidores del crecimiento bacteriano ([Molan Abdul *et al.*, 2000](#); [Wolstenholme *et al.*, 2004](#)).

La digestibilidad de la dieta con arbustos con alto contenido de taninos condensados se ve reducida, así como el balance de nitrógeno se ve afectado ([Ramírez-Lozano, 2003](#)). Así mismo, estos tienen diferentes efectos en los procesos de fermentación ruminal, posiblemente debido a su composición química (peso molecular, tipo de tanino) ([Tiemann-Tassilo *et al.*, 2006](#)). Aunque se ha encontrado que poblaciones microbianas en el rumen de cabras alimentadas con una dieta suplementada con la misma especie de ramoneo, pueden evolucionar y resistir los compuestos secundarios, aumentando la

degradación de los alimentos ricos en taninos ([Hoste et al., 2005](#); [Camacho et al., 2010](#)).

Por otra parte, los taninos condensados presentes en 3% de la materia seca se unen en parte a proteínas alimenticias, inhibiendo su degradación microbiana y favoreciendo el sobrepaso ruminal, mediante complejos proteína-taninos; así mismo se sabe que ejercen un efecto depresor sobre los parásitos gastroéntericos ([Shimada, 2003](#); [Torres-Acosta et al., 2008](#); [McDonald et al., 2011](#)).

Finalmente, se ha observado que los borregos infectados con nemátodos gastrointestinales, parecen ser atraídos al consumo de plantas taniníferas ([Martínez-Ortiz de Montellano et al., 2010](#)), esta es una ventaja importante, ya que estas plantas taniníferas mejoran la producción de carne y lana en borregos con infestaciones parasitarias severas ([Otero et al., 2004](#)). Por lo tanto, pudiera constituir una alternativa no solo para el control de los helmintos en los pequeños rumiantes, sino también para tratar enfermedades con importancia en la salud humana, alternativa reforzada, ya que los taninos condensados presentes no son desactivados, al ser adicionados en forma de extracto acuoso, además de conservar la condición corporal del animal ([Hoste et al., 2005](#); [Olmedo-Juárez et al., 2014](#)).

2.3. PLANTAS USADAS EN ESTE ESTUDIO

Se evaluó el material vegetativo de dos plantas, por una parte *Larrea tridentata* del desierto Chihuahuense y *Gliricidia sepium* del trópico mexicano por la otra, a continuación se describen cada una de ellas, así como principales estudios que se han realizado.

2.3.1. *Larrea tridentata*

Arbusto ramificado, perenne, xerófito, siempre verde, crece en zonas secas de México (Baja California, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas y Zacatecas). Soporta temperaturas de 14 a 28°C y en presencia de ocho meses de sequía, con climas muy áridos, con precipitaciones de 150 a 500 mm anuales, muy bien adaptada para sobrevivir en el desierto, llega a medir hasta tres metros de altura, es muy prolífica y territorialista, es conocida comúnmente como gobernadora, creosote (Creosote bush) o hediondilla ([CONABIO, 2016](#); [Lira-Saldivar, 2003](#)). Esta planta pertenece al Reino: *Plantae*, Filo: *Magnoliophyta*, Clase: *Magnoliopsida*, Familia: *Zygopyllacea*, Género: *Larrea* ([Brent, 1999](#); [CONABIO, 2016](#)).

Esta planta contiene en sus hojas terpenos, taninos, flavonoides, saponinas, ácido elágico, ácido tánico, ácido gálico, catequina, metil galato, ácido cinámico, ácido c2-hidroxinámico, resorcinol, lignanos fenólicos y monoterpenos volátiles, además contiene fitoestrógenos como, quercetina y kaempferol ([Lira-Saldivar, 2003](#); [Ruiz-Martínez et al., 2011](#); [Martins et al., 2012](#); [Gnabre et al., 2015](#)).

Las hojas, por su contenido de proteínas, son utilizadas para consumo animal, impregnadas de resina que contiene el lignano llamado ácido nordihydroguaiarético y 19 agliconas de flavonoides, algunos glicosidos flavonoides y aceites esenciales, compuestos que se le han atribuido efectos fungicidas, insecticidas, antioxidante, antiamebico, antineoplásico, antiinflamatorio y antiherpes ([Brent, 1999](#); [Gnabre et al., 2015](#); [CONABIO, 2016](#)), y estudios recientes contra el virus de la inmunodeficiencia humana, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y los síntomas del envejecimiento ([Gnabre et al., 2015](#)).

En la medicina tradicional se ha utilizado como emético, diurético, expectorante, para tratar quemaduras, ayuda a perder peso y “purificador” de la sangre. También para tratar dolencias que van desde infecciones del tracto respiratorio superior, influenza, diarrea, infecciones del tracto urinario, acné, psoriasis, caspa, hepatitis, tuberculosis, calambres menstruales, dolor en el pecho, dolores de dientes, y lesiones cutáneas venéreas, como inhibidor de las ansias de tomar alcohol, tratamiento para la varicela, tratamiento para mordeduras de serpiente, tratamiento de la hepatitis, aunque se encontró que su uso crónico puede causar hepatotoxicidad química ([Brent, 1999](#)).

Por otra parte, se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo*, relacionados con efecto ixodicida de los metabolitos secundarios contenidos en esta planta, un estudio *in vitro* donde usaron extractos hidro-alcohólicos a diferente concentración, tres aplicaciones y seis lecturas (1/2, 2, 4, 24, 48 y 72 horas) de *L. tridentata*, reveló diferencia estadística del efecto letal contra *Amblyomma cajennense*, acción similar al amitraz que fue usado como testigo ([Rodríguez-Arvizu, 2006](#)). Así mismo, en la costa de Oaxaca se realizó un estudio *in vivo* en bovinos de raza cebú, donde usaron esta planta a diferente concentración (10, 25, 50 y 75%) como atomizador, contra garrapatas *Amblyomma cajennense* y *Boophilus micropilus*, encontraron diferencia estadística del efecto letal contra las garrapatas en un lapso de 24 horas, comparado con el efecto del amitraz ([Salinas-Zárate, 2010](#)).

Otro estudio demostró que el extracto etílico (acetato de etilo) de las hojas de esta planta, tienen un efecto antibacterial sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, con una concentración mínima inhibitoria de 31.3 µg/mL, considerada baja, en comparación con el control tetraciclina (64 µg/mL) ([Martins et al., 2013](#)).

También se ha evaluado el efecto antifúngico *in vitro*, relacionado con el metil-ácido nordihydroguaiarético, sobre *Aspergillus flavus* y *Aspergillus*

parasiticus donde se observó inhibición del crecimiento micelial de ambos hongos a una concentración de 300 µg/mL y a 500 µg/mL, se observó eficacia completa al parecer este compuesto puede tener un potencial biopesticida como agente de control de aflatoxina ([Vargas-Arispuro et al., 2005](#)).

En conclusión, *L. tridentata* puede representar buena opción para enfrentar plagas y enfermedades infecciosas de gran importancia, ya que es fuente primordial de fitoquímicos bioactivos, además es biodegradable, y al parecer relativamente tóxico, para humanos, animales y el medio ambiente ([Lira-Saldivar, 2003](#)).

2.3.2. *Gliricidia sepium*

Es un arbusto caducifolio de fácil adaptación a diversas condiciones ambientales, de uso frecuente como cerca viva o sombra, se ha usado en la alimentación de rumiantes, suplementando al pastoreo o en sistemas agrosilvopastoriles junto con gramíneas ([Cuervo-Jiménez et al., 2013](#)), es nativo de las zonas bajas de México y partes secas de América central, principalmente en clima subhúmedo, con temperaturas de 20 a 30°C y precipitación anual de 500 a 2300 mm anuales y cinco meses de periodo seco. Se extiende desde el sur de México (Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Nayarit, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Yucatán y Veracruz), América central, Colombia y Venezuela, presenta una alta capacidad adaptativa, llega a medir de dos hasta 10 metros, también se le conoce como cacahuanano, frijolillo, cacahuananche, madre cacao ([CONABIO, 2016](#)). Esta planta pertenece al Reino: *Plantae*, Clase: *Magnoliopsida*, Orden: *Fabales*, Familia: *Fabaceae*, Género: *Gliricidia*, Especie: *Sepium*.

Este árbol contiene altos contenidos de polifenoles (taninos condensados) y saponinas, debido a una mayor actividad del metabolismo

vegetal en condiciones de alta conductividad eléctrica (mayor concentración de sales solubles en el suelo) ([Santacoloma-Varón y Granados, 2012](#)).

Entre los diversos estudios de esta planta, se encuentra la aplicación por aspersión de extractos acuosos como alternativa para el control de plagas del maíz, principalmente insectos que dañan tanto la planta como la mazorca, así como insectos benéficos a la planta de maíz, donde se encontraron una reducción en el daño de las hojas recién formadas y un efecto positivo en el rendimiento, pero no afectó la población de ambos insectos, esto puede ser debido a propiedades repelentes de insectos, y por lo tanto, se puede usar para reducir el daño al maíz ([Montes-Molina et al., 2008](#)).

Así mismo, se ha evaluado la posible actividad bactericida o bacteriostática *in vitro* de esta planta, contra 12 bacterias gram positivas y gram negativas en extractos, acuoso, metanólico y clorofórmico, donde se encontró un efecto bactericida de esta planta en extracto metanólico contra cinco de las 12 cepas bacterianas estudiadas, a una concentración de 200 µg ([Salud-Pérez et al., 2001](#)).

Por otra parte, se han realizado estudios *in vitro* que han mostrado la actividad de esta planta sobre el nematodo hematofago *H. contortus*, efectos que se le atribuye a las saponinas y taninos principalmente, que se encuentran presentes en las hojas ([Pérez-Pérez et al., 2014](#)). Se han usado extractos acetónicos ([Wabo-Poné et al., 2011](#)), acuosos ([Puerto-Abreu et al., 2014](#)) y metanólicos ([Pérez-Pérez et al., 2014](#)). Se han evaluado, los efectos de esta planta sobre la eclosión de huevos y la migración larvaria, con efecto letal a una concentración media de 30.7 mg/mL ([Puerto-Abreu et al., 2014](#)) así mismo, la estimulación del desenvaine de *H. contortus* a una concentración de 300 µg/mL, esta planta solo redujo la motilidad de la larva ([Von-Son de Fernex et al., 2012](#)).

Otro estudio *in vitro* realizado con dos extractos, etanólico y acetato de etilo, sobre huevo, pupa y larva del mosquito *Anopheles stephensi*, se encontró una mayor mortalidad sobre larva con extracto etanólico a una dosis de 250 ppm con 96% de efectividad, y sobre huevo el extracto de acetato de etilo mostró mayor actividad a una concentración de 25 ppm con una efectividad del 87.64%, mientras que sobre pupa el extracto etanólico a 100 ppm, tuvo un 91.10% de mortalidad, se puede concluir que el extracto de hoja de esta planta posee actividad contra el mosquito *Anopheles stephensi*, en sus estadios de huevo, larva y pupa ([Krishnappa et al., 2012](#)).

Se ha evaluado el efecto de esta planta contra el acaro *Tetranychus cinnabarinus* en forma de extracto etanólico de hojas, en concentraciones al 5, 10, 15 y 20%, usando la técnica de inmersión, donde encontraron que en concentraciones al 5% la tasa de ovoposición disminuye un 57%, mientras que en concentraciones al 10% hay una mortalidad de 72.5% de ácaros adultos, y en concentraciones de 20% encontraron el 100% de mortalidad, efecto atribuido a los alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos, aceites esenciales y saponinas presentes. Por lo tanto esta planta se considera como alternativa para el control de los ácaros de interés en la agricultura ([Sivira et al., 2011](#)).

Finalmente, estos resultados *in vitro*, sugieren que esta planta posee propiedades antiparasitarias, que podrían valorarse para estudios posteriores *in vivo* ([Puerto-Abreu et al. 2014](#)).

2.4. LA HEMONCOSIS EN PEQUEÑOS RUMIANTES

Los nemátodos o gusanos redondos, son pequeños, presentan una piel dura (cutícula), estos se pueden encontrar en piel, riñones, pulmones, vejiga urinaria, sistema nervioso, sangre y muy comúnmente en sistema digestivo ([Shapiro, 2010](#)). Estos nemátodos gastrointestinales afectan considerablemente la producción animal, sobre todo en animales jóvenes cuando su estado

nutricional es deficiente, ocasionando grandes pérdidas por la disminución en las ganancias de peso, y en ocasiones la muerte de los animales en casos de parasitosis masivas ([Flores-Crespo et al., 2003](#)). Los nemátodos gastrointestinales del familia *Trichostrongylidae* causan parasitismo en los pequeños rumiantes ([Fontenot et al., 2003](#)), dentro de los mismos, *Haemonchus contortus* es el parásito más frecuente y de mayor patogenicidad en los pequeños rumiantes ([Waruiru et al., 2001](#)).

Los nemátodos del género *Haemonchus spp.*, se encuentran alojados en el abomaso de rumiantes, tienen gran importancia económica debido a las pérdidas que ocasionan ([Quiroz-Romero, 1990](#)), las especies de mayor importancia son, *Haemonchus similis* afecta principalmente a los bovinos, mientras *Haemonchus contortus* tiene alta predisposición a los pequeños rumiantes y numerosos rumiantes silvestres y *Haemonchus placei* tiene disposición para huéspedes heterólogos, aunque es posible encontrar infecciones mixtas, el huésped tiene la capacidad de eliminar la especie de parásito que no esté adaptada, debido a la inespecificidad hospedadora ([Achi et al., 2003](#); [Rojas et al., 2012](#)). Este nematodo pertenece al Phylum: *Nematoda*, Clase: *Secermentea*, Orden: *Strongylida*, Género: *Haemonchus*, Especie: *Contortus* ([Quiroz-Romero, 1990](#)).

La hemoncosis se considera la enfermedad parasitaria más importante en rebaños de pequeños rumiantes en zonas tropicales y subtropicales ([Quiroz-Romero, 1990](#)). La fluctuación de infecciones aumentan con la temporada, al principio de la época de lluvias, cuando hay abundancia de pastos, mayor porcentaje de humedad, elevadas temperaturas, así como el aumento en la transpiración de las plantas, favorece la migración de la larva infectante del estiércol a las aspas del césped, por lo tanto, existe mayor índice de infección, independientemente del manejo y la estrategia de control ([Liebano-Hernández et al., 1998](#); [Arece-García et al., 2007](#); [Amaradasa et al., 2010](#); [Santos et al.,](#)

[2012](#)). La cría extensiva en pastos mixtos, predispone a un mayor índice de infección ([Achi et al., 2003](#)).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado la presencia de este parásito en unidades de producción de diferentes zonas del país, [Martínez-Santiago](#) (2014), encontró la presencia de huevos de *H. contortus* hasta en 74% de las explotaciones estudiadas en pequeños rumiantes bajo sistemas de producción extensivo en el estado de México. Resultados similares fueron encontrados en explotaciones caprinas de las zonas áridas de México, donde la importancia radica en que este parásito afecta directamente la producción del animal ([Aquino-Ozuna, 2012](#); [Córdova-Guillén, 2012](#); [Sánchez-López, 2012](#)); debido a que este parásito es hematófago y presenta un alto potencial reproductivo, desarrollándose en grandes cargas parasitarias que se pueden incrementar en las épocas secas y calurosas, pudiendo provocar la muerte de los animales susceptibles ([Montalvo-Aguilar et al., 2006](#)), además de causar daños severos en la mucosa abomasal, anemia, disturbios en la digestión, hipoproteinemia y diarrea ([Soulsby, 1987](#); [Rodríguez-Vivas, 2005](#); [Torres-Vásquez, et al., 2007](#)), afecta directamente la producción, debido a que los nutrientes ingeridos por el huésped, se utilizarán para contrarrestar los efectos fisiopatológicos producidos por la infección parasitaria, que en una situación favorable se usaría para producción ([Knox et al., 2006](#)).

Como una reacción autocurativa en infecciones severas, infecciones crónicas o en reinfecciones en ovinos, los anticuerpos séricos aumentan, IgG e IgM por la presencia de huevos de parásitos e IgG e IgA por la presencia de larvas, creando a largo plazo resistencia a este parásito. Donde IgA es la responsable de la expulsión de parásitos adultos y puede estar más involucrada en la reacción de autocuración o resistencia ([Charley-Poulain et al., 1984](#)).

Finalmente, se sabe que la variedad de nemátodos gastrointestinales que afectan a los caprinos son múltiples y se conocen sus ciclos biológicos, hay

evidencias sobre la inmunidad de los rumiantes contra los nemátodos gastrointestinales, sin embargo; los mecanismos inmunológicos que usan los caprinos son diferentes a los que usan los ovinos ([Aguilar-Caballero et al., 2008](#)).

2.4.1. Ciclo de vida del nemátodo *Haemonchus contortus*

El ciclo biológico de los nemátodos se divide en dos, una fase exógena (fuera del hospedero) y una fase endógena (dentro del hospedero), en la fase exógena involucra desde huevo, larva uno, larva dos y larva infectante con vaina, la fase endógena involucra larva infectante sin vaina, larva cuatro y adultos (Figura 2.3) ([Hoste et al., 2012](#)). A continuación una breve descripción de las principales estructuras que conforman el nemátodo y el ciclo biológico, como tal.

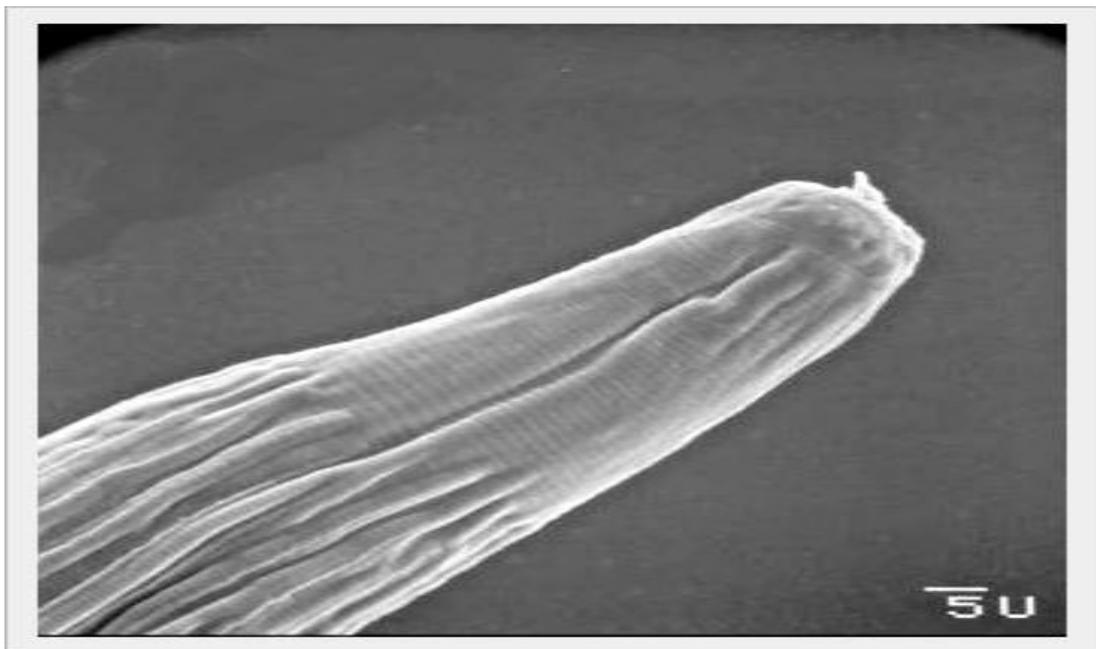


Figura 2.1. Cápsula bucal de *Haemonchus contortus*, se observa el diente o lanceta (Imagen tomada de [Martínez-Ortiz de Montellano, 2010](#)).

El macho de *H. contortus* mide de 10 a 20 mm de largo y la hembra de 18 a 30 mm de largo, un parásito adulto se calcula que consume diariamente

hasta 0.05 ml de sangre, posee una pequeña cápsula bucal con un delgado diente o lanceta (Figura 2.1) que se origina en el lado dorsal de la base, que le sirve para perforar la mucosa abomasal hasta las glándulas intestinales. Infiltra sustancias anticoagulantes alrededor de la ulcera para succionar sangre; al cambiar de sitio de alimentación, la ulcera continua sangrando, favoreciendo la pérdida de sangre ([Quiroz-Romero, 1990](#); [Shapiro, 2010](#)).



Figura 2.2. Vulva y bolsa copulatriz (100x) de *Haemonchus contortus* (Imágenes tomadas de [Martínez-Ortiz de Montellano, 2010](#)).

Las papilas cervicales son prominentes y tienen forma de espinas. La bolsa copulatriz tiene grandes rayos laterales y el dorsal es pequeño y asimétrico en forma de Y invertida. Las espículas son relativamente cortas, hay papilas prebursales y posee gubernáculo. La vulva está en la parte posterior del cuerpo y está cubierta de un prominente labio (Figura 2.2) ([Quiroz-Romero, 1990](#)).

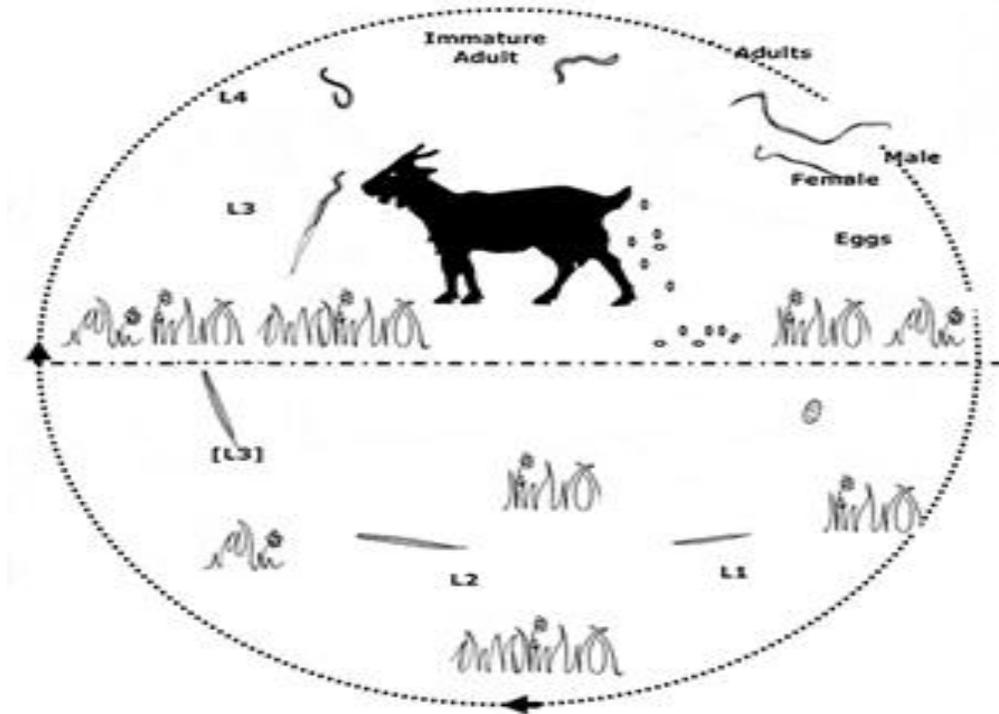


Figura 2.3. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus* (Modificado de [Hoste et al., 2012](#)).

Los huevos salen en las heces en estado de mórula. Con niveles de humedad, temperatura y oxígeno adecuados, eclosiona a larva uno (L₁) en alrededor de uno o dos días, se alimenta, muda a larva dos (L₂) y larva tres (L₃) o infectante, todo esto en el lapso de una semana. La larva tres, conserva su muda (vaina), ya no se alimenta y permanece en letargo en espera de ser ingerida por el huésped susceptible, su supervivencia se condiciona por la temperatura ambiente, reserva alimenticia, humedad y depredación por otros animales. Las larvas tres después de ser ingeridas llegan al rumen, y por acción de enzimas gástricas pierden la vaina, pasan al abomaso y permanecen en letargo por tres o más meses, llamado hipobiosis o larva tipo 14, con desarrollo detenido. La larva sin vaina en el abomaso, muda a larva cuatro o etapa preadulta, empieza a alimentarse en mucosa intestinal o abomasal, posteriormente muda a larva cinco (L₅) o adulta, alcanzando ya su madurez sexual todo esto en un periodo de 15 a 21 días (periodo prepatente), la hembra

adulta empieza a ovopositar y produce entre 5 000 y 10 000 huevos por día (Figura 2.3) ([Quiroz-Romero, 1990](#); [Shapiro, 2010](#)).

2.5. TRATAMIENTO ANTIHELMÍNTICO

Los antihelmínticos son utilizados para el tratamiento de gusanos redondos, ubicados en el tracto gastrointestinal, respiratorio y ocasionalmente en el circulatorio ([Sumano y Ocampo, 2006](#)).

Los antihelmínticos utilizados para controlar a los nemátodos se clasifican según su modo de acción y se agrupan en tres familias principales, antihelmínticos de amplio espectro: los benzimidazoles (albendazol, febendazol, oxibendazol, ricobendazol) y pro-benzimidazoles; el imidiazotiazol (levamisol) y tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel) y por último las lactonas macrocíclicas (ivermectinas, abamectina, doramectina y eprinomectina) y milbemicinas (moxidectina) ([Ahoussou-Sylvie, 2007](#); [Martínez-Ortiz de Montellano, 2010](#); [Anziani et al., 2015](#)).

En ovinos, además de los anteriores, se utiliza un cuarto grupo de amplio espectro, el de los aminoacetónitrilos cuyo único miembro es el monepantel. Se encuentran también disponibles nematodocidas de espectro reducido (*Haemonchus spp.*) como el grupo de las salicinalidas (closantel nitroxinil y rafoxanide) ([Anziani et al., 2015](#)).

2.6. RESISTENCIA A LOS NEMATOCIDAS CONVENCIONALES

Las enfermedades parasitarias causan las mayores pérdidas económicas en los productores de pequeños rumiantes ([Martínez-Santiago, 2014](#)). En la actualidad algunos nematocidas químicos dejaron de ser efectivos, pero no por el producto en sí, sino por los parásitos que desarrollaron mecanismos de adaptación permanente y heredable ([Montalvo-Aguilar et al., 2006](#)). Así,

diversos estudios han demostrado que las poblaciones de nemátodos de los herbívoros domésticos han desarrollado resistencia a los antihelmínticos y la dispersión y severidad de la misma se está incrementando rápidamente ([Anziani et al., 2015](#)).

[Rojas](#) (2007), encontró la presencia de resistencia antihelmíntica de *Haemonchus spp.* y *Trichostrongylus spp.*, al levamisol en bovinos; mientras que [Campos-Ruelas et al.](#) (1990), encontraron por primera vez en México, resistencia de *Haemonchus contortus* a los bencimidazoles en ovinos Pelibuey.

Tiempo después, en un estudio realizado en Veracruz con borregos de pelo encontraron resistencia de *H. contortus* al sulfóxido de albendazol y este mismo parásito sensible al levamisol, este tipo de resistencia ocurre cuando los nemátodos resistentes a un antihelmíntico también lo son a compuestos pertenecientes al mismo grupo químico, aunque nunca hayan estado expuestos, se conoce como resistencia lateral ([Figueroa-Castillo et al., 2000](#)). Una de las causas de esta resistencia, es el alto porcentaje de productores que usan dosificaciones incorrectas de antihelmínticos, ya sea porque éstas se suministran en épocas inadecuadas, en grupos inapropiados de animales, porque se utilicen productos ineficaces contra parásitos, o porque los productores no llevan un control de desparasitaciones de sus animales ([Rivera-Portillo, 2000](#); [Márquez-Laca, 2003](#)). También es necesario realizar muestreos coprológicos para determinar la efectividad del antihelmíntico usado y poder identificar si existe resistencia al principio activo ([Rivera-Portillo, 2000](#); [González-Colín, 2002](#)).

Por otra parte, el antiparasitario es un recurso necesario pero no renovable, en la medida que la resistencia va avanzando progresivamente sobre los más modernos grupos químicos disponibles. No existe antiparasitario “resistente” a la resistencia, por lo tanto, el tiempo del control “fácil y práctico” ha expirado. Cada vez es más importante integrar distintas y a veces más

complicadas estrategias de control para lograr los mismos resultados ([Nari, 2001](#)).

La resistencia antihelmíntica, es de grán preocupación debido al gran impacto que las parásitosis puedan tener sobre la salud y el bienestar de los rumiantes y de su producción, pérdida de peso y disminución de rendimientos de carne y leche. Estos parásitos son capaces también de poner en peligro el rendimiento reproductivo, siendo causa de alta morbilidad y mortalidad ([Mavrogianni et al., 2011](#)).

Para contrarrestar los efectos de la resistencia se optó por emplear alternativas, entre estas tenemos el uso de tratamientos naturales holísticos, esta se apoya de los recursos naturales para contener infecciones de parásitos nemátodos en ovejas y cabras ([Hoste et al., 2008](#)). También como una buena opción en la población rural de bajos recursos que depende de la agricultura y de otras actividades relacionadas con ella para obtener su sustento, donde las poblaciones de ganado se desenvuelven en agostaderos y en raras ocasiones reciben tratamientos con algún fármaco ([Espinoza-Villavicencio et al., 2007](#)). Con esto, se espera contribuir a fortalecer los programas sanitarios en contra de nemátodos parásitos que afectan a los rumiantes en esas condiciones ([Vásquez-Pineda et al., 2012](#)).

El uso de alternativas químicas y no-químicas, junto con el monitoreo permanente para el diagnóstico y manejo de la resistencia, como una estrategia para mantener un balance entre productividad y sustentabilidad en el control de los nemátodos gastrointestinales en rumiantes ([Muchiut et al., 2013](#)).

Al mismo tiempo, es necesario concientizar a los productores para establecer programas sanitarios de desparasitación interna usando antiparasitarios efectivos y amigables con el animal ([Juárez-Angeles, 2009](#)), así mismo reducir la dependencia a las drogas antihelmínticas, como único método

de control contra los nemátodos gastrointestinales ([Torres-Acosta et al., 2012](#)), todo esto en conjunto con prácticas de pastoreo y manejo, adecuadas a la estación climática del año ([Amaradasa et al., 2010](#)). Por lo tanto, es necesario realizar los máximos esfuerzos para desarrollar, validar y utilizar sistemas de control integrado de parásitos, a efectos de contrarrestar los efectos producidos por la resistencia ([Nari, 2001](#)). Y obtener cada vez más beneficios que mejoren la economía de los productores, y así ofrecer animales sanos y más productivos ([Rivera-Portillo, 2000](#)).

Finalmente, cada vez es más común encontrar que las cepas de nemátodos gastrointestinales sean resistentes a las drogas antihelmínticas comerciales. Al mismo tiempo, se ha encontrado evidencia del efecto antihelmíntico que pueden tener las sustancias bio-activas provenientes de las plantas taniníferas. ([Torres-Acosta et al., 2008](#)). Por lo tanto, es necesario identificar a las plantas con efectos antihelmínticos y poder ayudar a construir un enfoque integrado y sostenible para el manejo de nemátodos gastrointestinales en rumiantes ([Alonso-Díaz et al., 2008](#)). Es necesario usar de forma selectiva los tratamientos antihelmínticos, estos combinados con otras alternativas de control de nemátodos gastrointestinales, o de forma contraria la sustentabilidad de las próximas moléculas de antihelmínticos no serán viables ([Torres-Acosta et al., 2012](#)).

2.7. ESTRATEGIAS DE CONTROL ALTERNATIVO CONTRA LAS PARÁSITOSIS EN LOS RUMIANTES

Ante los problemas de resistencia a los antihelmínticos, se están buscando estrategias alternativas para el control de las parásitosis en los rumiantes ([Knox-David et al., 2003](#)). Entre estas están, el uso de los antihelmínticos de naturaleza orgánica (plantas taniníferas), control nutricional, la selección genética, pastoreo con otras especies domesticas (efecto aspiradora), control de los potreros, agujas de óxido de cobre, vacunación,

control biológico, con la ventaja de ser totalmente inocuos para plantas, animales y el hombre y su impacto sobre el medioambiente, al reducir el uso de antihelmínticos de naturaleza química los convierten en una invaluable herramienta de control biológico de las parasitosis gastrointestinales en rumiantes ([Athanasiadou et al., 2004](#); [Stear et al., 2007](#); [Arroyo-Balán et al., 2008](#); [Aguilar-Marcelino, 2012](#)).

El uso de plantas taniníferas para el control de las parasitosis gastrointestinales, se han experimentado de forma *in vitro* e *in vivo*, en diferentes especies domésticas, donde se ha evaluado la inhibición de la eclosión de huevos, reducción en el conteo de huevos en heces, inhibición de la migración larvaria, condición corporal del huésped, motilidad larvaria, aunque está claro el efecto antihelmíntico de varias plantas, aún falta por esclarecer el modo de acción sobre el huésped y el parásito, entre diferentes especies de plantas, diferentes especies de parásitos y en diferentes especies animales, antes de comercializar el principio activo y así, llegar a ser una alternativa de manejo sostenible contra helmintos ([Sandoval-Castro et al., 2012](#)).

Por otra parte, el estado nutricional de los animales puede influir sobre la inmunidad a los parásitos, animales con una mejor suplementación (proteína, energía o ambas), sobre el consumo voluntario de alimento por periodos de entre 5 y 7 meses, para estaciones húmedas y secas, respectivamente ([Hoste et al., 2005](#)). Éstos son más resistentes a la carga parasitaria por helmintos, lo que se conoce como “inmunidad nutricional” o “inmunidad adquirida”, consiste en proporcionar el alimento en cantidades suficientes para satisfacer sus necesidades de mantenimiento y luego proporcionar nutrientes adicionales para compensar los efectos fisiopatológicos por los parásitos, con el fin de acelerar las actividades inmunomoduladoras del huésped, y así desencadenar la respuesta inmune, ocasionando la resiliencia y resistencia ([Behnke et al., 2006](#); [Knox et al., 2006](#); [Athanasiadou et al., 2008](#); [Marume et al., 2011](#)). El fundamento de este enfoque es seleccionar los animales que se adapten, y por

lo tanto, su capacidad de recuperación sea más rápida a la infección por parásitos ([Hoste et al., 2005](#)).

Sin embargo, otros estudios han demostrado que el genotipo tiene influencia positiva sobre el grado de infestación parasitaria en el huésped, fenómeno conocido como haemocotolerancia, algunas razas autóctonas y animales procedentes de climas calurosos con elevado porcentaje de humedad ambiental, han desarrollado y expresado una fuerte resistencia y capacidad de recuperación (resilientes), a las altas cargas de nemátodos gastrointestinales, esto puede ser debido a un rasgo de supervivencia en condiciones de intensas y constantes presiones de infección del parásito, debido a la presencia de variabilidad genética con correlaciones positivas a la carga parasitaria ([Costa et al., 2000](#); [Behnke et al., 2006](#); [Marume et al., 2011](#)). Una vez identificados los genes, es posible usar marcadores genéticos para la creación de programas de mejoramiento genético, transferir los alelos, fijar esta característica y así desarrollar una raza más productiva ([Behnke et al., 2006](#)). Así mismo el sexo de los animales influye sobre la carga parasitaria, al parecer las hembras muestran menor carga parasitaria que los machos ([Sánchez-López, 2012](#)).

Así mismo, el pastoreo mixto consiste en alojar en el mismo potrero a dos especies animales (cabras, bovinos, ovinos), con el objetivo de reducir las cargas parasitarias en los pastos (“descontaminación” de los pastos), y así reducir los huevos por gramo de heces, ya que ciertos parásitos tienen especificidad hacia ciertas especies animales, aunque es necesario hacer estudios con otras especies de ganado, además de incluir otras alternativas en estos estudios como la tarjeta FAMACHA ([D’alexis et al., 2012](#); [Marshall et al., 2012](#)). Por otra parte, en el pastoreo rotacional se usa el cerco eléctrico para dividir los potreros, con el fin de proporcionar un correcto periodo de descanso, con el objetivo de lograr el rebrote requerido del pasto ([Barger et al., 1994](#)). Esto influye sobre el grado de infestación parasitaria, cuando el forraje se encuentra a poca altura (sobrepastoreo), los animales se ven obligados a

pastorear a ras de suelo cerca de sus excretas, y esto aumenta las probabilidades de ingerir larvas infectantes. Es necesario aumentar los periodos de descanso de las praderas mayor a dos meses, ya que la longevidad de las larvas infectantes puede ser mayor a cuatro semanas, la capacidad infectante del parásito va disminuyendo y el pasto toma mayor altura ([Vásquez-Hernández et al., 2006](#)).

Así mismo, el uso de agujas de óxido de cobre tiene un efecto antihelmíntico con una eficacia curativa, la vía de administración es oral mezclada con el alimento o en forma de cápsulas de gel, presenta una disminución de 75% hasta 90%, sobre cargas de *H. contortus* y por lo tanto disminuye la producción de huevos, finalmente se considera como alternativa para reducir la dependencia a los antihelmínticos convencionales ([Chartier et al., 2000](#); [Burke et al., 2010](#); [Soli et al., 2010](#)).

Otra alternativa de control de nemátodos son las vacunas, donde el nemátodo al hacer contacto con el hospedero durante la infección, libera productos de excreción y secreción (antígenos naturales H11, H-gal-GP, proteínas integrales de membrana), expresados en las microvellosidades del intestino del nemátodo o antígenos de superficie presentes en la cutícula del nemátodo, considerados para la elaboración de vacunas, debido a que estas glicoproteínas inducen la respuesta inmune durante la infección, actividades inmunoregulatoras que disminuyen las cargas parasitarias desde 70 a 90%. Se han probado formas recombinantes de estas proteínas o cocteles de antígenos (vacunas recombinantes multicomponente), aunque falta por hacer ([Knox-David et al., 2003](#); [Bassetto et al., 2015](#); [Tak et al., 2015](#)). Esta alternativa ha sido usada en forma experimental en algunas partes del mundo en ovejas, cabras y recientemente en bovinos, con resultados prometedores ([Bassetto et al., 2015](#)). En poco tiempo se espera tener una vacuna comercial a base de antígeno natural H11 ([Tak et al., 2015](#)).

Entre los métodos de control biológico, se encuentran la utilización de las clamidosporas de hongos nematofagos (*Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium eudermatum*, *Arthrobotrys oligospora*, *Clonostachys rosea*), su efecto se limita a capturar, destruir y alimentarse de las fases larvales de los nemátodos en las heces, por lo tanto, el ciclo biológico del parásito se ve alterado ([Mendoza de Gives et al., 1994](#); [Arroyo-Balán et al., 2008](#)). Estas clamidosporas se pueden suministrar como suplemento en forma de comprimidos multinutricionales, la dosificación es dependiente del conteo de huevos por gramo de heces, y se ha observado una disminución de la población de *H. contortus* (en sus diferentes fases larvales) en las heces de hasta un 70% en ovinos en confinamiento ([Ojeda-Robertos et al., 2008](#); [Aguilar-Marcelino, 2012](#)), y por lo tanto disminuye considerablemente la carga de larva infectante sobre las pasturas en sistemas de pastoreo ([Fontenot et al., 2003](#)). El uso de cepas bacterianas experimentales *in vitro* de *Bacillus thuringiensis*, *Comamonas aquatica* y *Pasteuria penetrans*, sobre estadios evolutivos de vida libre de *H. contortus*, *Rhabditis spp.*, *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita*, al parecer la bacteria muestra capacidad de adosamiento a la cutícula de los diferentes estadios evolutivos del nemátodo, alternativa usada como método de control biológico, para contribuir a disminuir la prevalencia de nemátodos gastrointestinales de vida libre a mediano plazo, y así ayudar a mitigar los problemas de resistencia de tipo múltiple a los antihelmínticos ([Aguilar-Marcelino, 2012](#); [Vásquez-Pineda et al., 2012](#)). También el acaro *Lasioseius penicilliger* muestra un comportamiento depredador, con porcentajes de reducción desde un 64.3% hasta un 80%, para las especies *H. contortus* (L₃), *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis spp.*, alternativa como agente potencial de control biológico de los nemátodos de animales y plantas ([Aguilar-Marcelino, 2012](#)). Así mismo, un estudio *in vitro* afirma la capacidad de nemátodos depredadores con comportamiento “caníbal”, tal es el caso del nemátodo del género *Blutarius spp.*, sobre poblaciones de nematodos “presa” del género *H. contortus*, *Panagrellus redivivus* y *Rhabditis spp.*, donde el primero mostró afinidad sobre *H. contortus* y *P. redivivus*, reduciendo sus poblaciones en un 92

y 81%. Mientras que la población de *Blutarius* aumento en 132 y 268 veces, respectivamente ([Aguilar-Marcelino, 2012](#)).

En conclusión la utilización y aplicación de estas estrategias se deben considerar como una alternativa adicional, y crear sinergismos con otras alternativas, con la finalidad de controlar las parásitosis generadas por los nemátodos gastrointestinales, aunque cada método tiene ventajas y desventajas, cada granja debe adoptar la combinación más adecuada según sus condiciones locales ([Stear *et al.*, 2007](#); [Aguilar-Marcelino, 2012](#)).

2.8. USO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS, COMO TRATAMIENTO A LAS NEMATODIASIS EN RUMIANTES

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la efectividad de los metabolitos secundarios de diversas plantas sobre los nemátodos gastrointestinales, aunque aún no se tienen muy claro las propiedades antinutricionales, los efectos benéficos sobre el animal, el modo de acción sobre los diferentes estados del parásito, y además es necesario realizar una evaluación simultanea de costo-beneficio ([Athanasiadou *et al.*, 2004](#); [Martínez-Ortiz de Montellano, 2010](#)).

2.8.1. Estudios *in vitro*

Se han realizado diversos estudios *in vitro* sobre diferentes parásitos, estadíos, solventes, concentraciones, diferentes plantas y partes de plantas.

Estudios donde se confrontan (*In vitro*) los extractos de plantas con diferentes parásitos, entre estos se encuentran el efecto de la inhibición de la migración larvaria ([Molan Abdul *et al.*, 2000](#); [Hernández-Orduño *et al.*, 2008](#); [Moreno *et al.*, 2010](#)), este efecto es dependiente de la concentración usada y se atribuye principalmente a los taninos condensados presentes ([Molan Abdul *et*](#)

[al., 2000](#); [Alonso-Díaz et al., 2008](#)). También se ha evaluado el efecto de los extractos de plantas contra larvas infectantes ([Olmedo-Juárez et al., 2014](#)), inhibición del desenvaine de larvas infectantes ([Ortiz-Ocampo et al., 2016](#)), nemátodos en estado adulto ([Nyla-Jabeen et al., 2015](#)), inhibición en la eclosión de huevos ([Pérez-Pérez et al., 2014](#)).

Al mismo tiempo se han evaluado la efectividad de diferentes solventes para la elaboración de los extractos, entre los principales están acetónico, metanólico, hexánico ([Galicia-Aguilar et al., 2008](#)), etanólico ([Tariq et al., 2009](#)), acuoso, acetona:agua ([Von-Son de Fernex et al., 2016](#)).

Se ha evaluado de forma *in vitro* la efectividad de los extractos con diferentes parásitos, parásitos que afectan a ovinos, caprinos ([Von-Son de Fernex et al., 2012](#); [Pérez-Pérez et al., 2014](#)) y bovinos ([Novobilský et al., 2011](#)), incluso con infecciones mixtas ([Olmedo-Juárez et al., 2014](#)), con cepas multiresistentes a antihelmínticos comerciales ([Von-Son de Fernex et al., 2016](#)) y con cepas de diferentes partes del mundo ([Chan-Pérez et al., 2015](#)).

Recientemente se han realizado estudios donde desactivan los taninos con el fin de comprobar si pierde actividad nemátocida, los resultados muestran efecto, por lo tanto se piensa que los taninos condensados no son solos los responsables del efecto antihelmíntico ([Chan-Pérez et al., 2015](#)).

Finalmente es necesario realizar estudios *in vivo* con el fin de verificar el efecto nemátocida bajo condiciones prácticas ([Novobilský-Adam et al., 2011](#); [Von-Son de Fernex et al., 2016](#)).

2.8.2. Estudios *in vivo*

Entre los estudios *in vivo* con plantas taniníferas, se ha encontrado evidencia que el consumo de estas plantas por ovejas disminuye el conteo de

huevos en heces y por lo tanto, afecta las poblaciones de gusano adulto ([Martínez-Ortiz de Montellano et al., 2010](#)) incluso con buenos resultados en infecciones mixtas de nemátodos ([Tariq et al., 2009](#)), así el consumo de plantas con taninos condensados podría indicarse en controles preventivos, disminuyendo la contaminación de los pastos y como alternativa para reducir el uso de productos químicos, aumentando el intervalo entre su administración, y con esto reducir la resistencia causada por la alta frecuencia de aplicación de los fármacos antiparasitarios tradicionales ([Pelegrine-Minho et al., 2010](#)).

2.8.3. Modo de acción de los taninos sobre los diferentes estadios de los nemátodos

Existe poca información acerca del modo de acción de los taninos, al parecer estos pueden actuar mediante la penetración de la pared celular de las larvas, provocando una pérdida de nutrientes y así afectar la actividad muscular del parásito ([Molan Abdul et al., 2000](#); [Martínez-Ortiz de Montellano, 2010](#)). En el parásito adulto lesionan la cutícula en diferentes partes del cuerpo, cápsula bucal, región cefálica, ano y vulva, por lo tanto, hay una disminución en la excreción de huevos, y alteraciones en la nutrición del parásito adulto, muerte por inanición y obstrucción ([Martínez-Ortiz de Montellano et al., 2012](#)). A nivel celular hay agrandamiento de células del intestino, pérdidas de vellosidades intestinales, mitocondrias inflamadas, así como las miofibrillas, zonas translucidas y daño al retículo endoplásmico, en general ocasiona una oxidación a nivel celular, además algunos daños encontrados han sido similares a los causados por los antihelmínticos convencionales ([Martínez-Ortiz de Montellano, 2010](#)). Y de manera indirecta, los taninos se adhieren a las proteínas encontradas en la saliva del rumiante, principalmente la prolina también presente en la cutícula del parásito, ante la presencia de histatinas se unen a monómeros de los taninos condensados formando enlaces débiles, los cuales se disocian en ambientes ácidos permitiendo la presencia de taninos libres los cuales pudieran ser absorbidos por la mucosa o cutícula del parásito,

además, desencadenan un aumento en las células de la mucosa ([Hernández-Orduño *et al.*, 2008](#); [Martínez-Ortíz de Montellano, 2010](#)).

Finalmente es posible utilizar plantas taniníferas como parte de un sistema integral de manejo de nemátodos gastrointestinales. Aunque, todavía falta por entender cuáles son los factores que determinan la variabilidad en la eficacia antihelmíntica, entre plantas de la misma especie, tipo de extracto, parte de la planta utilizada, concentración/dosis, vía de administración, bioensayo utilizado, especies de parásitos, especies animales infectadas, entre diferentes plantas taniníferas con cantidades semejantes de taninos e incluso entre parásitos de diferentes regiones del mundo. Además, se debe determinar qué cantidad se requiere para ocasionar el efecto antihelmíntico, sin perjuicio para el animal o para el consumidor de dicho animal ([Torres-Acosta *et al.*, 2008](#); [Sousa *et al.*, 2013](#)).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETATIVO

Se realizó un análisis químico proximal para determinar la calidad nutricional de las plantas, se determinó la concentración de polifenoles condensados, hidrolizables y totales, en extractos acuosos de *L. tridentata* y *G. sepium*, posteriormente, se evaluó el efecto nematicida de extractos hidro-metanólicos de *L. tridentata* y *G. sepium*, sobre larvas infectantes envainadas y desenvainadas del nemátodo *H. contortus*, y finalmente, se identificaron los principales compuestos bioactivos, presentes en extractos acuosos de *L. tridentata* y *G. sepium*.

3.1.1. Larrea tridentata

El material vegetativo de hojas de *L. tridentata*, se recolectó en el rancho “Los Ángeles” propiedad de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, ubicado en la ciudad de Saltillo (Figura 3.1).



Figura 3.1. Arbusto de *Larrea tridentata* con flores y frutos.

Esté se encuentra ubicado al sureste del estado de Coahuila en las coordenadas geográficas 101°59´ longitud oeste, 25°23´ latitud norte a una altitud de 1600 metros sobre el nivel del mar, presenta un clima semicálido, la temperatura media anual va de los 14 a los 18°C y la precipitación pluvial media es de 300 a 400 mm anuales ([INAFED, 2016](#)). La recolección fue a partir de plantas adultas en el mes de agosto de 2015 con una altura de 1 m, entre las 10 AM y 12 PM del día, inmediatamente después de recolectarlas se pesó, se deshidrató a 25°C durante nueve días y se pesó nuevamente.

Larrea tridentata es un arbusto ramificado, perenne, xerófito, siempre verde, crece en zonas secas de México, Baja California, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas y Zacatecas. Soporta temperaturas de 14 a 28°C y en presencia de ocho meses de sequía, con climas muy áridos, precipitaciones de 150 a 500 mm anuales, muy bien adaptada para sobrevivir en el desierto, llega a medir hasta tres metros de altura, muy prolífica y territorialista, es conocida comúnmente como gobernadora, creosote (creosote bush) o hediondilla ([Lira-Saldivar, 2003](#); [CONABIO, 2016](#)).

3.1.2. *Gliricidia sepium*

El material vegetativo de hojas de *G. sepium* se colectó en el municipio de Tataltepec de Valdés ubicado en la costa de Oaxaca, con las siguientes coordenadas geográficas 97°33´ longitud oeste, 16°18´ latitud norte, a una altitud de 370 m sobre el nivel del mar, presenta un clima semicálido subhúmedo, con una temperatura media de 25°C, así como una precipitación pluvial de 1409 mm anuales ([INAFED, 2016](#)), se colectó a partir de rebrote de siete semanas en junio de 2015 a una altura de 2.5 m sobre el suelo, entre las 11 AM y 1 PM del día, inmediatamente el material vegetal se pesó en una báscula digital comercial, se deshidrató a 32°C durante cinco días y se pesó nuevamente.

Gliricidia sepium es un árbol caducifolio, de fácil adaptación a diversas condiciones ambientales, de uso frecuente como cerco vivo o sombra, se ha usado en la alimentación de rumiantes, suplementando al pastoreo o en sistemas agrosilvopastoriles junto con gramíneas (Figura 3.2) ([Cuervo-Jiménez et al., 2013](#)). Este árbol, es nativo de las zonas bajas de México y partes secas de América central, sobrevive en clima subhúmedo, con temperaturas de 20 a 30°C y precipitación anual de 500 a 2300 mm anuales y cinco meses de periodo seco, se extiende desde el sur de México, América central, Colombia y Venezuela, llega a medir de dos hasta 10 m, también se le conoce como frijolillo, cacahuananche, madre cacao ([CONABIO, 2016](#)).



[Figura 3.2.](#) Arbusto de *Gliricidia sepium*.

Las fracciones vegetales de ambas plantas deshidratadas, fueron empaquetadas y conservadas a temperatura ambiente en bolsas de ixtle. Solo una muestra representativa de cada una de las plantas fue llevada al laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, ésta se molió en el molino Wiley, hasta menos de 1 mm de tamaño de partícula. Posteriormente, se pesó en una báscula (Ohaus) y fue puesta en charolas de

aluminio, para posteriormente introducir las en la estufa de secado (Robert Shaw) a 60°C por 24 hrs, la muestra y charola se volvieron a pesar y esta muestra se usó para realizar el análisis químico proximal, extractos acuosos y cromatografía en columna.

Se realizó la identificación de las plantas *Larrea tridentata* D.C. y *Gliricidia sepium* (Jacq.), y los especímenes se encuentran en el herbario ANSM (Antonio Narro Saltillo México) del departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, en Saltillo.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.2.1. Análisis químico proximal

El análisis químico proximal, se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, ubicado en Saltillo, Coahuila.

A cada muestra de material vegetativo de *L. tridentata* y *G. sepium*, se determinó el contenido de materia seca (MS), cenizas (C), proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), fibra cruda (FC), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) ([AOAC, 1990](#); [Van Soest et al., 1991](#)).

3.2.2. Elaboración de extractos acuosos

La elaboración de extractos acuosos se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” en Saltillo, Coahuila.

Se colocaron 10 g de material vegetativo de las plantas en matraces, posteriormente se vertieron 50 mL de agua destilada a 60°C, se homogenizó

completamente, y se colocaron dentro de la estufa para desecar a 60°C, removiéndolos cada cinco minutos por seis ocasiones, posteriormente se filtro con tela muselina para retirar las partículas grandes, se realizó otro filtrado con papel filtro y el extracto obtenido se colocó en viales de plástico (Figura 3.3), protegiéndolos con papel aluminio y a 5°C.

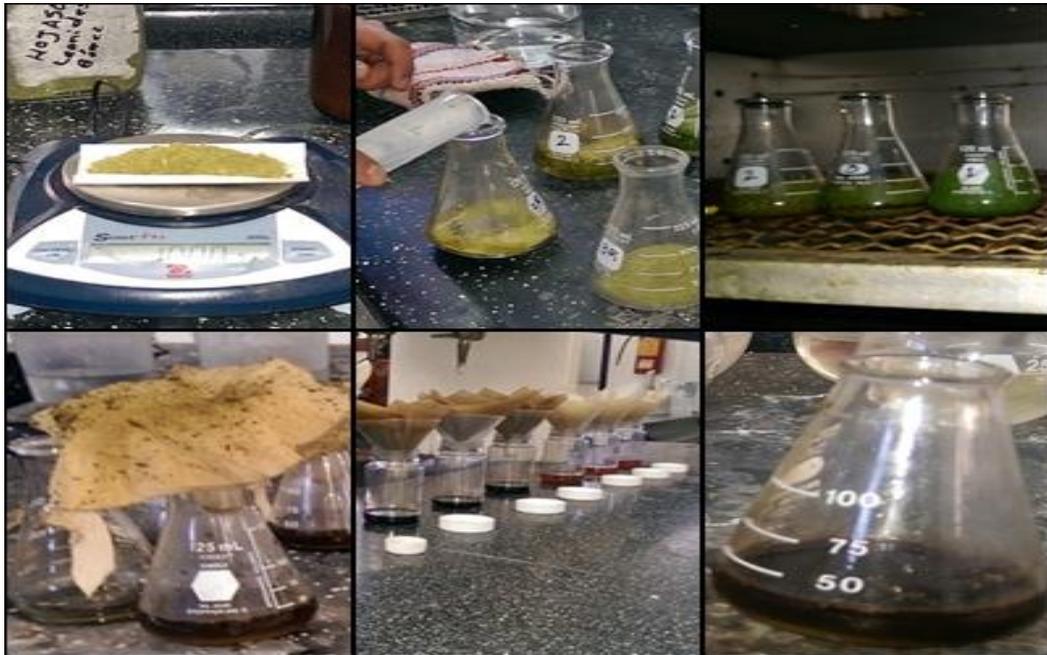


Figura 3.3. Elaboración del extracto acuoso.

3.2.3. Determinación de la concentración de polifenoles condensados, hidrolizables y totales

La determinación de la concentración de polifenoles condensados, hidrolizables y totales, se llevó a cabo en el laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” en la ciudad de Saltillo, Coahuila.

Para la obtención de polifenoles condensados (HCl-butanol), se tomaron 0.5 mL del extracto acuoso en tubos de ensaye con tapa, se agregaron 3 mL de HCl-Terbutanol, después se agregó 0.1 mL del reactivo férrico, los tubos fueron

cerrados herméticamente, posteriormente se calentaron en baño metabólico a 100°C durante 1 hora (Figura 3.4). Se dejó enfriar a temperatura ambiente, finalmente se leyó en el espectrófometro de masas a 460 nm (Figura 3.5), las lecturas obtenidas fueron registradas como mg por g, en equivalentes de catequina.



Figura 3.4. Técnica para la obtención de la concentración de polifenoles condensados.

Para la obtención de polifenoles hidrolizables (folin ciocalteau), del extracto acuoso fueron tomados 400 μ L con una micropipeta y colocados en un tubo de ensayo de 16x50, aquí mismo se adicionaron 400 μ L del reactivo folin ciocalteau, agitando suavemente para homogenizar, y se dejó reposar por cinco minutos.

Posteriormente se agregaron 400 μ L de carbonato de sodio 0.01 m, fue agitado suavemente y se dejó reposar por 5 minutos. Se adicionaron 2 mL de agua destilada (Figura 3.6) e inmediatamente leídos en un espectrofotómetro de masas a 725 nm (Figura 3.5). Las lecturas se registraron como mg por g, en equivalentes de ácido gálico.



Figura 3.5. Espectrófotometro de masas.

Para la obtención de polifenoles totales, se sumaron la concentración de polifenoles condensados y la concentración de polifenoles hidrolizables.

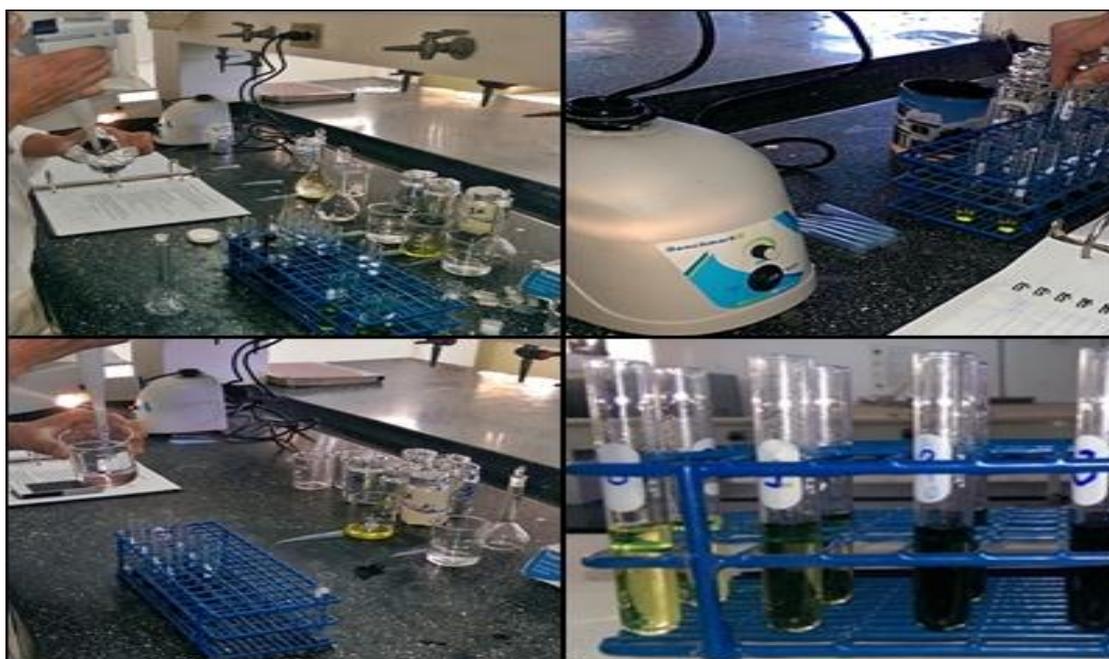


Figura 3.6. Técnica para la obtención de la concentración de polifenoles hidrolizables.

3.2.4. Obtención de larvas infectantes.

La infección del cordero, coprocultivos, técnica de Baermann en embudo, obtención, purificación, conteo y desenvaine de larvas infectantes de *H. contortus*, se desarrollarán en el Laboratorio de Helmintología del Centro de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del INIFAP, ubicado en Jiutepec, Morelos.

Para la obtención de larvas infectantes de *H. contortus* se infectó un cordero de aproximadamente 30 kg, con 350 larvas infectantes (L₃), por kg de peso vivo de una cepa experimental del nemátodo hematófago *H. contortus*, éste se colocó en una jaula metabólica. Se realizaron análisis coproparasitológicos (técnica de Mc-master) una vez por semana, hasta llegar al día 21 post-infección, posteriormente obtenida la carga parasitaria óptima (mayor a 800 hpg), las heces se colectaron en palanganas de plástico (Figura 3.7).



Figura 3.7. Ovino de la raza pelibuey infectado con el nemátodo *H. contortus*.

Las heces obtenidas en las palanganas se maceraron y se agregó agua corriente hasta obtener una consistencia pastosa, se agregó poliestireno en trozos de tres a cinco cm, de tal manera que se homogenizara con las heces, hasta propiciar una correcta aeración de las heces, la palangana se tapó herméticamente con una tapadera hechiza especial, y se procedió a colocarla en un estante, todos los días por la mañana durante siete días, se removió la muestra y se mantuvo la humedad necesaria para la eclosión y muda de las larvas (Figura 3.8).



Figura 3.8. Maceración de las heces para el cultivo de larvas.

Posteriormente, por medio de la técnica de Baermann en embudo se obtuvieron las larvas infectantes con detritus y restos de heces, por lo tanto se realizó otro filtrado con el sobrenadante obtenido, por otras 24 hr (Figura 3.9).

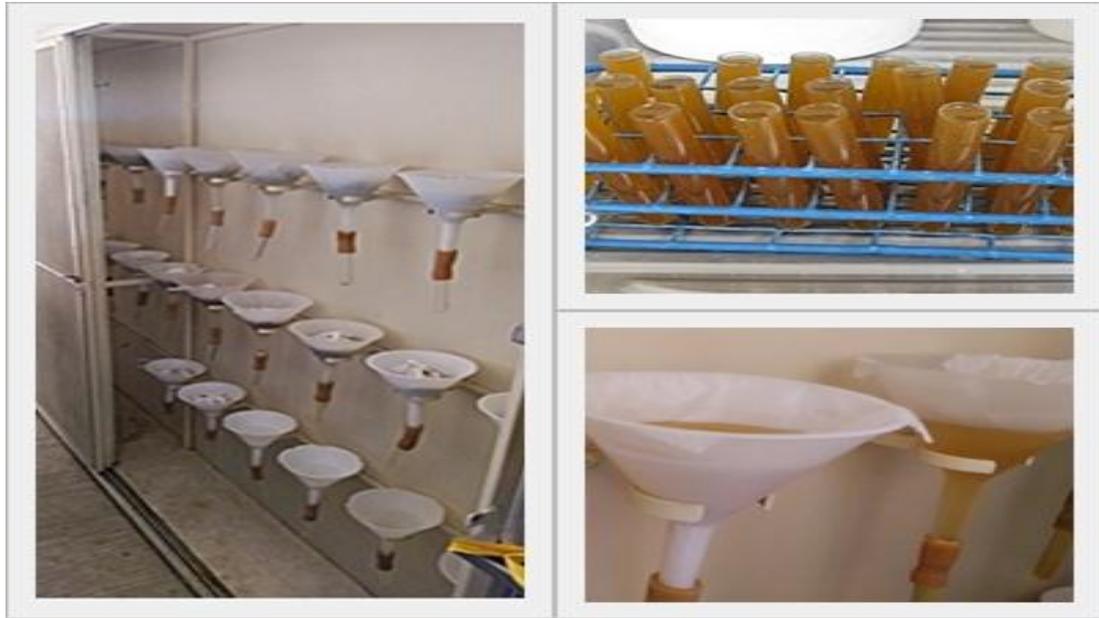


Figura 3.9. Filtración del sobrenadante por medio de la técnica de Baermann en embudo.

Finalmente, se purificó por medio de la técnica de gradientes de densidad, con sacarosa al 40% para la limpieza de larvas infectantes, se realizó el conteo de las larvas obtenidas, mediante 11 alícuotas de 10 μL en un portaobjetos con un enfoque al microscopio de 4x, se hizo el conteo de vivas y muertas, y mediante una regla de tres simples se realizó el cálculo, posteriormente las larvas se colocaron en cajas de cultivo, debidamente rotuladas y se conservaron en refrigeración a 4°C (Figura 3.10).

Para desenvainar las larvas infectantes, se usó hipoclorito de sodio (0.186 μL), se observaron periódicamente al microscopio, cuando las larvas inician el desenvainado, se realiza el lavado con agua purificada hasta eliminar el exceso de hipoclorito de sodio, todo esto en un lapso aproximado de 8-10 minutos, posteriormente obtenidas estas larvas sin vaina, inmediatamente se realizó el montaje de bioensayos.

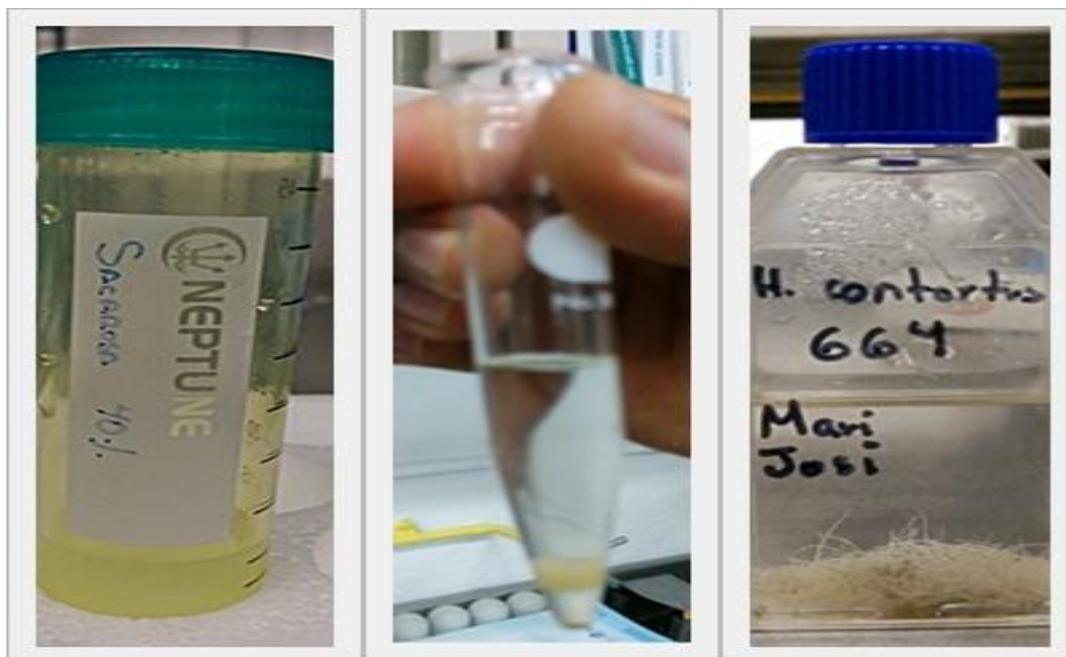


Figura 3.10. Sacarosa al 40% (izquierda), larvas infectantes limpias (L₃) (en medio) y caja de cultivo con larvas adultas (derecha).

3.2.5. Elaboración del extracto hidro-metanólico, montaje de bioensayos y confrontación extracto- larvas envainadas y desenvainadas.

El proceso de elaboración de los extractos hidro-metanólicos, rota-evaporación y liofilización, se llevó a cabo en el laboratorio de tecnología ambiental de la Universidad Politécnica del Estado del Morelos (UPEMOR), y el montaje de bioensayos con larvas infectantes envainadas y desenvainadas, se llevó a cabo en el laboratorio de Helmintología del CENID-PAVET del INIFAP, ambos en Jiutepec, Morelos.

Para elaborar el extracto hidro-metanólico se colocaron 100 g de fracción vegetal de cada planta en 300 mL de volumen neto en una proporción de 30% agua y 70% metanol, en un matraz de 500 mL durante 24 h, posteriormente el extracto se filtró, con tela muselina para eliminar las partículas más grandes y se volvió a filtrar con papel filtro y algodón (Figura 3.11).

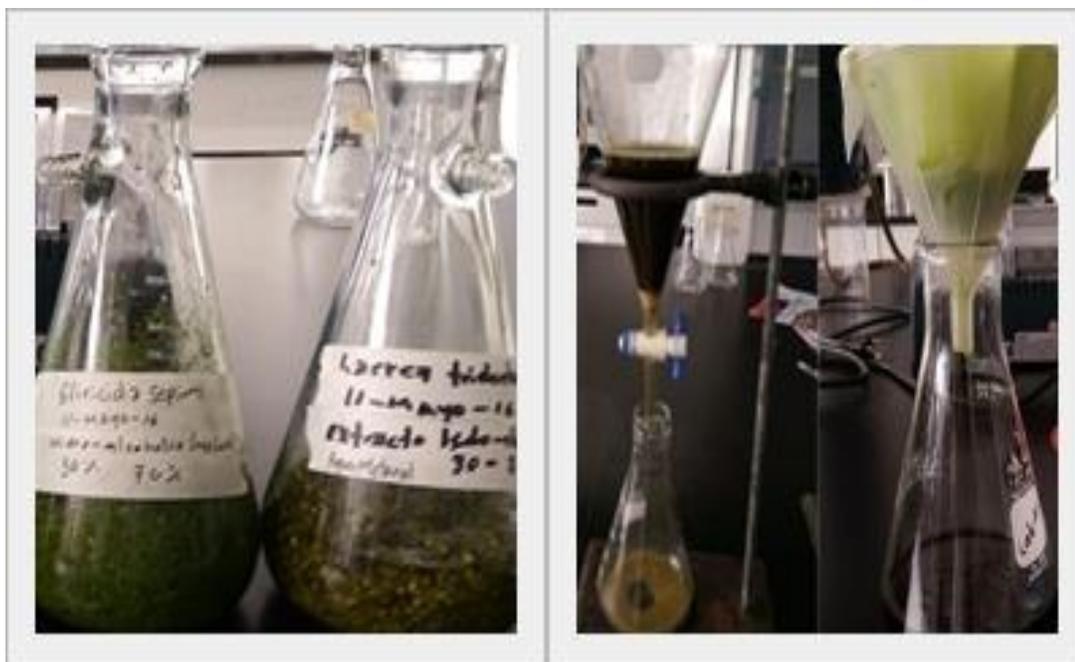


Figura 3.11. Confrontación entre material vegetativo y agua/metanol (30:70) y proceso de filtrado (derecha).

El extracto sin impurezas se procedió a rota-evaporar (rotaevaporador Yamato RE300) a 100°C para evaporar y recuperar el metanol, una vez separado el metanol, se procedió a evaporar el agua por medio de un liofilizador (labconco) a una temperatura de -45°C y a 0.200 bar, por 24 hrs dependiendo el volumen del contenido, una vez evaporada el agua se procedió a recuperar el extracto (polvo fino) en viales de vidrio, se pesó y se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su utilización (Figura 3.12).



Figura 3.12. Eliminación del solvente (arriba), agua (abajo izquierda) y los extractos hidro-metanólicos (abajo derecha).

Para obtener una concentración de 200 mg/mL, se tomaron 400 mg del liofilizado y se diluyó en 1 mL de agua destilada en un tubo eppendorf, se centrifugó por dos minutos (eppendorf centrifuge 5415 C) y se agregó 100 μ L en la concentración más alta, y 50 μ L de agua destilada en todas las concentraciones, posteriormente con una micropipeta multicanal calibrada a 0.5 μ L, se distribuyó el extracto concentración por concentración (Figura 3.13).



Figura 3.13. Pipeta multicanal para la distribución del extracto a cinco concentraciones (izquierda), adición de larvas infectantes (derecha).

Para montar los bioensayos se realizó una confrontación *in vitro* (extracto-larvas) ésta fue llevada a cabo en placas Elisa de 96 pozos. Por cada pozo se colocó 50 μ L del extracto en concentraciones en cascada de mayor a menor concentración 200, 100, 50, 25 y 12.5 mg/mL con tres repeticiones por concentración y ensayo por triplicado. Colocado el extracto, se agregaron 110 larvas (envainadas o desenvainadas) en cada pozo, contenidas en un volumen de 50 μ L, para finalmente obtener un volumen neto de 100 μ L por pozo (extracto-larva) (Figura 3.13).



Figura 3.14. Placa de Elisa con 96 pozos, se observa el control y las cinco concentraciones (izquierda), y el rotulo que se coloca antes de incubar (derecha).

En el control positivo, se usaron 50 μ L de ivermectina al 1% (Laboratorios Aranda) y 110 larvas infectantes contenidas en 50 μ L por pozo.

Posteriormente, la placa se cerró y se agregó una toalla “sanita” embebida con agua para mantener la humedad, se cubrió totalmente con papel aluminio, se rotuló con fecha y hora de entrada y de salida, se hicieron lecturas a 24, 48 y 72 horas (Figura 3.14).

Las placas se incubaron en una estufa a 20°C y 80% de humedad relativa, por 24, 48 y 72 horas.

Para realizar las lecturas se colocaron 11 alícuotas de 10 μ L en un portaobjetos, con un enfoque al microscopio de 10x (Figura 3.15). Se evaluó mortalidad en larva desenvainadas y, desenvaine y mortalidad en larva envainada.



Figura 3.15. Portaobjetos con 10 alicuotas de 10 μ L, para realizar las lecturas, con un enfoque de 4x.

3.2.6. Cromatografía líquida en columna y cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a masas

La cromatografía líquida en columna de amberlita para la obtención de polifenoles (polvo), se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, localizada en Saltillo, Coahuila y la cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas, se realizó en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Para purificar los polifenoles de otros compuestos, se usó una columna de vidrio con capacidad para 500 mL, que contenía amberlite XAD-16 (sigma-aldrich, P code:101594718)®, se usó agua destilada para lavar la amberlita, empaquetada dentro de la columna, se desecho el agua y se colocó nueva, posteriormente se vertió el extracto acuoso, el extracto hizo contacto con la amberlita, se dejo reposar por cinco minutos (Figura 3.16).



Figura 3.16. Columna de vidrio empaquetada con amberlite XAD-16 (izquierda) y columna empaquetada con amberlite XAD-16 en confrontación con el extracto acuoso (derecha).

Posteriormente se agregó agua, se desechó el agua de color oscuro, hasta que apareció clara nuevamente. Se agregó metanol, para arrastrar los polifenoles purificados, y se recuperó el metanol junto con los polifenoles obtenidos, el sobrenadante obtenido se vertió en cajas de cultivo y se dejó reposar a temperatura ambiente, hasta evaporar el solvente y obtener los polifenoles en polvo fino (Figura 3.17).

Los polvos obtenidos se diluyeron en metanol y se inyectaron en el HPLC, acoplado a espectrómetro de masas (HPLC/MS) (Varian model 350 RI detector), para identificar los compuestos bioactivos con más actividad en las dos plantas, y posibles responsables del efecto encontrado (Figura 3.18).



Figura 3.17. Obtención de los polifenoles purificados en estado líquido (metanol) (arriba izquierda), evaporación del solvente a temperatura ambiente en cajas de cultivo, obtención del polvo fino en viales de plástico para su conservación.



Figura 3.18. Cromatógrafo líquido de alta resolución, acoplado a masas.

3.3. TÉCNICAS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES CONDENSADOS, HIDROLIZABLES Y TOTALES

3.3.1. Extracto acuoso

Se colocaron 10 g de fracción vegetal molida en matraces de 100 mL, al mismo tiempo se calentaron 50 mL de agua a una temperatura de 60°C y se agregó a la muestra. Posteriormente, se colocaron los matraces dentro de la estufa para desecar (Robert sah) a 60°C, el contenido se removió cada cinco minutos, por 30 minutos; el contenido se filtró con tela muselina (separando el sólido del líquido). Finalmente, se volvió a filtrar con papel filtro (whatman no.41) de poro abierto, el sobrenadante se guardó en viales de plásticos sellados, protegidos con papel aluminio y conservados a 4°C (Modificado de [Ascacio-Valdés et al., 2013](#)).

3.3.2. Polifenoles hidrolizables, usando Folin-ciocalteau

Del extracto acuoso fueron tomados 400 µL con una micropipeta y colocados en un tubo de ensayo de 16x50, aquí mismo se adicionaron 400 µL del reactivo folin ciocalteau, agitando suavemente para homogenizar, y se dejó reposar por cinco minutos. Posteriormente se agregaron 400 µL de carbonato de sodio 0.01 mL, fue agitado suavemente y se dejó reposar por cinco minutos. Se adicionaron dos mL de agua destilada e inmediatamente leídos en un espectrofotómetro de masas a 725 nm. Para dar lugar a una reacción colorimétrica, medida en espectroscopia, se registran las lecturas. La curva de calibración se elabora con ácido gálico y agua destilada (Modificado de [Makkar, 2000](#)).

3.3.3. Polifenoles condensados, usando HCl-butanol

Para la extracción de los polifenoles condensados, se tomarón 0.5 mL del extracto acuoso en tubos de ensaye con tapa, se agregaron tres mL de HCl-Terbutanol (1:9), agregamos 0.1 mL del reactivo férrico. Los tubos fueron cerrados herméticamente, posteriormente se introdujeron en baño metabólico a 100°C durante una hora. Se dejó enfriar a temperatura ambiente; finalmente, se leyó en el espectrofotometro de masas a 460 nm y las lecturas obtenidas fueron registradas. La curva de calibración se elaboró con catequina y agua destilada ([Porter et al., 1986](#); [Makkar et al., 1993](#); [Makkar, 2000](#)).

3.4. TÉCNICAS DE CULTIVO DE LARVAS, CONTEO Y DESENVAINA DE LARVAS DE *Haemonchus contortus*

Se describen las técnicas, desde la obtención de las heces del cordero infectado, cultivo, limpieza, desenvaine y conteo de las larvas infectantes envainadas o desenvainadas según el caso, para el montaje de los bioensayos.

3.4.1. Técnica de cultivo de larvas

Se colocó un ovino de pelo previamente infectado con 350 L₃/kg de *H. contortus* ([Fernández-Ruvalcaba et al., 1994](#)) dentro de una jaula metabólica con una palangana de plástico a nivel del recto para que las heces eliminadas cayeran dentro. Diariamente, por la mañana, la palangana con la muestra de heces fue cambiada por una palangana vacía y limpia. Cada una de las muestras se maceró y se le agregó agua corriente hasta obtener una consistencia pastosa, después de esto se agregaron pequeños trozos de hule-espuma (poliestireno) y se homogenizarón con las heces hasta obtener una mezcla uniforme. Se tapó la palangana con una tapadera de papel aluminio, diseñada con gasas al centro de la muestra para que el aire circulante entrara dentro de la palangana, removiendo el contenido cada 24 hr y agregándose

agua cada que se necesitaba para mantener la humedad necesaria para el desarrollo de los estadios larvarios. Siete días después se formaron muñones con gasas y se procedió a realizar la técnica de Baermann para la obtención de larvas infectantes de *H. contortus* 24 hr después ([Liébano-Hernández et al., 1998](#); [Shapiro, 2010](#)).

3.4.2. Técnica de migración larvaria o de Baermann en embudo

Esta técnica es usada para separar las larvas de las heces, el principio de este método radica en la capacidad de las larvas de migrar dentro de un sustrato líquido debido a su movilidad e hidrotropismo positivo, por el cual sedimentan al fondo del recipiente. Con la muestra se elaboran muñones con gasas, estos se colocaron en los aparatos de Baermann, se agregó agua corriente (a 25°C) hasta cubrir totalmente los muñones, en reposo por 24 hrs a fin de permitir la migración larvaria, se debe evitar la evaporación del líquido, después se colectaron los tubos con las larvas sedimentadas, se recuperaron aproximadamente 10 cm³ del sedimento, debido a que aquí se encontraban las larvas ([Liébano-Hernández, 2010](#); [Shapiro, 2010](#)), se dejó reposar hasta que sedimentó y se procedió a realizar un segundo filtrado.

3.4.3. Técnica de gradientes de densidad con sacarosa para la limpieza de larvas infectantes (L₃) de *Haemonchus contortus*

Al obtener el sedimento conteniendo larvas de nemátodos gastrointestinales resultado de la técnica de Baermann en embudo, es común que junto con las larvas, hayan sedimentado también una gran cantidad de detritos, impurezas y materiales diversos contenidos en las heces.

Para obtener una suspensión de larvas de nemátodos libre de estas impurezas, se procedió a un filtrado utilizando papel para limpiar los objetivos del microscopio “Optical Lens paper” (Thomas Scientific, USA), colocados en un

aparato de Baermann con agua de la llave. Las larvas en movimiento descendieron pasando a través del “Optical Lens paper” y se sedimentaron hasta la base del tubo de ensaye. Las impurezas y materiales residuales de los cultivos fecales quedaron atrapados en el tejido del papel de microscopio.

Con la finalidad de eliminar el sobrenadante, el material resultante de la técnica de filtración se transfirió a tubos de plástico de 50 mL y se dejó reposar en el refrigerador a 4°C durante una hora. Las larvas fueron sometidas a gradientes de densidad y centrifugación con sacarosa al 40% a una velocidad de 3500 rpm durante cinco minutos ([Liébano-Hernández, 2010](#)). Para llevar a cabo esta técnica, se utilizaron dos tubos de ensaye de 15 cm en donde se agregaron 4 mL de sacarosa al 40% por tubo y después se agregó lentamente el sedimento conteniendo 2 mL de larvas con ayuda de una pipeta Pasteur, deslizando la suspensión larval por las paredes del tubo de ensaye.

Posteriormente, los tubos de ensaye fueron centrifugados a 3500 rpm durante cinco minutos. Este proceso, permitió que la mayor cantidad de contaminantes y residuos de materiales provenientes de los cultivos fecales fueran sedimentados en el fondo del tubo. Transcurrido el tiempo de centrifugación, se observó la formación de un anillo de color blanco en la superficie de la suspensión, que corresponde a un paquete de las larvas limpias concentradas. Con la ayuda de una pipeta de 200 µL se procedió a colectarlas para inmediatamente depositarlas en tubos de 10 mL y llevar a cabo tres lavados con agua destilada; esto se realizó con la finalidad de eliminar el exceso de sacarosa y evitar un desequilibrio osmótico y muerte de las larvas ([Liébano-Hernández, 2010](#)). Para tal efecto, se utilizó una centrifuga convencional y se centrifugó a 3500 rpm, durante tres minutos y así poder utilizarlas para diferentes pruebas experimentales ([Kennedy et al., 2013](#)). Las larvas obtenidas limpias fueron colocadas en cajas de cultivo celular de 30 mL aforadas a 10 mL con agua corriente y almacenadas en refrigeración a 4°C hasta su cuantificación.

3.4.4. Técnica de desenvaine de larvas infectantes (L₃) por medio de hipoclorito de sodio

Las larvas a desenvainar se colocan en 10 mL de agua destilada. Posteriormente se colocan 0.186 µL de hipoclorito de sodio por un lapso de ocho a 10 minutos, se monitorean constantemente hasta observar que todas hayan desenvainado, se centrifuga y se lavan con agua destilada por tres ocasiones o hasta eliminar el exceso de hipoclorito de sodio ([Liébano-Hernández et al., 1996](#); [Liébano-Hernández et al., 2011](#)).

3.4.5. Técnica de conteo de larvas infectantes (L₃) de *Haemonchus contortus*

Una vez extraída la caja de cultivo del refrigerador se sumerge en agua a 37°C durante unos minutos para reactivar las larvas ([Liébano-Hernández et al., 1996](#)). Se extraen 10 alícuotas de 5.0 µL de las cajas de cultivo con una micropipeta, entre una alícuota y otra se homogeniza lo más uniforme posible, con un vortex. Las alícuotas fueron colocadas sobre un portaobjetos y observadas en un microscopio óptico con el objetivo 4x. Se cuantificó el total de larvas presentes en cada alícuota, se sumaron las larvas presentes en las 10 alícuotas y se determinó por medio de una regla de tres simple la cantidad total, de acuerdo al contenido de líquido de cada caja de cultivo. Únicamente se cuantificaron larvas que fueron viables, presentado motilidad aparente.

3.5. BIOENSAYOS

3.5.1. Extracto hidro-metanólico

Hojas deshidratadas de las plantas se cortan en trozos de tres cm aproximadamente y se confrontan con 70% de metanol y 30% agua a temperatura ambiente durante 24 hr, posteriormente se filtra con gasa o tela

muselina, se filtra nuevamente con papel filtro (whatman No. 41). El extracto obtenido se concentró a presión reducida utilizando un rota-evaporador a 30 rpm y el baño metabólico a 100°C. Posteriormente se liofilizó a una temperatura de -45°C ([De Souza-Maria et al., 2000](#)), el extracto resultante se colocó en frascos de vidrio y se conservó en refrigeración a 4°C.

3.5.2. Ensayo con larvas envainadas

Se colocan 110 larvas infectantes envainadas (L₃) de *H. contortus*, contenidas en 50 µL de agua destilada, en cada pozo de la placa. Luego se confrontaron con los extractos hidro-metanólicos de cada planta (50 µL), a cinco concentraciones 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/mL, y un control positivo con ivermectina 10 mg/mL, se hicieron tres répeticiones de cada concentración y ensayo por triplicado, con lecturas a 24, 48 y 72 horas por observación microscópica (4x), donde se observaron criterios como la motilidad aparente, y principalmente el desenvaine y la mortalidad (Modificado de [Marie-Magdeleine et al., 2010](#); [Olmedo-Juárez et al., 2014](#)).

3.5.3. Ensayo con larvas desenvainadas

Se colocan 110 larvas infectantes desenvainadas (L₃) de *H. contortus*, en cada pozo de una placa, se confrontaron con los extractos hidro-metanólicos de cada planta, a cinco concentraciones 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/mL, y un control positivo con ivermectina 1%, se hicieron tres réplicas de cada concentración y ensayo por triplicado, las lecturas a tres tiempos 24, 48 y 72 hr por observación microscópica (4x), se evaluó la mortalidad de las larvas (Modificado de [Von-Son de Fernex et al., 2012](#)).

3.5.4. Determinación de la concentración letal 50

La concentración letal representa, la concentración del extracto que causó 50% de la mortalidad de los organismos de prueba dentro del periodo específico de exposición, y se determinó mediante la exposición del estadio del nematodo a las diferentes concentraciones del extracto. Sobre la base de la mortalidad de los organismos de prueba registrados en estos bioensayos, la concentración letal se calcula junto con sus límites de confianza, a nivel de confianza del 95% por análisis probit ([Krishnappa et al., 2012](#)).

3.6. TÉCNICAS PARA IDENTIFICAR LOS PRINCIPALES COMPUESTOS BIOACTIVOS PRESENTES

3.6.1. Cromatografía en columna utilizando amberlita XAD-16

Se realizó utilizando una columna con capacidad de 500 mL, se utilizaron 61.2 g de amberlite XAD-16 (sigma) para 100 mL de extracto. Se usó agua destilada como eluyente para descartar compuestos indeseables y, posteriormente, el etanol se empleó como eluyente para obtener una porción de metabolitos totales. El líquido obtenido se fraccionó en cajas de Petri y se dejó reposar en la estufa para desecar (marca Robert Shaw) a 65°C para evaporar el solvente, finalmente, los metabolitos totales se recuperaron como polvo fino (Modificado de [Seeram et al., 2005](#); [Ascacio-Valdés et al., 2013](#)). Se conservaron en viales de vidrio protegidos con papel aluminio a 4°C.

3.6.2. Cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a espectrómetro de masas (HPLC/MS)

Se analizó una muestra de polvo de polifenoles totales por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC/MS), primero se colocaron aproximadamente 6 mg de la muestra (obtenida de la columna de amberlita) en un vial de plástico y

se añadieron 10 mL de metanol ([Chapman et al., 2007](#)), se homogenizó completamente en un sonicador (Branson 2510). Se tomaron 1.5 mL de esta solución, se filtró (Whatmann 0.45 micras) y se colocó en viales de 1.5 mL, para ser inyectada por el HPLC/MS con el fin de encontrar algunos compuestos bioactivos (Técnica modificada de [Seeram et al., 2005](#); [Ascacio-Valdés et al., 2013](#)).

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para calcular las medias del análisis químico proximal y de los polifenoles condensados, hidrolizables y totales (se realizaron seis repeticiones del análisis químico proximal, por cada planta y seis repeticiones para determinar la concentración de polifenoles condensados e hidrolizables, por cada planta), se usó un diseño completamente al azar con igual número de repeticiones, mediante el procedimiento Proc GLM y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey, usando el paquete estadístico de SAS (Software Statistical Analysis System, versión 9.4).

Para determinar el porcentaje de mortalidad de larvas envainadas y desenvainadas de *H. contortus*, en cada una de las concentraciones de los extractos hidro-metanólicos de *G. sepium* y *L. tridentata*, se usó un análisis de varianza (ANOVA) mediante el procedimiento Proc GLM y la prueba de comparación de medias de Tukey, usando el paquete estadístico de SAS (Software Statical Analysis System, versión 9.4), para analizar los porcentajes se les aplicó una transformación a arco-seno, tres repeticiones por concentración y ensayo por triplicado, lecturas a tres tiempos (24, 48 y 72 hr).

Basándose en la mortalidad de las larvas, se calculó la concentración letal 50, a un nivel de confianza del 95%, mediante un análisis probit, usando el paquete estadístico SAS (Software Statical Analysis System, versión 9.4).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

Los resultados del análisis químico proximal de este estudio mostraron que *G. sepium* presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) sobre *L. tridentata* en contenido de PC, EE, FDN y FDA, mientras que *L. tridentata* presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) sobre *G. sepium* en contenido de cenizas. Por otra parte, la FC no presentó diferencia significativa ($P > 0.94$) (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Composición proximal (%) de fracción vegetal (hojas) de *L. tridentata* y *G. sepium* (M+EEM).

Fracción Vegetal	MS	PC	EE	C	FC	FDN	FDA
<i>L. tridentata</i>	91.5	17.2b	4.7b	10.9a	14.8a	37.8b	16.3b
<i>G. sepium</i>	32.01	27.6a	4.9a	9.5b	14.9a	72.6a	32.9b
EEM	-	1.2	11.9	0.9	12.8	22.9	3.4

Los valores con la misma literal dentro de una misma columna, no presentan diferencia significativa ($P > 0.05$). EEM- Error Estandar de la Media.

El mayor porcentaje de PC en *G. sepium* en el presente estudio, en comparación con *L. tridentata*, pudiera deberse a que *G. sepium* pertenece al grupo de las leguminosas y éstas tienen la capacidad de tomar el nitrógeno atmosférico y fijarlo al suelo por medio de nódulos ([Ibañez et al., 2016](#)), por lo tanto presentan un alto contenido de nitrógeno en sus hojas. Estudios han demostrado que las hojas de *G. sepium*, concentran un alto contenido de PC, estos van desde 18.3 hasta un 24.2% de PC, en las hojas de *G. sepium*, con plantas de diferentes edades ([Sereshine e Iben, 2003](#); [Archiméde et al., 2010](#); [Avilés-Nieto et al., 2013](#)).

Por otra parte, existen pocos estudios que indiquen la calidad nutricional de *L. tridentata*, aunque [Martins et al.](#) (2012), encontraron un 5.8% de PC,

empleando el método de extracción de Bradford. Por otra parte *G. sepium* debido a su contenido de PC, es una buena alternativa forrajera en la dieta de los rumiantes ([Castrejón-Pineda et al., 2016](#)) en el trópico, aunque se sabe que ambas plantas ofrecidas como único alimento en la dieta, presentan efectos antinutricionales, debido a compuestos secundarios no relacionados con la PC que se encuentran presentes principalmente en las hojas ([Hernández-Báez et al., 2016](#); [Castrejón-Pineda et al., 2016](#)). Aunado a esto, existe información que revela que las hojas de *G. sepium* suministradas en la dieta hasta en un 30%, da resultados positivos sobre el aumento de peso en ovinos y no afecta el consumo voluntario ([Archiméde et al., 2010](#)). En contraparte un estudio reciente encontró que *L. tridentata*, suministrada en un 10% en la dieta, solo disminuyó el consumo voluntario y la conversión alimenticia, en un lapso de mas de 20 días, mientras que la ganancia de peso no fue afectada en comparación con la dieta control ([Hernández-Báez et al., 2016](#)), por lo tanto, esta planta en la alimentación de borregos y cabras, se debe suministrar de forma limitada, debido a su alto contenido de aleloquímicos ([Lira-Saldivar, 2003](#)). Así estas plantas usadas de forma estratégica (en conjunto con otros ingredientes) podrían sustituir alimentos con alto contenido energético y disminuir los costos considerablemente ([Avilés-Nieto et al., 2013](#)).

Otra de las razones del uso de *L. tridentata* como posible fuente forrajera, es que este arbusto perenne crece en las zonas aridas, no se encuentra amenazado, ni es aprovechado actualmente, por lo tanto sería una posible y abundante fuente de forraje, cosechando solo la parte superior de las plantas ([Lira-Saldivar, 2003](#)), además de la fuente de proteína. Existe evidencia de que esta planta es consumida por los caprinos en condiciones de pastoreo en el norte de México, hasta en un 10% en conjunto con otras plantas sin presentar efectos antinutricionales, debido a una adaptación a los metabolitos secundarios presentes. Por lo tanto el porcentaje de inclusión de este arbusto en la dieta podría incrementarse sin riesgo de toxicidad para las cabras, aunado a esto se ha observado que las cabras en pastoreo en el norte de México,

prefieren consumir mas plantas arbustivas que leguminosas ([Mellado et al., 2004](#); [Mellado et al., 2011](#)).

4.2. POLIFENOLES CONDENSADOS, HIDROLIZABLES Y TOTALES

Se determinó la concentración cuantitativa de polifenoles condensados (PFC) e hidrolizables (PFH) expresada en mg/g. En los PFC expresado como equivalentes de catequina (EC), se observó diferencia significativa ($P < 0.001$) en *L. tridentata* (56.19 mg/g EC), comparado con *G. sepium* (3.36 mg/g EC).

Los PFH, expresado como equivalentes de ácido gálico (EAG), se observó mayor concentración ($P = 0.002$) en *L. tridentata* (41.68 mg/g EAG), el valor más bajo correspondió a *G. sepium* (3.06 mg/g EAG), finalmente, la concentración más alta ($P < 0.0001$) de PFT expresada en mg/g, fue encontrada en *L. tridentata* (97.88), mientras que el valor más bajo en *G. sepium* (6.42) (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Concentración cuantitativa de polifenoles condensados, hidrolizables y totales, en extractos acuosos de material vegetativo de *L. tridentata* y *G. sepium*.

Extracto acuoso	PFC mg/g ($P < 0.0001$)	PFH mg/g ($P = 0.0002$)	PFT mg/g ($P < 0.0001$)
<i>L. tridentata</i>	56.19a	41.68a	97.88a
<i>G. sepium</i>	3.36b	3.06b	6.42b

Los valores con la misma literal dentro de una misma columna, no presentan diferencia significativa. PFC- Polifenoles condensados, PFH- Polifenoles hidrolizables y PFT- Polifenoles totales.

En un estudio similar con un extracto a base de acetona:agua (70:30), usando hojas frescas de *G. sepium*, [Von-Son de Fernex et al. \(2012\)](#),

encontraron una concentración de 4.3 g/100 g de materia seca, de PFT (Folin-ciocalteau) y 0.05 g/100 g de materia seca, de PFC (prueba de Vainillin).

[Santacoloma-Varón y Granados](#) (2012) encontraron, a partir de plantas adultas de *G. sepium*, colectadas en tres zonas diferentes en agosto, con etanol como solvente, PFT (Folin-ciocalteau) 9.96, 10.98 y 10.89 g/kg, PFC (HCl-Butanol) 10.46, 14.7 y 14.3 g/kg, taninos totales (TT, Folin denis y Folin ciocalteau) 9.48, 12.25 y 11.7 g/kg, similar a esto, [Seresinhe e Iben](#) (2003), usando hojas y tallos tiernos de *G. sepium* deshidratados por congelación, encontraron la siguiente concentración, PFT (ácido tánico) 1.17% en materia seca, PFC (HCl-butanol) 0.57% en materia seca y TT 0.78% en materia seca.

En comparación con este estudio, donde se usaron hojas de *G. sepium* colectadas de plantas de 7 semanas de rebrote, y usando agua como solvente, con la siguiente concentración, PFC (HCl-butanol) 3.36 mg/g de catequina, PFH (Folin ciocalteau) 3.06 mg/g de ácido gálico y PFT 6.42 mg/g, cabe señalar que estos resultados se encuentran dentro del rango, de lo encontrado en los estudios antes citados.

Por otra parte, un estudio realizado con hojas deshidratadas de *L. tridentata*, colectadas en primavera, calcularon el contenido de PFT (Folin ciocalteau-ácido gálico) y los PFC (método colorimétrico-quercetina) en un extracto acuoso, donde obtuvieron PFT 68.55 mg de ácido gálico/ gramo de peso en seco y PFC 61.5 mg de catequina/gr de peso en seco ([Martins et al., 2012](#)).

[Hyder et al.](#) (2005), usando hojarasca de *L. tridentata* colectada durante el invierno, determinaron la concentración de PFT (Folin Denis- ácido tánico) y PFC (HCl-Vainillin, catequina) 46.3 mg/g de materia organica y 13.7 mg/g de materia organica, respectivamente.

Las concentraciones encontradas en este estudio para el extracto acuoso a partir de hojas de plantas adultas de *L. tridentata*, para PFC (HCl-butanol), PFH (Folin ciocalteau) y PFT (suma de los anteriores) fueron de 56.19, 41.68 y 97.88 mg/g, respectivamente. Estas concentraciones son más elevadas con respecto a lo encontrado en los estudios citados.

Finalmente, [Santacoloma-Varón y Granados \(2012\)](#), señalan que existe una alta correlación entre la conductividad eléctrica y la concentración de metabolitos secundarios, particularmente PFC, PFH y PFT, lo cual se atribuye a la mayor actividad del metabolismo vegetal en condiciones de alta conductividad eléctrica, mientras más elevada sea la concentración de sales solubles en el suelo, existe mayor capacidad del agua para transportar la corriente eléctrica, por lo tanto esto es un indicador para medir indirectamente la salinidad del suelo y el contenido de sólidos disueltos, posiblemente sería una de los factores que predisponen la concentración de polifenoles en estas plantas.

4.3. BIOENSAYOS CON LARVA ENVAINADA Y DESENVAINADA

El nemátodo *H. contortus*, es de hábitos hematófagos afecta a ovejas y cabras, en fase adulta se aloja en el abomaso ([Achi et al., 2003](#)), e intestino delgado ([Fontenot et al., 2003](#)). La enfermedad causada por este nemátodo está considerada como una de las enfermedades parasitarias más peligrosas, ya que ésta afecta directamente la producción como la reproducción del huésped ([Arece-García et al., 2007](#)), debido a que los nutrientes adquiridos durante la alimentación, en condiciones normales son dirigidos al mantenimiento, crecimiento, producción, y con una infección parasitaria, estos requerimientos serán redirigidos para compensar las pérdidas inducidas por los parásitos ([Knox et al., 2006](#)), dejando en segundo termino la producción y reproducción del hospedero, por lo tanto es de suma importancia para las unidades de producción pecuarias debido a las pérdidas que ocasiona ([Waruiru](#)

[et al., 2001](#)), de ahí la importancia y ante este problema real se optó por realizar el estudio con este nemátodo.

Por otra parte, el ciclo biológico de *H. contortus*, tiene dos fases (dentro y fuera del hospedero). La fase fuera del huésped comprende desde la liberación de huevos en las heces, hasta larvas tres o infectante envainada, la cual esta cubierta por una vaina que la protege de las adversidades del medio externo, ésta puede ser rígida o elástica y permite el crecimiento ([Quiroz-Romero, 1996](#)), esta fase larvaria se contempló en el experimento debido a que, posiblemente en forma práctica atacando esta fase larvaria, se podría romper el ciclo, y así disminuir la carga parasitaria en los pastos ([Fontenot et al., 2003](#)).

Así mismo, la larva infectante envainada al ser ingerida por el rumiante, se libera de la vaina en el rumen mediante acción enzimática, y la larva infectante ahora sin vaina, migra al abomaso o intestino delgado donde se alimenta (hasta 0.05 mL de sangre/día/parásito), una hembra adulta puede ovopositar hasta 10000 huevos/día ([Quiroz-Romero, 1996](#)), de aquí su rápida multiplicación y su alta morbilidad, sin embargo, para controlar la enfermedad, es necesario reducir la población de larvas dentro del hospedero y así, reducir la producción de huevos, por lo tanto la “contaminación” y la carga parasitaria de los pastos disminuirá ([Fontenot et al., 2003](#)), de este modo elegimos las larvas desenvainadas para confrontarlas de forma *in vitro* con los extractos de las plantas, y observar resultados. Para posteriormente corroborar en estudios *in vivo*, romper el ciclo biológico atacando la larva desenvainada desde dentro, disminuir la eliminación de huevos e indirectamente reducir la contaminación de los pastos.

Los resultados de la evaluación *in vitro* confirmaron que las larvas envainadas y desenvainadas de *H. contortus*, presentaron mayor susceptibilidad al extracto hidro-metanólico de fracción vegetal (hojas) de *G. sepium*.

Con lecturas a 24 hr, *G. sepium* mostró el menor porcentaje de mortalidad (14.7 ± 4.7) en concentraciones a 100 mg/mL, mientras que *L. tridentata* (17.5 ± 4.2) en concentraciones a 25 mg/mL, mientras que el mayor porcentaje de mortalidad en *G. sepium* fue en concentraciones a 200 mg/mL (25.2 ± 11.5) y en *L. tridentata* a 50 mg/mL (21.6 ± 9.5), comparado con la ivermectina (99.6 ± 0.6).

El extracto hidro-metanólico de *G. sepium* mostró el porcentaje de mortalidad más baja en concentraciones a 25 mg/mL, con lecturas a 48 hrs (11.7 ± 1.9), mientras que *L. tridentata* presentó menor porcentaje de mortalidad a 50 mg/mL con lecturas a 72 hrs (16.5 ± 3.5) ($P \leq 0.05$), con referencia con la ivermectina que presentó un 99.2 ± 1.0 de mortalidad.

A una concentración de 200 mg/mL con lecturas a las 72 hrs el extracto hidro-metanólico de *G. sepium*, mostró diferencia estadística ($P \leq 0.05$) (61.5 ± 20.4), con referencia a la ivermectina 1% que mostró un porcentaje de 99.6 ± 0.7 . Mientras que *L. tridentata*, aunque no presentó diferencia significativa ($P \leq 0.05$), mostró su mayor tasa de mortalidad a una concentración de 12.5 mg/ml a 48 hrs (36.9 ± 3.0), con respecto con la ivermectina que presentó un 99.2% de mortalidad (Cuadro 4.3).

Se ha demostrado la efectividad de la ivermectina 1% usada en borregos, administrada en cápsulas de liberación prolongada contra nueve especies de nemátodos (larva infectante L₃ y adultos) de interés pecuario, donde encontraron efectividad de 96.5% de mortalidad mínima y 100% máxima ([Rehbein et al., 2000](#)). Los porcentajes de efectividad de la ivermectina 1% aquí encontrados (99.2%-100%), se encuentran dentro de los rangos de efectividad antes mencionados. Otro estudio reciente demostró la efectividad de la ivermectina en comparación con otros antihelmínticos (levamisol y albendazol), donde usaron borregos de entre 7 y 8 meses de edad, naturalmente infectados con cepas multiresistentes (*Haemonchus spp.* y *Trychostrongylus spp.*), donde

encontraron una eficacia de hasta el 80% en la reducción de huevos en heces por parte de la ivermectina, en comparación con el levamisol (52%) y el albendazol (72%), administrados de forma intrarruminal ([Suarez et al., 2014](#)). Debido a esto, se eligió a la ivermectina como control en este estudio.

Cuadro 4.3. Porcentaje de mortalidad de larvas infectantes envainadas de *H. contortus*, expuesta a cinco concentraciones de extractos hidrometanólicos de *G. sepium* y *L. tridentata*, con lecturas a 24, 48 y 72 horas.

mg/mL	Planta	24 h (%)	48 h (%)	72 h (%)
12.5	<i>G. sepium</i>	20.9 ± 10.6 bc	13.8 ± 4.5 cd	30.4 ± 12.1 cd
	<i>L. tridentata</i>	19.1 ± 4.0 bc	36.9 ± 3.0 b	18.9 ± 3.9 ef
25	<i>G. sepium</i>	21.6 ± 2.5 bc	11.7 ± 1.9 d	38.7 ± 21.8 c
	<i>L. tridentata</i>	17.5 ± 4.2 bcd	34.7 ± 24.2 b	16.8 ± 3.3 ef
50	<i>G. sepium</i>	16.5 ± 4.7 bcd	22.2 ± 4.1 bcd	19.2 ± 4.8 ef
	<i>L. tridentata</i>	21.6 ± 9.5 bc	25.8 ± 16.9 bc	16.5 ± 3.5 ef
100	<i>G. sepium</i>	14.7 ± 4.7 cd	26.2 ± 7.5 bc	21.6 ± 3.6 de
	<i>L. tridentata</i>	21.2 ± 8.0 bc	30.2 ± 21.1 bc	16.7 ± 3.3 ef
200	<i>G. sepium</i>	25.2 ± 11.5 b	29.0 ± 5.2 bc	61.5 ± 20.4 b
	<i>L. tridentata</i>	19.0 ± 6.1 bc	30.0 ± 19.7 bc	26.4 ± 7.5 de
Control +	Ivermectina 1%	99.6 ± 0.6 a	99.2 ± 1.0 a	99.6 ± 0.7 a

Los valores con la misma literal dentro de una misma columna, no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$).

Los extractos hidro-metanólicos de fracción vegetal de hojas de *G. sepium* y de *L. tridentata*, presentan efecto letal en contra de larvas infectantes desenvainadas de una cepa del nemátodo *H. contortus* en todas sus concentraciones (Cuadro 4.4).

Cuadro 4.4. Porcentaje de mortalidad de larvas desenvainadas de *H. contortus*, expuesta a cinco concentraciones de extractos hidro-metanólicos de *G. sepium* y *L. tridentata*, con lecturas a 24, 48 y 72 horas.

mg/mL	Planta	24 h (%)	48 h (%)	72 h (%)
12.5	<i>G. sepium</i>	19.1 ± 9.2 d	14.6 ± 2.1 ef	17.4 ± 3.3 ef
	<i>L. tridentata</i>	18.1 ± 6.7 e	13.9 ± 3.0 f	10.8 ± 1.9 g
25	<i>G. sepium</i>	17.2 ± 5.7 ef	15.8 ± 3.4 ef	19.3 ± 4.3 de
	<i>L. tridentata</i>	16.1 ± 4.0 ef	11.8 ± 2.1 f	9.7 ± 2.3 g
50	<i>G. sepium</i>	17.4 ± 4.0 e	17.7 ± 5.1 ef	25.5 ± 6.1 d
	<i>L. tridentata</i>	14.5 ± 3.5 ef	11.6 ± 4.7 f	14.8 ± 6.8 fg
100	<i>G. sepium</i>	37.1 ± 14.6 d	35.5 ± 14.2 d	44.7 ± 2.8 c
	<i>L. tridentata</i>	32.0 ± 12.2 d	22.6 ± 7.0 e	31.6 ± 12.0 d
200	<i>G. sepium</i>	61.8 ± 15.7 c	62.3 ± 17.0 c	93.8 ± 2.9 b
	<i>L. tridentata</i>	74.0 ± 19.2 b	73.6 ± 6.1 b	44.7 ± 17.5 c
Control +	Ivermectina 1%	100 ± 0.0 a	99.6 ± 0.7 a	99.3 ± 1.2 a

Los valores con la misma literal dentro de una misma columna, no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$).

Con lecturas a 24 horas *G. sepium* presentó el menor porcentaje de mortalidad en concentraciones de 25 mg/mL, mientras que con *L. tridentata* a concentraciones de 50 mg/mL, se observó diferencia estadística ($P \leq 0.05$) a concentraciones de 200 mg/mL, *L. tridentata* con relación a la ivermectina (100 de mortalidad) y *G. sepium*. Así, con lecturas a 48 horas, se observó el menor porcentaje de mortalidad a 12.5 mg/mL para *G. sepium* (14.6 ± 2.1), y para *L.*

tridentata a (11.6 ± 4.7) concentraciones de 50 mg/mL. Se observó diferencia ($P \leq 0.05$) a concentraciones de 200 mg/mL, para *L. tridentata* y *G. sepium*, con relación a la ivermectina. Finalmente, con lecturas a 72 hrs, el menor porcentaje de mortalidad registrado para *G. sepium* fue a 12.5 mg/ml, mientras que para *L. tridentata* fue a 25 mg/mL (Cuadro 4.4). Se observó diferencia ($P \leq 0.05$), para *G. sepium* a 200 mg/mL, mientras que concentraciones de 200 mg/mL de *L. tridentata* no presentó diferencia estadística ($P \leq 0.05$), en comparación con la ivermectina (Cuadro 4.4).

Por otra parte, diversos estudios realizados evidencian el efecto nematocida de *G. sepium*. [Pérez-Pérez et al.](#) (2014) encontraron un efecto positivo sobre la inhibición de la eclosión de huevos de nemátodos gastrointestinales con un extracto metanólico de *G. sepium* en concentraciones de 600 $\mu\text{g/mL}$, efecto atribuido a las saponinas y taninos contenidos en las hojas. [Puerto-Abreu et al.](#) (2014) evaluaron la eclosión de huevos y la migración de las larvas del tercer estadio de estrogilidos gastrointestinales de ovinos, en confrontación con extractos acuoso de hojas de *G. sepium*, donde se observó mayor efecto de inhibición de la eclosión e inhibición de la migración larvaria, a una concentración de 25 mg/mL. Posteriormente un estudio similar donde usaron tres extractos (acuoso, 70:30, acetónico) contra huevos de *Cooperia punctata*, reveló una efectividad de inhibición de la eclosión de huevos del 100% con extractos acetónicos de hojas de *G. sepium* ([Von-Son de Fernex et al., 2016](#)). Así mismo, otro estudio sobre huevos y larvas en estadio 1 y 2 de *H. contortus*, reveló un efecto de inhibición sobre la eclosión de huevos y un efecto letal contra larvas 1 y 2, en concentraciones de 1.25 mg/mL, efecto atribuido a los taninos presentes ([Wabo-Poné et al., 2011](#)). Finalmente, un estudio realizado con larva infectante de *H. contortus*, donde evaluaron desvaine y migración larvaria encontraron, a una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ inhibición de la migración larvaria hasta en un 46.2% y no hubo desvaine de las larvas infectantes, solo disminuyó la motilidad a una concentración de 1200 $\mu\text{g/mL}$, efecto debido a los taninos/polifenoles presentes en el extracto acetona:agua

(70:30) de hojas de *G. sepium*, usado en este estudio ([Von-Son de Fernex et al., 2012](#)). Finalmente, se sugieren estudios *in vivo* con esta planta, sobre infecciones mixtas de nemátodos gastrointestinales para corroborar la efectividad encontrada en este y en otros estudios.

Cabe mencionar que *L. tridentata* no se ha estudiado como nematocida, hay reportes de esta planta usada en la medicina etnobotánica y tradicional ([Arteaga et al., 2005](#)), y entre otras diversas cualidades ([Gnabre et al., 2015](#)), como el potencial antioxidante debido a fitoestrógenos presentes en las hojas de esta planta (kaempferol, ácido nordihidroguayarático y quercetina), con diversas aplicaciones en la industria alimentaria y diversos campos de la medicina ([Martins et al., 2012](#)). Así como el uso de esta planta como inhibidor de hongos de interés en la agricultura (*Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum*, *Rhizopus oryzae*), con efectividad hasta del 100%, donde le confieren la actividad encontrada, a los compuestos ya mencionados, contenidos en la resina y hojas de esta planta ([Peñuelas-Rubio et al., 2015](#)). [Vargas-Arispuro et al.](#) (2005), usaron extractos etanólicos de hojas y tallos de *L. tridentata*, contra hongos de interés en la agricultura (*Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*), encontraron mayor inhibición micelial en extractos de hojas (68.7%-86.5%), donde le atribuyen el efecto a dos compuestos, el ácido nordihidroguayarático y methyl-ácido nordihidroguayarático. Otra de las cualidades encontradas en esta planta, es el efecto contra bacterias de interés en la salud pública, donde usaron seis bacterias gram positivas y seis gram negativas en confrontación con un extracto y cuatro fracciones de hojas de esta planta. Se observó mayor inhibición del crecimiento con la fracción de acetato de etilo, contra una cepa evaluada resistente a la metilicina, los compuestos responsables del efecto fueron el kaempferol, NDGA y quercetina, en orden de importancia ([Martins et al., 2013](#)). Otro estudio realizado demostró la actividad acaricida (*Amblyomma cajennense* y *Boophilus micropilus*) de hojas de esta planta donde encontraron mortalidad del 100% con lecturas a 24 horas ([Salinas-Zárate, 2010](#)). La administración prolongada de esta planta ha causado

hepatotoxicidad, debido a un fitoestrógeno y antioxidante contenido en la resina de las hojas, el ácido nordihidroguayarático (NDGA) ([Brent, 1999](#)). Así mismo se ha reportado disminución en el consumo voluntario, en un 10% adicionado en la dieta de borregos en finalización ([Hernández-Baez et al., 2016](#)), por lo tanto, es necesario realizar otros estudios *in vitro* contra infecciones mixtas de nemátodos gastrointestinales, identificar los compuestos y posteriormente usarlo *in vivo*, y así corroborar su eficacia.

Aunque los extractos acuosos de *G. sepium* mostraron menor concentración cuantitativa (mg/g) de polifenoles condensados, hidrolizables y totales (Cuadro 4.2) con relación con el extracto de *L. tridentata*, la primera presentó mejores porcentajes de mortalidad, lo que hace pensar que posiblemente la concentración cuantitativa de polifenoles no es indicativo del mayor o menor efecto nematicida. El efecto letal puede ser debido a algún compuesto bioactivo en particular o una acción sinérgica de ellos (flavonoides/taninos) ([Klongsiriwet et al., 2015](#)), compuestos bioactivos que posiblemente no están contenidos en el extracto de *L. tridentata*.

4.3.1. Concentración letal 50

La concentración letal 50, es la concentración necesaria para obtener el 50% de mortalidad de organismo vivos, en este caso larvas infectantes envainadas y desenvainadas, confrontadas por pozo a diferentes horas de lecturas ([Krishnappa et al., 2012](#)).

En el presente estudio, se encontró de la siguiente manera.

Contra larva envainada en confrontación con los extractos hidro-metanólicos de *L. tridentata* y *G. sepium*, se encontró la CL₅₀ en 41 mg/ml⁻¹ a 24 hrs para ambos extractos, mientras que con lecturas a 48 hrs *L. tridentata* necesitó 41 mg/ml⁻¹, mientras que *G. sepium* 70 mg/ml⁻¹, finalmente a 72 hrs *L. tridentata* necesitó 57 mg/ml⁻¹ para obtener un 50% de mortalidad, mientras que

G. sepium necesitó mas concentración (74 mg/ml⁻¹), para obtener los mismos resultados (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5. Concentración letal 50 expresada en mg/ml⁻¹ de ambas plantas, en contra de larvas infectantes envainadas de *H. contortus*, en los tres tiempos de lecturas.

Extractos Hidro-metanólicos	24 h	IC	48 h	IC	72 h	IC
<i>L. tridentata</i>	41	6-90	41	4-92	57	20-100
<i>G. sepium</i>	41	10-88	70	33-100	74	46-100

IC: Intervalo de confianza 95%.

Por otra parte, la CL₅₀, para larva desenvainada quedó de la siguiente manera, con lecturas a 24 hrs se necesitaron 36 mg/ml⁻¹ de extracto de *L. tridentata*, mientras que 23 mg/ml⁻¹ de *G. sepium*. Con lecturas a 48 hrs se necesitaron 58 mg/ml de extracto hidro-metanólico de *L. tridentata* y 40 mg/ml⁻¹ de *G. sepium*, finalmente, para obtener una mortalidad del 50% de las larvas con lecturas a 72 hrs, se necesitaron 61 mg/ml⁻¹ de *L. tridentata* y 68 mg/ml⁻¹ de *G. sepium* (Cuadro 4.6).

Cuadro 4.6. Concentración letal 50 expresada en mg/ml⁻¹ de ambas plantas, en contra de larvas infectantes desenvainadas de *H. contortus*, en los tres tiempos de lecturas.

Extractos Hidro-metanólicos	24 h	IC	48 h	IC	72 h	IC
<i>L. tridentata</i>	36	6-94	58	22-100	61	26-100
<i>G. sepium</i>	23	1-81	40	8-94	68	32-100

IC: Intervalo de confianza 95%.

Estudios realizados han mostrado la efectividad del extracto de *G. sepium*, mediante el cálculo de la concentración letal 50, de esta forma [Krishnappa et al.](#) (2012), usaron fracciones de hojas de *G. sepium* (acetato de etilo y etanol), donde encontraron la minima de 23.23 mg/L y la máxima de

30.50 mg/L en contra de larvas en fase tres de mosquito *Anopheles stephensi*. Por otra parte, [Von-Son de fernex et al. \(2016\)](#), usando tres extracciones (acuoso, acetónico, 70:30), sobre la inhibición de la eclosión de huevos del nemátodo *Cooperia punctata*, encontraron 32.63 mg/ml⁻¹, 1.03 mg/ml⁻¹ y 15.12 mg/ml⁻¹, respectivamente. Otro estudio donde usaron hojas de *G. sepium* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de nemátodos gastrointestinales, encontraron una dosis efectiva del 50% a 394.96 µg/mL ([Pérez-Pérez et al., 2014](#)).

En concordancia con los extractos hidro-metanólicos de las plantas aquí usadas, estos dieron como resultado en la CL₅₀, *G. sepium* contra larva envainada la máxima fue de 74 mg/ml⁻¹ con lecturas a 72 hrs, y contra larva desenvainada 68 mg/ml⁻¹ a 72 hrs, mientras que para *L. tridentata*, fueron de 57 mg/ml⁻¹ y 61 mg/ml⁻¹, respectivamente (Cuadros 4.5 y 4.6). Resultados elevados en comparación con los estudios citados, cabe señalar que para *L. tridentata* no se encontraron estudios, es necesario realizar otros estudios *in vitro* usando otros solventes.

Finalmente, los resultados del cálculo de la CL₅₀ aquí encontrados, corroboran el potencial nematocida de los extractos hidro-metanólicos de *L. tridentata* y *G. sepium*, por lo tanto, es necesario realizar otros estudios *in vitro* con diferentes solventes y observar si disminuye la CL₅₀, esto con el fin de ir buscando una dosis terapéutica, todo esto encaminado a aplicar estas plantas *in vivo*, usando la dosis necesaria para obtener el efecto nematocida, sin afectar al hospedero.

4.3.2. Hallazgos importantes encontrados al realizar las lecturas

Al realizar las lecturas se observaron lesiones a lo largo del cuerpo del nemátodo.

Estudios realizados, donde evaluaron el efecto nematicida de leguminosas *in vivo* e *in vitro*, realizaron microscopía electrónica a los nemátodos para observar los posibles daños, encontraron agregados en la región cefálica y cápsula bucal del nemátodo ([Martínez-Ortiz de Montellano et al., 2012](#)), en base a esto pudiéramos atribuir las lesiones observadas en el extracto de *L. tridentata* en lecturas a 48 h (Figura 4.1). Posiblemente estos agregados impiden o dificultan la alimentación del nemátodo así como la motilidad, por lo tanto posiblemente haya muerte por inanición ([Martínez-Ortiz de Montellano et al., 2012](#)).



Figura 4.1. Lesiones observadas en el cuerpo y porción anterior, sobre larvas envainadas después de la confrontación con el extracto hidro-metanólico de *L. tridentata*, con lecturas a 48 horas (10x) y concentraciones de 50 mg/mL.

En concentraciones de 100 y 200 mg/mL en sus tres lecturas, del extracto hidro-metanólico de *L. tridentata* contra larvas desenvainadas, se observaron adherencias en la cutícula, posición de rosca del nematodo y movimientos aletargados, posiblemente causados por las adherencias en la cutícula, cápsula bucal, vulva, ano y en la totalidad del cuerpo del nemátodo

(Figura 4.2) posiblemente estas larvas quedan inviables, debido a que no pueden alimentarse, ni reproducirse, debido a las adherencias en las diferentes partes ([Martínez-Ortíz de Montellano et al., 2012](#)), y menos aún para realizar una nueva infección. Por lo tanto se sugiere realizar estudios *in vivo* con las larvas resultantes de la confrontación del extracto hidro-metanólico de *L. tridentata* en una concentración de 100 mg/mL y así corroborar lo antes citado.



Figura 4.2. Adherencias observadas en la cutícula de larvas infectantes desvainadas de *H. contortus* después del contacto *in vitro*, con el extracto hidro-metanólico de *L. tridentata* en concentraciones de 100 mg/mL, con lecturas a 72 horas (10x).

Al realizar las lecturas de la confrontación entre el extracto hidro-metanólico de *G. sepium* contra larva infectante envainada, se observaron lesiones en la cutícula del nemátodo, oxidación de la cutícula ([Wabo-Poné et al., 2011](#)). Esto puede ser debido a que los taninos condensados penetran la pared celular del nemátodo, y causan pérdida de la continuidad celular, al mismo tiempo afectan la actividad muscular, e influyen directamente sobre la motilidad del nemátodo ([Molan Abdul et al. 2000](#)). Las lesiones en la cutícula

del nemátodo hechas por el extracto, parecen tener similitud al efecto de deformidad producido por la ivermectina 1% (Figura 4.3).

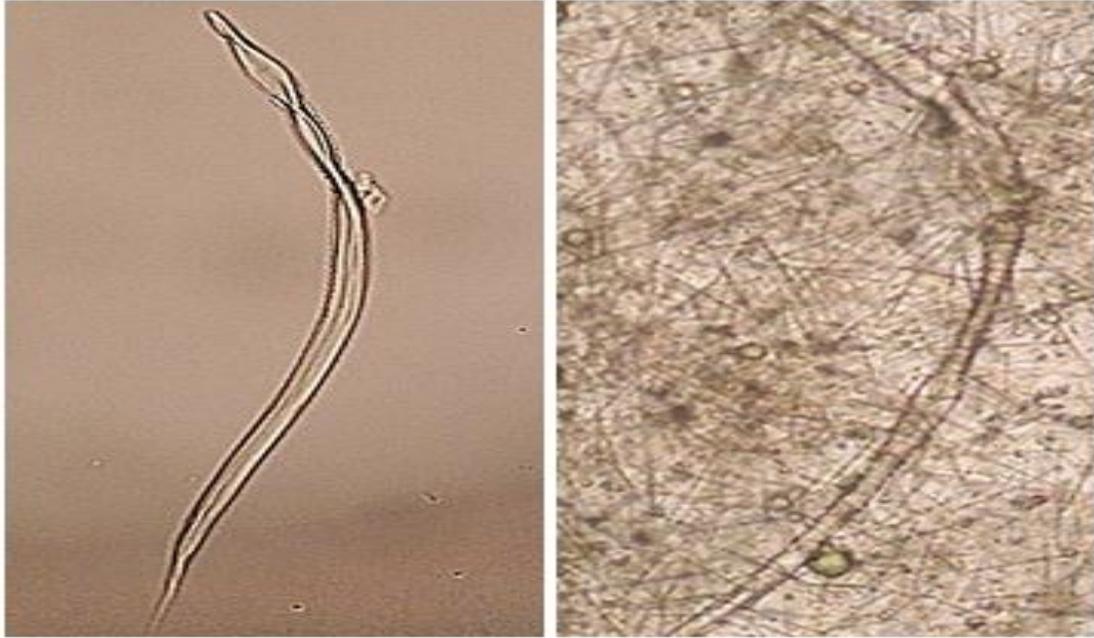


Figura 4.3. Cutícula de una larva envainada de *H. contortus*, después del contacto con la ivermectina 1% (izquierda) y con el extracto hidro-metanólico de *G. sepium* (derecha), en concentraciones a 200 mg/mL con lecturas a 72 horas (10x).

Se observaron otras lesiones como pérdida de la continuidad celular en el sistema digestivo del nemátodo, así como zonas irregulares translúcidas y vacuolización ([Martínez-Ortiz de Montellano et al., 2012](#)), lesiones observadas en concentraciones de 100 mg/mL (48 h) del extracto hidro-metanólico de *G. sepium* (Figura 4.4, imagen superior derecha). Además se observaron, lesiones en la estructura externa (cutícula) del nemátodo a 200 mg/mL con lecturas a 48 horas (Figura 4.4). Esto puede ser debido a que los taninos se unen y penetran la cutícula de las larvas, evitando la absorción de la glucosa, provoca una parálisis y la muerte del nemátodo, así mismo a nivel intestinal provoca una lisis celular ([Wabo-Poné et al., 2011](#)), a nivel de la cutícula provocan una pérdida de la continuidad normal de las crestas cuticulares y longitudinales, por partes o en la totalidad del cuerpo del nemátodo ([Martínez-Ortiz de Montellano et al., 2012](#)).

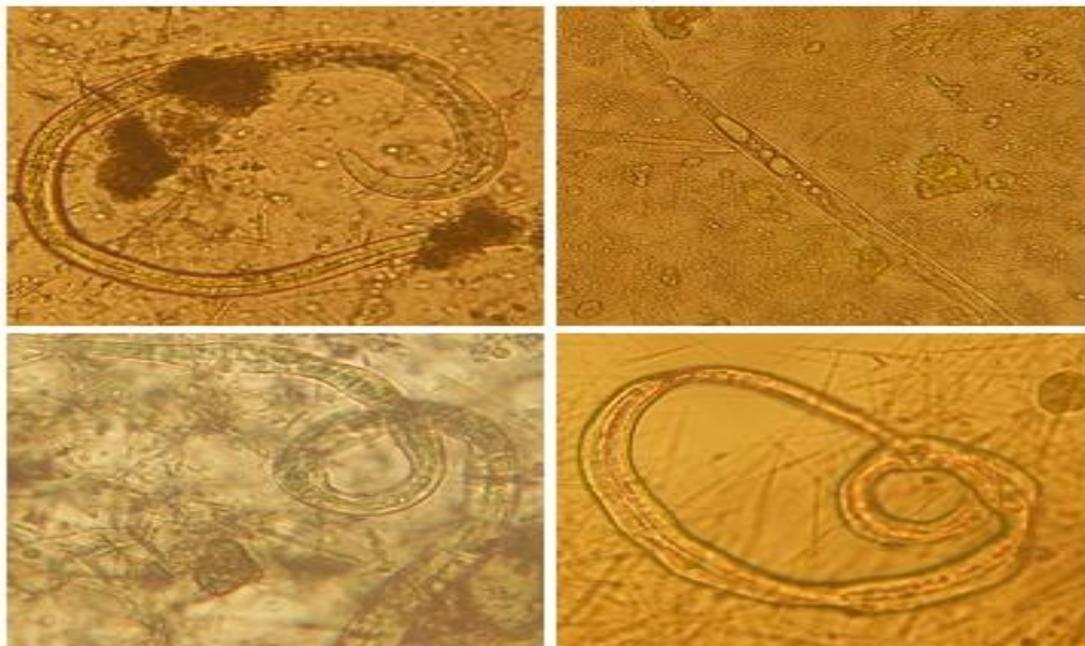


Figura 4.4. Daños en cutícula sobre larvas desenvainadas de *H. contortus*, después del contacto *in vitro* con el extracto hidro-metanólico de *G. sepium* en concentraciones de 100 (arriba) y 200 mg/mL (abajo) con lecturas a las 48 horas (10x).

4.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN, ACOPLADO A ESPECTRÓMETRO DE MASAS (HPLC/MS)

Se realizó el análisis cualitativo para determinar e identificar los compuestos bioactivos, como posibles responsables del efecto nematocida tanto en larvas envainadas como en larvas desenvainadas de *H. contortus*. Los polifenoles purificados (polvos), obtenidos de la columna de amberlite XAD-16, fueron inyectados al HPLC, acoplado al espectrómetro de masas.

Durante el análisis de la cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas, fueron identificados seis compuestos químicos activos procedentes de un extracto acuoso de material vegetativo de *L. tridentata*, provenientes de tres familias lignanos, flavonoles y antocianinas (Cuadro 4.7), polifenoles tanto condensados e hidrolizables.

Se registró el tiempo de retención (TR), según como los cromatogramas fueron apareciendo, posteriormente identificado el peso molecular (m/z), se realizó una búsqueda del compuesto en una base de datos preestablecida, donde se identificaron compuestos y familias a las que pertenecen.

Cuadro 4.7. Compuestos bioactivos identificados en cromatografía líquida de alta resolución, acoplado a masas (HPLC/MS) del extracto acuoso de *L. tridentata*.

TR (min)	m/z	Compuesto	Familia
39.84	352.9	Sesamin	Lignano
41.7	304.9	Galocatequina	Flavonoles
42.6	609	Peonidin 3-O rutinosido	Antocianina
44.12	283.9	Metil galangin	Flavonoles
45.85	497.3	Epigalocatequin 7-O-glucurónido	Flavonoles
47.26	305	Epigalocatequina	Flavonoles

TR- Tiempo de retención, m/z- Relación masa/carga.

Del extracto acuoso de hojas de *L. tridentata*, se identificó sesamin, galocatequina, peonidin 3-O rutinosido, metil galangin, epigalocatequin 7-O-glucurónido y epigalocatequina, pertenecientes a la familias de lo lignanos, flavonoles y antocianias, en el cuadro 4.7 se observan el tiempo de retención y peso molecular, en la figura 4.5 se observan sus estructuras químicas.

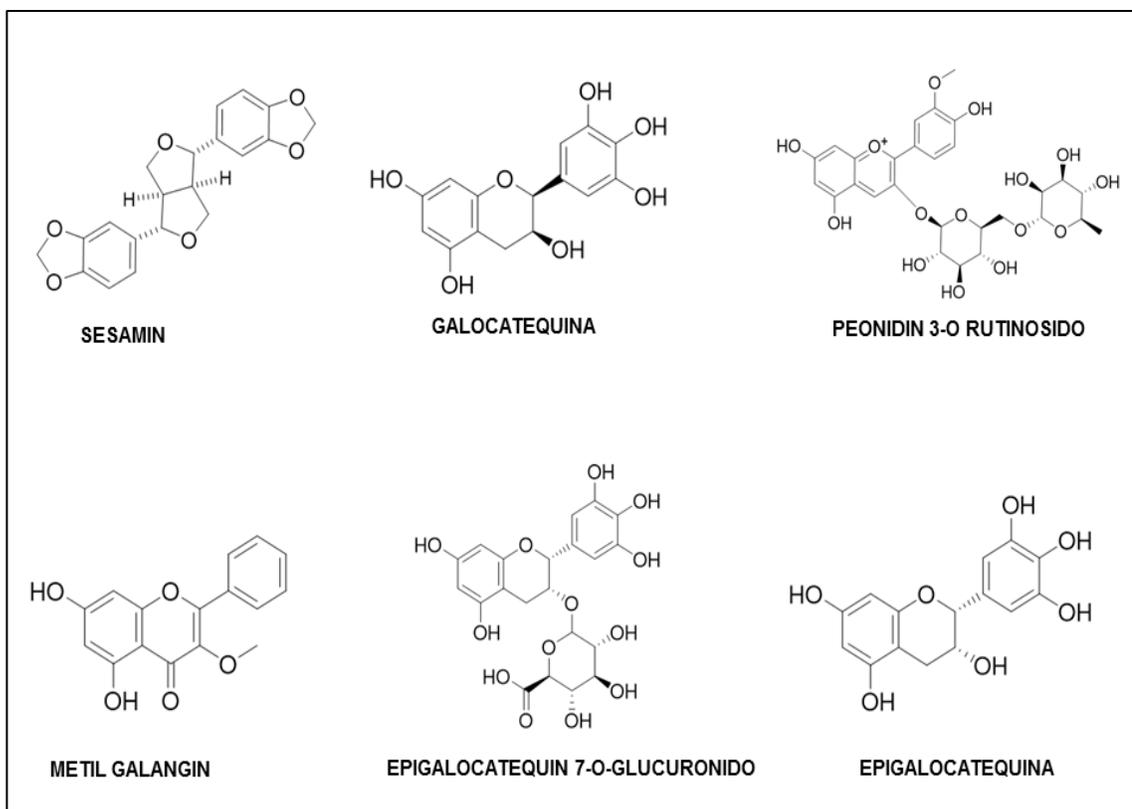


Figura 4.5. Estructura química de los compuestos bioactivos identificados en el extracto acuoso de *L. tridentata*.

Existen estudios sobre la actividad en los diversos campos científicos, que presentan los compuestos encontrados en el extracto acuoso de *L. tridentata* del presente estudio, a continuación se mencionan.

El primer compuesto encontrado fue un lignano, el sesamin es perteneciente al grupo de los polifenoles condensados, a este compuesto se le han atribuido propiedades en la reducción de lípidos y colesterol, antihipertensivo, neuroprotector, antitumoral y actividad antiinflamatoria ([Eitsuka et al., 2016](#)).

Por otra parte, al grupo de los lignanos le han atribuido propiedades antioxidantes muy potentes, propiedades antifúngicas con hongos de interés en la agricultura (*Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*), al parecer la acción antifúngica fue resultado de dos compuestos en sinergia ([Vargas-Arispuero et al.,](#)

[2005](#)), de esta manera posiblemente el efecto nematocida encontrado en este estudio haya sido una respuesta de la acción sinérgica entre este compuesto, y los otros cinco encontrados en el extracto acuoso de *L. tridentata*.

Por otro lado, la catequina pertenece a la familia de los flavonoles, y al grupo de los polifenoles condensados, es un potente antioxidante generalmente en forma de galato de epigallocatequina, además de poseer propiedades antimicrobiales y antivirales, se encuentra presente en vinos, frutas y algunos tés ([Ruiz-Martínez et al., 2011](#)). La epigallocatequina se encuentra presente en tés, uvas, y algunas semillas de leguminosas, este compuesto tiene diversos usos en la salud, y particularmente posee una acción anti-cancerígena ([Eitsuka et al., 2016](#)). Por otra parte, un estudio *in vitro* reciente, donde usaron la catequina, apicatequina, epigallocatequina y galato de epigallocatequina, en sinergia con un tanino condensado (prodelfinidin), sobre dos nemátodos que afectan a los bovinos, solo hubo disminución de la motilidad de los nemátodos, al parecer la concentración y tamaño de moléculas de taninos condensados, predispone al efecto antiparasitario ([Desrués et al., 2016](#)), lo anterior podría explicar lo observado al realizar las lecturas, los movimientos demasiado aletargados por parte de las larvas que se confrontaron con el extracto de *L. tridentata*, posiblemente efecto de estos compuestos (galocatequina, epigallocatequin 7-O glucuronido y la epigallocatequina), en sinergia con los otros encontrados en el extracto de *L. tridentata* (sesamin, peonidin 3-O rutinosido y metil galangin), y así potencializar el efecto nematocida contra larvas envainadas y desenvainadas.

Por otra parte, el peonidin 3-O rutinosido, es una antocianina (flavonoide). Las antocianinas confieren pigmento a las plantas, estas tienen acción antioxidante, además, se ha reportado acción antitumoral, antiarteroesclerosis, antialérgica, hipoglicemiante, antifatiga, protección neuronal ([Deng et al., 2013](#)). Se tienen reportes del efecto nematocida de los flavonoides en sinergia con otros compuestos ([Klongsiriwet et al., 2015](#)), por lo tanto

posiblemente el efecto nematicida encontrado en confrontación extracto-larva desenvainada, pudiera ser debido a este compuesto, que actuó en sinergia con flavonoles y lignanos, encontrados en el extracto acuoso de *L. tridentata*.

Otro de los compuestos encontrados en el extracto acuoso de *L. tridentata* fue el metil-galangin; este es un flavonol perteneciente al grupo de los polifenoles condensados. Algunas de las actividades de los flavonoles, ya se enlistaron anteriormente.

Al parecer los taninos condensados, flavonoides y taninos hidrolizables, en sinergia, son los responsables del efecto nematicida ([Katiki et al., 2013](#); [Klongsiriwet et al., 2015](#)), en el extracto acuoso de *L. tridentata* encontramos mortalidad en todas las concentraciones estudiadas tanto para larvas envainadas y desenvainadas, que al parecer fueron debido a compuestos de las familias de las flavonoles (polifenoles condensados), antocianinas (flavonoide) y los lignanos (polifenoles condensados), que actuaron en sinergia para potencializar el efecto. Es necesario realizar otros estudios *in vitro* con ensayos biodirigidos, usando los compuestos encontrados en este estudio, en forma individual y colectiva, y en base a resultados, comparar con lo encontrado por Klongsiriwet et al. (2015) y Katiki et al. (2013).

Por otro lado, durante el análisis de la cromatografía líquida de alta resolución acoplado a masas, fueron identificados cualitativamente nueve compuestos químicos activos procedentes de un extracto acuoso de material vegetativo de *G. sepium*, provenientes de cuatro familias flavonoles, flavonoide, proantocianidinas y ácidos fenólicos (Cuadro 4.8), metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los polifenoles tanto condensados e hidrolizables.

Se registró el tiempo de retención (TR), según como los cromatogramas fueron apareciendo, posteriormente identificado el peso molecular (m/z), se

realizó una búsqueda del compuesto en una base de datos preestablecida, donde se identificaron compuestos.

Del extracto acuoso de hojas de *G. sepium* se identificaron los siguientes compuestos químicos bioactivos, vainillin 4 sulfato, prodelfinidin, p-cumaroilglucosa, kaempferol 3-O- glucosil- ramnocil- glucosido, kaempferol 3-O-xilosil- rutinosido, ácido P-coumárico, luteolin 7-O- rutinosido, isoramnetin 3-O-glucósido 7-O-ramnosido y ácido dehidrodiferúlico, en el cuadro 4.8 se observan, el tiempo de retención, peso molecular y la familia a la que pertenecen, en la figura 4.6 se observan las estructuras químicas.

Cuadro 4.8. Compuestos bioactivos identificados en cromatografía líquida de alta resolución acoplado a espectrómetro de masas (HPLC/MS) del extracto acuoso de *G. sepium*.

TR (min)	m/z	Compuesto	Familia
16.5	233	Vainillin 4 sulfato	Flavonoide
28.7	885	Prodelfinidin	Proantocianidinas
29.6	325	P- coumaroilglucosa	Ácido fenólico
30.7	755	Kaempferol 3-O- glucosil- ramnocil- glucosido	Flavonoles
31.8	739	Kaempferol 3-O- xilosil- rutinosido	Flavonoles
33.2	164.9	Ácido P-coumárico	Ácido fenólico
34	593.1	Luteolin 7-O- rutinosido	Flavonoide
35.1	623	Isoramnetin 3-O-glucósido 7-O-ramnosido	Flavonoles
36.6	385	Ácido dihidrodiferúlico	Ácido fenólico

TR- Tiempo de retención, m/z- Relación masa/carga.

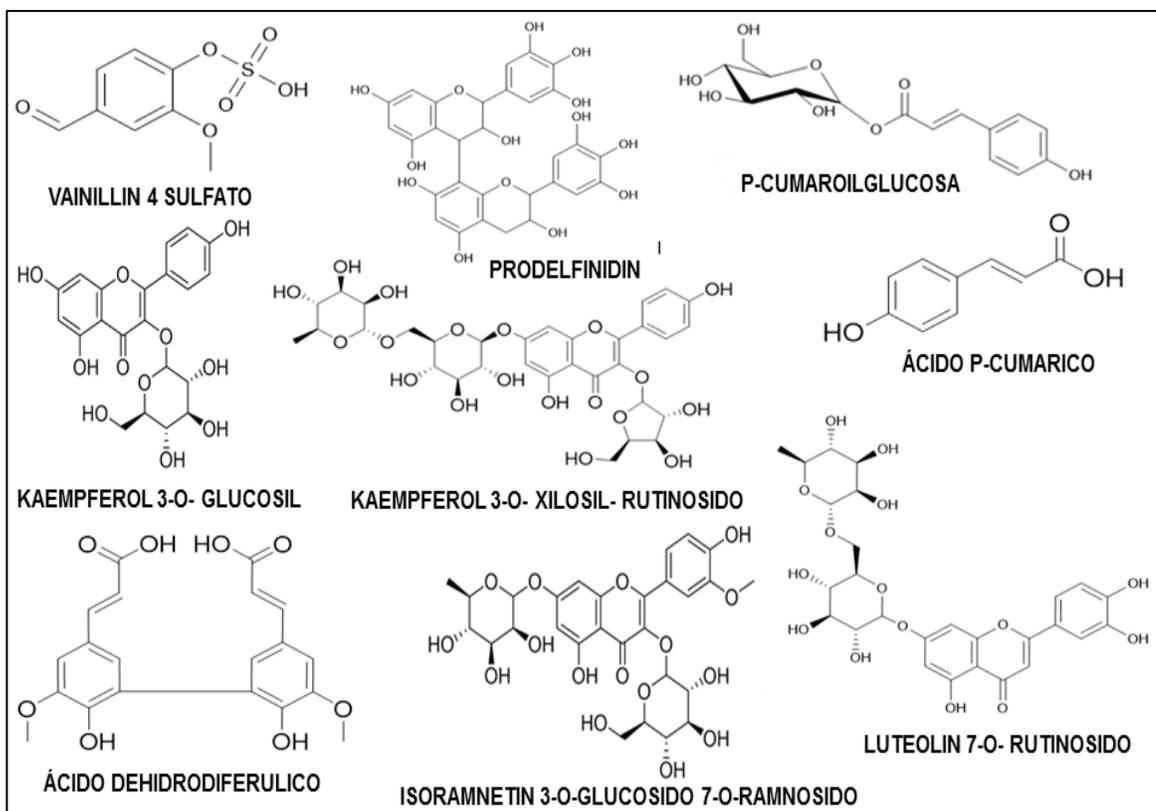


Figura 4.6. Estructura química de los compuestos bioactivos identificados en el extracto acuoso de *G. sepium*.

Existe evidencia del efecto nematocida de los compuestos encontrados en el extracto acuoso de *G. sepium*.

El prodelfinidin es una proantocianidina perteneciente al grupo de los taninos condensados, hay reportes recientes del efecto de los taninos condensados sobre nemátodos gastrointestinales, se sabe que actúan en conjunto con otros compuestos ([Klongsiriwet et al., 2015](#)). Otro estudio donde usaron este tanino condensado en combinación con cinamaldehído de forma *in vitro*, encontraron que este TC afecta directamente la motilidad de los nemátodos, reduciéndola considerablemente ([Ropiak et al., 2016](#); [Desrues et al., 2016](#)), sin embargo, en un estudio reciente donde evaluaron la actividad nematocida con compuestos en sinergia, también encontraron actividad nematocida de un compuesto en particular (prodelfinidin) al parecer este actuó de manera individual sobre un nemátodo que afecta a borregos y cabras

([Quijada et al., 2015](#)), por lo tanto en base a lo anterior, posiblemente este compuesto actuó en sinergia con los flavonoides, taninos hidrolizables y polifenoles condensados, encontrados en el extracto acuoso de *G. sepium* y así potencializar el efecto nematocida de esta planta en contra de las larvas envainadas y desenvainadas, pero no podemos descartar la posibilidad de que este compuesto actúe de manera individual sobre las larvas infectantes, debido a que los taninos condensados tienen diferentes modos de acción contra diferentes especies de parásitos ([Quijada et al., 2015](#)). Por lo tanto es necesario realizar otros estudios *in vitro* con estos compuestos en forma individual y en sinergia e identificar cual o cuales compuestos son los responsables del efecto nematocida.

Por otra parte, aunque no hay evidencia del posible efecto nematocida del kaempferol (flavonol), si hay evidencias de este fitoestrogeno con capacidad antioxidante con aplicaciones en la medicina y en la industria ([Martins et al., 2012](#)). Así mismo, otro estudio demostró que este compuesto puede disminuir e inhibir el ensamblaje y la liberación viral ([Coelho-dos-Reis et al., 2011](#)), en base esta evidencia, posiblemente la capacidad antioxidante y antiviral de este compuesto, es la misma responsable del efecto nematocida encontrada en este estudio, en sinergia con los demás compuestos.

El luteolin y vainillina 4-sulfato pertenecen a la familia de los flavonoides, un estudio reciente le ha atribuido efecto nematocida, mediante la inhibición del desvainado de larvas infectantes de *H. contortus*, efecto atribuido debido al sinergismo de este flavonoide, con los taninos condensados y la quercetina ([Klongsiriwet et al., 2015](#)), reafirmando esto muy posiblemente estos compuestos fueron los responsables de la mortalidad de las larvas, que actuaron en sinergia con los taninos condensados, taninos hidrolizables y polifenoles condensados encontrados en el extracto acuoso de *G. sepium*.

El ácido dihidrodiferúlico es un ácido fenólico, pertenece al grupo de los taninos hidrolizables. Hay reportes del uso de los compuestos de este grupo con actividades antitumoral, tratar la diabetes, enfermedades cardiovasculares, y desórdenes neurodegenerativos ([Eitsuka et al., 2016](#)). Otro estudio afirmó la actividad nematocida de los taninos hidrolizables en conjunto con los taninos condensados ([Katiki et al., 2013](#)), por lo tanto este compuesto posiblemente fue uno de los responsables de la actividad nematocida, probablemente en acción sinérgica con el prodelfinidin que es un tanino condensado encontrados en el extracto acuoso de *G. sepium*.

Se sabe que los flavonoides actúan de manera sinérgica con los taninos condensados, para potenciar el efecto nematocida ([Klongsiriwet et al., 2015](#)), donde la cantidad contenida de taninos condensados (prodelfinidin) en la planta, predispone al mayor o menor efecto nematocida ([Desrues et al., 2016](#)), así mismo, los taninos condensados tienen diferentes modos de acción contra diferentes especies de parásitos ([Quijada et al., 2015](#)), en el extracto acuoso de *G. sepium* de este estudio, encontramos la presencia de polifenoles condensados, flavonoides, taninos condensados e hidrolizables, por lo tanto, en base a lo anterior, muy probablemente haya acción sinérgica entre flavonoides (vainillina 4 sulfato, luteolina 7-O- rutinosido) y taninos condensados (prodelfinidin). Así mismo, otro estudio demostró la acción sinérgica oxidativa y nematocida de los taninos condensados e hidrolizables (galotaninos y elangitaninos), juntos potencializan la acción letal nematocida, que solo uno de estos compuestos ([Katiki et al., 2013](#)). Por lo tanto, en base a lo anterior, el efecto nematocida encontrado en este estudio, podríamos atribuírselo a la acción sinérgica entre flavonoides, taninos hidrolizables (ácido fenólico) y taninos condensados, presentes en el extracto acuoso de *G. sepium*.

Finalmente, se sugiere realizar estudios *in vitro* con ensayos biodirigidos con cada uno de estos compuestos, en forma individual y en forma compuesta o sinérgica, con cepas mixtas de parásitos, y así determinar de manera

especifica cual o cuales son los compuestos con la mayor actividad nematicida, y caracterizar el modo de acción de cada uno de estos compuestos sobre los nemátodos, ya que se sabe que los taninos condensados tienen diferentes modos de acción contra diferentes especies de parásitos, debido a que las enzimas liberadas de la vaina son diferentes en cada especie de nemátodos y eso quizás interfiere en la interacción con los taninos ([Quijada et al., 2015](#)), esto pudiera explicar, el porqué las lesiones observadas en las larvas fueron diferentes en cada uno de los extractos.

4.6. RENDIMIENTO DE LA FRACCIÓN VEGETAL EN EXTRACTO HIDRO-METANÓLICO

El extracto hidro-metanólico de *Larrea tridentata*, presentó el siguiente rendimiento por cada 100 g de fracción vegetal se obtuvieron 7.4 g de extracto integro (rendimiento de 7.4%). Mientras que *Gliricidia sepium* por cada 100 g de fracción vegetal, se obtuvieron 6.8 g (rendimiento de 6.8%) de extracto integro, en un estudio Von-Son de Fernex et al. (2016), registraron mediante tres procesos de extracción (acuoso, acetona:agua, acetónico) el rendimiento de *G. sepium*, para el extracto acuoso fue de 5.7%, acetona:agua 9.53% y acetónico 1.01%, los rendimientos de las plantas estudiadas en este estudio fueron mas altas que el extracto acuoso, pero más bajas que el extracto acetona:agua, como lo expreso el estudio antes citado, sin embargo se encuentran dentro de los rangos de los tres procesos de extracción, encontrados por [Von-Son de Fernex et al.](#) (2016).

5. CONCLUSIONES

El material vegetativo de *G. sepium*, presentó mejor porcentaje de PC en comparación con *L. tridentata*, por lo tanto, éste podría usarse como fuente proteica en dietas para rumiantes en el trópico, mientras que *L. tridentata* parece no ser viable como fuente forrajera debido a su alta concentración de metabolitos secundarios. Por otro lado, conociendo la concentración de polifenoles condensados, hidrolizables y totales de ambas plantas, es posible calcular el porcentaje de inclusión en la dieta sin ocasionar toxicidad en los animales.

Por otra parte, la concentración cuantitativa de polifenoles condensados, hidrolizables y totales, contenidos en las plantas no predispone a mayor o menor efecto nematicida. Este efecto se limita a compuestos bioactivos en particular que pueden actuar de manera individual o crear sinergismos, por lo tanto, es necesario realizar otras pruebas *in vitro* con los compuestos identificados en este estudio, en forma individual y/o en forma compuesta e identificar el o los compuestos que presentan el efecto nematicida, así mismo identificar el modo de acción por medio de ensayos con especies de parásitos diferentes.

Se observó mortalidad de larvas en todas las concentraciones de extractos utilizadas en este estudio y el mayor efecto nematicida se observó en concentraciones de 200 mg/mL, en sus tres horas de lectura. Se concluyó que el extracto de *L. tridentata* presenta un efecto letal más lento, tanto en larva envainada como desenvainada en comparación con *G. sepium*. Se sugiere realizar pruebas *in vitro* con tiempos de lecturas más largas y observar si se eleva la mortalidad de las larvas. Así mismo, se observaron múltiples adherencias en la cutícula del nematodo, se piensa que tales adherencias en cavidad bucal del nematodo pueden ocasionar muerte por inanición, y en el aparato reproductivo una disminución en la ovoposición; por lo tanto, pudiera

disminuir la carga parasitaria. Se sugiere un estudio *in vivo* e inocular con estas larvas a ovinos y observar si ocurre la infección.

Los resultados del cálculo de la CL_{50} aquí encontrada, corroboran el potencial nematicida de ambos extractos (*L. tridentata* y *G. sepium*), por lo tanto es necesario realizar otros estudios *in vitro*, con diferentes solventes y observar si disminuye la CL_{50} , esto encaminado a aplicar estas plantas de manera *in vivo*, usando la dosis mínima efectiva, sin afectar al hospedero, y así obtener una alternativa sustentable y sostenible para el control de nemátodos gastrointestinales.

Finalmente, se identificarán nueve compuestos en el extracto acuoso de *G. sepium* (pertenecientes a los grupos de los taninos condensados, taninos hidrolizables, flavonoides y polifenoles condensados) y seis compuestos en el extracto acuoso de *L. tridentata* (polifenoles condensados y flavonoides). Se piensa que el efecto nematicida observado es debido a la acción sinérgica de estos compuestos, aunque no se descarta que algún compuesto en particular haya actuado de manera individual, por lo tanto, se sugiere realizar otras pruebas *in vitro*, con cada uno de los compuestos en forma individual y en sinergia, y así confirmar la acción nematicida, posteriormente evaluar de manera *in vivo* y corroborar la efectividad de ambas plantas.

6. LITERATURA CITADA

- [Achi Y.L.](#), Zinsstag J., Yao K., Yeo N., Dorchies P., Jacquet P. (2003). Host specificity of *Haemonchus spp.* for domestic ruminants in the savanna in northern Ivory coast. *Veterinary Parasitology*. 116. 151-158
- [Aguilar-Caballero A.](#), Torres A.J., Cámara S.R., Hoste H., Sandoval C.C. (2008). Inmunidad contra los nemátodos gastrointestinales: la historia caprina. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 9(1). 73-82. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán. México
- [Aguilar-Marcelino L.](#) (2012). Microorganismos con uso potencial contra el nematodo de *Haemonchus contortus*. Tesis de doctorado. Colegio de postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México
- [Ahoussou Sylvie.](#) (2007). Effet du loperamide sur l'efficacite de l'ivermectine et de la moxidectine dans le traitement des strongyloses gastrointestinales chez les bovins en argentine. These pour obtenir le grade de docteur veterinaire. l'Université Paul-Sabatier de Toulouse. Toulouse, France
- [Alonso-Díaz M.](#), Torres-Acosta J., Sandoval-Castro C., Aguilar-Caballero A., Hoste H. (2008). *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*. 153. 313-319
- [Amaradasa B. S.](#), Lane R. A., Manage A. (2010). Vertical migration of *Haemonchus contortus* infective larvae on *Cynodon dactylon* and *Paspalum notatum* pastures in response to climatic conditions. *Veterinary Parasitology*. 170. 78-87
- [Anziani O.S.](#), Fiel C.A. (2015). Resistencia a los antihelmínticos en nemátodos que parasitan a los rumiantes en la Argentina. EEA INTA Rafaela-Universidad Católica de Córdoba. Facultad Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aire. ISO 690. ISSN 1669-2314
- [AOAC](#) (Association of Oficial Analytical Chemists). (1990). Official Methods of Analysis. Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs. Vol. 1. Edition 15. Journal of the Association of Oficial Agricultural Chemists. Virginia, Usa. ISBN 0-935584-42-0

- [Aquino-Ozuna A.](#) (2012). Evaluación de dos antihelmínticos sobre variables productivas y fisiológicas en cabras boer y murciano granadina en zonas áridas. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo Zootecnista. División de ciencia animal- UAAAN. Saltillo, Coahuila. México
- [Arece-García J.](#), Rodríguez D.J., Torres H. G., Mahieu M., González G.E., González G.R. (2007). The epizootiology of ovine gastrointestinal strongyles in the province of Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Research*. 72. 119-126
- [Arroyo-Balán F.](#), Mendoza de Gives P., López-Arellano M., Liébano-Hernández E., Vázquez-Prats V., Miranda-Miranda E., Ortiz de Montellano Nolasco A. (2008). Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina en condiciones controladas. *Técnica pecuaria en México*. 46(2). 217-223
- [Archiméde H.](#), Gonzáles-Garcia E., Despois P., Etienne T., Alexandre G. (2010). Substitution of corn and soybean with Green banana fruits and *Gliricidia sepium* forage in sheep fed hay-based diets: effects on intake, digestion and growth. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 94. 118-128
- [Arteaga Silvia.](#) Andrade-Cetto Adolfo., Cárdenas René. (2005). *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 98. 231-239
- [Ascacio-Valdés J.](#) Burboa E., Aguilera-Carbo A., Aparicio M., Pérez-Schmidt R., Rodríguez R., Aguilar C. (2013). An antifungal ellagitannin isolated from *Euphorbia antisyphilitica* Zucc. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 3. 41-46
- [Athanasiadou S.](#), Huntley J. (2008). Emerging technologies and their applications in interactions between nutrition and immunity to gastrointestinal parasites in sheep. Review article. *Parasite Immunology*. 30. 101-111
- [Athanasiadou S.](#), Kyriazakis I. (2004). Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*. 63. 631-639

[Ávalos-García A.](#), Pérez-Urria Carril E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología vegetal. 2(3). 119-145. Universidad complutense de Madrid. Madrid, España. ISSN 1989-3620

[Avilés-Nieto Jonathan.](#), Valle-Cerdán José., Castrejón-Pineda Francisco., Angeles-Campos Sergio., Vargas-Bello-Pérez Einar. (2013). Digestibility of Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*)-based diets supplemented with four levels of *Gliricidia sepium* hay in hair sheep lambs. *Tropical Animal Health and Production*. 45(6). 1357-1362

[Barger I.A.](#), Siale K., Banks D.J.D., Le jambre L.F. (1994). Rotational grazing for control of gastrointestinal nematodes of goats in a wet tropical environment. *Veterinary Parasitology*. 53(1-2).109-116

[Bassetto C.C.](#), Amarante A.F. (2015). Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. *Journal of Helminthology*. 89(05). 1-9

[Behnke J.](#), Chiejina S., Musongong G., Fakae B., Ezeokonkwo R., Nnadi P., Ngongeh L., Jean E., Wakelin D. (2006). Naturally occurring variability in some phenotypic markers and correlates of haemonchotolerance in west African dwarf goats in a subhumid zone of Nigeria. *Veterinary Parasitology*. 141. 107-121

[Brent J.](#) (1999). Three new herbal hepatotoxic syndromes. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 37(6). 715-719

[Burke J.M.](#), Soli F., Miller J.E., Terril T.H., Wildeus S., Shaik S.A., Getz W.R., Vanguru M. (2010). Administration of copper oxide wire particles in a capsule or feed for gastrointestinal nematode control in goats. *Veterinary Parasitology*. 168. 346-350

[Camacho, L.M.](#), Rojo, R., Salem, A.Z.M., Provenza, F.D., Mendoza, G.D., Avilés, F., Montañez-Valdez, O.D. (2010). Effect of season on chemical composition and in situ degradability in cows and in adapted and unadapted goats of three Mexican browse species. *Animal Feed Science and Technology*. 155. 206-212

[Campos-Ruelas Ricardo.](#), Herrera-Rodriguez David., Quiroz-Romero Hector., Olazaran J.S. (1990). Resistencia de *Haemochus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Técnica Pecuaria México*. 28(1). 30-34

- [Castrejón-Pineda Francisco A.](#), Martínez-Pérez Paulina., Corona Luis., Valle Cerdán José Luis., David Mendoza Germán. (2016). Partial substitution of soybean meal by *Gliricidia sepium* or *Guazima ulmifolia* leaves in the rations of growing lambs. *Tropical Animal Health and Production*. 48. 133-137
- [Chan-Pérez J.I.](#), Torres-Acosta J.F., Sandoval-Castro C.A., Hoste H., Castañeda-Ramírez G.S., Vilarem G., Mathieu C. (2015). *In vitro* susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary Parasitology*. 217. 53-60
- [Chapman J. M.](#), Nast J. R., Scholes C., Niemann S. (2007). Application of LC/ESI/MS and LC/EI/MS to the characterization of tannins and flavonoids from the acorns of *Quercus macrocarpa*. Poster presented at the 57th Pittsburg. Conference on analytical Chemistry and Applied Spectroscopy. Orlando, Florida
- [Charley-Poulain J.](#), Luffau G., Pery P. (1984). Serum and abomasal antibody response of sheep to infections with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 14.129-141
- [Chartier C.](#), Etter E., Hoste H., Pors I., Koch C., Dellac B. (2000). Efficacy of copper oxide needles for the control of nematode parasites in dairy goats. *Veterinary Research Communications*. 24. 389-399
- [Church D.](#) (1988). *El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición*. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. ISBN 84-200-0739-0
- [Coelho-dos-Reis Graziela Jordana.](#), Ab Gomes Orlando., Bortolini Dener E., Martins Marina L., Almeida Marcia R., Martins Camila S., Carvalho Luciana D., Souza Jaqueline G., Vilela Jose Mario C., Andrade Margareth S., Barbosa-Stancioli Edel Figueredo. (2011). Evaluation of the effects of Quercetin and Kaempferol on the surface of MT-2 cells visualized by atomic force microscopy. *Journal of virological methods*. 174. 47-52
- [CONABIO.](#) (2016). *Zygopillaceae, Larrea tridentata, Coville., Gliricidia sepium y matorral xerófilo*. Consulta: 08 de Mayo de 2016. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/>

[Córdova-Guillen J.](#) (2012). Evaluación de la suplementación alimenticia y un antihelmíntico sobre la endoparasitosis en ovejas Dorper. Tesis de Licenciatura como Ingeniero Agrónomo Zootecnista. División de Ciencia Animal- UAAAN. Saltillo, Coahuila. México

[Costa C.A.](#), Vieira L., Berne M.E., Silva M.U., Guidoni A.L., Figueiredo E.A. (2000). Variability of resistance in goats infected with *Haemonchus contortus* in Brazil. Short communication. Veterinary Parasitology. 88. 153-158

[Cuervo-Jiménez A.](#), Narváez-Solarte W., Hahn von Hessberg C. (2013). Características forrajeras de la especie *Gliricidia sepium* (Jacq.) Stend. Fabaceae. Boletín Científico de Museos de Historia Natural. 17(1). 33-45. ISSN 0123-3068

[D'alexis S.](#), Mahieu M., Jackson F., Boval M. (2012). Cross-infection between tropical goats and heifers with *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology. 184. 384-386

[Deng G.F.](#), Xu X.R., Zhang Y., Li D., Gan R.Y., Li H.B. (2013). Phenolic compounds and bioactivities of pigmented rice. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 53. 296-306

[De Souza Marcia Maria.](#), Madeira Alexandre., Berti Cristine., Krogh Renata., Yunes Rosendo A., Cechinel-Filho Valdir. (2000). Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.)R. Br. Journal of Ethnopharmacology. 69. 85-90

[Desrués Olivier.](#), Fryganas Christos., Ropiak Honorata M., Mueller-Harvey I., Enemark Heidi L., Thamsborg Stig M. (2016). Impact of chemical structure of flavonol monomers and condensed tannins on *in vitro* anthelmintic activity against bovine nematodes. Parasitology. 143. 444-454

[Eitsuka T.](#), Tatewaki N., Nishida H., Nakagawa K., Miyazawa T. (2016). Synergistic anticancer effect of tocotrienol combined with chemotherapeutic agents or dietary components: A review. International Journal of Molecular Sciences. 17. 1605

- [Espinoza-Villavicencio J.](#), Palacios-Espinosa A., Ávila-Serrano N., Guillén-Trujillo A., De Luna De la Peña R., Ortega-Pérez R., Murillo-Amador B. (2007). La ganadería orgánica, una alternativa de desarrollo pecuario para algunas regiones de México: una revisión. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*. 32(6). 385-390. ISSN 0378-1844
- [Fernández-Ruvalcaba M.](#), Vázquez-Prats V., Liebano-Hernández E. (1994). Development and recovery of *Haemonchus contortus* first larval stages on experimental plots in México. *Veterinary Parasitology*. 51. 263-269
- [Figuroa-Castillo J.](#), Méndez-Medina R., Berruenco-Villalobos J., Álvarez-León J. (2000). Detección de resistencia en *Haemonchus contortus* al sulfóxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovino. *Veterinaria México*. 31(4). 309-313
- [Flores-Crespo J.](#), Herrera R. D., Mendoza P., Liébano H. V., Vázquez P. V., López A. M. (2003). The predatory capability of three nematophagous fungi in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces. *Journal of Helminthology*. 77. 297-303
- [Fontenot M.E.](#), Miller J.E., Peña M.T., Larsen M., Gillespie A. (2003). Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology*. 118. 203-213
- [G Galicia-Aguilar H.H.](#), Mendoza de Gives P., Salinas-Sánchez D.O., López-Arellano M.E., Liébano-Hernández E., López-Aroche U., Valladares-Cisneros G. (2008). *In vitro* nematocidal activity of plant extracts of mexican flora against *Haemonchus contortus* fourth larval stage. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases*. 1149. 158-160
- [Gnabre J.](#), Bates R., Chih Huang R. (2015). Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 5. 119-126
- [González-Colín J.](#) (2002). Resistencia de los nematodos gastrointestinales a los antihelmínticos en borregas de la raza Pelibuey y Rambouillet. Tesis de Licenciatura como Ingeniero Agrónomo Zootecnista. División de Ciencia Animal- UAAAN. Saltillo, Coahuila. México

[Hernández-Báez I.](#), Pinos-Rodriguez J.M., García-López J.C., Espinosa-Reyes G., Álvarez-Fuentes G. (2016). *Larrea tridentata* como forraje en finalización de corderos. Perspectivas y avances de la producción animal en México (memorias). 1a edición. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. ISBN 978-607-9453-73-2

[Hernández-Orduño G.](#), Torres-Acosta J., Sandoval-Castro C., Aguilar-Caballero A., Reyes-Ramirez R., Hoste H., Calderon-Quintal J. (2008). *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia gaudieri*, *Havardia albicans* and quebracho tannin extracts on a mexican strain of *Haemonchus contortus* L₃ larvae. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 8. 191-197

[Hoste H.](#), Martinez-Ortiz de Montellano C., Manolaraki F., Brunet S., Ojeda-Robertos N., Fourquaux I., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro S.A. (2012). Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. Veterinary Parasitology. 186. 18-27

[Hoste H.](#), Torres-Acosta J., Alonso-Díaz M., Brunet S., Sandoval-Castro C., Houzangbe Adote S. (2008). Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. Tropical Biomedicine. 25(1). 56-72. ISSN 0127-720

[Hoste H.](#), Torres-Acosta J., Paolini V., Aguilar-Caballero A., Etter E., Lefrileux Y., Chartier C., Broqua C. (2005). Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. Small Ruminant Research. 60. 141-151

[Hyder P.W.](#), Fredrickson E.L., Estell R.E., Lucero M.E., Remmenga M.D. (2005). Loss of phenolic compounds from leaf litter of creosotebush [*Larrea tridentata* (Sess. & Moc. Ex DC.) cov.] and tarbush (*Flourensia cernua* DC.). Journal of Arid Environments. 61. 79-91

[Ibañez F.](#), Wall L., Fabra A. (2016). Starting points in plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercelular invasión of roots. Journal of Experimental Botany. 387. 1-14

[INAFED.](#) (2016). Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo municipal, Tataltepec de Valdés/Saltillo. Consulta: 30 de Agosto de 2016. Disponible en: <http://www.inafed.gob.mx/>

[Juárez-Ángeles S.](#) (2009). Prevalencia de nemátodos gastrointestinales (NGI) en hatos ovinos del municipio de Francisco I. Madero, Hidalgo. Tesis de Licenciatura como Ingeniero Agrónomo Zootecnista. División de Ciencia Animal- UAAAN. Saltillo, Coahuila. México

[Katiki Luciana M.](#), Ferreira Jorge F.S., Gonzalez Javier M., Zajac Anne M., Lindsay David S., Chagas Ana Carolina S., Amarante Alessandro F.T. (2013). Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolysable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. *Veterinary Parasitology*. 192. 218-227

[Kennedy M.W.](#), Harnett W. (2013). Parasitic nematodes: Molecular biology, biochemistry and immunology. 2nd edition. Ed. Cabi. London, UK. ISBN. 13:9781845937591

[Klongsiriwet Chaweewan.](#) Quijada Jessica., Williams Andrew., Mueller-Harvey Irene., Williamson Elizabeth., Hoste Hervé. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 5. 127-134

[Knox David P.](#), Redmond Diane L., Newlands George F., Skuce Philip J., Pettit Dan., David Smith W. (2003). The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. Invited review. *International Journal for Parasitology*. 33. 1129-1137

[Knox M R.](#), Torres-Acosta J., Aguilar-Caballero A. (2006). Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*. 139. 385-393

[Krishnappa K.](#), Dhanasekaran S., Elumalai K. (2012). Larvicidal, ovicidal and pupicidal activities of *Gliricidia sepium* (Jacq.) (*Leguminosae*) against the malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Culicidae: Diptera). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 5. 598-604

[Liébano-Hernández E.](#) (2010). Cultivo e identificación larvaria de nemátodos del tracto gastroenterico. Diagnóstico de enfermedades parasitarias selectas de rumiantes. Libro técnico no.2. CENID-PAVET, INIFAP. 14-15. Editor: Bautista Garfias Carlos Ramón. Jiutepec, Morelos. México

[Liébano-Hernández E.](#), López-Arellano M., Mendoza de Gives P., Aguilar-Marcelino L. (2011). Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nemátodos gastrointestinales en rumiantes. Publicación especial No 2. 1ª ed. CENID-PAVET, INIFAP. México, D.F. ISBN 978-607-425-694-9

[Liébano-Hernández E.](#), López-Arellano M., Vázquez-Prats V., Mendoza de Gives P. (1996). Cryopreservation of infective larvae of *Haemonchus contortus*. Revista latinoamericana de microbiología. 38. 111-114

[Liébano-Hernández E.](#), Vázquez-Prats V., Fernández-Ruvalcaba M. (1998). Sobrevivencia de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* en un clima subcálido subhúmedo en México. Veterinaria México. 29. 245-249

[Lira-Saldívar Ricardo H.](#) (2003). Estado actual sobre las propiedades biocidas de la gobernadora (*Larrea tridentata* D.C. Coville). Revista mexicana de fitopatología. 21(2). 214-222

[Makkar H. P.](#) (2000). Quantification of tannins in tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Animal Production and Health Sub-programme. Vienna, Austria

[Makkar H. P.](#), Blümel M., Borowy N., Becker K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. Journal of the Science Food and Agriculture. 61. 161-165

[Marie-Magdeleine C.](#), Udino L., Philibert L., Bocage B., Archimede H. (2010). *In vitro* effects of cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology. 173. 85-92

[Márquez-Laca D.](#) (2003). Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. Artículo de revisión. Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 4(1). 55-71. ISSN 0122-8706

[Marshall R.](#), Gebrelul S., Gray L., Ghebreyessus Y. (2012). Mixed species grazing of cattle and goats on gastrointestinal infections of *Haemonchus contortus*. American Journal of Animal and Veterinary Science. 7. 61-66

- [Martins Silvia.](#) Aguilar Cristobal., Teixeira José., Mussatto Solange. (2012). Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. Separation and Purification Technology. 88. 163-167
- [Martins S.](#), Amorim E., Peixoto Sobrinho T., Saraiva A., Pisciotano M., Aguilar C., Teixeira J., Musatto S. (2013). Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. Industrial Crops and Products. 41. 306-311
- [Martínez-Ortíz de Montellano C.](#) (2010). Mecanismos de acción de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nemátodos gastrointestinales de los pequeños rumiantes. Tesis de Doctorado. FMVZ-UADY. Mérida, Yucatán. México
- [Martínez-Ortíz de Montellano C.](#), Arroyo-López C., Fourquaux I., Torres-Acosta J., Sandoval-Castro C., Hoste H. (2012). Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. Experimental Parasitology. 133. 281-286
- [Martínez-Ortíz de Montellano C.](#), Vargas-Magaña., Canul-Ku H., Miranda-Soberanis R., Capetillo-Leal C., Sandoval-Castro C., Hoste H., Torres-Acosta J. (2010). Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. Veterinary Parasitology. 172. 283-290
- [Martínez-Santiago J.](#) (2014). Determinación de *Haemonchus contortus* en muestras de materia fecal de ovinos del municipio de Acambay, Estado de México. Tesis de licenciatura como Médico Veterinario Zootecnista. UAAAN-UL. Torreón, Coahuila. México
- [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
- [Mavrogianni V.S.](#), Papadopoulos E., Fragkou I.A., Gougoulis D.A, Valasi I., Orfanou D.C., Ptochos S., Gallidis E., Fthenakis G.C. (2011). Administration of a long-acting antiparasitic to pre-pubertal ewe-lambs in Greece results in earlier reproductive activity and improved reproductive performance. Veterinary Parasitology. 177. 139-144

[McDonald P.](#), Edwards R., Greenhalgh J., Morgan C., Sinclair L., Wilkinson R. (2011). Nutrición animal. 7ª edición. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza. España. ISBN 978-84-200-1169-1

[Mendoza de Gives P.](#), Vázquez-Prats V. (1994). Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagus fungi in sheep faecal cultures. *Veterinary Parasitology* 55. 197-203

[Mellado M.](#), Arevalo J.R., De Santiago A., Lozano E.A., Rodríguez A. (2011). Diet botanical composition of goats on rangeland treated with trembolone acetate. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 10. 235-240

[Mellado Miguel.](#), Rodríguez Alvaro., Olvera Abundio., Villarreal José A., Lopez Ramiro. (2004). Diets of nubian and granadina goats grazing on arid rangeland. *Journal of Range Management*. 57. 630-634

[Molan Abdul. L.](#), Waghorn Garry. C., Min Beyng. R., Mcnabb Warren.C. (2000). The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitológica*. 47. 39-44

[Montalvo-Aguilar X.](#), López A. M., Vázquez P. V., Liéban H. E., Mendoza G. P. (2006). Resistencia antihelmíntica de nemátodos gastroentericos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala. *Técnica Pecuaria México*. 44. 81-90

[Montes-Molina J.](#), Luna-Guido M., Espinoza-Paz S., Govaerts B., Gutierrez-Miceli F., Dendooven L. (2008). Are extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss. (L)) and *Gliricidia sepium* (Jacquin) an alternative to control pests on maize (*Zea mays* L.)?. *Crop Protection*. 27. 763-774

[Moreno F.C.](#), Gordon I.J., Wright A.D., Benvenuti M.A., Saumell C.A. (2010). Efecto antihelmíntico in vitro de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nemátodos gastrointestinales de rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 42(3). 155-163. doi:10.4067/S0301-732X2010000300006

[Muchiut S.](#), Mildenberger M., Pujato A., Anziani S. (2013). *Haemonchus contortus* con resistencia múltiple a los antihelmínticos de corta y larga acción y consideraciones sobre el impacto sanitario-productivo de este fenómeno en una majada de ovinos lecheros de la provincia de santa fe. *Revista FAVE. Ciencias Veterinarias*. 12(1-2). 77-85. ISSN 1666-938X

[Nabors M.](#) (2006). Introducción a la botánica. Pearson educación, S.A. Madrid. España. ISBN 978-84-7829-073-4

[Nari A.](#) (2001). Diagnóstico y control de resistencia antihelmíntica en pequeños rumiantes. II Congreso latinoamericano de especialistas en pequeños rumiantes y camélidos sudamericanos. XI Congreso nacional de producción ovina. Mérida, Yucatán. México

[Novobilský Adam.](#), Mueller-Harvey Irene., Milan Thamsborg Stig. (2011). Condensed tannins act against cattle nematodes. *Veterinary Parasitology*. 182. 213-220

[Nyla Jabeen.](#), Sadaf Anwar., Qaisar Mahmood., Muhammad Abid Zia., Ghulam Murtaza. (2015). *In vitro* anthelmintic efficacy of native plants against *Haemonchus contortus*. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*. 72(5). 1051-1055. PMID 26665413

[Ojeda-Robertos N.](#), Torres-Acosta J., Aguilar-Caballero A., Ayala-Burgos A., Cob-Galera L., Sandoval-Castro C., Barrientos-Medina R., Mendoza de Gives P. (2008). Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*. 158. 329-335

[Olmedo-Juárez. A.](#), Rojo, R. R., Arece, G. J., Salem, A. Z. M., Kholif, A. M. Morales, A. E. (2014). *In vitro* activity of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Italian Journal of Animal Science*. 13(4). 303-307. doi:10.4081/ijas.2014.310

[Ortiz-Ocampo G.I.](#), Chan-Pérez J.I., Covarrubias-Cardenas A.G., Santos-Ricalde R.H., Sandoval-Castro C.A., Hoste H., Capetillo-Leal C.M., González-Pech P.G., Torres-Acosta J.F.J. (2016). Efecto antihelmíntico *In vitro* e *In vivo* de residuos de *Coffea arabica* sobre un aislado de *Haemonchus contortus* con baja susceptibilidad a taninos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 19(1). 41-50

[Otero M.](#), Hidalgo L. (2004). Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). *Livestock Research for Rural Development*. 16(2). Buenos Aires. Argentina. ISSN 0121-3784

[Pelegrine-Minho A.](#), Francisco-Filippsen L., Talamine do Amarante A., Luiz Abdalla A. (2010). Efficacy of condensed tannin presents in acacia extract on the control of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Ciência Rural*. 40. 1360-1365

[Peñuelas-Rubio O.](#), Arellano-Gil M., Vargas-Arispuro I.C., Lares-Villa F., Cantú-Soto E.U., Hernández-Rodríguez S.E., Gutiérrez-Coronado M.A., Mungarro-Ibarra C. (2015). Bioactividad *In vitro* de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de hongos poscosecha: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* y *Rhizopus oryzae*. *Polibotánica*. 40. 183-198

[Pérez-Pérez C.](#), Hernández-Villegas M., de la Cruz Burelo P., Bolio-López G., Hernández-Bolio G. (2014). Efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nemátodos gastrointestinales de ovinos. *Tropical and subtropical agroecosystems*.17(1). 105-111. Universidad Autónoma de Yucatán

[Porter L. J.](#), Hrstich L N., Chan B G. (1986). The conversión of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*. 25. 223-230

[Puerto-Abreu M.](#), Arece-García J., López-Leyva Y., Roche Y., Molina M., Sanavria A., da Fonseca A.H. (2014). Efecto *in vitro* de extractos acuosos de *Moringa oleífera* y *Gliricidia sepium* en el desarrollo de fases exógenas de estrogilidos gastrointestinales de ovinos. *Revista de Salud Animal*. 36(1). 28-34. ISSN 0253-570X

[Quijada Jessica.](#), Frygnas Christos., Ropiak Honorata M., Ramsay Aina., Mueller-Harvey Irene., Hoste Herve. (2015). Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* and *Trychostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63. 6346-6354

[Quiroz-Romero H.](#) (1990). Parasitología. Editorial Limusa. México, D.F. ISBN 968-18-1674-9

[Ramírez-Lozano R.](#) (2003). Nutrición de rumiantes. Sistemas extensivos. Trillas. México, D.F. ISBN 968-24-6852-3

[Rehbein S.](#), Barth D., Visser M., Winter R., Langholff W.K. (2000). Efficacy of an ivermectin controlled-release capsule against some rarer nematode parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*. 88. 293-298

- [Rivera-Portillo J.](#) (2000). Evaluación de 3 antihelmínticos contra parásitos gastrointestinales en borregas de raza Rambouillet y Pelibuey. Tesis de Licenciatura como Ingeniero Agrónomo Zootecnista. División de Ciencia Animal- UAAAN. Saltillo, Coahuila. México
- [Rodríguez-Arvizu M.](#) (2006). Evaluación de extracto de *Larrea tridentata* como garrapaticida contra un químico comercial (Amitraz). Tesis de Licenciatura como Ingeniero Agrónomo Zootecnista. División de ciencia animal- UAAAN. Saltillo, Coahuila. México
- [Rodríguez-Vivas R.](#) (2005). Enfermedades de importancia económica en producción animal. Mc Graw- Hill Interamericana. Universidad Autónoma de Yucatán. México D.F. ISBN 970-10-4876-8
- [Rojas J.](#) (2007). Resistencia antihelmíntica de nemátodos a los antiparasitarios más utilizados en Bovinos en los fundos “Tres Molinos, distrito Cajamarca” e “Ingatambo, distrito San Pablo”, Región Cajamarca, Perú. Revista electrónica de Veterinaria (REDVET). VIII(9). 1-5. ISSN 1695-7504
- [Rojas N.,](#) La O M., Arece J., Carrión M., Pérez K., San Martín C., Valerino P., Ramírez W. (2012). Identificación y caracterización de especies de *Haemonchus* en caprinos del valle del Cauto en Granma. Redvet. 13(1).1-10. ISSN 1695-7504
- [Ropiak H.M.,](#) Desrues O., Williams A.R., Ramsay A., Mueller-Harvey I., Thamsborg S.M. (2016). Structure-activity relationship of condensed tannins and synergism with trans-cinnamaldehyde against *Caenorhabditis elegans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1-40
- [Ruiz-Martínez J.,](#) Ascacio J., Rodríguez R., Morales D., Aguilar C. (2011). Phytochemical screening of extracts from some mexican plants used in traditional medicine. Journal of Medicinal Plants Research. 5. 2791-2797
- [Salud-Pérez G.,](#) Miguel-Zavala S., Lucina-Arias G., Cuauhtémoc-Pérez G., Rosa-Pérez G. (2001). Antimicrobial study of bark from five tree species. *Phytotherapy Research*. 15. 356-359
- [Salinas-Zarate A.](#) (2010). Evaluación de concentraciones de extracto de *Larrea tridentata* como garrapaticida. Tesis de Licenciatura como Ingeniero Agrónomo Zootecnista. División de Ciencia Animal- UAAAN. Saltillo, Coahuila. México

[Sánchez-López L.](#) (2012). Evaluación de la suplementación alimenticia y un antihelmíntico sobre la endoparasitosis en crías Boer. Tesis de Licenciatura como Ingeniero Agrónomo Zootecnista. División de ciencia animal- UAAAN. Saltillo, Coahuila. México

[Sandoval-Castro C.A.](#), Torres-Acosta J.F., Hoste H., Salem A.Z., Chan-Pérez J.I. (2012). Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. *Animal Feed Science and Technology*. 176. 192-201

[Santacoloma-Varón L](#) y Granados J. E. (2012). Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades fisicoquímicas del suelo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 3(1). 53-62. ISSN 21456097

[Santos M.C.](#), Silva B.F., Amarante A.F. (2012). Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 188. 277-284

[Seeram N.](#), Lee R., Hardy M., Heber D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the comercial juice industry. *Separation and Purification Technology*. 41. 49-55

[Seresinhe T., Iben C.](#) (2003). *In vitro* quality assessment of two tropical shrub legumes in relation to their extractable tannins contents. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 87. 109-115

[Shapiro L.S.](#) (2010). Pathology and parasitology for veterinary technicians. Segunda edición. Delmar, Cengage Learning. United States of America. ISBN-13: 978-1-4354-3855-2

[Shimada-Miyasaka A.](#) (2003). Nutrición animal. Trillas. México. D.F. ISBN 968-24-6563-X

[Sivira A.](#), Sanabria M.E., Valera N., Vásquez C. (2011). Toxicity of ethanolic extracts from *Lippia organoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: *Tetranychidae*). *Neotropical Entomology*. 40. 375-379

[Soli F.](#), Terrill T.H., Shaik S.A., Getz W.R., Miller J.E., Vanguru M., Burke J.M. (2010). Efficacy of copper oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*. 168. 93-96

[Soulsby E.](#) (1987). Helminths, arthropods and protozoans of domestic animals. 7^a Edición. Nueva editorial Interamericana. México. D.F. ISBN 0-7020-0820-6

[Sousa R.G.](#), Falcão H.S., Barbosa-Filho J.M., Melo-Diniz M.F.F., Batista L.M. (2013). Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: uma revisão. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Campinas. 15(2). 287-292. ISSN 1983-084X

[Stear M. J.](#), Doligalska M., Donskow Schemelter K. (2007). Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. Review Article. Parasitology. 134. 139-151

[Suarez Gonzalo.](#), Alvarez Luis., Castells Daniel., Moreno Laura., Fagiolino Pietro., Lanusse Carlos. (2014). Evaluation of pharmacological interactions after administration of a levamisole, albendazole and ivermectin triple combination in lambs. Veterinary Parasitology. 201. 110-119

[Sumano-López H.](#), Ocampo-Camberos L. (2006). Farmacología veterinaria. 3^a edición. McGraw- Hill Interamericana. México, D.F. ISBN 970-10-1436-7

[Tak I.R.](#), Dar J.S., Dar S.A., Ganai B.A., Chishti M.Z., Ahmad F. (2015). A comparative analysis of various antigenic proteins found in *Haemonchus contortus*- a review. Molecular Biology. 49. 789-795

[Tariq K.A.](#), Chishti M.Z., Ahmad F., Shawl A.S. (2009). Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. Veterinary Parasitology. 160. 83-88

[Tiemann-Tassilo T.](#), Ávila P., Ramírez G., Dieter-Hess H., Lascano C. (2006). Efecto de taninos extraídos de leguminosas arbustivas sobre la dinámica de fermentación ruminal. Memorias del segundo taller taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia. 15-17. Cali, Colombia. ISBN 958694087X

[Torres-Acosta J.](#), Alonso-Díaz M., Hoste H., Sandoval-Castro C., Aguilar-Caballero A. (2008). Efectos negativos y positivos del consumo de forrajes ricos en taninos en la producción de caprinos. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 9(1). 83-90. Universidad Autónoma de Yucatán

- [Torres-Acosta J.](#), Mendoza de Gives P., Aguilar-Caballero A., Cuéllar-Ordaz J. (2012). Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*. 189. 89-86
- [Torres-Vásquez P.](#), Prada-San miguel A., Márquez-Lara D. (2007). Resistencia antihelmíntica en los nemátodos gastrointestinales del bovino. *Revista de Medicina Veterinaria*. 13. 59-76. ISSN 0122-9354
- [Van Soest P.J.](#), Robertson J.B., Lewis B.A. (1991). Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *Journal Dairy Science*. 74(10). 3583-3597
- [Vargas-Arispuro I.](#), Reyes-Baez R., Rivera-Castañeda G., Martínez-Tellez M., Rivero-Espejel I. (2005). Antifungal lignans from the creosotebush (*Larrea tridentata*). *Industrial Crops and Products*. 22. 101-107
- [Vásquez-Hernández M.](#), González-Garduño R., Torres-Hernández G., Mendoza de Gives P., Ruiz-Rodríguez J. (2006). Comparación de dos sistemas de pastoreo en la infestación con nemátodos gastrointestinales en ovinos de pelo. *Veterinaria México*. 37(1).15-27
- [Vásquez-Pineda A.](#), Bravo de la Parra A., Mendoza de Gives P., Hernández-Linares I., Yáñez-Pérez N., Aguilar-Marcelino L., Ramírez-Vargas G., Hernández-Castro E., Gutiérrez-Segura I., López-Arellano María. (2012). Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nemátodos de importancia veterinaria. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria*. 3(1). 77-88
- [Von-Son de Fernex E.](#), Alonso-Díaz M.A., Mendoza de Gives P., Valles de la Mora B., Zamilpa A., González-Cortázar M. (2016). Ovicidal activity of extracts from four plants species against the cattle nematode *Cooperia punctata*. *Veterinaria México*. 3(2). 1-14
- [Von-Son de Fernex E.](#), Alonso-Díaz M., Valles de la Mora B., Capetillo-Leal C. (2012). *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*. 131. 413-418
- [Wabo-Poné J.](#), Tameli Florence K., Mpoame Mbida., Pamo Tedonkeng E., Bilong Bilong C.F. (2011). *In vitro* activities of acetonic extracts from leaves of three forage legumes (*Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena diversifolia*) on *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4. 125-128

[Waruiru, R.M.](#), Thamsborg S.M., Nansen P., Kyvsgaard N.C., Bogh H.O., Munyua W.K., Gathuma J.M. (2001). The epidemiology of gastrointestinal nematodes of dairy cattle in central Kenya. *Tropical Animal Health and Production*. 33. 173-188

[Wolstenholme, A.J.](#), Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson Himmelstjerna, G., Sangster, N.C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 20. 469-476