

Actividad ovicida de extractos de cuatro especies de plantas contra el nematodo gastrointestinal *Cooperia punctata*

Elke von Son-de Fernex¹

0000-0003-0903-4154

Miguel Ángel Alonso Díaz^{1*}

0000-0003-4912-8403

Pedro Mendoza de Gives²

0000-0001-9595-3573

Braulio Valles de la Mora¹

0000-0003-3296-5627

Alejandro Zamilpa³

0000-0002-2233-5958

Manasés González Cortazar³

0000-0002-3693-1670

¹ Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Ganadería Tropical
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
km 5.5 Carretera Federal Tlapacoyan-Martínez de la Torre, 93600, Veracruz, México

² Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
km 11.5 Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec, A.P. 206 CIVAC, 62500, Morelos, México

³ Centro de Investigación Biomédica Del Sur
Instituto Mexicano de Seguro Social
Argentina 1, Xochitepec, Morelos, México

***Autor para correspondencia:**

Tel: + 52 232 324 3941

Fax: + 52 232 324 3943

Correo electrónico:

alonsodma@hotmail.com

Recibido: 2016-02-26

Aceptado: 2016-05-24

Publicado: 2016-06-28

Información y declaraciones adicionales
en la página 12

© Derechos de autor:

Elke von Son-de Fernex et al 2016.

acceso abierto Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Resumen

El uso de plantas bioactivas representa una alternativa para el control de *Cooperia punctata* en el ganado de pastoreo. Los objetivos de este estudio fueron: (1) evaluar la actividad ovicida de extractos de cuatro especies de plantas contra *C. punctata*, (2) determinar la participación de los compuestos polifenólicos (CP) en la actividad antihelmíntica (AH) y (3) evaluar el mejor método de extracción para alcanzar una actividad ovicida. El bioensayo de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) fue utilizado para evaluar el efecto ovicida de *Leucaena leucocephala*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmifolia* y *Cratylia argentea*; con diferentes métodos de extracción: acuoso (AQ), acetona:agua (AW) y acetónico (AC). Los huevos de *C. punctata* fueron incubados por cuadruplicado a 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 y 9.6 mg mL⁻¹ de cada uno de los extractos de plantas. La participación de los CP fue determinada mediante el uso de polietilenglicol (PEG). Los 12 extractos de plantas inhibieron la eclosión de huevos de modo dosis-dependiente, y las mejores concentraciones letales medias (CL₅₀) fueron: 1.03 ± 0.17 para *G. sepium*-AC, y 7.90 ± 1.19 mg mL⁻¹ para *L. leucocephala*-AQ. Se observaron diferencias en la actividad AH según el método de extracción (P < 0.05). A mayor concentración, *L. leucocephala*-AQ inhibió más del 50 % de la eclosión de *C. punctata*, entretanto, el extracto *G. sepium*-AC inhibió la eclosión en su totalidad. La adición de PEG demostró la participación de los CP en la actividad AH de la mayoría de los extractos; no obstante, con *G. sepium*-AC, los CP no fueron los principales compuestos bioactivos. En general, el mejor método de extracción fue acetona:agua, pues permitió obtener una buena actividad ovicida, con un mayor rendimiento del extracto. Las tasas de inhibición sugieren que *L. leucocephala* y *G. sepium* podrían ser evaluadas con la finalidad de reducir la densidad larvaria en pastos.

Palabras clave: Bovinos, nematodos, *Cooperia punctata*, efecto ovicida, extractos de plantas.

Introducción

Las nematodosis gastrointestinales se clasifican como la principal enfermedad parasitaria endémica de las unidades de producción bovina (Fitzpatrick 2013), situación que afecta la productividad y la salud del ganado (Charlier *et al.* 2009; Perri *et al.* 2011). Dentro de las especies de nematodos gastrointestinales (NGI) que afectan al ganado, *Cooperia* spp. se considera el género de NGI con mayor prevalencia a nivel mundial (Kenyon 2012; Stromberg *et al.* 2012). Este parásito hace que el ganado disminuya el consumo de materia seca y el aprovechamiento de los nutrientes (Stromberg *et al.* 2012).

Los antihelmínticos de amplio espectro son una herramienta viable para el control de los NGI, tienen la capacidad de mejorar la productividad y el desempeño animal (Sutherland 2011). Desafortunadamente, la resistencia antihelmíntica (RA) de los NGI se ha convertido en un problema emergente para el ganado bovino (Gasbarre 2014). Estudios recientes han reportado la emergencia de cepas de *Cooperia* spp., resistentes a lactonas macrocíclicas (LM) (Bartley *et al.* 2012), benzimidazoles (Arnaud-Ochoa 2012) e imidazotiazoles (Becerra-Nava *et al.* 2014). Por ello, se requieren alternativas para el control de helmintos de ganado bovino, a fin de evitar que los NGI se conviertan en un problema más grave debido a la diseminación de cepas resistentes y multi-resistentes dentro de las unidades de producción.

Una de las alternativas más estudiadas ha sido la utilización de plantas bioactivas con efecto AH (Hoste *et al.* 2012). Estudios *in vitro* e *in vivo* han expuesto el efecto AH de algunas plantas utilizando NGI de pequeños rumiantes como modelo experimental (Alonso-Díaz *et al.* 2008a; Alonso-Díaz *et al.* 2008b; Alonso-Díaz *et al.* 2010; Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.* 2010; Von Son-de Fernex *et al.* 2012); pero existe muy poca información referente a la investigación contra NGI de ganado bovino.

Las leguminosas tropicales han recibido mayor atención por su elevada concentración de metabolitos secundarios (MS) y por los beneficios que ofrecen de acuerdo con su calidad nutricional. La AH de los MS ha sido asociada principalmente a la presencia de taninos, debido a su capacidad para interrumpir fases específicas del ciclo biológico de los NGI, como la inhibición de la eclosión de huevos, el desarrollo larvario, la motilidad larvaria y el desenvaine larvario (Molan *et al.* 2000; Athanasiadou *et al.* 2001; Alonso-Díaz *et al.* 2008b; Von Son-de Fernex *et al.* 2012). Hoste *et al.* (2012) han relacionado el efecto AH de los taninos con su capacidad de unirse a las proteínas estructurales de la morfología de los nematodos; no obstante, algunos reportes han identificado otras moléculas bioactivas con efecto AH, como los flavonoides glicosilados, las flavonas y las lactonas sesquiterpénicas (Molan *et al.* 2003; Barrau *et al.* 2005; Kozan *et al.* 2013).

Durante la última década, se han estandarizado múltiples métodos de extracción de fitoquímicos para la evaluación de su efecto AH *in vitro*, utilizando distintas mezclas de solventes. Al ser los taninos condensados (TC) los compuestos más analizados, se ha comprobado que el sistema más eficiente para su recuperación es la mezcla de acetona:agua (Chavan *et al.* 2001; Chavan 2013); aunque otros métodos de extracción (oleosa, acetato de etilo, acuoso y acetónico) también han revelado bioactividad contra diferentes parásitos (Katiki *et al.* 2011; Botura *et al.* 2013; Kozan *et al.* 2013).

La evaluación de diferentes métodos de extracción de plantas tropicales podría ayudar a estandarizar extractos con posible efecto AH contra NGI de bovinos, y a identificar las clases de fitoquímicos presentes. Los objetivos de este estudio fueron: (1) evaluar la actividad ovicida de extractos de cuatro especies de plantas contra *C. punctata*, (2) determinar la participación de los compuestos polifenólicos (CP) en su actividad AH y (3) evaluar el mejor método de extracción cuando se busca obtener un efecto ovicida.

Materiales y métodos

Material vegetal

En marzo de 2013, en el área experimental del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, localizada en Martínez de la Torre (20° 03' N y 93° 03' O; 151 msnm), Veracruz, México, se cosecharon hojas frescas de *Leucaena leucocephala*, *Cratylia argentea*, *Gliricidia sepium* y *Guazuma ulmifolia*. Estas plantas fueron seleccionadas por su elevada concentración de MS, y porque algunas de ellas expresan actividad AH contra NGI de pequeños rumiantes (Alonso-Díaz *et al.* 2008a, b; Von Son-de Fernex *et al.* 2012).

Estos árboles y arbustos forrajeros predominan en la vegetación nativa de Veracruz, se encuentran distribuidos en otras áreas tropicales del mundo (Flores-Guido 2001), y representan una alternativa nutricional importante para las unidades de producción animal.

Método de extracción

Para cada especie de planta, se colectó 1.0 ± 0.15 kg de hojas frescas y se secaron en una estufa de aire a 60 °C por 72 h. Después las hojas fueron molidas para obtener partículas de un milímetro, y se colocaron en vasos de precipitado de dos litros con acetona:agua (70:30) y un agitador magnético. Posteriormente, la mezcla fue sonicada por cuatro horas a baño María (Branson Sonicator 2510MT®, Emerson Industrial Automation, Danbury, USA).

Para la segunda extracción se colocaron 500 ± 36.97 g de material vegetal de cada planta seca y molida en un vaso de precipitado con acetona, que se mantuvo a temperatura ambiente (24 °C) durante 24 horas. Finalmente, se extrajo la parte acuosa, del mismo material vegetal utilizado en la extracción acetónica, que, una vez seco se colocó en agua destilada previamente calentada a 58 °C por dos horas.

En cada uno de los métodos de extracción, el extracto se obtuvo después de filtrar el material (Whatman® qualitative filter paper, Grade 1). A 58 °C, los solventes se evaporaron de los extractos mediante el proceso de destilación a baja presión en un rotoevaporador (Rotovapor® R-3, Büchi®, Suiza). Los extractos fueron lavados cuatro veces con 500 mL de n-hexano para la remoción de clorofilas y lípidos; a través de un embudo de separación se descartó la fracción n-hexánica, y se realizó un análisis cualitativo para confirmar que las clorofilas y los lípidos se hubieran eliminado. Finalmente, los extractos fueron congelados y liofilizados.

Bioensayos

Recuperación de huevos de *ngi*

Los huevos de *C. punctata* se obtuvieron de un becerro donador infectado con una cepa de *C. punctata* multi-resistente a las lactonas macrocíclicas, benzimidazoles e imidazotiazoles (cepa CEIEGT-FMVZ-UNAM, México). Los machos adultos de *C. punctata* se identificaron mediante claves taxonómicas (Gibbons 1981) y técnicas moleculares (von Son de Fernex, datos sin publicar). Los becerros se mantuvieron en corrales con piso de cemento y se les ofreció heno, concentrado comercial y agua *ad libitum*. Diariamente se colectaron las heces utilizando arneses y bolsas de poliuretano. Las muestras fueron almacenadas y procesadas a temperaturas de 23.37 ± 0.21 °C. A 200 g de heces se les añadió agua corriente (1 L), contamos los huevos en un promedio de 150 por gramo de heces (HPGH) y ambas partes fueron mezcladas para crear una suspensión relativamente líquida. La suspensión se filtró en una criba de 400 μm para remover residuos vegetales, y la suspensión obtenida la fue filtrada nuevamente a través de tamices con diferente tamaño de poro: 1000, 149 y 74 μm . Finalmente, los huevos se colectaron en un tamiz de 24 μm . El material contenido en este tamiz, se colocó en tubos centrífugos de 50 mL, llenos de una solución salina saturada, y fue centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue lavado con agua corriente en una maya de 24 μm , de la cual se recobraron los huevos.

Para su cuantificación, los huevos limpios se concentraron y colocaron en tubos centrífugos de 15 mL. La concentración final de huevos se estimó por un conteo directo de alícuotas del 10% con un portaobjetos, entonces se obtuvo una concentración final de 500 huevos/mL mediante la concentración y dilución de la suspensión de huevos con agua destilada. La recuperación de huevos se estandarizó de forma que se completara en un lapso promedio de 1.25 ± 0.08 horas.

Bioensayo de la eclosión de huevos (IEH)

Se colocaron aproximadamente 100 huevos/200 μL en cada pozo de una placa de cultivo celular de 24 pozos, y se les añadieron 200 μL de concentraciones crecientes del extracto de planta correspondiente (1.2, 2.4, 4.8, 9.6 y 19.2 mg mL^{-1}), para obtener concentraciones finales de 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 y 9.6 mg mL^{-1} . Se utilizó Levamisol al 10% como control positivo para igualar la concentración más elevada de los extractos (Dobson *et al.* 1986).

Como control negativo para los extractos 70:30 y acuosos, se empleó agua destilada; mientras que para los extractos acetónicos, Dimetil-sulfóxido al 2.5% (como solvente para los compuestos de baja/nula polaridad en los bioensayos). Los pozos control, de igual manera, contenían 200 μL de la suspensión de huevos. Se realizaron cuatro réplicas para cada dosis, extracto y control; y se incubaron las placas a 27.7 ± 0.1 °C por 48 horas. Para detener la eclosión, se añadió una gota de Lugol a cada pozo, y se contabilizaron los huevos sin eclosionar y las larvas (vivas o muertas) en cada uno (Coles *et al.* 1992).

Para determinar la participación de los compuestos polifenólicos en el efecto AH, se incubó una segunda serie con tres tratamientos: i) control negativo (agua destilada o DMSO al 2.5%), ii) la dosis máxima del extracto analizado (9.6 mg mL^{-1}) con PEG (19.2 mg mL^{-1}) en un periodo de preincubación de tres horas para que se formaran los complejos con los compuestos polifenólicos (previo a la exposición

a los huevos), y iii) la dosis máxima del extracto analizado sin la adición de PEG (Makkar *et al.* 1995).

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto dosis-dependiente entre los extractos de las diferentes especies de plantas se utilizó un Modelo Lineal General (MLG) ($Y_{ij} = \mu + T_j + E_{ij}$), donde la variable dependiente fue la eclosión de huevos (Y_{ij}), la cual representa la i ava observación obtenida bajo el j avo tratamiento. La variable independiente (T_j) corresponde a las concentraciones crecientes de cada extracto de planta, μ representa la media general y E_{ij} , la variación residual del error experimental.

Las medias de los tratamientos se compararon las mediante el análisis de la diferencia mínima significativa (DMS), y un valor probabilístico indicativo de significancia estadística de $P < 0.05$ (prueba-F). Debido a que los datos se distribuyeron de forma normal y homocedástica, no se requirió de transformación alguna (STATGRAPHICS, Centurión xvi versión 16.1.18, USA).

Cuando no se cumplió con los supuestos del análisis ANOVA, se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis para: i) comparar las tasas de eclosión obtenidas según el extracto de planta aplicado, con y sin la adición de PEG; ii) comparar la tasa de eclosión entre los métodos de extracción y la especie de planta; y iii) evaluar el rendimiento entre los métodos de extracción. El valor probabilístico indicativo de significancia estadística fue de $P < 0.05$ (prueba-H).

El porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 (1 - P_t / P_c)$$

Donde P_t es el número de huevos eclosionados en el tratamiento, y P_c es el valor obtenido en los controles negativos de agua o DMSO (Bizimenyera *et al.* 2006). La concentración letal para inhibir el 50% de la eclosión de huevos (CL_{50}) de cada extracto se calculó utilizando el Programa de Análisis Probit (Minitab® 17.1.0, Minitab Inc., USA).

Resultados y discusión

Bioensayo de la eclosión de huevos (IEH)

El porcentaje de eclosión de huevos ($\pm$ EE) de *C. punctata* en los controles negativos ocurrió en un rango de $92.48 \pm 1.97\%$ a $95.29 \pm 0.76\%$, y en los controles positivos, ocurrió de $31.17 \pm 4.69\%$ a $35.49 \pm 4.37\%$. La eclosión de huevos en cada uno de los 12 extractos se comportó de manera dosis-dependiente ($P < 0.01$) (figuras 1 a 3). *L. leucocephala*-AQ inhibió más del 50% de la eclosión de huevos de *C. punctata* ($P < 0.05$; $r^2 = 69.51\%$) (figura 1). *G. ulmifolia* alcanzó la máxima tasa de inhibición con la extracción AW $45.42 \pm 2.30\%$ ($P < 0.01$; $r^2 = 95.71\%$), mientras *C. argentea*, la alcanzó a los $35.07 \pm 1.40\%$ ($P < 0.01$; $r^2 = 97.46\%$) (figura 2). A la concentración máxima, *G. sepium*-AC inhibió la eclosión de huevos de *C. punctata* en su totalidad ($P < 0.01$; $r^2 = 94.42\%$) (figura 3). *Cooperia* spp. es uno de los NGI con mayor prevalencia en el ganado de pastoreo.

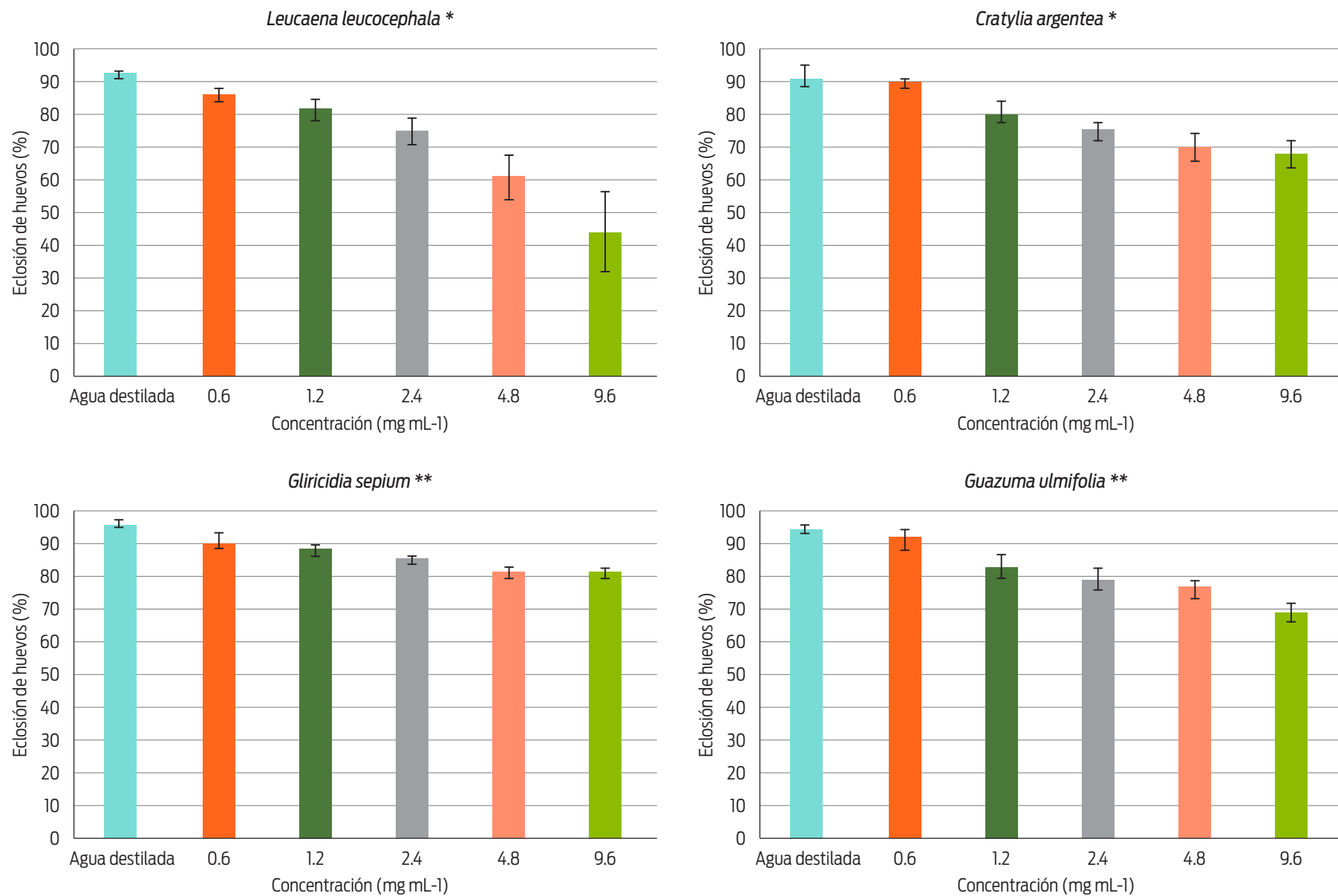


Figura 1. Eclosión de huevos de *Cooperia punctata* posterior a su incubación en los extractos acuosos de las plantas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

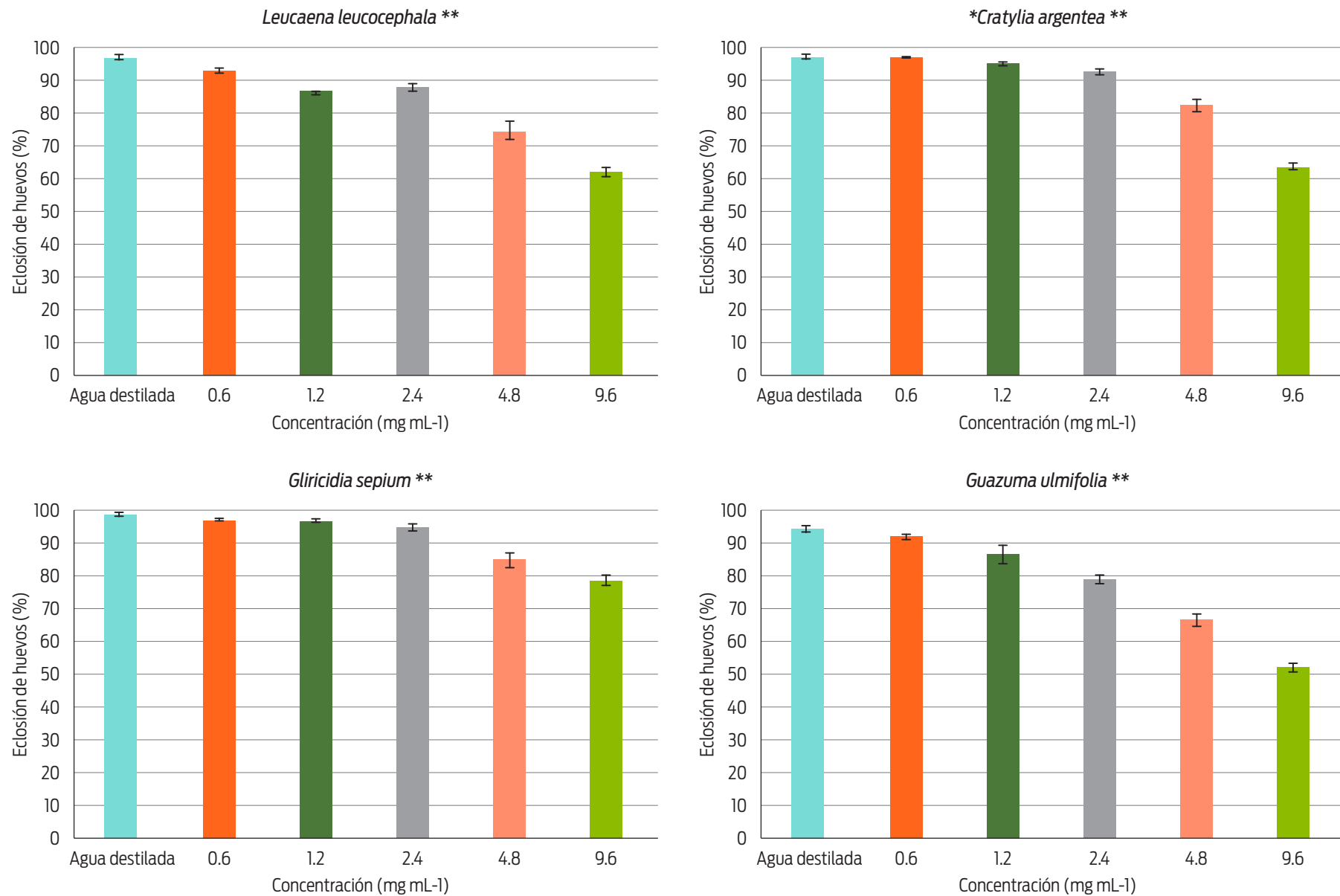


Figura 2. Eclosión de huevos de *Cooperia punctata* posterior a su incubación en los extractos acetona:agua de las plantas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

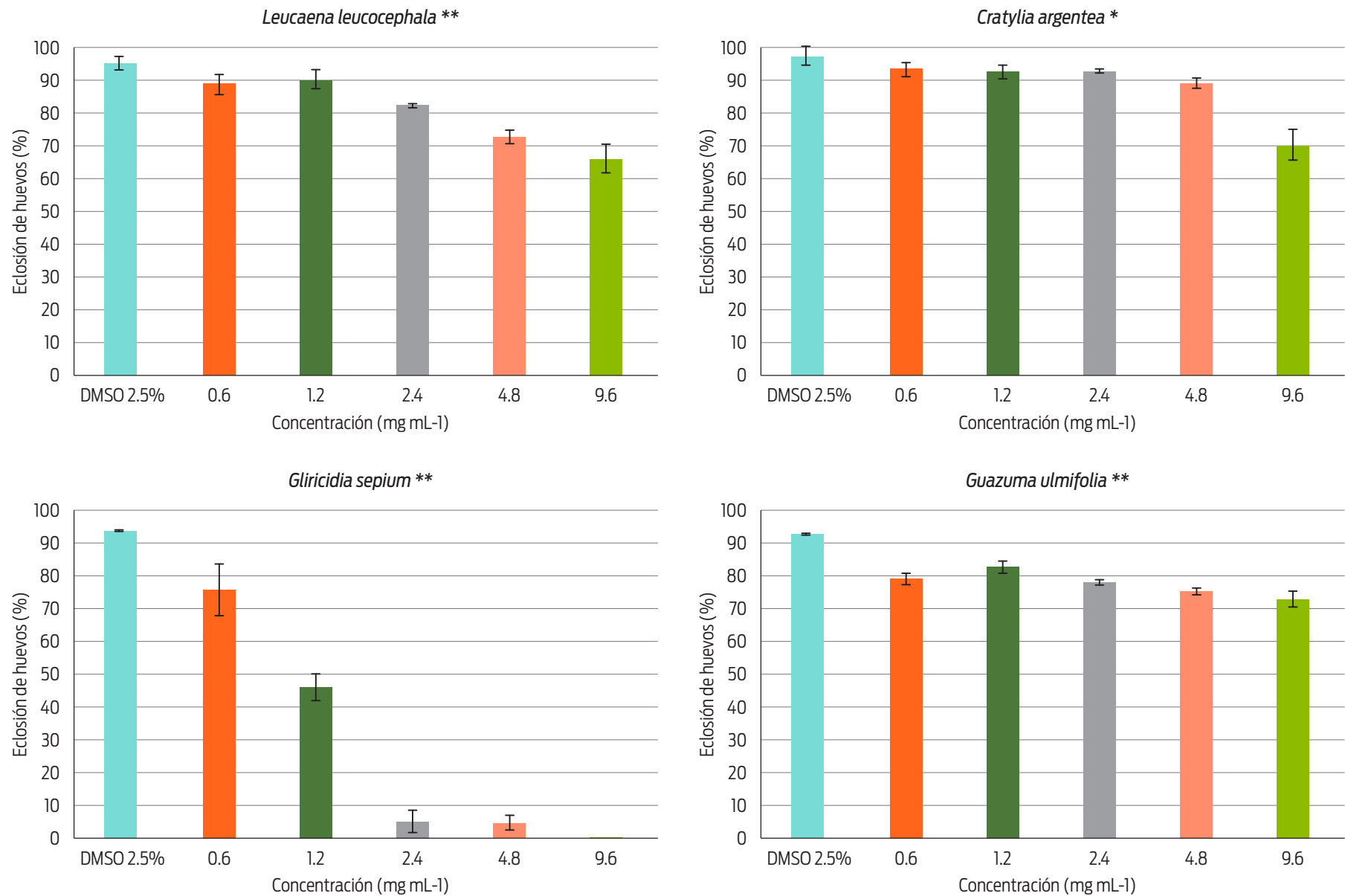


Figura 3. Eclosión de huevos de *Cooperia punctata* posterior a su incubación en los extractos acetónicos de las plantas (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Cuadro 1. Concentraciones letales requeridas para inhibir el 50% de la eclosión de huevos de *Cooperia punctata* (CL₅₀), posterior a su incubación en los extractos bioactivos por 48 h mg mL⁻¹.

Análisis Probit (CL ₅₀) de la inhibición de la eclosión de huevos de <i>C. punctata</i> (IC 95% normal)					
Material vegetal	Extracción	Media	Error Estadístico	Límites	
				Inferior	Superior
<i>L. leucocephala</i>	Acuoso	7.93	1.19	5.59	10.27
	70:30	11.77	1.19	9.42	14.12
	Acetónico	13.84	1.19	11.51	16.16
<i>C. argentea</i>	Acuoso	15.05	4.44	6.34	23.75
	70:30	11.31	0.79	9.78	12.86
	Acetónico	14.79	2.51	9.88	19.71
<i>G. sepium</i>	Acuoso	32.63	16.41	0.47	64.79
	70:30	15.12	1.86	11.47	18.76
	Acetónico	1.03	0.17	0.69	1.37
<i>G. ulmifolia</i>	Acuoso	16.41	5.35	5.92	26.89
	70:30	8.84	0.89	7.09	10.59
	Acetónico	29.08	9.31	10.83	47.34

El incremento de su resistencia a la quimioterapia, según los reportes, denota la importancia de desarrollar estrategias de control nuevas y seguras (Bartley *et al.* 2012; Demeler *et al.* 2013).

Este trabajo de investigación provee evidencia del efecto ovicida de extractos de plantas contra huevos y fases de vida libre de *C. punctata*. Existen pocos reportes sobre nuevas tecnologías que permitan controlar las fases de vida libre de los NGI en ganado bovino (Novobilsky *et al.* 2011). Evaluaciones *in vitro* han demostrado que las leguminosas de clima templado tienen actividad contra las larvas infectantes de *C. oncophora* (Novobilsky *et al.* 2011); no obstante, existen pocos reportes relacionados con nuevas tecnologías, que arrojen información sobre el control de otras fases de vida libre como la eclosión de huevos. Los huevos son una fase biológica de los NGI que poseen una tricapa relativamente gruesa (Mansfield *et al.* 1992), la cual les provee de resistencia al estrés medioambiental (temperatura, humedad, radiación UV y pisoteo del ganado). Tales características dificultan el desarrollo de estrategias de control efectivas.

Las concentraciones letales, calculadas con los 12 extractos, requeridas para inhibir el 50% de la eclosión de huevos, se exponen en el cuadro 1. El mejor valor para una concentración letal CL₅₀ de *G. sepium*-ac fue 1.03 ± 0.17 mg mL⁻¹ y, para *L. leucocephala*-aq fue 7.9 ± 1.19 mg mL⁻¹. En los extractos aw, la CL₅₀ abarcó de 8.84 a 15.12 mg mL⁻¹. El efecto dosis-dependiente observado en la mayoría de los extractos de plantas indica una respuesta toxicológica de los fitoquímicos de las cuatro especies de plantas analizadas (Hoste *et al.* 2012); sin embargo, se requieren nuevos estudios que permitan la identificación y el aislamiento de las moléculas con actividad-ah presentes en los extractos con mayor bioactividad. La identificación fitoquímica ayudaría a comprender los mecanismos de acción involucrados en su actividad.

Cuadro 2. Inhibición de la eclosión de huevos (IEH) obtenida con la concentración máxima (9.6 mg mL⁻¹) con y sin la adición de polietilenglicol (PEG), entre especies de plantas y métodos de extracción.

Material vegetal	Extracción	Inhibición de la eclosión de huevos de <i>Cooperia punctata</i> (%)	
		IEH (%)	PEG_IEH (%)
<i>L. leucocephala</i>	Acuoso	52.01 ± 12.4 ^a	12.59 ± 2.5 ^b
	70:30	35.75 ± 1.53 ^a	0.82 ± 0.90 ^b
	Acetónico	29.80 ± 1.50 ^a	2.76 ± 1.50 ^b
<i>C. argentea</i>	Acuoso	25.73 ± 4.10 ^a	5.86 ± 3.40 ^b
	70:30	35.07 ± 1.40 ^a	0.16 ± 0.20 ^b
	Acetónico	26.76 ± 4.90 ^a	0.67 ± 1.60 ^b
<i>G. sepium</i>	Acuoso A	15.40 ± 1.40 ^a	1.78 ± 0.90 ^b
	70:30 A	19.59 ± 1.70 ^a	2.40 ± 0.50 ^b
	Acetónico B	100.0 ± 0.00 ^a	79.85 ± 1.2 ^b
<i>G. ulmifolia</i>	Acuoso A	27.26 ± 3.40 ^a	2.48 ± 3.10 ^b
	70:30 B	45.42 ± 2.30 ^a	0.95 ± 1.20 ^b
	Acetónico A	21.46 ± 3.00 ^a	1.59 ± 1.50 ^b

Las letras minúsculas diferentes en la misma fila y diferentes letras capitales entre métodos de extracción de la misma planta, representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Participación de los compuestos polifenólicos en la actividad ovicida de los extractos de plantas bioactivas

La adición de PEG evidenció la participación de los compuestos polifenólicos en la mayoría de los extractos de plantas, restaurando los valores de eclosión de huevos a valores similares a los obtenidos con los controles negativos (agua destilada o DMSO 2.5%) (cuadro 2). El polímero hidrofílico PEG se ha utilizado para evaluar la participación de los compuestos polifenólicos en la bioactividad de los extractos (Makkar 2003). Tras la adición de PEG, los valores inhibitorios de la mayoría de los extractos se restauraron a valores similares a los obtenidos en los controles negativos, esto indica la predominancia de la participación de los polifenoles (cuadro 2). Sin embargo, después de añadir PEG a *G. sepium*-AC, se observaron valores inhibitorios de 79.85 ± 1.2%, lo que sugiere la posible participación de otros fitoquímicos en la actividad ovicida de los extractos acetónicos.

El análisis de cromatografía en capa fina es una de las técnicas más empleadas para la identificación y diferenciación de fitoquímicos en las plantas medicinales (Rafi *et al.* 2011). Las cromatografías obtenidas con cada extracto de planta, así como la aplicación de PEG sugieren que, flavonoides de mediana polaridad tienen efecto ovicida contra *C. punctata*.

Nuestros resultados son consistentes con autores que reportan flavonoles como la quercetina, la rutina y el kenferol con propiedades antihelmínticas (Barrau *et al.* 2005). Por otro lado, el análisis fitoquímico de *G. sepium*-AC reveló poseer, como componente principal, un fitoquímico de baja polaridad, visible bajo luz UV de onda corta (254 nm), pero no-reactivo a AS y NEU. Además, PEG no logró restaurar la inhibición de la eclosión de huevos a los valores control (79.85 ± 1.2%), situación que sustenta la hipótesis de la presencia de un fitoquímico no flavonoide con actividad-AH y difiere de lo reportado por Wabo Poné *et al.* (2011), quienes relacionaron la participación de los TC de los extractos acetónicos de *G. sepium*

Cuadro 3. Rendimiento de fitoquímicos de las cuatro plantas utilizando tres métodos de extracción (acuoso, acetona:agua, acetónico).

Material vegetal	Rendimiento de extracto (%)		
	Acuoso	Acetona:agua	Acetónico
<i>L. leucocephala</i>	6.40	7.31	1.33
<i>C. argentea</i>	6.44	9.79	2.67
<i>G. sepium</i>	5.74	9.53	1.01
<i>G. ulmifolia</i>	5.78	10.62	1.00
Mean ± SE	6.09 ± 0.17 ^a	9.31 ± 0.91 ^b	1.50 ± 0.31 ^c

Las letras diferentes en las medias de cada método de extracción representan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

con la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus*. En esta investigación no fue posible la elucidación estructural del fitoquímico involucrado en el efecto AH; a pesar de ello, esta información ayudará a comprender los posibles mecanismos de acción sobre *C. punctata*.

Rendimiento de los extractos de plantas

La extracción fotoquímica arrojó diferencias de rendimiento entre los métodos de extracción ($P < 0.05$). El rendimiento de la extracción AW fue de $10.04 \pm 0.91\%$ (Media ± EE). Los rendimientos individuales se presentan en el **cuadro 3**. En este análisis, también se compararon los métodos de extracción con base en su actividad ovicida, donde observamos los mejores valores inhibitorios cuando utilizamos las extracciones uni-solventes (*G. sepium*-AC y *L. leucocephala*-AQ), lo que nos lleva a la percepción de que compuestos con polaridades similares pudiesen incrementar la bioactividad. Sin embargo, el desempeño general de cada método de extracción mediante el análisis de CL_{50} , fue (Media ± EE): 16.64 ± 4.27 , 12.41 ± 1.19 y 13.49 ± 4.59 mg mL⁻¹ para AQ, AW y AC respectivamente (**cuadro 3**). Más aun, entre los métodos de extracción, el método AW tuvo el mayor porcentaje de rendimiento ($P < 0.05$).

Los análisis de esta investigación permitieron determinar que: i) los flavonoides poseen propiedades ovicidas, y ii) los flavonoides son los fitoquímicos predominantes en las extracciones AW. Esto es consistente con estudios previos que señalan la extracción acetona:agua como el sistema más eficiente para la recuperación de fenoles (Chavan *et al.* 2001; Chavan 2013).

También estudios fitoquímicos previos han manifestado efectos agonistas/antagonistas entre componentes del mismo extracto (Biavatti 2009), fenómeno que explicaría por qué el extracto *G. sepium*-AC mostró un efecto ovicida excepcional, pero la bioactividad fue prácticamente nula en la extracción acetona:agua. No obstante, estas tendencias sólo se observaron con una de las cuatro plantas analizadas (*G. sepium*) y, en general, la actividad AH en la extracción AW fue igual o mayor; sin embargo, se requiere de un fraccionamiento bio-dirigido de los fitoquímicos que permita la identificación de las moléculas activas presentes en cada extracto, así como sus interacciones.

Conclusiones

Esta investigación corroboró el potencial ovicida de los extractos acetona:agua de las plantas contra *C. punctata*. El uso de PEG afirmó que los compuestos polifenólicos son los fitoquímicos involucrados principalmente con la actividad AH. *Leucaena leucocephala* y *Gliricidia sepium* fueron los forrajes con mayor actividad antihelmíntica, y se recomienda considerarlos para evaluaciones *in vivo* posteriores.

Financiamiento

Este proyecto fue posible gracias al proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM No. IN212613.

Agradecimientos

El primer autor agradece al programa de posgrado "Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal" de la UNAM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Conflictos de intereses

Miguel Ángel Alonso Díaz es el director técnico del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Los demás autores no tienen ninguna relación personal o financiera con otras personas u organizaciones que pudiesen influenciar inapropiadamente el contenido de este artículo.

Contribución de los autores

Elke von Son de Fernex llevó a cabo el estudio, obtuvo los extractos de plantas y redactó el artículo.

Miguel Ángel Alonso Díaz elaboró el diseño experimental y colaboró con la redacción y revisión del artículo.

Pedro Mendoza de Gives colaboró con el aislamiento de la cepa de *C. punctata*, así como con la revisión del artículo.

Braulio Valles de la Mora hizo el análisis estadístico de los experimentos y colaboró con la revisión del artículo.

Alejandro Zamilpa diseñó los métodos de extracción de las plantas, hizo la evaluación fitoquímica y colaboró con la revisión del artículo.

Manases González Cortazar interpretó los resultados del análisis fitoquímico y colaboró con la revisión del artículo.

Referencias

- 1) Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro, CA, Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H. 2008a. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*, 153:313-319.
- 2) Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal C, Brunet S, Hoste H. 2008b. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology*, 153:187-192.

- 3) Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Hoste H. 2010. Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: A friendly foe? *Small Ruminant Research*, 89:164-173.
- 4) Arnaud-Ochoa R, Alonso Díaz MA. 2012. Unidades de producción bovina con nematodos gastrointestinales resistentes al albendazol (benzimidazoles) en México. *Revista Científica*, XXII (4):315-320.
- 5) Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, 99:205-219.
- 6) Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H. 2005. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: Role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*, 131:531-538.
- 7) Bartley DJ, McArthur CL, Devin LM, Sutra JF, Morrison AA, Lespine A, Matthews JB. 2012. Characterisation of macrocyclic lactone resistance in two field-derived isolates of *Cooperia oncophora*. *Veterinary Parasitology*, 190:454-460.
- 8) Becerra-Nava R, Alonso-Díaz MA, Fernandez-Salas A, Quiroz RH. 2014. First report of cattle farms with gastrointestinal nematodes resistant to levamisole in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 204:285-290.
- 9) Biavatti MW. 2009. Synergy: An old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45:371-378.
- 10) Bizimenyera ES, Githiori JB, Eloff JN, Swan GE. 2006. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (*Fabaceae*) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, 142:336-343.
- 11) Botura MB, dos Santos JD, da Silva GD, de Lima HG, de Oliveira JV, de Almeida MA, Batatinha MJ, Branco A. 2013. In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, 192:211-217.
- 12) Charlier J, Hoglund J, von Samson-Himmelstjerna G, Dorny P, Vercruysse J. 2009. Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: Impact on production, diagnosis and control. *Veterinary Parasitology*, 164:70-79.
- 13) Chavan UD, Amarowicz R. 2013. Effect of various solvent systems on extraction of phenolics, tannins and sugars from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *International Food Research Journal*, 20(3):1139-44.
- 14) Chavan UD, Shahidia F, Naczkb M. 2001. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75:509-512.
- 15) Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44:35-44.
- 16) Demeler J, Krucken J, AlGusbi S, Ramunke S, De Graef J, Kerboeuf D, Geldhof P, Pomroy WE, von Samson-Himmelstjerna G. 2013. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 188:10-19.

- 17) Dobson RJ, Donald AD, Waller PJ, Snowdown KL. 1986. An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites. *Veterinary Parasitology*, 19:77-84.
- 18) Fitzpatrick JL. 2013. Global food security: The impact of veterinary parasites and parasitologists. *Veterinary Parasitology*, 195:233-248.
- 19) Flores-Guido JS. 2001. Leguminosae. *Florística, Etnobotánica y Ecología*. Etnoflora Yucateense. Universidad Autónoma de Yucatán; Mérida, Yucatán, México.
- 20) Gasbarre LC. 2014. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US. *Veterinary Parasitology*, 204:3-11.
- 21) Gibbons LM. 1981. Revision of the african species of the genus *Cooperia* Ransom, 1907 (*Nematoda, trichostrongylidae*). *Systematic Parasitology*, 2:219-252
- 22) Hoste H, Martinez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*, 186:18-27.
- 23) Katiki LM, Chagas AC, Bizzo HR, Ferreira JF, Amarante AF. 2011. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. *Veterinary Parasitology*, 183:103-108.
- 24) Kenyon F, Jackson F. 2012. Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Veterinary Parasitology*, 186:10-17.
- 25) Kozan E, Anul SA, Tatli IL. 2013. In vitro anthelmintic effect of *Vicia pannonica* var. *purpurascens* on trichostrongylosis in sheep. *Experimental Parasitology*, 134:299-303.
- 26) Makkar HPS. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. *A laboratory manual*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- 27) Makkar HPS, Blummel M, Becker K. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition*, 73:897-913.
- 28) Mansfield LS, Gamble HR, Fetterer RH. 1992. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*-I. Structural components. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 103B(3):681-686.
- 29) Martinez-Ortiz-de-Montellano C, Vargas-Magana JJ, Canul-Ku HL, Miranda-Soberanis R, Capetillo-Leal C, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Torres-Acosta JF. 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 172:283-290.
- 30) Molan AL, Duncan AJ, Barry TN, McNabb WC. 2003. Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parasitology International*, 52:209-218.
- 31) Molan AL, Waghorn GC, Min BR, McNabb WC. 2000. The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitologica*, 47:39-44.
- 32) Novobilsky A, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM. 2011. Condensed tannins act against cattle nematodes. *Veterinary Parasitology*, 182:213-220.

- 33) Perri AF, Mejia ME, Licoff N, Lazaro L, Miglierina M, Ornstein A, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM. 2011. Gastrointestinal parasites presence during the peri-partum decreases total milk production in grazing dairy Holstein cows. *Veterinary Parasitology*, 178:311-318.
- 34) Rafi M, Rohaeti E, Miftahudin A, Darusman LK. 2011. Differentiation of *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza* and *Zingiber cassumunar* by thin layer chromatography fingerprint analysis. *Indonesian Journal of Chemistry*, 11(1):71-74.
- 35) Stromberg BE, Gasbarre LC, Waite A, Bechtol DT, Brown MS, Robinson NA, Olson EJ, Newcomb H. 2012. *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity? *Veterinary Parasitology*, 183:284-291.
- 36) Sutherland IA, Leathwick DM. 2011. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: A global issue? *Trends in Parasitology*, 27:176-181.
- 37) Von Son-de Fernex E, Alonso-Diaz MA, Valles-de la Mora B, Capetillo-Leal CM. 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*, 131:413-418.
- 38) Wabo Poné J, Kenne Tameli F, Mpoame M, Pamo Tedonkeng E, Bilong Bilong C. 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.