



ACTIVIDAD NEMATICIDA DE LOS FRUTOS DE LA LEGUMINOSA
***Caesalpinia Coriaria*: EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS**
COMO ALTERNATIVA DE USO EN PEQUEÑOS RUMIANTES

TESIS POR ARTÍCULO CIENTÍFICO

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y GESTIÓN LOCAL

P R E S E N T A

XOCHITL DE JESÚS MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORIAL

Director de Tesis: DR. JAIME OLIVARES PÉREZ
Co-Director de Tesis: DR. AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ
Asesores: DR. SAÚL ROJAS HERNÁNDEZ
DR. MOISÉS CIPRIANO SALAZAR
DR. LUIS MIGUEL CAMACHO DÍAZ

IGUALA DE LA INDEPENDENCIA, GRO, MÉXICO, MARZO 2019



UAGro

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y GESTIÓN LOCAL

La presente tesis titulada **Actividad nematocida de los frutos de la leguminosa *Caesalpinia coriaria*: evaluación de compuestos bioactivos como alternativa de uso en pequeños rumiantes**, realizada por la alumna **Xochitl de Jesús Martínez**, ha sido leída y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local. La dirección de la investigación estuvo integrada por el:

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Jaime Olivares Pérez

Director de Tesis

Dr. Agustín Olmedo Juárez

Co-Director de Tesis

Dr. Luis Miguel Camacho Díaz

Asesor

Dr. Saúl Rojas Hernández

Asesor

Dr. Moisés Cipriano Salazar Asesor

Asesor

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A ti DIOS que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia tan maravillosa y Dios me ha dado la suerte de estar rodeada de seres queridos y tener la oportunidad de contar con ellos para compartir mis fracasos, triunfos, tristezas y alegrías. *Hoy doy gracias a dios por darme a mis padres, familia, amigos y los seres queridos que están conmigo en las buenas y en las malas, por su apoyo que simboliza el inicio de mi profesión.*

A mis Padres: Felipe de Jesús Molina y Ma. Del Carmen Martínez Cruz.

Con mucho cariño principalmente a mis padres que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá por brindarme su apoyo y creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles. *Con la mayor gratitud por sus esfuerzos realizados para dejarme la mejor herencia que yo pudiese tener, gracias por guiar mi vida con energía, esto ha hecho que sea lo que soy.*

A mis Hermanos.

Dra: Yuridia, Profa.: Yesbeth y Prof. Jose Bladimir, por haber brindado de su apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación. *Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecerles una vida de lucha, sacrificio, esfuerzo, solo deseo que comprendan que el logro mío es suyo, que mi esfuerzo es inspiración en ustedes hermanas y que son mi único ideal, pero más que nada, por su amor y apoyo incondicional. ¡Gracias a ustedes hermanas, Con respeto y admiración!*

A mis familiares:

Familia: García De Jesús y Díaz De Jesús, por el apoyo que me brindaron para desarrollar ciertas actividades durante este trabajo. En especial a la más pequeña de la familia Sofía García De Jesús.

A mis Co- Asesor de tesis:

Debo agradecer de manera especial y sincera a Dr. Jaime Olivares por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, para el desarrollo de esta tesis. Le agradezco

también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades durante el desarrollo de esta tesis.

Co-Director de Tesis: Dr. Agustín Olmedo Juárez, debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que hizo durante el trabajo de largas jornadas en el laboratorio, redundaran benéficamente tanto a nivel científico y a mis asesores Dr. Luis Miguel Camacho, Dr. Saúl Rojas, por confiar en mí, por tenerme la paciencia necesaria y apoyarme en momentos difíciles, me dio mucho gusto el haber tenido unos asesores, tan buenas personas, les agradezco todo el apoyo y compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean.

A todas las personas y amigos que se han cruzado en mi camino, porque todas han dejado un gran conocimiento en mí.

Recalco dos nombres de las personas que me apoyaron durante este trabajo:

Gerardo Núñez López e Itzel Sánchez Alonso, quienes me apoyaron y me dieron buenos consejos para seguir adelante, y en todo momento estuvieron, Gracias!!

Si no escalas la montaña jamás podrás disfrutar el paisaje. (Pablo Neruda).

ÍNDICE

I.	RESUMEN GENERAL	11
II.	INTRODUCCIÓN.....	12
III.	JUSTIFICACIÓN.....	14
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
V.	REVISIÓN DE LITERATURA	16
5.1.	Importancia de las leguminosas forrajeras	16
5.2.	Características nutricionales de las leguminosas arbustivas.....	16
5.3.	Plantas y recursos taniniferos en el trópico	17
5.3.1.	Principales leguminosas arbóreas de climas tropicales o subtropicales	17
5.4.	Descripción taxonómica de <i>Caesalpinia coriaria</i>	19
5.4.1.	<i>Caesalpinia coriaria</i> (cascalote)	19
5.5.	Metabolitos secundarios: estructura, biosíntesis y propiedades generales de los arboles forrajeros	20
5.5.1.	Compuestos Fenoles y Polifenoles.....	21
5.5.1.1.	Estructura química.....	21
5.5.1.2.	Biosíntesis en las plantas	21
5.5.1.3.	Clasificación	22
	Ácidos fenólicos	22
	Flavonoides.....	23
5.6.	Taninos	25
5.6.1.	Distribución de los taninos en la naturaleza	26
5.6.2.	Distribución y localización de los taninos en los vegetales.....	26
5.6.3.	Clasificación de los taninos	27
5.6.3.1	Taninos Hidrolizables.....	28
5.6.3.2	Taninos Condensados TCs o Proantocianidinas.....	28

5.6.3.2.1	Estructura química de los taninos condensados.....	29
5.6.3.2.2	Tipos de taninos condensados.....	30
5.6.3.2.3	Propiedades generales de los taninos condensados	30
5.6.3.2.4	Propiedades físico químicas de los taninos condensados	31
5.6.3.2.5	Solubilidad de los taninos condensados.....	31
5.6.3.2.6	Formación de complejos con las proteínas	31
5.6.3.2.7	Propiedades antioxidantes.....	32
5.6.3.2.8	Efectos de los taninos en la dieta de los rumiantes	32
5.6.3.2.9	Efectos negativos de los taninos	34
	-Reducción ingesta voluntaria	34
	-Efectos en la fisiología digestiva.....	34
5.6.3.2.10	Efecto positivo de los taninos condensados en los rumiantes	35
	-Efectos dependientes de la dosis	36
	-Masticación	36
	-Efectos sobre las fermentaciones intra-ruminales.....	37
	-Aumento de la proteínas a nivel intestinal (Efectos post-ruminales).....	37
	-Efecto sobre la salud: prevención del meteorismo.....	38
5.7.	Adaptación de los herbívoros al consumo de taninos	38
5.8.	Aceptabilidad de la biomasa de árboles en rumiantes.....	39
5.9.	Propiedades antihelmiticas de los taninos y polifenoles	40
5.10.	Impacto en la resiliencia del hospedador.....	41
5.11.	Efectos de metabolitos secundarios de plantas, dependiendo de los nematodos..	42
5.12.	Variaciones que surgen de las especies de nematodos y etapas del ciclo de vida	42
5.13.	Variación en la composición del tanino de la planta (cantidad y calidad) en relación con actividades contra <i>H. contortus</i>	43
VI.	OBJETIVOS.....	44

VII.	HIPOTESIS	45
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
8.1.	Experimentos <i>in vitro</i>	46
8.1.1.	Colección del fruto	46
8.1.2.	Elaboración de extractos y estudios <i>in vitro</i>	46
8.1.3.	Material biológico	47
8.1.4.	Prueba de inhibición de la eclosión de los huevos (% IEH).....	48
8.1.5.	Prueba de mortalidad de larvas.....	48
8.2.	Análisis estadístico	49
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
9.1.	Capítulo primero.....	50
9.2.	Capítulo segundo.....	58
9.3.	Capítulo tercero.....	74
X.	CONCLUSIONES.....	85
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

Índice de figuras

Pag.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

Figura 1	Estructura molecular de las Flavonas	24
Figura 2	Estructura molecular de las Isoflavonas	24
Figura 3	Estructura molecular de las Flavonoles	25
Figura 4	Estructura molecular de las Atocianidinas	25
Figura 5	Estructura molecular de taninos hidrolizables: Ácidos Gálicos y Elágico ...	28
Figura 6	Estructura básica de los Taninos Condensados o Proantocianidinas	29

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo	In vitro anthelmintic activity of methanolic extract from <i>Caesalpinia coriaria</i> J. Willd fruits against <i>Haemonchus contortus</i> eggs and infective larvae	
I		
Figure 1	Lethal concentrations (LC) of the methanolic extract from <i>C. coriaria</i> J. Willd fruits to inhibit <i>H. contortus</i> eggs (24 h of <i>in vitro</i> exposure).....	53
Figure 2	Lethal concentrations (LC) of themethanolic extract of <i>C. coriaria</i> J.Willd fruits for infecting larvae (L3) of <i>H. contortus</i> (72 h of <i>in vitro</i> exposure).....	54
Figure 3	Secondary compounds identified in the methanolic extract of <i>C. coriaria</i> J.Willd fruits (HPLC analysis).....	55
Capítulo	Evaluation of a hydroalcoholic extract of the <i>Caesalpinia coriaria</i> j. Wild fruit against eggs and larvae of <i>Haemonchus contortus</i>	
II		
Figure 1	Lethal concentrations required to inhibit the <i>H. contortus</i> egg hatching after 48 h exposed to a <i>Caesalpinia coriaria</i> fruit hydroalcoholic extract ..	70
Figure 2	Lethal concentrations required to cause the mortality of <i>H. contortus</i> infective larvae after 72 h exposed to a <i>Caesalpinia coriaria</i> fruit hydroalcoholic extract	70
Figure 3	Results of the HPLC analysis of the Hydroalcoholic extract from <i>Caesalpinia coriaria</i> fruits	71
Capítulo	Desafío <i>in vitro</i> de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> a dos extractos del fruto de <i>Caesalpinia coriaria</i>	
III		
Figura 1	Concentraciones letales del extracto acetónico y etanólico de los frutos de	

Caesalpinia coriaria sobre la inhibición de la eclosión de huevos de
Haemonchus contortus 80

V.		REVISIÓN DE LITERATURA	
Cuadro 1	Principales árboles y arbustos que predominan la selva baja caducifolia de Tierra Caliente		18
Cuadro 2	Compuestos procedentes del Metabolismo Secundario		20
Cuadro 3	Concentraciones mg/μL de los extractos utilizados en el experimento <i>in vitro</i> y controles contra huevos de <i>H. contortus</i>		48
Cuadro 4	Concentraciones mg/μL de los extractos utilizados en el experimento <i>in vitro</i> y controles contra larvas de <i>H. contortus</i>		49
IX.		RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Capítulo I	<i>In vitro</i> anthelmintic activity of methanolic extract from <i>Caesalpinia coriaria</i> J. Willd fruits against <i>Haemonchus contortus</i> eggs and infective larvae		
Table 1	Egg hatching inhibition (% EHI) of <i>Haemonchus contortus</i> exposed to a methanolic extract made with <i>Caesalpinia coriaria</i> fruits.....		53
Table 2	Mortality percentages of infective larvae (L3) of <i>Haemonchus contortus</i> exposed to a <i>Caesalpinia coriaria</i> methanolic extract at different concentrations.....		54
Capítulo II	Evaluation of a hydroalcoholic extract of the <i>Caesalpinia coriaria</i> j. Wild fruit against eggs and larvae of <i>Haemonchus contortus</i>		
Table 1	Inhibition eggs hatching (% IEH) of <i>Haemonchus contortus</i> exposed to a hydroalcoholic extract made with <i>Caesalpinia coriaria</i> fruits		72
Table 2	Mortality percentages of infective larvae (L3) of <i>Haemonchus contortus</i> exposed to a <i>Caesalpinia coriaria</i> hydroalcoholic extract at different concentrations		73
Capítulo III	Desafío <i>in vitro</i> de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> a dos extractos del fruto de <i>Caesalpinia coriaria</i>		
Cuadro 1	Porcentajes de inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> del extracto acetónico y etanólico del fruto <i>Caesalpinia coriaria</i>		79

I. RESUMEN GENERAL

En el presente estudio se realizó una evaluación *in vitro* de extractos liofilizados del fruto de la leguminosa *Caesalpinia coriaria* sobre la eclosión de huevecillos y motilidad de larvas para controlar infestaciones de *Haemonchus contortus* Rudolphi en pequeños rumiantes. En este documento se describen tres capítulos con información relevante y científica, derivada del proyecto de tesis. En los capítulos se describen los diferentes apartados que comprenden la difusión de la investigación (resumen, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión y la literatura citada). *Capítulo I.* *In vitro* anthelmintic activity of Methanolic extract from *Caesalpinia coriaria* J. Willd fruits against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae, publicado en la revista BioMed Research International (Hindawi, 2018) que describe el efecto *in vitro* del extracto metanólico sobre huevos y larvas del parásito. *Capítulo II.* Evaluation of a Hydroalcoholic extract of the *Caesalpinia coriaria* J. Wild fruit against eggs and larvae of *Haemonchus contortus*, aceptado con revisiones menores en la revista Agroforestry Systems- 2018, que describe el efecto *in vitro* del extracto hidroalcohólico sobre huevos y larvas del parásito. *Capítulo III.* Desafío *in vitro* de huevos de *Haemonchus contortus* a dos extractos del fruto de *Caesalpinia coriaria*, concluido para su envío a la revista Tropical Animal Health and Production, que describe el efecto *in vitro* del extracto acetónico y etanólico sobre huevos del parásito.

Palabras clave: cascalote, extractos, parásito, metabolitos secundarios.

II. INTRODUCCIÓN

La parasitosis es una de las principales enfermedades que afectan el desarrollo normal de los animales donde los nematodos gastrointestinales (NGI) son los principales que afectan su salud (Pérez *et al.*, 2009, Muñiz-Lagunes *et al.*, 2015). La NGI es actualmente un problema mundial, causando pérdidas económicas en la producción ganadera (Habela *et al.*, 2000), debido al retraso del crecimiento de los animales por la desnutrición y la pérdida del apetito (Rojas *et al.*, 2007). La NGI ha sido uno de los factores determinantes en la producción de ovinos en pastoreo y está ligada a las condiciones medio ambientales de la región, influyendo en el desarrollo de huevos y fases larvarias infectantes (Olivares *et al.*, 2006).

La resistencia antihelmíntica (RA) de los nemátodos gastrointestinales en rumiantes está relacionada con los fármacos disponibles en el mercado y uso continuo para el tratamiento y control de tales parásitos (León-Castro *et al.*, 2015, Olivares *et al.*, 2012, Muñiz-Lagunes *et al.*, 2015). Lo que origina que en cada aplicación sobreviva un pequeño porcentaje de NGI, los cuales después de varias generaciones serán resistentes a estos productos (González *et al.*, 2010). El incremento en los casos de la RA ha puesto en riesgo la sustentabilidad de los métodos de control (González *et al.*, 2010), buscando nuevas alternativas para el control NGI. El uso de plantas arbóreas con propiedades nutraceuticas son opciones viables para el control de los NGI, en animales es un tema relativamente nuevo el cual consiste en utilizar sus metabolitos secundarios, con la finalidad de mejorar la producción y salud animal (Castillo-Mitre *et al.*, 2017). Reduciendo las pérdidas económicas a escala local y nacional (Aleman *et al.*, 2011). Además, al utilizar productos naturales con actividad antihelmíntica contra NGI, disminuyen las cargas parasitarias (Pérez *et al.*, 2014).

La utilización de plantas con compuestos bioactivos con poder antihelmíntico (AH) contra NGI de rumiantes ha sido sugerida (Pérez *et al.*, 2014). El uso de plantas ricas en taninos (PRT), se debe al mecanismo de acción por el contenido de metabolitos secundarios (Martínez 2010), PRT demuestran que pueden mejorar la resistencia de los pequeños rumiantes a infecciones contra los NGI (Alemán *et al.*, 2011). El árbol de cascalote (*Caesalpinia coriaria* Jacq. Willd) está muy extendido en la Región de Tierra Caliente de Guerrero, tanto los frutos y hojas de esta leguminosa contienen una gran variedad de

compuestos secundarios como taninos, ácido gálico y flavonoides (Sánchez-Carranza *et al.*, 2017, Makkar, 2006), en el fruto arbóreo, por lo que es muy utilizado en la curtiduría de pieles (Camacho *et al.*, 2015). Además se ha observado cotidianamente que los frutos de este árbol son consumidos por los rumiantes sin manifestaciones de síntomas de intoxicación (Olivares *et al.*, 2011). Estos antecedentes pueden sugerir a *C. coriaria* como un recurso natural con potencial para la elaboración de extractos acetónico, hidroalcohólico, etanólico y metanólico para el control de parásitos (*H. contortus*) en corderos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antihelmínticos de extractos elaborados con frutos de *Caesalpinia coriaria* en diferentes solventes sobre la eclosión de huevos y desarrollo de larvario de *Haemonchus contortus* en pequeños rumiantes.

III. JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de producción de ovinos basados fundamentalmente en la utilización de los pastos que son recursos naturales forrajeros para la alimentación de los animales (Zamora *et al.*, 2001). García (2009), menciona que en la actualidad la ganadería se enfrenta a problemas, pérdidas y desventajas para los productores ya que en ella se presentan la baja producción y en casos se puede presentar la mortalidad del ganado presentando problemas de parasitosis ocasionados por los nematodos gastrointestinales.

El nematodo *H. contortus* es una de las especies de mayor importancia económica, ya que independientemente la mayoría de las situaciones las infestaciones pasan de forma inadvertida, son los responsables de los bajos comportamientos productivos y reproductivos constituyendo en muchas ocasiones una de las causas principales de muerte (Olmedo-Juárez *et al.*, 2014; Olmedo-Juárez *et al.*, 2015). Actualmente, se ha reportado que los métodos tradicionales de control no son lo suficientemente efectivos y se ha demostrado la aparición de resistencia a los fármacos por su mal uso en la dosificación para la prevención y tratamiento de enfermedades parasitarias en ovinos (Muñiz-Lagunes *et al.*, 2015).

Es por ello que es necesario buscar estrategias para el control de las parasitosis; dentro de estas alternativas se tienen el uso de plantas con propiedades antihelmínticas o nutraceuticas en animales es un tema relativamente nuevo el cual consiste en utilizar sus metabolitos secundarios, con la finalidad de mejorar la producción y salud animal (Castillo-Mitre *et al.*, 2017). Las plantas o sus extractos han sido usadas durante siglos en medicina veterinaria, tanto de forma interna como externa para el tratamiento de diversas patologías (Olmedo *et al.*, 2014). Una de estas alternativas es explorar el efecto de los taninos condensados presentes en el follaje y/o frutos de árboles locales, como es el caso de *C. coriaria* que produce frutos con contenido representativo de taninos condensados pero que además hay antecedentes de que son consumidos por los animales naturalmente sin reportes de toxicidad. Por estos antecedentes resulta importante usar éste recurso natural para elaborar extractos con diferentes solventes (acetónico, hidroalcohólico, etanólico y metanólico) y evaluar primero su efecto *in vitro* contra los estadios de huevo y larva de *H. contortus*.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las parasitosis son un gran problema que atacan principalmente a los pequeños rumiantes, provocando problemas en la salud y retrasa su crecimiento de los animales donde los nematodos gastrointestinales (NGI) son los principales responsables (Pérez *et al.*, 2009, Muñiz-Lagunes *et al.*, 2015).

La resistencia antihelmíntica (RA) de los nematodos gastrointestinales en rumiantes está relacionado con los fármacos disponibles en el mercado y uso continuo para el tratamiento y control de tales parásitos (León-Castro *et al.*, 2015, Olivares *et al.*, 2012). Lo que origina que en cada aplicación sobreviva un pequeño porcentaje de NGI, los cuales después de varias generaciones serán resistentes a estos productos (González *et al.*, 2011).

En la actualidad sean demostrado el uso de plantas ricas en taninos (PRT), se debe al mecanismo de acción por el contenido de metabolitos secundarios (Martínez 2010). Las PRT demuestran que pueden mejorar la resistencia de los pequeños rumiantes a infecciones contra los NGI (Alemán *et al.*, 2011), que contiene una gran variedad de compuestos secundarios como taninos, ácido gálico y flavonoides (Sánchez-Carranza *et al.*, 2017, Makkar, 2006).

¿Cuál será el efecto *in vitro* de los extractos elaborados con frutos de *C. coriaria* (cascalote) en diferentes solventes para el control de *H. contortus* en pequeños rumiantes?

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Importancia de las leguminosas forrajeras

Las plantas, arbóreas o arbustos que pertenecen a la familia Leguminosae, juegan un papel importante en el medio ambiente (García *et al.*, 2012), dado que son fijadoras de nitrógeno atmosférico gracias a la presencia de la bacteria del *Rhizobium sp.*, localizadas en nódulos a nivel radicular, que contribuyen a incrementar la fertilidad de los suelos. Por sus características han sido empleadas como plantas forrajeras (Romero 2000).

Existen listas florísticas de la vegetación de regiones de México que se clasifican familias, géneros y especies, cuya información sirve como respaldo para identificar específicamente y en este caso, a las leguminosas en general (Cab 2011).

5.2. Características nutricionales de las leguminosas arbustivas

El contenido nutricional de leguminosas arbustivas debe ser atractivo para la producción animal. En el primer término esta debe de ser consumida de manera natural por los rumiantes, de tal forma que el animal los consuma y pueda obtener de ella la suficiente cantidad de nutrientes que exprese su potencial zootécnico (Pinto *et al.*, 2002).

Los principales componentes químicos de los árboles y arbustos forrajeros como un indicativo para su calidad nutritiva son la proteína cruda, fibra detergente neutra y acida y los minerales como es el calcio y fosforo (Cab 2011). Considerando el aspecto nutricional, el hecho de que algunas especies presenten una cantidad aceptable de PC, moderados niveles de fracciones de fibra, bajo contenido de factores antinutricionales y que sean apetecibles por los animales, hacen que su uso en la ganadería sea promisorio (Pinto *et al.*, 2002). La Proteína Cruda y la Proteína Cruda Digestible son indicadores importantes de la calidad nutricional de las especies forrajeras, por lo cual los valores reportados para muchas de las especies evaluadas son suficientes para considerarlas como suplementos proteicos en pasturas de baja calidad (Pinto *et al.*, 2002), ya que se encontraron valores superiores de Proteína Cruda en algunos árboles con respecto a los pastos tropicales.

Los frutos y vainas de las leguminosas son consumidas por los animales, por esta razón se han investigado más a fondo su contenido para valorar la calidad nutritiva (Pinto *et al.*, 2002). Narvaez y Lazcano (2004), mencionan sobre la calidad nutritiva de algunas

leguminosas arbóreas y arbustivas de tipo caducifolio en ambientes subtropicales y tropicales, entre las más comunes se encuentran: *Leucaena leucocephala*, *Callindra calothyrsus*, *Gliricidia sepium*, *Acacia farnesiana*, *Pithecellobium dulce*, *Acacia cochiliacantha* (Carranza *et al.*, 2003).

El contenido de proteína cruda de las leguminosas arbóreas y arbustivas ha sido determinado en ambientes naturales, cuyos valores en las hojas de algunas especies puede alcanzar entre el 20 y 35% de PC, algunas de ellas son: *L. leucaena*, *G. sepium*, *A. farnesiana*, *P. dulce*, y *Pennatula*. Otras especies que contienen menos del 20% de proteína son: *A. cochiliacantha*, *C. calothyrsus*, *P. saman*, *C. fistuca*, *C. grandis*, *A. lebeck* y *A. caribaea* (Pinto *et al.*, 2002 y Carranza *et al.*, 2002).

5.3. Plantas y recursos taniniferos en el trópico

Los frutos de arbustivas y los recursos alimenticios disponibles, en general pueden clasificarse por su calidad, consumo voluntario, valor nutritivo (digestibilidad y composición química), contenido de sustancias tóxicas (Carranza *et al.*, 2002, García 2002 y Villa *et al.*, 2010). Considerando que el follaje de algunas especies arbóreas, tienden a tener características aceptables para su consumo en épocas críticas en donde se destaca por tener un alto contenido de proteína cruda, contenido de fibra, nitrógeno no proteico (NNP) y una cantidad variable de proteína y grasa (Camacho *et al.*, 2015).

Sin embargo, su digestibilidad es relativamente baja (entre 50 y 60 %), comparada con los forrajes herbáceos. Cabe mencionar que la fibra, el NNP y una cantidad variable de la proteína, consumidos en el forraje arbóreo, son fermentados y utilizados como nutrientes por la flora ruminal. Una parte de la proteína puede estar ligada a compuestos antinutricionales, llamados taninos y fenoles, que les permite escapar, con la grasa, a la fermentación ruminal, por lo cual su forraje puede ser fuente importante de proteína y de energía sobrepasante, siempre que se logre un balance apropiado de nutrientes (Barrientos *et al.*, 2012).

5.3.1. Principales leguminosas arbóreas de climas tropicales o subtropicales

Los rumiantes que se encuentran en pastoreo bajo sistemas extensivos dentro de los climas tropicales o subtropicales, se basa en vegetación nativa e inducida de selva baja caducifolia,

donde la perturbación de las comunidades a ocasionando la aparición de extremosos bosques espinosos (INIA 1982 y SAGARPA 2001). Dentro de las áreas tropicales o subtropicales, se identifican sistemas de producción pecuario, que tienen disponibilidad de recursos alimenticios naturales para el ganado (pastos y especies arbóreas), lo que se traduce en diferentes estrategias de manejo que incluyen el aprovechamiento de la biodiversidad vegetal local, tratando de incrementar la productividad obtenida, lo que puede definirlos como sistemas de producción de ganado agrosilvopastoriles (Villa *et al.*, 2010 y SAGARPA 2001). Las áreas tropicales y subtropicales poseen un número significativo de plantas nativas con producción de follaje y frutos ricos en taninos, algunas de ellas empleadas en la alimentación (Cuadro 1). Estos frutos, se consideran con un gran potencial por su abundancia y aceptación por el ganado. Estos árboles producen follaje por periodos prolongados durante el año, que podría aprovecharse, para la alimentación de los rumiantes principalmente (Villa *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Principales árboles y arbustos que predominan la selva baja caducifolia de Tierra Caliente

Nombre común.	Nombre científico.
Pinzan	<i>Pithecellobium dulce</i>
Huizache	<i>Acacia farnesiana</i>
Cascalote	<i>Caesalpinia coriaria</i>
Cuaulote	<i>Guazuma umifolia</i>
Espino Blanco	<i>Pithecellobium lanceolatum</i>
Cuachalalate	<i>Amphipterygium adstringens</i>
Cirian	<i>Crescentiana alata</i>
Pasto común	<i>Poaceae Barnhart</i>
Pasto triguillo	<i>Dactylis glomerata</i>
Cubata	<i>Acacia cochiliacantha.</i>

(Villa *et al.*, 2010 y Olivares *et al.*, 2010).

5.4. Descripción taxonómica de *Caesalpinia coriaria*

5.4.1. *Caesalpinia coriaria* (cascalote)

Caesalpinia coriaria, es una especie común y bien conocida en muchas partes del mundo. Es un componente de las zonas bajas del bosque seco caducifolio del pacífico y sabanas, se encuentra asociados con árboles nativos de las áreas calientes y secas; (*Acacia* y *Crescentia*); pertenece al grupo de leguminosas (CONABIO 2015).

Este árbol llega a medir de 3 a 9 m de altura, es un perennifolio, tiene una corteza rugosa y no presenta espinas, las hojas están divididas en hojuelas, sus flores, miden de 5 a 10 mm de diámetro y son de color blanco o amarillento y se encuentran en racimos simples y compuestos. Las vainas no se abren naturalmente y tienen de 6 a 6 cm de longitud, son oblongas, gruesas, carnosas y coriáceas. Su fruto son vainas que se encuentran enroscadas. El polvo amarillento que rodea las semillas dentro de las vainas contiene un 50 % de taninos, los cuales son usados para curtir pieles, y compuestos relacionados de las vainas y la corteza (CEDAF 2015). Habitan en un clima cálido desde los 550 y los 1000 msnm, asociados a bosques tropical caducifolio y bosque espinoso.

Composición química

De acuerdo a la literatura se ha reportado que la leguminosa *Caesalpinia coriaria* tiene un contenido de proteína cruda de 6.0 y 6.90%, FDN de 41.04, FDA de 25.98, taninos hidrolizable en los frutos de 56.6% y taninos catequínicos 7.5%, coincidiendo el valor de taninos hidrolizables dentro del rango de taninos (Velásquez *et al.*, 2005, Velásquez *et al.*, 2011, Olivares *et al.*, 2014, Camacho *et al.*, 2015 y Carretero 2000). Otros autores, señalaron un contenido total de taninos en los frutos de *C. coriaria* de 20 a 40%, sin embargo, no se mencionan el tipo de taninos encontrados (López de Lara 1984). Por otra parte el follaje también es utilizado en ramoneo por los animales en pastoreo, representando un recurso de alimento fresco durante la época seca, que los valores más altos en contenido de proteína cruda están representados por dos especies de la familia Leguminosae.

5.5. Metabolitos secundarios: estructura, biosíntesis y propiedades generales de los arboles forrajeros

Las especies vegetales poseen diversos componentes en su estructura, los cuales sin lugar a duda son importantes para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de las plantas (Carrion *et al.*, 2010 y García 2010). García (2004), mencionan las rutas metabólicas básicas, que constituyen los orígenes del metabolismo secundario de las plantas, dando lugar a una variada serie de compuestos, y presentan una distribución celular, los metabolitos secundarios más importantes se muestran en el Cuadro 2.

Dentro de éstos nos centraremos en los compuestos fenólicos, que están implicados en funciones defensivas o de atracción para la reproducción; a diferencia de los metabolitos primarios (metabolismo celular), como (la nutrición y crecimiento vegetal) (Carrion *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Compuestos procedentes del Metabolismo Secundario

Grupo	Compuestos
Isoprenoides	Terpenos (hormonas y pigmentos esenciales), aceites esenciales, saponinas, cardiotónicos.
Derivados fenólicos	Fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, flavonoides, antocianinas.
Glucósidos	saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos
Alcaloides	

(García 2010, Avalos *et al.*, 2009 y Cowan, 1999).

5.5.1. Compuestos Fenoles y Polifenoles

5.5.1.1. Estructura química

Los fenoles y polifenoles son los metabolitos más simples y se encuentran en las plantas producen una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo hidroxilo en un anillo aromático, que les confiere a una estructura fenólica (Cowan, 1999 y Gonzales 2010). Los fenoles se clasifican de acuerdo al número de átomos de carbono que poseen. Existen fenoles simples (C6) y derivados con cadenas laterales de uno, dos o tres carbonos. Los fenoles son importantes económicamente por que contribuyen al sabor, aroma y color (Piñol *et al.*, 2000). Los compuestos fenólicos, son algunas de las sustancias toxicas más abundantes en las leguminosas, reciben el nombre de polifenoles o fenilpropanoides, derivados de ellas el fenol, la estructura química, son un grupo muy diverso que se comprende de moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta complejos como los taninos y la lignina (García 2004). Se atribuye a la mayoría de los compuestos fenólicos propiedades antimicrobianas, antioxidantes y terapéuticas (Helander *et al.*, 1998, Davidson y Naidu, 2000).

Se conocen alrededor de 10000 de estos compuestos, de los cuales solo algunos de ellos son solubles en solventes orgánicos mientras que los ácidos carboxílicos y glicósidos, lo son en agua. Los polímeros, éstos resultan ser bastante insolubles. Los compuesto fenólicos abarcan un amplio grupo, desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos (derivados del ácido benzoico y cinámico) a cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos hidrolizables, taninos condensados, lignanos y lignina (García *et al.*, 2009 y Avalos-Pérez 2009).

Mientras que los fenoles vegetales no son considerados tóxicos bajo condiciones y concentraciones normales, los fenoles poliméricos tales como los taninos, podría ser una excepción, destacando por su reactividad química y actividad biológica (Avalos-Pérez 2009). Estas estructuras pueden ocasionar efectos detrimentales o beneficiosos en la alimentación animal, fundamentalmente en dependencia de la concentración y la naturaleza de los compuestos específicos (Gracia 2004).

5.5.1.2. Biosíntesis en las plantas

Puerto (2012), menciona que existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la Ruta del ácido malónico y la ruta del ácido siquímico.

La ruta del ácido malónico, es la fuente de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores. La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas (Carrion *et al.*, 2010 y García 2010). A partir del eritrosa-4 fosfato y el ácido fosfoenolpirúvico (procedentes de la ruta de las pentosa-fosfato y de la glicólisis respectivamente), se inicia una secuencia de reacciones que conduce la síntesis de ácido siquímico y a partir de éste, se sintetizan los aminoácidos aromáticos: fenilalanina, triptófano y tirosina (González 2010 y García *et al.*, 2012).

La mayoría de los compuestos fenólicos derivados de la fenilalanina, esta ruta se encuentran presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (García 2004). La fenilalanina y el triptófano se encuentran entre los aminoácidos esenciales para los animales que se incorporan en la dieta. La tirosina no es esencial en el sentido de que los animales pueden sintetizar por hidroxilación de fenilalanina (Puerto 2012). La mayoría de compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina, por un proceso de desaminación catalizado por la Fenilalanina Amonio Lipasa (PAL), que da lugar a la consecuente formación de ácidos cinámicos por eliminación de una molécula de amonio fenilalanina y cumárico, precursores de la lignina, flavonas, isoflavonas y flavonoides (Avalos *et al.*, 2009).

Los ácidos cinámico y cumárico, así como sus derivados, son compuestos fenólicos simples llamados fenilpropanoides, por contener un anillo de benceno (C6) y una cadena lateral de tres carbonos (C3) (Romero 2000).

5.5.1.3. Clasificación

Los principales compuestos fenólicos sintetizados en las plantas se clasifican en Fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas, flavonoides y antocianinas (Cuadro 2).

Ácidos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol, la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como taninos y la lignina (Avalos *et al.*, 2009). Destacan dos familias ampliamente distribuidas en los vegetales una procedente de la sustitución del ácido benzoico (C6-C1), que tiene un esqueleto formado por fenilpropanoides que han perdido un fragmento de dos carbonos de la cadena lateral y otra derivada del ácido cinámico (C6-C3) (Avalos *et al.*, 2009). Ambos tipos pueden

aparecer en forma conjugada o esterificada. Dentro de los derivados del ácido benzoico, encontramos ácidos gálico, vainillina y ácido salicílico (actúa como regulador del crecimiento vegetal, implicado en la resistencia de la planta frente a patógenos) (Carrion *et al.*, 2010).

Flavonoides

Constituyen el grupo más amplio de fenoles naturales, y diverso de compuestos fenólicos en plantas, que incluyen chalcones, flavanones, flavones e isoflavones, flavonoles y antocianinas. En la actualidad se conocen más de 2000 de estos compuestos, de los cuales unos 500 se encuentran en estado libre (Romero 200). Los flavonoides proceden del metabolismo secundario de los vegetales, se encuentran distribuidos en las plantas superiores, sobre todo en las partes aéreas: hojas, flores y frutos (Carrion *et al.*, 2010).

Tienen un origen biosintético mixto, por convergencia de las rutas del shiquimato y la del acetato. Las primeras reacciones enzimáticas son comunes para las proantocianidinas y antocianidinas y tienen lugar en el citoplasma, mientras que la maduración y polimerización de los taninos condensados (TCs) tiene lugar en las vacuolas (Avalos *et al.*, 2009).

Las propiedades de los flavonoides dependen de los grupos hidroxifenólicos y de las características de su estructura química, produciéndose en la estructura básica multitud de variaciones y sustituciones, en el anillo o cadena C (Cariron *et al.*, 2010). La presencia de un gran número de sustituyentes (grupos metilo, hidroxilo, residuos de azúcares en el grupo O- y los enlaces C-glicosídicos), dará lugar a un amplio y complejo espectro de flavonoides diferentes. En los vegetales, en la mayoría de las ocasiones, los flavonoides aparecen ligados a carbohidratos, por lo que reciben el nombre de glicósidos, mientras que si no tienen ligadas moléculas de carbohidratos reciben el nombre de agliconas flavonoides. Algunos flavonoides (flavonoles y flavonas) se presentan como O- glicósidos al establecer enlaces con distintos azúcares, generalmente en C3 y con menor frecuencia, en C7 del anillo a estos enlaces, pueden establecerse a través de un grupo -OH o por el contrario, es un enlace C-C, por lo que recibirán el nombre de O-glicosiflavonoides o C-glicosiflavonoides. El tipo del enlace condicionará la estabilidad, solubilidad, resistencia a la degradación enzimática y la reactividad.

Carrion *et al.*, (2010), mencionan que existen multitud de flavonoides, algunos de los cuales podemos identificarlos como flavonas (figura 1), isoflavonas (figura 2), flavonoles (figura 3), flavononas, flavanoles, antocianidinas (figura 4) y también flavononoles, chalconas, auronas, pterocarpanos, rotenoides.

Flavonas: Se introducen un doble enlace (diosmetina) entre las posiciones C2 y C3, un grupo carbonilo en posición 4 y carecen de –OH en posición 3 del anillo C, de las flavonas. Son amarillas y pueden estar en algunas flores y frutos. La intensidad de su color amarillo aumenta con el número de grupos hidroxilos y el incremento del pH. Destacan: apigenina, baicaleina, crisina, diosmetina, diosmina, flavona, leuteolina, etc; (Carrion *et al.*, 2010 y Avalos *et al.*, 2010).

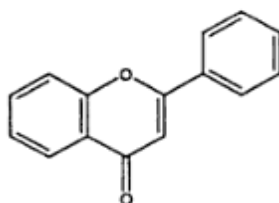


Figura 1. Estructura molecular de las Flavonas.

Isoflavonas: Isómeros de los flavones, pero con una migración de un grupo arilo con el mismo esqueleto de C15: Daidceína, Genisteína, Prunetina, Pratenseína (Carrion *et al.*, 2010 y Avalos *et al.*, 2010).

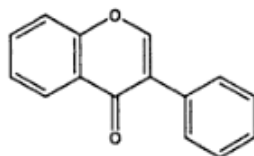


Figura 2. Estructura molecular de las Isoflavonas.

Flavonoles: Como la Quercetina, poseen un doble enlace entre los carbonos C2 y C3, un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C: quercetina, rutina, fisetina, galangina, kaempferol, morina, miricetina, ramnetina, robinina, etc; (Carrion *et al.*, 2010 y Avalos *et al.*, 2010).

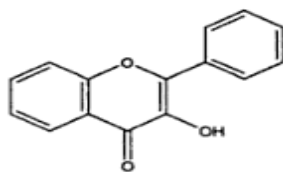


Figura 3. Estructura molecular de las Flavonoles.

Flavononas: eriodictiol, hesperidina, naringina, naringenina y pinocembrina, que presentan un grupo carbonilo en posición C4 del anillo C (Carrion *et al.*, 2010 y Avalos *et al.*, 2010).

Flavanoles: Parecen ser los únicos que no se presentan como glicósidos, pero muestran gran reactividad a la polimerización y la formación de Taninos Condensados. Destaca la catequina con un grupo -OH, en la posición 3 del anillo C: (+)-catequina (C), (+)-galocatequina (GC), (-)-epicatequina (EC), (-)-epigalocatequina (EGC), (-)-epicatequina 3-galato, (-)-epigalocatequina 3-galato (EGCG), teaflavina, tearubiginas (Carrion *et al.*, 2010).

Antocianidinas: Poseen un sistema conjugado de doble ligadura, que confiere características coloridas típicas. Tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C: cianidina, delfinidina, diosmetinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina (Carrion *et al.*, 2010 y Avalos *et al.*, 2010).

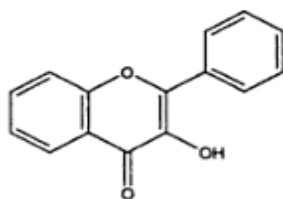


Figura 4. Estructura molecular de las atocianidinas.

5.6. Taninos

Los taninos, así como los alcaloides, terpenos, poliacetilenos y micotoxinas se presentan esporádicamente en la naturaleza y su presencia sin duda constituye alguna especialidad taxonómica (Makkar *et al.*, 2007 y Rochfort *et al.*, 200). El hombre utiliza extractos vegetales de plantas ricas en taninos para convertir la piel de animal en cuero. Son sustancias químicas que afectan el valor nutritivo de las plantas, para ser utilizadas por los animales herbívoros, lo que se da principalmente por una reducción en la palatabilidad y

digestibilidad de las plantas y de una actividad tóxica o inhibitoria sobre las enzimas en los microorganismos ruminales, la protección que los taninos confieren contra las plagas les ha permitido estar presentes en una amplia variedad de árboles y especies leguminosas tanto en clima tropical como templado (Hervas 2001 y Márquez 2008).

Son compuestos fenólicos y poseen uno o más grupo hidroxilo (OH) sustituyentes, ligados a un anillo aromático; donde los compuestos que poseen varios OH son definidos como polifenoles secundarios de elevado peso molecular (500 a > 3000 kDa) presentes en la naturaleza, que se encuentran principalmente en árboles de forraje, arbustos, leguminosas, cereales y granos nutricionalmente importantes limita a menudo su utilización como piensos (Nogueira 2001 y McSweeney *et al.*, 2001).

Taninos son compuestos polifenólicos de origen vegetal, que son de dos tipos distintos, Taninos Hidrolizables (THs): poliésteres de ácido gálico y diversos azúcares individuales y Taninos Condensados (TCs): polímeros de flavonoides, aunque existen otros taninos que son combinaciones de estas dos estructuras básicas (Márquez 2008 y McSweeney *et al.*, 2001).

5.6.1. Distribución de los taninos en la naturaleza

Los taninos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en árboles, arbustos y plantas herbáceas leguminosas, de regiones tropicales, áridas o semiáridas y/o templadas (Galindo *et al.*, 2005). Aparecen en las familias Betulaceae (*Betula*), Cesalpiniaceae (*Ceratonia*), Cistaceae (*Cistus*), Cupresaceae (*Juniperus*), Ericaceae (*Calluna*, *Erica*, *Vaccinium*), Fagaceae (*Castanea*, *Quercus*), Leguminaceae (*Cytisus*, *Genista*, *Lathyrus*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*), Poaceae (*Holcus*, *Hordeum*, *Lolium*, *Sorghum*, *Triticum*), Rosaceae (*Crataegus*, *Rosa*, *Rubus*) y Salicaceae (*Salix*) entre otras (Tezén 2008, Romero 2000 y Hervas 2001).

5.6.2. Distribución y localización de los taninos en los vegetales

En general, los compuestos fenólicos no presentan una distribución uniforme en los vegetales, siendo más abundantes en aquellas partes más susceptibles de ser ingeridas por los herbívoros (hojas y flores por ejemplo). El mayor o menor contenido en taninos en los

vegetales, estará condicionado por los efectos medioambientales, estacionales y de la fenología vegetal (García 2004).

A nivel celular, los THs se encuentran en las paredes celulares y espacios intercelulares, mientras que los TCs se almacenan en las vacuolas de forma libre o unida a otras fibras como la lignina de las paredes celulares o a proteínas celulares y en la epidermis y tricomas de las hojas. Debido a que la presencia de los THs es minoritaria en los forrajes de las zonas templadas y a su potencial tóxico, el objeto de interés de este trabajo han sido los TCs, abundantes en forrajes, árboles y arbustos de interés ganadero (Hervas 2001).

5.6.3. Clasificación de los taninos

En la naturaleza vamos a encontrar dos tipos de taninos, TCs y THs (García 2004, Frutos *et al.*, 2004). Los taninos, se encuentran extensamente distribuidos en las plantas dicotiledóneas, en especial en las leguminosas, capaces de afectar el comportamiento animal, también se encuentran en frutas, árboles y entre otras especies, empleadas con la frecuencia en la alimentación de los rumiantes (García y Avalos *et al.*, 2009). Frutos *et al.*, (2004); menciona que son compuestos fenólicos poliméricos de gran variabilidad, que se clasifican generalmente en dos grupos principales en base a su estructura, función y origen biosintético.

Los Taninos Hidrolizables (THs) están compuestos por ácido galico o elagico unidos a carbohidratos. Taninos Condensados (TCs), que pueden ser oxidativamente degradados en ácido antocianidinas; (García 2004), son derivados de los ácidos gálico y elagico; (García 2004 y Frutos *et al.*, 2004).

Los taninos son parte integral del sistema de defensa contra los herbívoros y otros patógenos de las plantas como bacterias, hongos, insectos y virus. Estos compuestos son muy importantes para el medio ambiente y el ecosistema. Los taninos tienen una muy alta afinidad por las proteínas y forman complejos proteína-taninos (Hervás 2001).

Forman parte importante de las características que determinan la apetencia por las plantas por los herbívoros debido a las características astringentes de estos compuestos. De esta manera la planta reduce la frecuencia de ataque de los rumiantes y mejora sus posibilidades de sobrevivir. Se ha comprobado que las plantas que reciben mayor ataques de los herbívoros son capaces de aumentar su concentración de taninos (Hervás 2001).

5.6.3.1 Taninos Hidrolizables

Los taninos (THs), se consideran en un núcleo central de carbohidrato al cual se unen ácidos fenólicos carboxílicos mediante enlaces éster (figura5). Estos últimos son ésteres de azúcares de ácidos gálico o elágico. Estos taninos pueden ser fácilmente hidrolizados con ácidos, álcalis, agua caliente o enzimas. A los THs se le atribuye los principales efectos negativos en los rumiantes que los consuman, provocando intoxicaciones, que afecta hígado y riñones, pudiendo ocasionar la muerte. Sin embargo, se ha reportado que los THs mejoran la absorción de nutrientes, tienen una amplia actividad biológica y farmacológica e incluso son más potentes como agentes biológicos (unidad masa) que los taninos condensados (Márquez *et al.*, 2008).

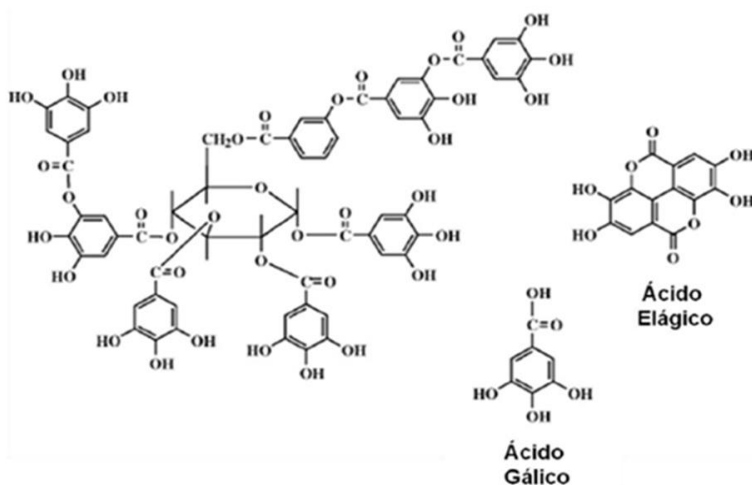


Figura 5. Estructura molecular de taninos hidrolizables: Ácidos Gálicos y Elágico

5.6.3.2 Taninos Condensados TCs o Proantocianidinas

Los taninos (TCs), son polímeros resultantes de la condensación de flavonoles-3 (polifenoles) (figura 6). Los flavonoles forman flavonoides, son componentes naturales de las plantas, más de 4000 flavonoides han sido aislados de plantas briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas. La mayoría de las plantas vasculares contienen flavonoides, estos se clasifican en diversas subclases como los chalconas, flavanonas, flavones, dohidroflavonoles, flavonoles, antoianinas y proantocianidinas, unidades de catequinas que forman a taninos condensados (Nogueira 2001).

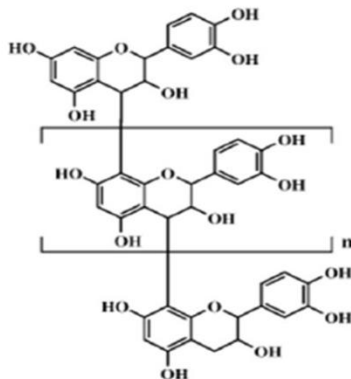


Figura 6. Estructura básica de los Taninos Condensados o Proantocianidinas.

5.6.3.2.1 Estructura química de los taninos condensados

La unidad básica de los TCs es el flavan-3-ol que suele polimerizar hasta dar polímeros de más de 20 unidades. Los monómeros de flavan-3-ol de los polímeros puede tener estereoquímica 2,3.*trans* (2R, 3S), como ocurre en el caso de (+)- catequina o (+)-galocatequina o la forma más abundante 2,3-*cis* (2R, 3R), como el caso de (-)- epicatequina o (-)- epigalocatequinas son comunes en la naturaleza. De la adición de un tercer grupo fenólico en el anillo B, se obtienen Epigalocatequín y Galocatequín. Las principales variaciones entre los TCs radican por tanto, en el número de grupos -OH en los anillos A y B, la posición de éstos, la estereoquímica de los carbonos 2, 3 y 4 del anillo C y la posición, tipo de enlace y número de unidades de flavanol. Los flavan-3,4-diols o leucoantocianidinas son flavonoides monoméricos y, pese a tener una reactividad química similar a los TCs, no forman complejos con las proteínas para precipitarlas. Los flavan-4-ol, son también leucoantocianidinas, que dan lugar a antocianidinas ante tratamiento con alcohol a temperatura ambiente (Arroyo 2015).

Los monómeros pueden aparecer unidos por enlaces C-C (Tipo B) o C-O-C (Tipo A). Los enlaces interflavánicos para los flavan-3-ols, son principalmente de tipo B (C-C), entre el C4 del monómero terminal y el C8 del monómero que se añade, lo que dará lugar a polímeros lineales (4-8). Los homopolímeros más abundantes en los vegetales superiores, están compuestos con un solo tipo de flavan-3-ol en su estructura; catequina (C) o epicatequina (EC) (ambos con 2 grupos -OH en el anillo B del monómero de flavanol). Producen Cianidín, por lo que son conocidos por Procianidinas (PCs). Los homopolímeros

de base galocatequina o epigalocatequina poseen 3 grupos -OH en el anillo B, producen Delfinidín y se les denomina Prodelfinidinas (PD). También, se producen enlaces entre el C6 del monómero terminal y el C4 del monómero que se añade, dando lugar a estructuras ramificadas (C4→C8, C4→C6). Es característico de polímeros del 5-desoxi-flavan-3-ol, donde las ramificaciones son abundantes por la reactividad del 5-desoxi del anillo A. Esto da lugar a profisetinidinas y prorobinetinidinas, taninos abundantes en el quebracho (*Schinopsis* spp.) y en las preparaciones de acacia.

Los enlaces tipo A (C-O-C) son los menos estudiados y en ellos intervienen a la vez enlaces C4-C8 y enlace C2-O-C7 entre 2 monómeros. Son característicos de los flavan-3-4-diols y dan lugar a las A2-proantocianidinas correspondientes.

Finalmente, según el grado de polimerización, podemos encontrar:

- Oligómeros (de 2 a 10 monómeros) y,
- Polímeros (más de 10 monómeros) (Arroyo 2015).

5.6.3.2.2 Tipos de taninos condensados

Se pueden diferenciar cuatro clases de homopolímeros de flavan-3-ols: procianidinas (PCs), prodelfinidinas (PDs), profisetinidinas y prorobinetinidinas. Las profisetinidinas y prorobinetinidinas son más raramente encontradas. Los PCs y PDs se diferencian en la posición de un grupo -OH que les confiere la capacidad de formar complejos con proteínas. En las leguminosas las más abundantes son las PDs y las PCs cuya proporción es variable dependiendo de la especie de planta en cuestión y/o de las variedades (Arroyo 2015).

5.6.3.2.3 Propiedades generales de los taninos condensados

Bajo el término tanino, se engloban diversos oligómeros y polímeros. Dada su particular estructura bioquímica, pueden establecer enlaces y formar complejos con múltiples macromoléculas, proteínas, hidratos de carbono e iones metálicos. Lo que les confiere unas propiedades físico-químicas y biológicas particulares: agentes quelantes de iones metálicos, precipitación de proteínas, agentes antioxidantes, etc. A continuación se describe las propiedades generales asociadas a los taninos, para más adelante profundizar en aspectos más concretos de los TCs, que justifican su inclusión en nuestras experiencias (Arroyo 2015).

5.6.3.2.4 Propiedades físico químicas de los taninos condensados

Los taninos difieren entre sí respecto a su solubilidad, capacidad oxidativa y fuerza de enlace con las proteínas y son especialmente sensibles a la concentración de oxígeno, temperatura y pH alcalinos, entre otros (Romero 2000).

5.6.3.2.5 Solubilidad de los taninos condensados

La solubilidad en agua dependerá de su peso molecular y grado de polimerización (Lorenz *et al.*, 2013). Igualmente son solubles en acetona y alcoholes, lo que explica que la mayoría sean extractados a partir de soluciones acetona- agua o metanol agua (Escaray 2012).

5.6.3.2.6 Formación de complejos con las proteínas

Dada la capacidad de los taninos para formar complejos con las proteínas, pueden unirse directamente a los centros activos de las enzimas o bien, indirectamente, unirse al substrato potencial de naturaleza proteica, contribuyendo a la inhibición enzimática (Arroyo 2015).

Romero (2000), García (2000) mencionan que la formación de complejos tanino-proteína implica la aparición de enlaces de hidrogeno entre los grupos carboxílicos peptídicos de la proteína y de los grupos hidroxilo, fenólicos del tanino, sin la intervención de enlaces ionios o covalentes.

García (2004), menciona que los taninos se unen a las proteínas, formando complejos solubles o insolubles dependiendo del pH fisiológico, que se disocian a pH alcalino (>7,5) o ácido (<3,5), como el que tiene lugar en el abomaso (pH=2,3).

En la formación de estos complejos, intervienen interacciones de tipo hidrofóbico o enlaces por puentes de hidrógeno, formando complejos dinámicos dependientes del tiempo. El grado de afinidad tanino-proteína, depende del tamaño molecular del tanino es también un factor importante en la interacción con la proteína, para que los oligómeros de flavonoles entrecrucen las hélices de colágeno y tengan por ello capacidad curtiente, deben estar constituidos por al menos tres subunidades, de la estructura tridimensionales y de los dos tipos de moléculas intervinientes: taninos de gran peso molecular y flexibilidad estructural y proteínas con una conformación abierta, peso molecular superior a 20K Dalton, ricas en aminoácidos hidrófobos como la prolina y la hidroxiprolina (García 2004).

Dependiendo de las condiciones ambientales para dar la proporción tanino-proteína, (pH, temperatura, fuerza iónica o la presencia de moléculas competitivas), se pueden establecer distintos tipos de complejos:

a) Complejos reversibles.

Las interacciones tanino-proteína tienen carácter reversible pH-dependiente, cuando ocurren en condiciones no oxidantes, dentro de un pH próximo a 7. Mediante puentes de hidrógeno entre los grupos -OH de los grupos fenólicos y el oxígeno de los grupos amida de las proteínas, o por interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático de los compuestos fenólicos y las regiones hidrofóbicas de la proteína (Escaray 2012).

b) Complejos irreversibles

Los complejos irreversibles se producen ante estrés oxidativo. Los grupos fenólicos de los taninos tienden a auto-oxidarse en O-quinonas, que interaccionan con las proteínas mediante enlaces covalentes de carácter irreversible. No obstante, la estabilidad de estos complejos dependerá de las condiciones ambientales, en una gama de pH entre 3,5 y 7,0 (Arroyo 2015).

5.6.3.2.7 Propiedades antioxidantes

Los compuestos antioxidantes inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas. Según su modo de acción se puede clasificar en agentes terminadores de radicales libres, complejos de iones metálicos que intervienen como catalizadores en la oxidación de los lípidos, o como captadores de oxígeno en sistemas cerrados.

La capacidad antioxidante de muchos compuestos ha sido estudiada en función de la resistencia de los lípidos a la acción de oxidantes. Las sustancias de origen natural con capacidad antioxidante son compuestos fenólicos: tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos; compuestos nitrogenados alcaloides, aminoácidos y aminas o carotenoides. Se obtienen también a partir de hojas, semillas y corteza de plantas (Carrion *et al.*, 2010).

5.6.3.2.8 Efectos de los taninos en la dieta de los rumiantes

Frutos *et al.*, (2004), reporta que los taninos en las plantas son compuestos fenólicos de naturaleza, presentes en una gran variedad de plantas, en altas concentraciones se

caracterizan por su capacidad para reaccionar con macromoléculas y proteínas solubles de forrajes durante el paso a través del rumen, característica que tiene relación también dependerá con la estructura química y el peso molecular (Romero 2000 y McSweeney *et al.*, 2001). Se encuentra compuesto por una sustancia llamada poli-fenólicos, que se encuentra principalmente en una amplia variedad de las plantas, que forman parte de la dieta de los herbívoros. Estos dos grupos de taninos (TCs y THs) y lignina, son importantes ya que pueden presentar efectos tóxicos por indigestión de taninos hidrolizables y antinutricionales en cantidades elevadas en la dieta o benéfico en cantidades bajas (menores al 7 %) en la dieta de los animales (Mederos *et al.*, 2004 y McSweeney *et al.*, 2001).

El consumo de plantas ricas en taninos, tiene atribuidos efectos contradictorios en la fisiología de los rumiantes, puesto que se les atribuyen efectos positivos en la tasa de crecimiento animal, pero también podría provocar la muerte de los mismos (Hervas 2001).

McSweeney *et al.*, (2001) y Hussein *et al.*, (2012), mencionan que las dietas con taninos, muestran un efecto sobre la digestión y absorción de nutrientes, al reducir la cantidad de proteínas que son degradadas por los microorganismos del rumen, aumentándose la cantidad de aminoácidos que pueden ser absorbidos a nivel intestinal (Romero 2000).

Se ha descubierto que los taninos tienen otro efecto benéfico: su efecto antihelmíntico (AH) directo e indirecto (Escaray 2012). Williams *et al.*, (2014), reporta que las plantas que contienen taninos condensados (TC), son prometedores como una opción complementaria para tratar infecciones por helmintos gastrointestinales, reduciendo así la dependencia de fármacos AH sintéticos. Se han hecho estudios enfocados al efecto como un AH en los parásitos de los rumiantes. Antes de proponer su uso con acción AH se deberá conocer sus mecanismos de acción contra los parásitos, como también se deberá conocer su dosificación, para que no afecte negativamente el consumo y digestión de los rumiantes, así como las características organolépticas de la canal o de la salud animal (Noro *et al.*, 2013 y Hervás 2001).

Los taninos son moléculas de alto peso moléculas y tiene propiedades para precipitar sustancias como proteína, alcaloides, ácidos nucleicos, esteroides, saponinas y carbohidratos (Hervás 2001).

5.6.3.2.9 Efectos negativos de los taninos

Algunos alimentos que contienen taninos pueden provocar altas excreciones de nitrógeno (N) fecal, el origen de esta eliminación fecal de N aún no se ha establecido y puede provenir de las fuentes de proteína de la dieta o endógenos (Romero 2000). Al contrario que los THs, los TCs raramente están asociados a la toxicidad aguda en rumiantes, dado que por su gran peso molecular no pueden ser absorbidos por la mucosa gastrointestinal. Sin embargo, un contenido excesivo de TCs en la dieta puede afectar al rendimiento, aunque, existen diferencias dependiendo del tipo TCs involucrados (Hervás 2001).

-Reducción ingesta voluntaria

El consumo elevado de taninos se ha relacionado con la alteración de la ingesta voluntaria por el efecto astringente de su liberación, debido a la ruptura de las paredes celulares vegetales en el tracto digestivo. La baja palatabilidad, la baja tasa de evacuación fuera del rumen y los efectos tóxicos, son factores que podrían explicar este efecto en la ingesta voluntaria. También se citan efectos en la tasa de crecimiento, eficiencia energética y la digestibilidad de proteínas debido a la formación de complejos con las proteínas, almidón y enzimas digestivas y por el gasto energético que supone contrarrestar los efectos tóxicos. Pese a todo, dichos fenómenos podrían modificarse controlando la cantidad de TCs presente en la dieta (Hervás 2001, Piluzza *et al.*, 2013 y McSweeney *et al.*, 2001). Esto fue observado en estudios realizados con leguminosas de zonas templadas, una concentración de TCs < 4.5% de la MS, parece no alterar la ingesta voluntaria. En el caso de las plantas tropicales con concentraciones de TCs en hojas menor al 3% MS, no se produjeron alteraciones de la ingesta voluntaria en caprinos, ovinos o bovinos (Arroyo 2015 y Piluzza *et al.*, 2013).

-Efectos en la fisiología digestiva

El impacto de los TCs en la función intestinal en rumiantes no es del todo conocido, aunque los datos sugieren la inhibición enzimática (Hussein *et al.*, 2012). Los TCs libres se unirían a enzimas endógenas, inhibiendo la actividad proteolítica, alterando la absorción intestinal (Hussein *et al.*, 2012). Igualmente, se han descrito alteraciones de la mucosa gástrica que favorecerían la absorción de TCs y THs. Debido a su gran peso molecular, los TCs no serían absorbidos en el tubo digestivo, grandes concentraciones de taninos alterarían el

epitelio intestinal favoreciendo la absorción de estos, con los consecuentes efectos tóxicos que eso supondría. Se observan por ejemplo descamaciones y ulceraciones en corderos expuestos a fuerte dosis de quebracho (16% de la ración). En caprinos, el incremento de la dosis de TCs en la ración está asociado a un proceso de queratinización del epitelio digestivo. Del mismo modo, se observa un incremento en el número de células inflamatorias y en la secreción de mucus, éste último, asociado a la hiperplasia de las células de Goblet cuya función podría ser la protección intestinal, aunque en exceso, podrían alentar el movimiento de metabolitos a los enterocitos para su absorción (Arroyo 2015).

A nivel sanguíneo se observa un descenso en la hemoglobina, así como un descenso medio de los glóbulos rojos y un incremento en los niveles séricos de bilirrubina. A nivel del rumen, la formación de complejos TC-proteína y fibra alimentaria reduciría la digestibilidad y comprometería la digestión de lípidos o ácidos grasos. No obstante, los efectos deletéreos están asociados con ingestiones masivas de TCs, que pueden perturbar la digestión ruminal y la reducción global de la actividad enzimática de la flora bacteriana (Escaray 2012 y Hussein *et al.*, 2012).

5.6.3.2.10 Efecto positivo de los taninos condensados en los rumiantes

Se menciona que cantidades moderadas de taninos condensados de 2 y el 4% de MS producen efectos benéficos sobre el metabolismo de las proteínas en rumiantes, por que reducen la degradación de la dieta proteínica en el rumen e incrementa la absorción de aminoácidos en el intestino delgado (García 2004, Hussein *et al.*, 2012 y McSweeney *et al.*, 2001).

(García 2004, Patra and Saxena 2011) menciona que la proporción de un 6% de la MS se ha obtenido efectos benéficos sobre herbívoros, por el aumento del crecimiento y el aumento de la leche y la producción de lana han sido asociados con el consumo de taninos condensados. Las plantas ricas en taninos han atraído más la atención por su efecto sobre los nematodos internos de los rumiantes (Noro *et al.*, 2013).

-Efectos dependientes de la dosis

La ingesta de metabolitos secundarios por parte de los herbívoros, está asociada con efectos beneficiosos o bien perjudiciales dependiendo de la concentración y de la mezcla de metabolitos (Noro *et al.*, 2013 y Williams *et al.*, 2014). Esta acción dual toxina/medicina se debe fundamentalmente a la dosis y a las consecuencias que esto puede acarrear sobre la tolerancia y el estado fisiológico del animal.

Noro *et al.*, (2013) menciona que el consumo moderado de TCs, está asociado con efectos favorables, mientras que la ingestión de cantidades elevadas podría provocar efectos negativos sobre los parámetros zootécnicos, la fisiología digestiva y la salud de los animales. La concentración de TCs en la dieta condiciona entonces, los efectos fisiológicos y metabólicos en el ganado. Desde las últimas revisiones, se han publicado numerosos estudios sobre los efectos de los taninos sobre la inhibición de la metanogénesis y el enriquecimiento de ácidos linoleicos conjugados (ALC) en la carne y la leche de los rumiantes, lo que justifica una nueva valoración del escenario actual Influencia de taninos en el metabolismo del rumen y en el rendimiento animal (Patra and Saxena 2011). Una dieta con una concentración débil (<2% Materia Seca (MS)) muestra efectos débiles o ausentes sobre el hospedador; una concentración moderada (3-6% MS) efectos benéficos (ej. Mejoras en el crecimiento, en la producción de lana y leche y mejora de la resiliencia) (. Finalmente, una concentración alta de TCs (>7% MS) ocasionando efectos detrimentales e el organismo de los rumiantes.

Un estudio realizado por Noro *et al.*, (2013), mencionan que la utilización de taninos (< 40 g/d) en la suplementación de vacas lecheras con quebracho, obtuvo buenos resultados, sin afectar los parámetros de fermentación ruminal y de balance energético-proteico, sin embargo cuando se usa en dosis de 65 g/vaca/día redujo el contenido de proteína y grasa láctea, motivo por lo cual estos autores recomiendan el uso de dosis mayores a 40 g/vaca/día en sistemas pastoriles.

-Masticación

Durante la masticación se produce la ruptura del 60% de las células vegetales, los TCs son liberados pudiéndose unir a proteínas salivales, proteínas vegetales, polisacáridos, metales y proteínas de la pared celular. Asimismo, una parte queda en forma de TCs libres. Todo ello provoca una reducción en la proporción de proteína soluble en la ingesta y disminuye

la tasa de degradación proteica. La producción de saliva producida por las glándula parótidas durante la ingestión es elevada, siendo proporcionalmente mayor en los rumiantes de habito ramoneador como las cabras. Si la saliva contiene además, grandes cantidades de proteínas ricas en prolina, la tolerancia a los TCs es mayor, dada la alta capacidad para formar complejos Prolina-TC (Arroyo 2015).

-Efectos sobre las fermentaciones intra-ruminales

Se ha demostrado que las plantas y los extractos que contienen aceites esenciales, taninos, saponinas, flavonoides y muchos otros metabolitos secundarios de las plantas mejoran el metabolismo ruminal, como la disminución de la metanogénesis y la degradación de la proteína en el hongo, el aumento de la producción de proteínas microbianas y el flujo de proteínas al duodeno (Patra and Saxena 2011). Durante las fermentaciones ruminales, la mayor parte de la proteína alimentaria es convertida en amoniaco por los microorganismos del rumen. Después es absorbido, convertido en urea en el hígado y posteriormente eliminado a través de la orina. Gracias al pH del rumen (6-7 neutro), pueden formarse complejos estables TC-proteína o bien la fijación de los TCs a las enzimas bacterianas, reduciéndose globalmente la proteólisis ruminal. Esto favorece la reducción de la excreción de metano y amoniaco por parte de los rumiantes, mejorando el rendimiento animal (Arroyo 2015).

-Aumento de la proteínas a nivel intestinal (Efectos post-ruminales)

Los TCs pueden viajar a través del tracto gastrointestinal de forma libre o en complejo tanino-proteína. Los taninos libres, pueden ser absorbidos o degradados a su paso por el tracto gastrointestinal. Los complejos tanino-proteína, que se forma en el rumen y loran llegar al abomaso, son rotos gracias al pH (2,5-3,5), lo cual facilita la disociación de los complejos y la proteína es liberada. Se aumenta por tanto el flujo de proteínas hacia el intestino delgado pH 8-9) donde es digerida hasta la obtención de aminoácidos y se absorben de esta forma a través del epitelio intestinal. Todo ello favorecerá el potencial de crecimiento de los rumiantes, debido a que habrá mayor disposición de aminoácidos para la síntesis de carne, lana y leche, limitando los niveles de nitrógeno excretados y con ello, la contaminación de suelos y agua. Así mismo, toda suplementación proteica en el organismo

contribuirá a la mejora de la respuesta inmunitaria del hospedador frente a los vermes (Escaray 2012).

-Efecto sobre la salud: prevención del meteorismo

El consumo de TCs contribuye a la prevención del meteorismo. El meteorismo espumoso, es un desorden digestivo de los rumiantes que afecta mayoritariamente al rumen y al retículo. Se produce por la acumulación de gas procedente de la fermentación, responsable de la formación de una espuma que perturba la digestión. El mismo es causado por la formación de espuma proteica en el rumen de los animales, y generalmente se encuentra asociado a la ingesta de leguminosas tales como (trébol blanco y la alfalfa), por una ingestión elevada de sustancias fermentables (carbohidratos y proteínas), que favorece una elevada actividad metabólica de la flora bacteriana ruminal, liberando metano como producto (Escaray 2012).

Es una alteración de la salud muy común, que disminuye la productividad (carne y leche), al reducirse la ingesta voluntaria de alimento y que es responsable del incremento de la mortandad del ganado. Su incremento en las últimas décadas puede deberse al manejo y a las prácticas alimentarias realizadas aunque, el consumo de plantas ricas en taninos condensados en una concentración del 0.5% en la dieta, parecen prevenir este fenómeno. El establecimiento de complejos tanino-proteína, protege las proteínas de la degradación ruminal, limitando las fermentaciones ruminales y por tanto disminuyendo el riesgo de meteorismo.

5.7. Adaptación de los herbívoros al consumo de taninos

A lo largo de la evolución, los herbívoros han desarrollado diferentes mecanismos adaptativos fisiológicos y etológicos que les permite reducir el efecto dañino de los taninos. Las estrategias alimentarias de los pequeños rumiantes, condicionan su exposición a los taninos, existiendo además, mecanismos que les permiten disminuir la toxicidad de los TCs, con diferencias interés específicas observadas también en los trópicos. En caprinos, la liberación de proteínas salivares ricas en prolina, ejercería un efecto detoxificador al formar complejos solubles tanino-proteína suavizando el impacto negativo (Escaray 2012).

Igualmente, la presencia de taninas de origen microbiano a nivel del rumen, que ejerce una actividad detoxificadora. En el caso de los ovinos, las adaptaciones fisiológicas se producen

tras un periodo de tiempo consumiendo forrajes ricos en proantocianidinas. A nivel de suero sanguíneo, se observa un incremento de los niveles de hormona de crecimiento, lo que contribuiría a la retención de nitrógeno, mejorando el metabolismo de las proteínas. Por este motivo, el animal dedicaría gran parte de su tiempo a la selección de especies vegetales tanto por su valor nutritivo como por su menor toxicidad de ahí, las diferencias encontradas en el comportamiento de caprinos y ovinos (Arroyo 2015).

5.8. Aceptabilidad de la biomasa de árboles en rumiantes

La aceptabilidad de las plantas forrajeras para los rumiantes va a ser influida por los compuestos químicos y esta composición a la vez también estará determinada por factores como la especie, condiciones de crecimientos y estación del año, entre otros, para que el animal pueda consumir en mayor o menor grado como parte de su dieta (García 2004).

García et al. (2006), Menciona que el consumo que realizan los animales en pastoreo libre no solo depende de la composición química de las plantas que forman parte de su dieta, sino también del tipo de rumiante, la categoría animal y sus hábitos alimentarios, la disponibilidad y proporción de gramíneas en el área y de factores intrínsecos de las especies, tales como su arquitectura, la aparición de espinas, la rugosidad y la pubescencia de las hojas.

García *et al.*, (2012) mencionaron al evaluar la composición química de las especies arbóreas forrajeras en el trópico que *Albizia*, *Cassia* y *Pithecellobium*, pueden considerarse también como una alternativa para formar parte de los suplementos alimenticios en las dietas de mala calidad para los rumiantes.

Olivares *et al.*, (2011) menciona que la utilización de frutos puede ser una alternativa para los ganaderos de bajos recursos, ya que son aceptables para los pequeños rumiantes.

Pinto *et al.*, (2002), Hacen mención en forma general, que las especies leñosas y herbáceas estudiadas presentaron niveles aceptables de PC, MO y fibra, bajo contenido de FT y valores medios de DMS, DMO y DPC, lo cual demuestra el potencial nutricional de muchas de ellas y que su inclusión en las dietas de baja calidad podría mejorar la eficiencia de utilización por el animal; por ello se justifica la promoción del empleo de estas especies en sistemas multiestratos.

5.9. Propiedades antihelmiticas de los taninos y polifenoles

Las plantas pueden funcionar ya sea como remedios con preparaciones a base de ellas, o de acuerdo con el concepto más innovador de las plantas como operadores nutracéuticos, a menudo como forraje. Las preparaciones fitoterapéuticas a base de plantas son por lo general preparadas con mezclas complejas de compuestos activos, que se brindan para tratar los animales infectados por un periodo corto (Rochfort *et al.*, 2008; Hoste *et al.*, 2012). Los nutracéuticos se definen como una planta que es consumida por los animales y brinda ventajas tanto sobre la salud de los animales como en su nutrición en su sentido estricto (Hoste *et al.*, 2011).

Algunos estudios sobre el efecto de las plantas con propiedades antihelmínticas han permitido confirmar el interés potencial del ajo (*Allium sativa*), papaya (*Carica papaya*), hoja de yuca (*Manihot esculenta*), o algunas arbustivas tropicales como leucaena (*Leucaena leucocephala* y *Lysiloma latisiliquum*, entre otras), (Marley *et al.*, 2003, Githiori *et al.*, 2006 y Chagas *et al.*, 2008).

(Hoste *et al.*, 2011 y Hoste *et al.*, 2016), menciona los diferentes enfoques que se pueden utilizar para evaluar e interpretar los efectos AH de compuestos bioactivos y nutracéuticos, tienen ventajas y desventajas. Se mencionan cuatro aspectos:

- 1.- La identificación de recursos naturales con compuestos bioactivos.
- 2.- Acción de los efectos *in vitro*, con potencial AH y la ausencia de toxicidad
- 3.- Confirmación bajo condiciones controladas *in vivo*, caracterizando de los mecanismos de acción directos (de tipo farmacológico), indirectos (respuesta del hospedador).
- 4.- Validación *in vivo* a través de modelos animales (roedores y/o rumiantes) y verificación de su uso potencial en condiciones de producción ganadera (Hoste *et al.*, 2012).

En la actualidad se han reportado varios estudios *in vitro* aplicando diferentes concentraciones, mostrando n efectos antihelmínticos de extractos de plantas ricas en taninos (Arroyo-López 2015). Olmedo *et al.*, (2014), reporta un efecto larvicida de extractos acuosos de dos leguminosas tropicales *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium*

dulce, donde los resultados del primero fueron mejores en eclosión de huevos, desarrollo larvario y migración

Dentro de las investigaciones sobre el efecto AH, *Haemonchus contortus* ha sido ampliamente utilizado como modelo de NGI en estos estudios, debido a:

- 1.- La aparente expansión de la prevalencia de este NGI en condiciones epidemiológicas.
- 2.- La información básica que ahora está disponible sobre la genética y la genómica de *H. contortus*, que incluye aislamientos que son resistentes a drogas sintéticas.
- 3.- La gravedad de las consecuencias patológicas a enfermedades presentes en pequeños rumiantes presentando pérdidas económicas; la mortalidad causadas por heamonchosis son particularmente graves para los productores en los trópicos (Arroyo-López 2015)

5.10. Impacto en la resiliencia del hospedador

Los efectos de los taninos que pueden desencadenar son diferentes en la biología del parásito, los NGI están asociados con multitud de lesiones y perturbaciones de la fisiología digestiva, reducción del apetito, malabsorciones, mal digestiones, alteraciones metabólicas, en la retención y absorción mineral (fósforo) (Hoste *et al.*, 2005 y Knox *et al.*, 2006). Las alteraciones metabólicas, especialmente las de las proteínas, son factores nutricionales limitantes (Coop and Kyriazakis 2001) respecto al balance energético en la producción ganadera y suponen un efecto importante sobre la regulación de la respuesta inmune del hospedador (Lord 2002). (Coop and Kyriazakis 2001, Hoste *et al.*, 2005 y Hoste *et al.*, 2011), mencionan en que se han constatado los beneficios eventuales ligados a la suplementación proteica que permitirían beneficios en torno a la resiliencia o resistencia del hospedador frente a los vermes.

Debido a los efectos sobre la biología de *H. contortus*, múltiples estudios han demostrado repetidamente que los nutracéuticos que contienen taninos pueden tener efectos positivos sobre la resiliencia del hospedador en pequeño rumiantes (Hoste *et al.*, 2011). Estas investigaciones se realizaron en el contexto de infecciones experimentales controladas o en situaciones en las que *Haemonchus* era la especie dominante. Estos efectos beneficiosos incluyen:

- 1.- Mejores parámetros de producción, en particular ganancia de peso corporal en corderos,
- 2.- Diminución en signos de anemia en cabras y ovejas
- 3.- Menores tasas de mortalidad cuando se enfrentan con NGI, algunos estudios también registraron el número de tratamientos AH como un índice de resistencia requerido para controlar la *hemonchosis*.

Así mismo, es preciso valorar la relación que se establece entre el hospedador (genética) y el medio (ambiente) en que se desarrolla (Hoste *et al.*, 2011).

5.11. Efectos de metabolitos secundarios de plantas, dependiendo de los nematodos

En comparación con las moléculas de drogas sintéticas, los nutraceuticos taniferos producen que eliminen un porcentaje de los NGI de hospedador (Hoste *et al.*, 2006). Estos nutraceuticos ejercen sus efectos principalmente a través de impactos combinados en la biología del NGI al interferir con las tres etapas del ciclo (huevos, L3 y larvas adultos). Y se busca disminuir las cargas de NGI, evitando que se dañe la producción y economía de los productores (Arroyo-López 2015). El consumo de plantas que contienen TC conduce a una disminución de la infección del huésped causada por NGI; eliminando las poblaciones de *H. contortus*, (Githiori *et al.*, 2006 y Hoste *et al.*, 2006). Además, los nutraceuticos y los productos de PMS, a diferencia de los fármacos sintéticos, no se usan en formas puras y estandarizadas. Por lo tanto, varios factores pueden afectar su actividad y estas investigaciones se deben considerar para futuras aplicaciones en la ganadería (Hoste *et al.*, 2006 y Hoste *et al.*, 2012).

5.12. Variaciones que surgen de las especies de nematodos y etapas del ciclo de vida

Los estudios realizados sobre plantas que contienen taninos condensados (TC) sugieren que los efectos de metabolitos secundarios sobre la biología de los nematodos parecen depender de las especies de parásitos (Hoste *et al.*, 2012).

Los factores intrínsecos de la especie NGI, se podría mencionar las diferencias en la composición proteica de la vaina, la cutícula o el tracto digestivo pueden explicar su efecto de taninos contra actividad antihelmíntica (Hoste *et al.*, 2016). Se han reportado trabajos de ensayos *in vitro*, contra las diferentes etapas y especies NGI, debido a esto se menciona que

las especies son las más afectadas por los taninos, el resultado de diferencias en la biodisponibilidad, ya que la composición de taninos libres y unidos varía a lo largo del tracto digestivo (Hoste *et al.*, 2006). Los taninos libres pueden tener una actividad AH más potente, aunque esto aún no se ha probado. La formación de complejos de TC-proteína depende de las estructuras de taninos y proteínas, pero también de la composición molecular de taninos (Poncet-Legrand *et al.*, 2006 y Hoste *et al.*, 2012). De particular relevancia es el pH de una solución, ya que afecta la estabilidad de los complejos de tanino-proteína (Poncet-Legrand *et al.*, 2006). Los diferentes valores de pH ruminal, abomasal e intestinal pueden modular la biodisponibilidad del tanino (Bennick, 2002). Existen pocos estudios que examinen la farmacología del tanino a lo largo del intestino, los efectos AH de taninos y polifenoles pueden ser difíciles de explicar porque su concentración y composición agregan otra dimensión de complejidad (Piñol *et al.*, 2000).

5.13. Variación en la composición del tanino de la planta (cantidad y calidad) en relación con actividades contra *H. contortus*

En muchas plantas, la composición también varía entre las diferentes partes de la planta. Dada la gran variación fenotípica que típicamente existe dentro de las colecciones de gen-plasma, será posible, por lo tanto, mejorar los tipos de taninos deseables, cuando se conocen los rasgos más importantes relacionados con la actividad AH (Karonen, 2011). Factores adicionales son la etapa de crecimiento y el medio ambiente. Afortunadamente, también hay cierta evidencia de que los taninos y polifenoles se ven afectados por las interacciones genotipo-ambiente y que algunas accesiones tienen composiciones particularmente robustas, que están menos sujetas a las influencias ambientales. La investigación deberá centrarse en la identificación de variedades de plantas que puedan ofrecer propiedades HA constantes (Katiki *et al.*, 2013 y Salminen and Karonen 2011)

El procesamiento de las plantas cosechadas mediante secado (heno), granulación o ensilado también puede afectar a la composición de polifenoles. La granulación y el ensilado conducen a una mayor proporción de taninos unidos que se extraen con menos facilidad usando solventes. Se reportan estudios que plantas con mayor proporción de prodelphinidinas que las procianidinas y los altos pesos moleculares se han relacionado con una mejor bioactividad antiparasitaria (Falchero *et al.*, 2011; Stringano *et al.*, 2012)

VI. OBJETIVOS

- Evaluación de extractos del fruto de *Caesalpinia coriaria* en el control de *Haemonchus contortus* en pequeños rumiantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Elaborar extractos con los frutos de *C. coriaria* en diferentes solventes (acetona, hidroalcohólico, etanol y metanol).
- Tipificar los extractos en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) obtenidos de la dilución de los frutos de *C. coriaria* en solventes, hidroalcohólico y metanólico.
- Evaluar el efecto *in vitro* de los extractos contra huevos y larvas de *H. contortus*.

VII. HIPOTESIS

Si consideramos que los compuestos secundarios tales como los taninos condensados presentes en frutos de árboles como el cascalote (*Caesalpinia coriaria*) pueden afectar los diferentes estadios parasitarios (huevos, larvas y/o parásito adulto).

Se espera que los extractos elaborados con diferentes solventes (acetónico, hidroalcohólico, etanólico y metanólico) muestren actividad *in vitro* contra un estadio parasitario, con posibilidades para su uso en el control *in vivo* en pequeños rumiantes.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1. Experimentos *in vitro*

8.1.1. Colección del fruto

Se recolecto manualmente los frutos maduros de *C. coriaria* entre diciembre-mayo 2017 de la Región de Tierra Caliente que se ubica a 18 20 ' 30 " de latitud norte y 100 39 ' 18 " de longitud oeste. El clima es Aw0, el más seco de la zona cálido subhúmedo con lluvias en verano. La media temperatura y precipitaciones son 28 C y 1010,7 mm, respectivamente (Fragoso 1990). El material vegetativo se almaceno y traslado en refrigeración para evitar cambios en su composición. Posteriormente fueron secados bajo la sombra durante una semana y finalmente los frutos se molieron en un molino Willey con criba de 1 mm, y se almacenaron para la preparación de los extractos (Salem *et al.*, 2006).

8.1.2. Elaboración de extractos y estudios *in vitro*

La elaboración de los extractos y el desarrollo de los estudios *in vitro* se realizaron en el laboratorio de Helminología, en las instalaciones del Centro Nacional De Investigación Disciplinaria En Salud Animal E Inocuidad (CENID-SAI), ubicado en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, con latitud norte de 18°53'06.85" y una latitud oeste de 99°09'24.01" a 1369 metros sobre nivel del mar (msnm) con un clima subhúmedo, con temperaturas máximas y mínimas de 32°C a 21.5°C, y una precipitación pluvial media de 900 mm.

Elaboración de Extracto: 300 g de frutos secos fueron macerados con los diferentes solventes, acetónico, hidroalcohólico, etanólico y metanólico (300g/2000ml) durante 72 horas, con procesos repetidos por dos ocasiones consecutivas adicionales, para después obtener el extracto por destilación y liofilización para eliminar los solvente, con la ayuda de un rotavapor marca Büchi R-114 de acuerdo a la temperatura de ebullición de cada solvente (50 a 56.3 °C). Posteriormente se filtraron los extractos mediante diferentes filtros, utilizando gasa, algodón y papel filtro con la finalidad de obtener un extracto libre de material vegetal. Una vez obtenidos los extracto, se congelaran a -42 °C y finalmente se procederá a un proceso de liofilización para posteriormente su uso en los estudios *in vitro* (Castillo-Mitre *et al.*, 2017).

8.1.3. Material biológico

Obtención de huevos de *Haemonchus contortus*.

Se utilizaron huevos de *H. contortus* obtenidas a partir de un ovino donador respectivamente, infectando de manera experimental con larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus* (cepa INIFAP, 350 L3/ kg de PV de los animal). Los huevos de *H. contortus* fueron concentrados mediante diferentes tamices (200, 150, 75 y 37 μm de diámetro) y lavados con sacarosa al 40 %, para su uso del experimento *in vitro*.

Obtención de las larvas de *Haemonchus contortus*

Para la obtención de las larvas frescas, se utilizó un ovino donador, infectado artificialmente vía oral con una dosis de 350 larvas L3 de *H. contortus* por kg de peso. Diariamente se colectaron las heces en una palangana de plástico, las heces se homogenizarán con agua corriente y hule de espuma para permitir aireación. La palangana con el cultivo se cubrió con papel aluminio el cual se le hizo ranuras que fueron cubiertas con tela gasa que funcionara como respiradero permitiendo el intercambio de gases, evitando malos olores y proliferación de larvas de mosca. Los coprocultivos se dejaron en reposo durante siete días a temperatura ambiente, durante este periodo de manera manual, se removerá el medio para una mejor oxigenación (Liévano 2004).

Trascurridos los siete días de incubación, se elaboraron muñones con gasa, donde fueron envueltas las muestras de heces para la recuperación de larvas utilizando la técnica de Baerman o método de migración larvaria. Este método consiste en utilizar embudos de plástico conectados a un tubo de ensayo de 10 ml a través de un trozo de manguera de hule látex. Los embudos son colocados en un soporte especial de metal. Una vez colocados los embudos, se colocan muñones de heces y se le agregara agua corriente suficiente para cubrir todo el muñón. Se dejaron reposar durante 24 horas para que las larvas migren al fondo del tubo. Pasando el tiempo de migración, las larvas fueron filtradas por una malla de poros amplios a fin de quitar residuos grandes, el líquido obtenido se colocó en tubos de 50 ml y se almacenaron a 4°C durante 2 horas con el objetivo por segunda vez la técnica de Baermann. Finalmente el líquido obtenido se almaceno a 4°C para su posterior uso del experimento *in vitro* (Liévano 2004).

8.1.4. Prueba de inhibición de la eclosión de los huevos (% IEH)

Se utilizaron placas de micro titulación de 96 pozos, con tres repeticiones (n=3). Los tratamientos fueron las concentraciones de los diferentes extracto acetónico hidroalcohólico, metanólico y etanólico de *C. coriaria* (mg/ μ L), se utilizó ivermectina al 0.5 % como control positivo (C+) y metanol 4% mg/ μ L como control negativo (C-). Donde a cada pocillo se le agrego una solución de 50 μ L que contenía huevos de *H. contortus* 100 \pm 150 y 50 μ L de extracto o controles (C⁺ y C⁻). Los huevo eclosionados a larvas L1 fueron contados de cada pocillo después de la incubación de las placas durante 48 horas a temperatura ambiente (28 °C) y en seguida procedió a contar cada pozo tomando 10 alícuotas de 5 μ l. El porcentaje de inhibición de huevos fue calculado mediante la siguiente formula: ((número de larvas/ (número de larvas +número de huevos))*100.

Cuadro 3. Concentraciones mg/ μ L de los extractos utilizados en el experimento *in vitro* y controles contra huevos de *H. contortus*

Solventes	Concentraciones (mg/ μ L)						Controles (mg/ μ L)	
Acetónico	20	10	5	2.5	1.2	0.6	C+	C-
Hidroalcohólico	50	25	12.5	6.15	3.12		C+	C-
Metanólico	6.15	3.12	1.56	0.78			C+	C-
Etanólico	6.15	3.12	1.56	0.78			C+	C-

C⁺ ivermectina 0.5%; C⁻ metanol 4% y H₂O

8.1.5. Prueba de mortalidad de larvas

La prueba de mortalidad se llevó a cabo en placas de micro titulación de 96 pozos, donde a cada pocillo se le agrego una solución de 50 μ L que contenía larvas L3 (100 \pm 150) y 50 μ L de extracto o controles (C⁺ y C⁻). Los tratamientos fueron las concentraciones de los diferentes extracto acetónico, hidroalcohólico, metanólico y etanólico de *C. coriaria* (mg/ μ L). Para evaluar el efecto las larvas L3 fueron contadas como vivas o muertas de manera individual por cada pozo, a las 72 horas después de la exposición a los extractos a temperatura ambiente (28 °C) y en seguida procedió a contar cada pozo tomando 10 alícuotas de 5 μ l. El porcentaje de mortalidad de larvas L3 fue calculado mediante la

siguiente formula: % de mortalidad = ((n° de larvas muertas / (n° de L muertas + n° de L vivas))*100.

Cuadro 4. Concentraciones mg/μL de los extractos utilizados en el experimento *in vitro* y controles contra larvas de *H. contortus*

Solventes	Concentraciones (mg/μL)					Controles (mg/μL)	
Hidroalcohólico	150	100	75	50	25	C+	C-
Metanólico	150	100	75	50		C+	C-

^{C+} ivermectina 0.5%; ^{C-} metanol 4% y H₂O

8.2. Análisis estadístico

Los datos de las diferentes variables fueron analizados por varianza y la prueba de Tukey para comparación de medias entre tratamientos y se considerará un valor de significancia alfa de ≤ 0.05 (SAS 2006).

Además las concentraciones letales CL₅₀ y CL₉₀ mínimas de los extractos trabajados, se determinaran mediante el análisis de datos PROBIT del paquete estadístico SAS, (2006).

Los datos de las variables del efecto *in vitro* de los extractos contra huevos del parasito fueron calculados en un diseño completamente al azar (SAS 2006):

Modelo estadístico: $Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$; donde: Y_{ij} = variable de respuesta de los frutos (i) en la repetición (j); μ = media general; T_i = efecto del tratamiento (1, 2, 3...8 tratamientos; seis concentraciones del extracto más dos testigos con metanol e ivermectina, respectivamente), ξ_{ij} = el error aleatorio del tratamiento (i) en la repetición (j), términos de $n-1$ ($\sigma^2, 0$) (SAS 2006).

La diferencia entre medias de las variables medidas se comparó con la prueba de Tukey (P < 0,05).

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Capítulo primero

In vitro anthelmintic activity of methanolic extract from *Caesalpinia coriaria* J.

Willd fruits against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae

Research Article

***In Vitro* Anthelmintic Activity of Methanolic Extract from *Caesalpinia coriaria* J. Willd Fruits against *Haemonchus contortus* Eggs and Infective Larvae**

X. De Jesús-Martínez,¹ A. Olmedo-Juárez ,² J. Olivares-Pérez ,¹ A. Zamilpa ,³
P. Mendoza de Gives,² M. E. López-Arellano,² S. Rojas-Hernández,¹ A. Villa-Mancera ,⁴
L. M. Camacho-Díaz,¹ and M. Cipriano-Salazar¹

¹Programa de Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local, FMVZ, Universidad Autónoma de Guerrero, Mexico

²Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP, Mexico

³Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Argentina No. 1. Col. Centro, CP. 62790 Xochitepec, Morelos, Mexico

⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Mexico

Correspondence should be addressed to A. Olmedo-Juárez; olmedo.agustin@inifap.gob.mx and J. Olivares-Pérez; olivaares@hotmail.com

Received 21 June 2018; Revised 9 October 2018; Accepted 4 November 2018; Published 29 November 2018

Academic Editor: Gail B. Mahady

Copyright © 2018 X. De Jesús-Martínez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* lethal effect of a methanolic extract (ME) from *Caesalpinia coriaria* fruits against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. The anthelmintic activity was assessed using the egg hatching inhibition assay (EHI) and the mortality test. The ME was assessed using five concentrations as follows: 6.15, 3.12, 1.56, and 0.78 mg/mL to eggs and 150, 100, 75, and 50 mg/mL to larvae, respectively. Ivermectin (5 mg/mL) was used as positive control and 4% methanol and distilled water were used as negative controls. The data of ovicidal and larvicidal effect were analyzed with a completely randomized design through ANOVA analysis using the general linear model (GLM) and lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀) were estimated through a Probit analysis using the SAS program. A clear ME increased concentration dependence effect was observed in the EHI and mortality tests. The highest activity of the methanolic extract was observed at the highest concentration ($P < 0.05$) to obtain a similar effect to the positive control (ivermectin), with LC₅₀ = 78.38 and 0.00064 mg/mL and LC₉₀ = 235.63 and 0.024 mg/mL, respectively, for larvae and eggs. The results indicate that the *C. coriaria* fruit ME possesses *in vitro* ovicidal and larvicidal properties (gallotannins: methyl gallate) against *H. contortus* that needs to be investigated more *in vivo* for the control of gastroenteric nematodes in ruminants.

1. Introduction

Ruminants under grazing conditions in tropical and subtropical zones are exposed to several economically important parasite species. Among these the gastrointestinal nematodes (GIN), which affect the livestock industry worldwide, represent one of the most important parasites group. *Haemonchus contortus* is one the most pathogenic parasites that affect the health of small ruminants [1]. The excessive use of chemical anthelmintics is leading to increased occurrence of

anthelmintic resistance [2, 3]. In this context, the use of plant extracts and their secondary metabolites might represent a future alternative to chemical anthelmintics. Several studies have reported that some secondary compounds from arboreal leguminous express anthelmintic effects against livestock parasites [4–6]. *Caesalpinia coriaria* Jacq Willd is a tree named as “Cascalote” in Mexico, and it is very widespread in the Tierra Caliente region of Guerrero. This plant produces a number of secondary metabolites like tannins and some flavonoids [7, 8]. Isolated compounds from this leguminous

have shown medicinal properties such as antioxidant and anticancer activities [8]. Thus, this leguminous might be interesting to investigate its activity against parasitic stages, with the intention of using them in animals, since reports indicate that the fruits of this tree are consumed by ruminants in their grazing routes, without manifestations of intoxication symptoms [9].

Therefore, the objective of this study is to evaluate the *in vitro* anthelmintic activity of methanolic extract from *Caesalpinia coriaria* J. Willd fruits against eggs and infective larvae (L3) of the gastrointestinal parasite *H. contortus*.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material. *Caesalpinia coriaria* dried fruits (5000 g) were collected in the Tierra Caliente region of Guerrero, Mexico, located at 18° 20' 30" NL and 100° 39'18" WL, and were dried to constant weight in a forced air oven at 45°C for 72 h. The dry material was ground using an electrical miller to reduce the fruit obtaining a 1 mm particle size.

2.2. Preparation of Methanolic Extract. Once ground, the dry material (100 g) was suspended in 2000 mL of methanol as extraction solvent, for 24 h at room temperature. The solvent methanol was used in the order to obtain both less and high polar compounds. The liquid solution was filtered using different filters (gauze, cotton, and filter paper), and the residual solvent was removed by distillation under reduced pressure with the help of a rotary evaporator (Buchi R-114) at 50°C, to obtain a semisolid extract, which was dried by lyophilization processes. Finally, the solvent-free dry extract (36 g) was obtained and stored at -40°C until its later use in the *in vitro* bioassays.

2.3. Identification of Bioactive Compounds of the Extract. The methanol extract of *C. coriaria* dried fruits was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), using a Waters 2695 (Waters Corporation, USA) and a LC-F Supelcosil column (4.6 mm x 50 mm i.d., 5- μ m particle size; Sigma, Aldrich, Bellenfnote, USA) for chemical separation. The mobile phase consisted of an aqueous solution with 0.5% trifluoroacetic acid (Solvent A) and acetonitrile (Solvent B). The gradient system was as follows: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% B; 4-20 min, 30% B; 21-23 min, 50% B, 24-25 min, 80% B; 26-27 min 100% B; 28-30 min, 0% B. The retention rate was maintained at 0.9 mL/min, with an injection volume of 10 μ L. The absorbance was measured at 330 nm. The standards of gallic acid and methyl gallate (Sigma-Aldrich®, USA) were used as reference standards.

2.4. Biological Material

2.4.1. Harvest of Haemonchus Contortus Eggs. *Haemonchus contortus* eggs obtained from a donor ovine experimentally infected with infective larvae (L₃) of the parasite were used (strain INIFAP, 350 L₃/kg of BW of the animal). The eggs were concentrated by passing different sieves (200, 100, 75, and 37 μ m of diameter) and by density gradients with 40% sucrose.

Egg recovery was performed according to the technique described by Coles et al. [10]. With the recovered eggs, an aqueous suspension was prepared at a concentration of 100 eggs per mL for use in the parasite egg hatching inhibition assay.

2.4.2. Egg Hatching Inhibition Test (EHI). The assay was performed using 96-well microtitration plates (n = 6). The treatments were the methanol extract at different concentrations (6.15, 3.12, 1.56, and 0.78 mg/mL), 4% methanol (Merck®, Germany) and distilled water as a negative control and ivermectin (5 mg/mL, Sigma-Aldrich®, USA) as a positive control. Fifty microliters of an aqueous suspension containing 100 \pm 10 eggs of *H. contortus* were distributed in each well. Afterwards, 50 μ L aliquots of the extract and controls were added, with a final volume of 100 μ L per well. The plates were incubated for 48 hours at a temperature of 28°C. The egg hatching process was stopped by adding 10 μ L of Lugol solution. Finally, the total eggs or larvae of each well were counted and the percentage of inhibition of egg hatching (%EHI) was determined by the following formula: % EHI = [(number of eggs)/(number of larvae (L1+L2) + number of eggs)] * 100, [10].

2.4.3. Harvest of Haemonchus contortus Infective Larvae. Larvae (L₃) were obtained from the donor sheep by daily collection (24 h). Fecal cultures were prepared by mixing the feces with polyethylene particles in plastic basins. Water was added to the fecal material and homogenized to obtain adequate oxygenation to promote better hatching of the eggs. The fecal cultures were covered with aluminum foil and incubated for 7 days at room temperature (25-31°C). The infective larvae were extracted of the fecal material using the Baermann funnel technique [11]. The L₃ were cleaned by density gradient and centrifugation; the larvae were drawn with 0.187% sodium hypochlorite and washed with distilled water. Finally, they were used in the *in vitro* bioassays.

2.4.4. In Vitro Larval Mortality Test (L₃). Microtiter plates (96-well) were used, where 50 μ L of the extract solutions were deposited (n = 6). The treatments were four concentrations of the extract (150, 100, 75, and 50 mg/mL), and two controls, one positive (C+) with 5 mg/mL of ivermectin and another negative (C-) with 4% methanol and distilled water. After each well, 100 L₃ larvae were deposited in 50 μ L solution to complete a total volume of 100 μ L. Finally, the plates were incubated at 28°C, for 72 hours. Ten aliquots of 5 μ L were taken to count alive or dead larvae and with this the mortality percentage of larvae L₃ (% ML₃) was calculated by the following formula: % ML₃ = [(number L₃ dead)/(number of L₃ dead + number of live L₃)] * 100. The criteria of L₃ mortality were assessed according to Olmedo-Juárez et al. [7] considering if mobility was not observed during 15-20 s. When larvae remained motionless but their aspect caused confusion about if they were dead or alive, a physical stimulus was applied touching their coat with a metal needle and the final decision was based on their motility.

TABLE 1: Egg hatching inhibition (% EHI) of *Haemonchus contortus* exposed to a methanolic extract made with *Caesalpinia coriaria* fruits.

Treatments	Means of eggs and larvae (L1 or L2) recovered		% EHI
	Eggs	L1+L2	
Methanol 4 %	06	34	15.00 ^b
Ivermectin 5 mg/mL	91	0	100 ^a
Water (H ₂ O)	03	64	4.47 ^c
<i>C. coriaria</i> fruit extract (mg/mL)			
6.15	121	0	100 ^a
3.12	90	0	100 ^a
1.56	90	1	98.90 ^a
0.78	117	0	100 ^a
Variation coefficient			3.35
Standard error of means			0.13

^{abc} Means with different letter in the same column statistically differ, Tukey (P < 0.05).

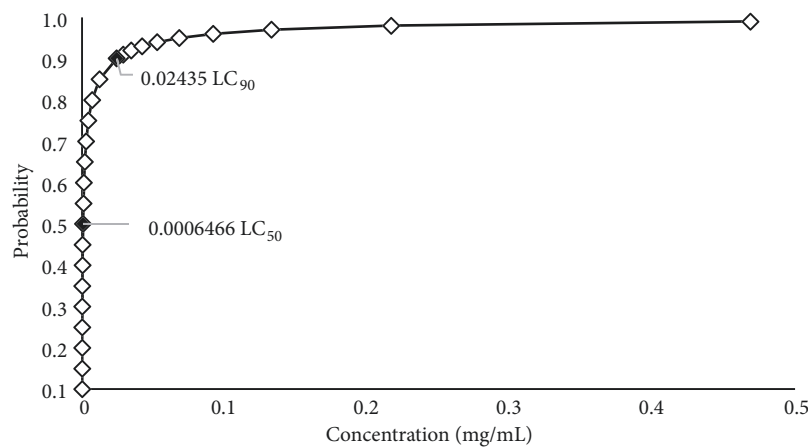


FIGURE 1: Lethal concentrations (LC) of the methanolic extract from *C. coriaria* J. Willd fruits to inhibit *H. contortus* eggs (24 h of *in vitro* exposure).

2.5. *Statistical Analysis.* The results obtained were analyzed in a completely randomized design through ANOVA analysis using the general lineal model (GLM), with the following statistical model: $Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$, where Y_{ij} = inhibition of egg hatching and larval mortality; μ = general mean; T_i = effect of the concentration of the extract and controls, and ξ_{ij} = the random error of the treatments. The difference between means was compared with the Tukey test (P < 0.05). Likewise, minimum (LC₅₀) and maximum (LC₉₀) lethal concentrations were determined using the PROBIT procedure of the statistical package [12].

3. Results and Discussion

3.1. *Egg Hatch Inhibition Test.* Table 1 and Figure 1 show the lethal concentrations 50 and 90 produced by the *C. coriaria* fruit methanolic extract on *H. contortus* eggs after 48 h of exposure. The LC₅₀ and LC₉₀ values of the ovicidal effect were 0.0006 and 0.0243 mg/mL, respectively. On the other hand, the results of the EHI percentages, the methanolic extract showed an ovicidal activity close to 99% with the concentrations of 1.56 and 0.78 mg/mL, (P < 0.05), similar to

the positive control. Boubaker et al. [13] report anthelmintic activity of two extracts, aqueous and ethanolic, respectively, evaluated against *H. contortus* eggs, where they obtained results at a lethal concentration (LC₅₀) of 0.368 µg/mL for the ethanolic extract and for the aqueous extract (LC₉₀) of 6.344 µg/mL. Likewise Pérez-Pérez et al. [2] reported *in vitro* activity of the methanolic extract of *Gliricidia sepium* leaves, and the percentages of effectiveness found were 27.7%, 46.2%, and 49.7% inhibition at 125, 250, and 500 µg/mL, respectively, with an LC₅₀ of 394.96 µg/mL. Castillo-Mitre et al. [4] report poor ovicidal activity against *H. contortus* of the methanolic fraction in extracts made from *Acacia cochliacantha* leaves; however, they describe a strong action of the organic fraction at initial doses of 1.56 µg/mL and LC₅₀: 0.33 µg/mL and LC₉₀: 0.85 µg/mL. The comparative analysis of these results clearly highlights that the methanol extract obtained from the fruits of *C. coriaria* was more active to inhibit eggs hatching of the parasite, because 99% inhibitions were obtained with the lowest doses and the activity was accentuated up to 100% of the inhibition with the higher concentrations. This reflects the potential use of the extract for the control of parasitic infestations in the livestock industry.

TABLE 2: Mortality percentages of infective larvae (L_3) of *Haemonchus contortus* exposed to a *Caesalpinia coriaria* methanolic extract at different concentrations.

Treatments	Means infective larvae (live or dead) recovered		% Mortality
	Live	Dead	
Methanol 4 %	3	63	4.54 ^d
Ivermectin 5 mg/mL	0	80	100 ^a
<i>C. coriaria</i> fruits methanolic extract (mg/mL)			
150	14	38	73.07 ^b
100	14	51	78.46 ^b
75	49	29	37.19 ^c
50	52	30	36.58 ^c
Variation coefficient			10.4
Standard error of means			0.35

^{abc} Means with different letter in the same column statistically differ, Tukey ($P < 0.05$), LC = lethal concentration.

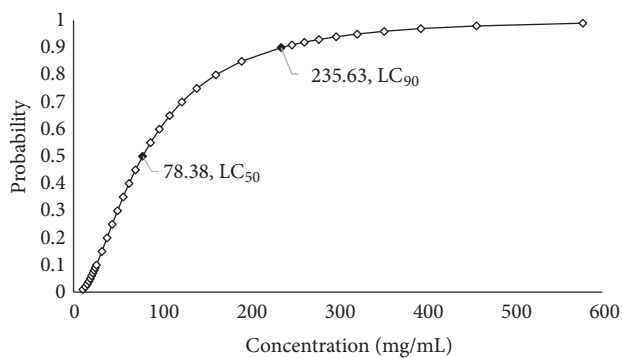


FIGURE 2: Lethal concentrations (LC) of the methanolic extract of *C. coriaria* J. Willd fruits for infecting larvae (L_3) of *H. contortus* (72 h of *in vitro* exposure).

3.2. Mortality Test of Infective Larvae (L_3). Table 2 show the results of the mortality percentages of *H. contortus* L_3 exposed to the extract at the different concentrations and their controls, respectively. An effect of 78.3 and 72.3% against L_3 of *H. contortus* was observed at the highest concentrations of 100 and 150 mg/mL, respectively. The extract of *C. coriaria* had a larvicidal effect (L_3) superior to that observed in the negative control, but lower than the positive control ($P < 0.05$). The lethal concentrations observed were $LC_{50} = 78.38$ mg/mL and $LC_{90} = 235.63$ mg/mL; schematically in Figure 2 it can be seen that to increase the larvicidal effect from 50 to 90% or greater, it is required about three times the concentration of the extract.

The results of the effect of the fruit extract of *C. coriaria* on *H. contortus* larvae are similar to those reported by other researchers. Olmedo-Juárez et al. [5] reported a larvicidal effect (*H. contortus*) greater than 70% at a dose of 150 mg/mL with an extract made from *Acacia cochliacantha* leaves and an LC_{50} and LC_{90} of 127.3 and 177.8 mg/mL, respectively. Also Chan-Pérez et al. [14, 15] observed that *H. contortus* larvae after being exposed to an acetic: aqueous extract of *A. pennatula* and *O. viciifolia* at concentrations of 600 μ g/mL showed evident lesions such as separation of the cuticle and the internal structures including the pharynx, bulb, and

intestinal cells and when they were exposed to doses of 5000 μ g/mL the cuticle of the larvae was clearly swollen and the internal structures (pharynx, bulb, and intestine) were not distinguishable. The results also show that the larvicidal activity of the extract depends directly on the concentration dose. In the case of the methanolic extract of *C. coriaria* fruits it is necessary to consider high concentrations >300 mg/mL to obtain a larvicidal effect superior to the 90%; this same tendency has been described by Alonso-Díaz et al. [16] and Alemán et al. [17] in studies developed with extracts from other plants. However, there are other factors to consider in the use of plant extracts as a resource to control parasitic diseases, such as the type of parasitic isolation where Calderon-Quintal et al. [18], Alonso-Díaz et al. [19], and Vargas-Magaña et al. [20] observed differences in the susceptibility of *H. contortus* larvae from mainly Mexican and French isolates, which can be attributed to certain tolerance developed by the parasite.

3.3. Identification of Bioactive Compounds by HPLC. In the methanolic extract of *C. coriaria* dried fruits, methyl gallate was identified as a major compound and gallate derivatives as other compounds (Figure 3). These compounds could be responsible for ovicidal and larvicidal activity against *H. contortus*. However, future studies with this plant, through chemicals bioguided assay to identify the responsible metabolite of the anthelmintic activity, are necessary. *Caesalpinia coriaria* is a tree with multiple uses in traditional medicine in Mexico [8]. Phytochemical reports detected that the fruits of *C. coriaria* have a high content of phenolic compounds [2, 8] which have diverse properties such as anti-inflammatory, cicatrizing and apoptosis in cancer cells [8]. Additionally Mi-Sun et al. [21] reported activity of these phenolic compounds against bacteria. In this study it was demonstrated that the gallotannins identified in the methanolic extract of the *C. coriaria* fruits had anthelmintic properties for the *in vitro* control of the eggs and larvae stages of *H. contortus*. Developed publications agree that the condensed tannins present in plants have activity against gastroenteric parasites of ruminants [12, 22]. However, synergic effect of tannins has also been reported with other compounds such as flavonoids

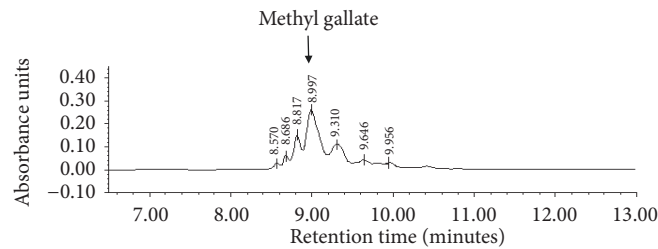


FIGURE 3: Secondary compounds identified in the methanolic extract of *C. coriaria* J. Willd fruits (HPLC analysis).

in the control of parasites [9, 17]. These results suggest that in any control program of parasites, where it is intended to use tree extracts by their nematicidal effect, it is necessary to consider the concentration dose, the type of bioactive compound, and the parasitic isolate, as main factors that determine the anthelmintic efficacy.

4. Conclusions

The *in vitro* ovicidal and larvicidal activity of the methanolic extract of *Caesalpinia coriaria* J. Willd fruits against *H. contortus* was demonstrated, and phenolic compounds such as methyl gallate and its derivatives were identified as possibly responsible for the anthelmintic effect. In addition, the ovicidal effect was observed at the lower concentrations of the extract, while the larvicidal effect was observed at the highest concentrations, which indicated that the effect against the stages of the parasite depends on the concentration dose. These results justify continuing the investigation on *Caesalpinia coriaria* J. Willd fruits *in vivo* under controlled conditions to verify if the activities recorded *in vitro* could be reproduced *in vivo* in sheep infested with *H. contortus*.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support of the Program for the Professional Development of Teachers, the Higher Type (PRODEP), and PROFIDES-SEP for research networks, 2018. This research forms a part of the Master thesis of the MVZ, Xochitl de Jesús Martínez. Part of this work was supported by INIFAP (Project SIGI: 8215734475).

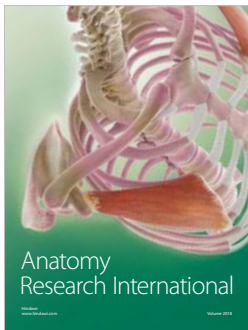
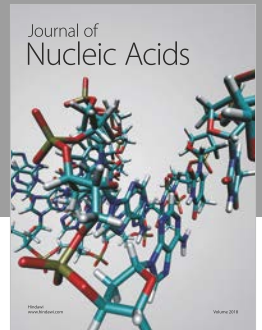
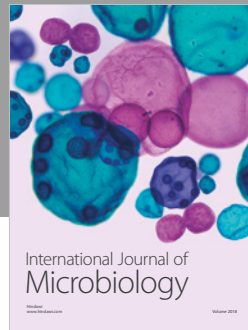
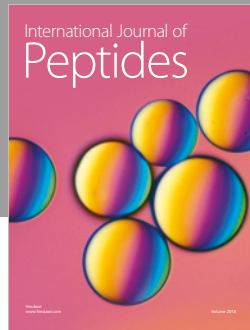
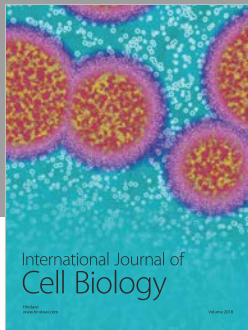
References

[1] P. J. Olivares, S. I. Gutiérrez, H. S. Rojas, A. M. T. Valencia, M. E. J. Míreles, and I. A. Córdova, "Seasonal prevalence of Strongyle

in Creole goats of the Tierra Caliente region, State of Guerrero, México," *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, vol. 2, pp. 216–220, 2012.

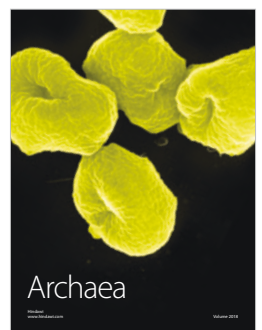
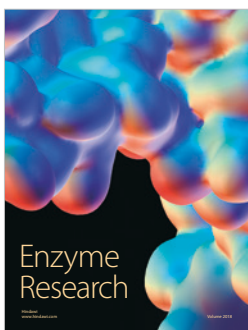
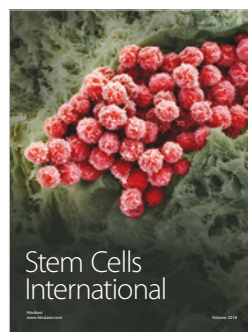
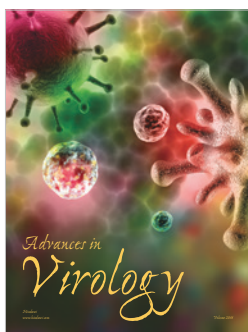
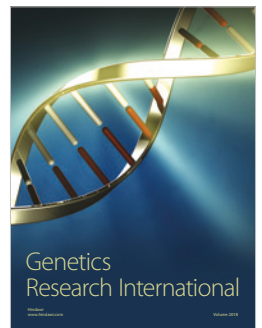
- [2] N. Sánchez, G. D. Mendoza, J. A. Martínez et al., "Effect of caesalpinia coriaria fruits and soybean oil on finishing lamb performance and meat characteristics," *BioMed Research International*, vol. 2018, Article ID 9486258, 6 pages, 2018.
- [3] Y. León-Castro, J. Olivares-Pérez, S. Rojas-Hernández et al., "Chemical composition of three tree fodders and effect in control *Haemonchus contortus* and change of body weight in kids," *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, vol. 2, no. 5, pp. 193–201, 2015.
- [4] G. F. Castillo-Mitre, A. Olmedo-Juárez, R. Rojo-Rubio et al., "Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 204, pp. 125–131, 2017.
- [5] B. Pérez-Pérez, M. M. Hernández-Villegas, P. De la Cruz-Burelo et al., "Efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gastrointestinales de ovinos," *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 17, pp. 105–111, 2014.
- [6] A. R. Williams, H. M. Ropiak, C. Fryganas, O. Desrues, I. Mueller-Harvey, and S. M. Thamsborg, "Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*," *Parasites & Vectors*, vol. 7, pp. 518–527, 2014.
- [7] A. Olmedo-Juárez, R. Rojo-Rubio, A. Zamilpa et al., "In vitro larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes," *Veterinary Research Communications*, vol. 41, no. 3, pp. 227–232, 2017.
- [8] J. N. Sánchez-Carranza, L. Alvarez, S. Marquina-Bahena et al., "Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines," *Molecules*, vol. 22, no. 4, article no. 666, 2017.
- [9] J. Olivares-Pérez, S. Rojas-Hernandez, L. M. Camacho-Diaz, M. Cipriano-Salazar, and A. Z. Salem, "Fruits chemical composition and potential ruminal digestion of nine tree species in dry tropic region of Mexico," *Agroforestry Systems*, 2017.
- [10] G. C. Coles, C. Bauer, F. H. M. Borgsteede et al., "World association for advancement in veterinary parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance," *Veterinary Parasitology*, vol. 44, pp. 35–44, 1992.
- [11] E. Liebano-Hernández, "Identificación morfológica de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales y pulmonares en animales domésticos de México," in *Diagnóstico y Control De Los Nematodos Gastrointestinales De Los Rumiantes En México*, M. V. Prats, Ed., pp. 27–34, 2nd edition, 2004.

- [12] J. J. Vargas-Magaña, J. F. J. Torres-Acosta, A. J. Aguilar-Caballero et al., "In vitro susceptibility to tannin rich extracts differs amongst *Haemonchus contortus* isolates from tropical and temperate regions," in *Proceedings of the 13th International Congress of Parasitology*, Ciudad de México, México, 2014.
- [13] R. Boubaker Elandalousi, H. Akkari, F. B'chir et al., "Thymus capitatus from Tunisian arid zone: Chemical composition and in vitro anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*," *Veterinary Parasitology*, vol. 197, no. 1-2, pp. 374–378, 2013.
- [14] J. I. Chan-Pérez, J. F. J. Torres-Acosta, C. A. Sandoval-Castro et al., "Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of polyphenol-rich plants. Part 2: Infective L3 larvae," *Veterinary Parasitology*, vol. 240, pp. 11–16, 2017.
- [15] J. I. Chan-Pérez, J. F. J. Torres-Acosta, C. A. Sandoval-Castro et al., "In vitro susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants," *Veterinary Parasitology*, vol. 217, pp. 53–60, 2016.
- [16] M. A. Alonso-Díaz, J. F. J. Torres-Acosta, C. A. Sandoval-Castro, A. J. Aguilar-Caballero, and H. Hoste, "In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts," *Veterinary Parasitology*, vol. 153, no. 3-4, pp. 313–319, 2008.
- [17] Y. Alemán, L. M. Sánchez, T. Pérez et al., "Actividad larvicida de extracto de *Rhizophora mangle* L. contra estrongiloides gastrointestinales de ovinos," *Revista Salud Animal*, vol. 22, no. 2, pp. 111–115, 2011.
- [18] J. Calderón-Quintal, J. Torres-Acosta, C. Sandoval-Castro, M. Alonso, H. Hoste, and A. Aguilar-Caballero, "Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible?" *Archivos de Medicina Veterinaria*, vol. 42, pp. 165–171, 2010.
- [19] M. A. Alonso-Díaz, J. F. J. Torres-Acosta, C. A. Sandoval-Castro, and H. Hoste, "Comparing the sensitivity of two in vitro assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*," *Veterinary Parasitology*, vol. 181, no. 2-4, pp. 360–364, 2011.
- [20] E. von Son-de Fernex, M. Á. Alonso-Díaz, P. Mendoza-de Gives et al., "Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp.," *Veterinary Parasitology*, vol. 214, no. 1-2, pp. 89–95, 2015.
- [21] M.-S. Kang, J.-S. Oh, I.-C. Kang, S.-J. Hong, and C.-H. Choi, "Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria," *Journal of Microbiology*, vol. 46, no. 6, pp. 744–750, 2008.
- [22] C. Klongsiriwet, J. Quijada, A. R. Williams, I. Mueller-Harvey, E. M. Williamson, and H. Hoste, "Synergistic inhibition of *haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins," *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, vol. 5, no. 3, pp. 127–134, 2015.



Hindawi

Submit your manuscripts at
www.hindawi.com



9.2. Capítulo segundo

Evaluation of a hydroalcoholic extract of the *Caesalpinia coriaria* j. Wild
fruit against eggs and larvae of *Haemonchus contortus*

Agroforestry Systems

Evaluation of a hydroalcoholic extract of the *Caesalpinia coriaria* J. Wild fruit against eggs and larvae of *Haemonchus contortus*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AGFO-D-18-00141
Full Title:	Evaluation of a hydroalcoholic extract of the <i>Caesalpinia coriaria</i> J. Wild fruit against eggs and larvae of <i>Haemonchus contortus</i>
Article Type:	S.I. : Tree By-products for Animal Feeding
Keywords:	Nematodes; ruminants; lethal concentration; tree
Corresponding Author:	OLIVARES PEREZ JAIME, Dr. Unidad academica de medicina veterinaria y zootecnia Altamirano, Guerrero MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Unidad academica de medicina veterinaria y zootecnia
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Xochitl De Jesús - Martínez
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Xochitl De Jesús - Martínez Agustín Olmedo - Juarez Saúl Rojas - Hernández Alejandro Zamilpa Pedro Mendoza- De Gives Maria E. López - Arellano Abel E. Villa - Mancera Luis M. Camacho - Díaz Moisés Cipriano - Salazar Jaime Olivares - Pérez, Dr.
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	The aim of this study was to evaluate the in vitro lethal effect of a hydroalcoholic extract (HAE) from <i>Caesalpinia coriaria</i> fruit against eggs and larvae of <i>Haemonchus contortus</i> of domestic ruminants. The HAE was assessed using five concentrations: 50, 25, 12.5, 6.15, 3.12 mg/mL to eggs and 100, 125, 175, 150 and 200 mg/mL to larvae, respectively; 0.5% Ivermectin was used as a positive control and methanol to 4% with distilled water as negative control. The data of larvicidal and ovicidal effect were analyzed with a completely randomized design through ANOVA analysis using the general lineal model (GLM) and lethal concentrations (LC50 and LC90), were estimated through a Probit analysis of the SAS program. A clear HAE increased concentration dependence effect was observed on eggs and larvae. The highest activity of the HAE was obtained at the highest concentration ($P < 0.05$) to obtain a similar effect to the positive control (ivermectin), with LC50 =22.93 and 10.3 mg/mL; LC90 =44.0 and 84.18 mg/mL, respectively for larvae and eggs. The results indicate that the HAE of <i>C. coriaria</i> fruit possess in vitro ovicidal and larvicidal properties (Total phenols: methyl gallate) against <i>H. contortus</i> and it becomes an alternative for in vivo research for the control of gastroenteric nematodes in ruminants

[Click here to view linked References](#)

1 **Evaluation of a hydroalcoholic extract of the *Caesalpinia coriaria* J. Wild fruit against eggs**
2 **and larvae of *Haemonchus contortus***

3 X. De Jesús-Martínez¹, A. Olmedo-Juárez*², S. Rojas Hernández¹, A. Zamilpa³, P. Mendoza de
4 Gives², ME. Lopez-Arellano², A. Villa-Mancera⁴, LM. Camacho-Díaz¹, M. Cipriano Salazar¹, J.
5 Olivares-Pérez*¹

6 ¹ Programa de Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local, FMVZ- Universidad
7 Autónoma de Guerrero, México

8 ² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP, México

9 ³ Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Argentina
10 No. 1. Col. Centro, CP. 62790 Xochitepec, Morelos, México

11 ⁴ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
12 México

13 *Corresponding authors: olivares@hotmail.com, olmedo.agustin@inifap.gob.mx; ORCID ID:
14 0000-0002-7455-2890; Tel: 7321198006

15 **Abstract**

16 The aim of this study was to evaluate the *in vitro* lethal effect of a hydroalcoholic extract (HAE)
17 from *Caesalpinia ciliaria* fruit against eggs and larvae of *Haemonchus contortus* of domestic
18 ruminants. The HAE was assessed using five concentrations: 50, 25, 12.5, 6.15, 3.12 mg/mL to
19 eggs and 100, 125, 175, 150 and 200 mg/mL to larvae, respectively; 0.5% Ivermectin was used as
20 a positive control and methanol to 4% with distilled water as negative control. The data of larvicidal
21 and ovicidal effect were analyzed with a completely randomized design through ANOVA analysis
22 using the general lineal model (GLM) and lethal concentrations (LC₅₀ and LC₉₀), were estimated
23 through a Probit analysis of the SAS program. A clear HAE increased concentration dependence

24 effect was observed on eggs and larvae. The highest activity of the HAE was obtained at the highest
25 concentration ($P < 0.05$) to obtain a similar effect to the positive control (ivermectin), with LC_{50}
26 =22.93 and 10.3 mg/mL; LC_{90} =44.0 and 84.18 mg/mL, respectively for larvae and eggs. The
27 results indicate that the HAE of *C. coriaria* fruit possess *in vitro* ovicidal and larvicidal properties
28 (Total phenols: methyl gallate) against *H. contortus* and it becomes an alternative for *in vivo*
29 research for the control of gastroenteric nematodes in ruminants.

30 **Keywords:** Nematodes, ruminants, lethal concentration, tree

31 **Introduction**

32 The parasites are microorganisms that affect the normal development of domestic animals.
33 Gastrointestinal nematodes (GIN) are responsible for economic losses in livestock production. Due
34 to the constant and irrational use of chemical anthelmintic, the evolution and generation of parasitic
35 resistance has been promoted (Muñiz - Lagunes et al. 2015). This situation has generated the search
36 for other control strategies such as the use of phytopharmaceuticals and bioactive plants rich in
37 secondary metabolites. Especially plants rich in tannins, have received great attention lately and
38 have been proposed as a method of control of GIN in ruminants, improving production and animal
39 health (Pérez-Pérez et al. 2014). *Caesalpinia coriaria* Jacq. Willd, is an arboreal legume commonly
40 known as "Casalote", it is very widespread in the tropical regions of Mexico, and it contains a
41 great variety of secondary compounds such as tannins, gallic acid and flavonoids (Sánchez-
42 Carranza et al. 2017). The aim of the present work was to evaluate *in vitro* a hydroalcoholic extract
43 of the fruit of *C. coriaria* against larvae and eggs of *H. contortus*.

44

45 **Materials and methods**

46 *Caesalpinia coriaria* dried fruits (5 kg) were collected in the Tierra Caliente region of Guerrero,
47 Mexico, located at 18° 20` 30" NL and 100° 39` 18" WL, and were dried to constant weight in a
48 forced air oven at 45 ° C for 72 h. Later they were ground in a willey mill until obtaining a 1 mm
49 particle size.

50 Preparation of hydro-alcoholic extract

51 100 g of ground dry fruit were used and were suspended in 2000 mL of hydro-alcoholic as solvent,
52 for 72 h at room temperature. The liquid solution was filtered using different filters (gauze, cotton
53 and filter paper), the residual solvent was removed by distillation under reduced pressure with the
54 help of a rotary evaporator (Buchi R-114) at 50 ° C, to obtain a semi-solid extract, which was dried
55 by lyophilization processes. Finally, the solvent-free dry extract was obtained and stored at -40 °
56 C until its later use in the *in vitro* bioassays.

57 Biological material

58 Obtaining eggs from *Haemonchus contortus*

59 *Haemonchus contortus* eggs obtained from a donor ovine experimentally infected with infective
60 larvae (L₃) of the parasite were used (strain INIFAP, 350 L₃ / kg of BW of the animal). The eggs
61 were concentrated by passing different sieves (200, 100, 75 and 37 µm in diameter) and by density
62 gradients with 40% sucrose.

63 Inhibition of egg hatching (IEH)

64 96-well microtiter plates (n = 6) were used. The treatments were the hydroalcoholic extract at
65 different concentrations (50, 25, 12.5, 6.15, 3.12 mg / mL), 4% methanol as a negative control and

66 ivermectin (5 mg / mL) as a positive control. Fifty micro-liters of an aqueous suspension containing
67 100 ± 10 eggs of *H. contortus* were distributed in each well. Afterwards, 50 μ L aliquots of the
68 extract and controls were added, with a final volume of 100 μ L per well. The plates were incubated
69 for 48 hours at a temperature of 28 ° C. The egg hatching process was stopped by adding 10 μ L of
70 Lugol solution. Finally, the total eggs or larvae of each well were counted and the percentage of
71 inhibition of egg hatching (% IEH) was determined by the following formula: % IEH = [(number
72 of eggs) / (number of larvae + number of eggs)] * 100.

73 Obtaining larvae of *Haemonchus contortus*

74 Larvae (L₃) were obtained from the donor sheep by daily collection (24 h). Fecal cultures were
75 prepared by mixing the feces with polyethylene particles in plastic basins. Water was added to the
76 fecal material and homogenized to obtain adequate oxygenation to promote better hatching of the
77 eggs. The fecal cultures were covered with aluminum foil and incubated for 7 days at room
78 temperature (25-31 °C). The infective larvae were extracted of the fecal material using the
79 Baermann funnel technique (Liebano - Hernandez 2004). The L₃ were cleaned by density gradient
80 and centrifugation; the larvae were drawn with 0.187% sodium hypochlorite and washed with
81 distilled water. Finally, they were used in the *in vitro* bioassays.

82 *In vitro* larval mortality test (L₃)

83 Microtiter plates (96-well) were used, where 50 μ L of the extract solutions were deposited (n = 6).
84 The treatments were four concentrations of the extract (100, 125, 175, 150 and 200 mg / mL), plus
85 two controls, one positive (C+) with 0.5% ivermectin and another negative (C-) with 50 μ L distiller
86 water (H₂O). After each well, 100 L₃ larvae were deposited in 50 μ L solution to complete a total
87 volume of 100 μ L. Finally the plates were incubated at 28 °C, for 72 hours. Ten aliquots of 5 μ L

88 were taken to count alive or dead larvae and with this the mortality percentage of larvae L₃ (%
89 ML₃) was calculated by the following formula: % ML₃ = [(number of dead L₃ / (number of L₃ dead
90 + number of live L₃)] * 100. Total phenolic content (TP) and condensed tannins (CT) were
91 estimated in *C. coriaria* fruit, according to the method TP-Folin–Ciocalteu and CT butanol–HCl,
92 respectively, described by Waterman and Mole (1994).

93 Identification of major compounds by HPLC analysis

94 The hydroalcoholic extract (HA-E) was analysed by HPLC using a Waters 2695 separation module
95 HPLC system equipped with a Waters 996 photodiode array detector and Empower Pro software
96 (Waters Corporation, USA). Chemical separation was achieved in a supelcosbil LC-F column (4.6
97 mm x 250 mm i.d., 5-µm particle size) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, USA). The mobile phase
98 consisted of 0.5 % trifluoroacetic acid aqueous solution (Solvent A) and acetonitrile (Solvent B).
99 The gradient system was obtained as follows: 0-1 min, 0 % B; 2-3 min, 5 % B; 4-20 min, 30 % B;
100 21-23 min 50 % B; 24-25 min, 80 % B; 26-27 min, 100 % B; 28-30 min, 0 % B. The flow rate was
101 maintained at 0.9 mL/min and the injection volume was 10 µL. The absorbance was measured at
102 280 nm. Gallic acid and methyl gallate were identified by comparison of the retention times and
103 UV spectra with reference standards (Sigma-Aldrich, St Louis Mo, USA) (Wagner and Bladt,
104 1996).

105 Statistical analysis

106 The results obtained were analyzed in a completely randomized design, with the following
107 statistical model: $Y_{ij} = \mu + T_i + \zeta_{ij}$; where: Y_{ij} = Inhibition of egg hatching and larval mortality; μ =
108 general mean; T_i = effect of the concentration of the extract and controls and ζ_{ij} = the random error
109 of the treatments. The difference between means was compared with the Tukey test (P <0.05).

110 Likewise, minimum (LC₅₀) and maximum (LC₉₀) lethal concentrations were determined using the
111 PROBIT procedure of the statistical package SAS, (2006).

112 Results and Discussion

113 The analysis of the content of secondary compounds fruits in the *C. coriaria*, revealed 55.3% of
114 total phenols and 2.7% of total condensed tannins on dry matter basis. In the bioassays the results
115 obtained in this work reveal evidence that the hydroalcoholic extract of *C. coriaria* fruits has
116 ovicidal effects. The Table 1 shows the percentages of inhibition egg hatching (% IEH) of parasite.
117 Ovicidal effect of 100% was observed at the maximum concentration of 50 mg / mL, similar to the
118 positive control and higher than the negative control. Lethal concentrations were LC₅₀ and LC₉₀ de
119 10.31 and 84.18 mg/ mL, respectively, this indicated that there was a strong effect at low
120 concentrations of the extract, where the inhibition depends on the concentration dose, ie, for the \geq
121 50% inhibition of the eggs of *H. contortus* minimally requires 10.31 mg / mL of the extract, while
122 to inhibit \geq 90% of the eggs of the parasite requires 84.18 mg / mL or higher concentrations,
123 respectively (Figure 1).

124 The Table 2 shows the mortality percentages. A larvicidal effect close to 100% was observed at
125 the concentration of 50 mg / mL, which meant that, from this concentration, effects of the extract
126 can be expected in the larval mortality of *H. contortus*. On the other hand, Figure 2 shows that the
127 LC₅₀ was 0.55 mg / mL and the LC₉₀ was 0.91 mg / mL. The results demonstrate a strong effect
128 of HAE on infective larvae (L3) of *H. contortus*, with the tendency of an increase in larval mortality
129 (100%) at higher concentrations between 100 and 150 mg / mL of the extract and was higher than
130 the positive and negative controls, respectively (Table 2).

131 The chemical composition of the HAE extract from *C. coriaria* fruits is shown in Figure 3.
132 According their chromatographic profile, the peaks obtained correspond to less polar compounds

133 as major secondary components. The major peaks found in the chromatogram showed retention
134 times of 9.09 and 10.06 corresponding to methyl gallate and ethyl gallate respectively, compounds
135 to which the ovicidal and larvicidal effect observed in in vitro tests are attributed.
136 Similar data are reported by Getachew et al. (2012), with hydroalcolic extracts of six trees that
137 showed larvicidal activity at concentrations of 50 µg / mL with 63% mortality of infective larvae.
138 The observed effect may be related to the chemical structure of the secondary metabolites present
139 in the plants, at the concentration doses used in the bioassays and / or to the type of parasitic isolate.
140 Publications report that the fruit of *C. coriaria* contains 553 g / kg DM of total phenols and 32.06
141 g / kg DM of condensed tannins (Olivares et al., 2017, Sanchez et al., 2018). Jeeva et al. (2014)
142 reported that extracts of *C. coriaria* leaves were rich in polyphenols (tannins) with activity against
143 microorganisms for use in biomedicine. Sanchez-Carranza et al. (2017) found in extracts of *C.*
144 *coriaria* phenolic compounds such as ethyl gallate, gallic acid and tannic acid with properties to
145 preserve health in humans. The toxicity or inhibitory effects of phenolic compounds especially
146 tannins on microorganisms (parasites and bacteria) has been greatly documented (Castillo-Mitre et
147 al. 2017; Olmedo-Juarez et al. 2017; Cipriano-Salazar et al. 2018; Jeeva et al. 2014). However, it
148 is mentioned that microorganisms have some capacity to develop tolerance to exposure to
149 secondary compounds (Calderon-Quintal et al. 2010; Cipriano-Salazar et al. 2018). Chan-Perez et
150 al. (2017) showed that the susceptibility of *H. contortus* to plant extracts rich in tannins was
151 different between French and Mexicans isolates. The results indicate that the *C. coriaria* fruit can
152 be a resource for the preparation of hydroalcolic extracts for use in the *in vivo* control of parasites
153 in ruminants, which suggests further research in this line.

154

155 **Conclusions**

156 The *in vitro* ovicidal and larvicidal activity of the hydroalcoholic extract elaborated with the
157 *Caesalpinia coriaria* fruits against *H. contortus* were severe at low concentrations, and was
158 attributed to the high concentrations of total phenols that the plant possesses as a natural resource
159 with potential for parasitic control in ruminants. These studies set the standard for the development
160 of *in vivo* tests with the use of animals to regulate the doses of concentration that can decrease the
161 parasitic load without affecting the animal health, the consumption and digestibility of the feed.

162 **Conflicts of Interest**

163 The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

164 **Acknowledgements**

165 The authors are grateful for the financial support for the Program for the Professional Development
166 of Teachers, for the Higher Type (PRODEP) and PROFIDES-SEP for research networks - 2018.
167 This research forms part of the Master's thesis of the MVZ. Xochitl de Jesús Martínez.

168 **References**

- 169 Calderón-Quintal JA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Alonso-Díaz MA, Hoste H,
170 Aguilar-Caballero A (2010) Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins:
171 Can it be possible?. *Archiv Med Vet* 42:165-171.
- 172 Castillo-Mitre GF, Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, Cortázar-González M, Mendoza- de Gives P,
173 Hernández- Beteta EE, Reyes-Guerrero DE, López-Arellano ME, Velázquez-Armijo JF,
174 Ramírez-Vargas G, Zamilpa A (2017) Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia*
175 *cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *J Ethnopharmacol*
176 204:125-131.
- 177 Chan-Pérez JI, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Castañeda-Ramírez GS, Vilarem G,
178 Mathieu C, Hoste H, (2012) Susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from

179 different geographical origins towards acetone:water extracts of polyphenol-rich plants,
180 Part 2: Infective L3 larvae. *Vet Parasitol* 240:11-16, 2017.

181 Cipriano-Salazar M, Rojas-Hernández S, Olivares-Pérez J, Jiménez-Guillén R, Cruz-Lagunas B,
182 Camacho-Díaz LM, Eziuche-Ugbogu A (2018) Antibacterial activities of tannic acid
183 against isolated ruminal bacteria from sheep. *Microb Pathog* 117:255-258.

184 Getachew S, Nuraddis I, Belay A, Tadesse E (2012). *In vitro* evaluation of anthelmintic activities of
185 crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* in alemgena
186 wereda, Ethiopia. *Acta Parasitol Glob* 3(2):20-27.

187 JeevaK, Thiyagarajan M, Elangovan V, Geetha N, Venkatachalam P (2017) *Caesalpinia coriaria*
188 leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial
189 activity against clinically isolated pathogens. *Indust Crop Produc* 52:714– 720

190 Liebano-Hernández E, (2004) Identificación morfológica de larvas infectantes de nematodos
191 gastrointestinales y pulmonares en animales domésticos de México. In *Diagnóstico y*
192 *control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México*, Prats, M.V., Ed.,
193 2nd edición, pp. 27-34

194 Muñoz-Lagunes, A, González-Garduño R, López-Arellano ME, Ramírez-Valverde R, Ruíz-Flores
195 A, García-Muñoz G, Ramírez-Vargas G, Mendoza de Gives P, Torres-Hernández G, (2015)
196 Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in
197 Campeche State, Mexico. *Trop Anim Health Prod* 47, 1049-1054.

198 Olivares-Pérez J, Rojas-Hernandez S, Camacho-Diaz LM, Cipriano-Salazar M, Salem AZM
199 (2017) Fruits chemical composition and potential ruminal digestion of nine tree species in
200 dry tropic region of Mexico. *Agrof Syst* <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0161-y>.

201 Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, Zamilpa A, Mendoza- de Gives P, Arece-García J, López-
202 Arellano ME, Von Son- de Fernex E (2017) *In vitro* larvicidal effect of a hydroalcoholic
203 extract from *Acacia cochilacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. Vet Res
204 Commun 41(3):227-232.

205 Pérez –Pérez B, Hernández- Villegas MM, De la Cruz-Burelo P, Bolio- López GI (2014) Efecto
206 antihelmíntico *in vitro* del extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* contra
207 nematodos gastrointestinales de ovinos. Trop Subtrop Agroecosyst 17(1):105-111.

208 Pérez- Pérez C, Hernández-Villegas MM, Cruz- Burelo P, Hernandez-Bolio, Bolio-Lopez GI
209 (2014) Efecto antihelmitico *in vitro* del extracto metanólico e hojas de *Gliricidia sepium*
210 contra nematodos gastrointestinales de ovinos. Trop Subtrop Agroecosyst 17:105-111.

211 Sánchez N, Mendoza GD, Martínez JA, Hernández PA, Camacho DLM, Lee-Rangel HA, Vazquez
212 R, Flores R (2018) Effect of *Caesalpinia coriaria* Fruits and Soybean oil on finishing Lamb
213 Performance and Meat Characteristics. Biom Res Internat 2018:1-6.

214 Sánchez-Carranza JN, Alvarez L, Marquina-Bahena S, Salas-Vidal E, Cuevas V, Jiménez EW,
215 Veloz RAG, Carraz M, González-Maya L (2017) Phenolic Compounds Isolated from
216 *Caesalpinia coriaria* Induce S and G2/M Phase Cell Cycle Arrest Differentially and Trigger
217 Cell Death by Interfering with Microtubule Dynamics in Cancer Cell Lines. Molecules
218 22(666):1-14.

219 SAS Institute (2006) SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute. Cary. 956 p.

220 Wagner H, and Bladt S (1996) Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd
221 Edition, Springer-Verlag, Berlin. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>

222 Waterman PG, Mole S (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific
223 Publications, London, p 238.

Figures:

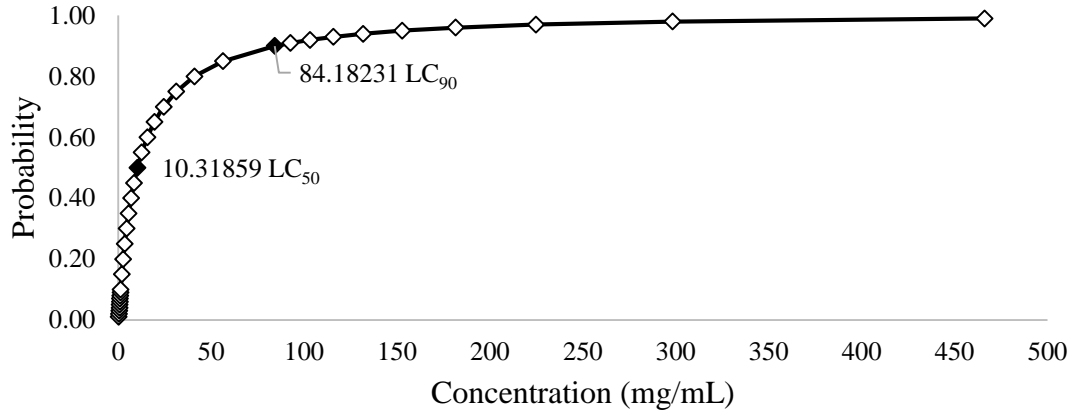


Figure 1. Lethal concentrations required to inhibit the *H. contortus* egg hatching after 48 h exposed to a *Caesalpinia coriaria* fruit hydroalcoholic extract

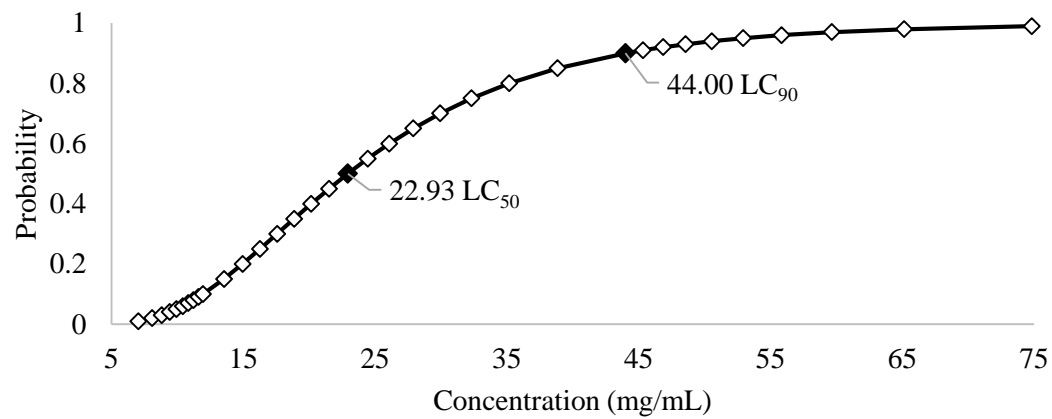


Figure 2. Lethal concentrations required to cause the mortality of *H. contortus* infective larvae after 72 h exposed to a *Caesalpinia coriaria* fruit hydroalcoholic extract

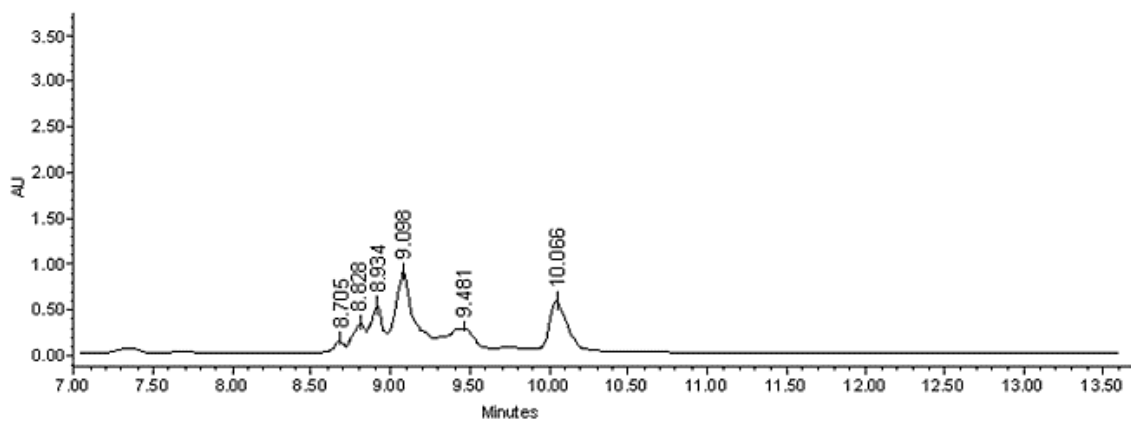


Figure 3. Results of the HPLC analysis of the Hydroalcoholic extract from *Caesalpinia coriaria* fruits

Tables:

Table 1. Inhibition eggs hatching (% IEH) of *Haemonchus contortus* exposed to a hydroalcoholic extract made with *Caesalpinia coriaria* fruits

Treatments	Eeg		IEH (%)
	Exposed (n°)	Hatched (n°)	
Methanol 4 %	106	96	7 ^d
Ivermectin 5 mg/mL	130	0	100 ^a
H ₂ O	85	79	9 ^e
<i>C. coriaria</i> fruit extract (mg/mL)			
50	121	0	100 ^a
25	139	47	66 ^b
12.5	126	93	26 ^c
6.15	108	92	14 ^d
3.12	127	109	14 ^d
Variation coefficient			10.56
Standard error of means			0.20

^{abcd} Means with different letter in the same column statistically differ, tukey (P <0.05), LC = lethal concentration

Table 2. Mortality percentages of infective larvae (L₃) of *Haemonchus contortus* exposed to a *Caesalpinia coriaria* hydroalcoholic extract at different concentrations

Treatments	Larvae		Mortality (%)
	Exposed (n°)	Dead (n°)	
H ₂ O (Negative control)	67	4	6.6 ^c
Ivermectin 5 mg/mL (Positive control)	53	53	100 ^a
<i>C. coriaria</i> fruits extract (mg/mL)			
150	100	100	100 ^a
100	100	100	100 ^a
75	63	63	99.6 ^a
50	66	64	97.7 ^a
25	63	55	86.3 ^b
Variation coefficient			13.4
Standard error of means			0.37

^{abcd} Means with different letter in the same column statistically differ, tukey (P <0.05), LC = lethal concentration

9.3. Capítulo tercero

In vitro challenge of *Haemonchus contortus* eggs to two extracts of
Caesalpinia coriaria fruit

***In vitro* challenge of *Haemonchus contortus* eggs to two extracts of *Caesalpinia coriaria* fruit**

De Jesús MX¹, Olmedo JA², Olivares PJ^{1*}, Rojas HS¹, Camacho DLM¹, Cipriano SM¹.

¹ Programa de Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local- UAGro. Carretera Iguala- <http://mcagropecuarias.uagro.mx>

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carretera Federal Cuernavaca- Cuautla N° 8534/Col. Progreso C.P. 625550 Jiutepec, Morelos / A.P. 206- CIVAC Tel. (777) 319 28 50 y 319 28 60 www.inifap.gob.mx olivaares@hotmail.com; olmedo.agustin@inifap.gob.mx

Abstract

The objective was to evaluate the *in vitro* effect of the acetonic and ethanolic extract of the *Caesalpinia coriaria* fruits on the egg hatching inhibition (EHI) of *Haemonchus contortus* in small ruminants. The inhibition effect of hatching was evaluated at different concentrations of the extracts (acetonic: 20.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.2 and 0.6 mg / μ L), (ethanolic: 6.15, 3.12, 1.56 and 0.78 mg / μ L) and methanol to the 4% with distilled water as negative control and 0.5% ivermectin as positive control, were used. The ovicidal effect data were analyzed with a completely randomized design by analysis of variance using the general linear model and the tukey test ($P < 0.05$); the lethal concentrations (LC_{50} and LC_{90}) were estimated by the Probit analysis of the statistical analysis systems (SAS) program. Concentration dosage depended extracts effects, were observed, where the ovicidal activity was comparatively similar to the positive control to the doses of 1.2 mg / μ L for the acetonic extract (AE) and 0.78 mg / μ L for the ethanolic extract (EE), respectively ($P < 0.0001$). The LC_{50} were AE = 0.23 mg / μ L and EE = 0.014 mg / μ L; CL_{90} AE = 1.04 mg / μ L and EE = 0.14 mg / μ L, for each extract, respectively. The results indicate that the EHI of the extracts elaborated with the *C. coriaria* fruits in acetonic and ethanolic solvent extract secondary compounds that have activity against *H. contortus* eggs, nevertheless, requires of greater investigations as antiparasitic for its direct animal use.

Key words: cascalote, solvents, nematodes, ovicide

Introduction

Parasitism is one of the main problems that afflict small ruminants, caused by gastrointestinal nematodes (GIN), is one of the important causes of mortality in sheep and goats in the tropics of Mexico (Delgado *et al.* 2016, Zapata *et al.* 2016, Canul-Ku *et al.* 2012). The frequent use of anthelmintics for the parasites control has been one of the causes that has led to the resistance development in the GIN. The impact of parasitism by NGI has stimulated the investigation in alternative medicine, such as medicinal plants or extracts of tree leaves, which are used in ruminants (Márquez *et al.*, 2016, León-Castro *et al.*, 2015, Olivares *et al.*, 2012 and Carvalho *et al.*, 2012). The NGI effect is of importance, from the biological and economic point of view; the problems for the GIN control are aggravated when the inadequate use of chemical dewormers is abused, which promotes the development of the parasites resistance (Muñiz-Lagunes *et al.*, 2015); from this arises the need to look for alternatives to control NGI, such as the use of biological agents (fungi and hematophagous mites) and / or bioactive plants and extracts with nematicidal properties (Pérez-Pérez *et al.*, 2014, Von de - Fernex *et al.*, 2015 and Olmedo *et al.*, 2014 and García-Ortiz *et al.*, 2015). The arboreal legume *Caesalpinia coriaria* Jacq. Willd, is commonly known as "Cascalote", is widespread in the Tierra Caliente region of Guerrero and contains high variety of secondary metabolites such as tannins, gallic acid and flavonoids (Sánchez-Carranza *et al.*, 2017). The objective of the study was to evaluate the acetonc and ethanolic extracts made with the *C. coriaria* fruits against *H. contortus* eggs.

Material and methods

Vegetative material. *C. coriaria* dried fruit (5000 g) were collected in the Tierra Caliente region of Guerrero, Mexico, located at 18° 20' 30" NL and 100 39' 18" WL, which were brought to total dryness through of a forced air heater at 200° C 24/200 LSP01. Subsequently they were subjected to a milling with a Mini Wiley Mill type mill, to obtain a particle size of 1 mm.

Preparation of acetonc and ethanolic extracts

A representative sample of 300 g of dried fruit was used, which was suspended in 2000 mL of acetone and ethanol as extraction solvents, during 72 h, at environment temperature, in

order to extract polar secondary compounds and of intermediate polarity. Then the liquid solutions were filtered using different filters (gauze, cotton and filter paper), the residual solvents were removed by distillation under reduced pressure with the help of a rotary evaporator (Buchi R-114) at 60 °C, and finally they were dried by Lyophilization processes (Labconco FreeZone -105 °C) to obtain the semi-solid extracts. The solvent-free dry extracts (36 g) were stored at -40 ° C until their use in the *in vitro* bioassays.

Biological material

Obtaining *Haemonchus contortus* eggs

H. contortus eggs obtained from a donor ovine were used, the animals were experimentally infected with infective larvae (L3) of the parasite (strain INIFAP, 350 L3 / kg of PV of the animal). The eggs were concentrated through the passage in different sieves (200, 100, 75 and 37 µm in diameter) and by density gradients in 40% sucrose solution.

Hatching inhibition egg (% HIE)

Ninety-well well microtitre plates (n = 8) were used. The treatments were acetic and ethanolic extracts at different concentrations (20, 10, 5, 2.5, 1.2 and 0.6 mg / mL) and (6.15, 3.12, 1.56 and 0.78 mg / mL), 4% methanol as a negative control and ivermectin (5 mg / mL) as a positive control, respectively. Fifty micro-liters of an aqueous suspension containing 100 ± 10 *H. contortus* eggs were distributed in each well. Subsequently aliquots of 50 µL of the extract and controls were added, having a final volume of 100 µL per well. The plates were incubated by 48 hours at a temperature of 28 ° C. The egg hatching process was stopped by adding 10 µL of lugol solution. Finally, a total count of eggs or larvae of each well was made and the HIE percentage was determined by the following formula: % HIE = [(number of eggs) / (number of larvae + number of eggs)] * 100.

Statistical analysis

The data were analyzed under a completely randomized design, with the following statistical model: $Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$; where: Y_{ij} = Inhibition of hatching; μ = general mean; T_i = effect of the extracts and controls) ξ_i = the random error of the treatment. The difference between means was compared with the Tukey test (P <0.05). In addition, minimum (LC₅₀) and

maximum (CL₉₀) lethal concentrations were determined using the PROBIT procedure of the SAS statistical package (SAS 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained in the study show evidence that the fruit of this arboreal legume has ovicidal effects, in both extracts used. Table 1 shows the percentages of HIE, where an ovicidal effect close to 100% was observed from the concentration of 2.5 and 3.12 mg / μ L of the acetonic and ethanolic extracts respectively, this means that both extracts used effectively inhibited the hatching of eggs to the interrupt their development. Pone et al. (2011) reported that the active compounds in the extracts penetrate the envelope (cuticle) of the egg and prevent its development and / or paralyze the larvae of the first embryonic stage.

Ademola *et al.*, (2011) and Zebré *et al.*, (2017) when using an acetonic solvent observed that tannins extracted from *Cassia alata* and *Acacia raddiana*, respectively, were responsible of blocking egg hatching and adult mortality inducing in *H. contortus*, but they to envelope inhibition were not related. Similar results were obtained by Carvalho *et al.*, (2012), Akkari *et al.*, (2014) and Cabardo and Portugaliza (2017) when they used ethanol solvent observed that tannins extracted polarly from several plants rich in condensed tannins, showed in studies *in vitro* activity to inhibit the hatching of eggs, infective stage larvae (L3) and cause paralysis and / or death in adult parasites. This background suggests that the use of acetonic and ethanolic solvents extracted secondary polar compounds that showed activity against *H. contortus* eggs. Veloz-Garcia et al. (2004) found as main phenolic compounds to gallic and tannic acids in the cascalote pods, in another study De Jesús-Martínez *et al.*, (2018) reported to the gallotannins (methyl gallate) and their derivatives as primordial secondary compounds, for this reason, the effects observed against the parasite eggs in this study, could be attributed to the action of these compounds.

Table 1. Hatching inhibition of *Haemonchus contortus* eggs exposed to acetonetic and ethanolic extracts elaborated with *Caesalpinia coriaria* fruits

<i>Caesalpinia coriaria</i> fruit Extracts	Eggs		% EIH
	Exposed	Hatching	
Acetonetic extract			
(-) Methanol 4 %	159	152	4.7 ^C
(-) H ₂ O	40	34	4.0 ^C
(+) Ivermectin 5 mg / μ L	210	0	100 ^a
Concentrations (mg / μ L)			
20	178	0	99.7 ^a
10	139	0	99.7 ^a
5	197	3	98.7 ^a
2.5	205	4	99.7 ^a
1.2	179	10	93.7 ^a
0.6	103	24	78.5 ^b
Standard error of the mean			4.2
P-value			<0.0001
Ethanolic extract			
(-) Methanol 4 %	67	64	4.0 ^b
(-) H ₂ O	40	34	4.0 ^b
(+) Ivermectin 5 mg / μ L	91	0	100 ^a
Concentrations (mg / μ L)			
6.15	67	0	100 ^a
3.12	66	0	100 ^a
1.56	67	1	98.5 ^a
0.78	75	1	99.3 ^a
Standard Error of the mean			0.78
P-value			<0.0001

Averages with different literals in the same column statistically differ, (P<0.05).

The lethal concentrations (LC₅₀ and CL₉₀) of the extracts used are shown in figure 1A and 1B. In the acetonic extract, an LC₅₀ of 0.23 mg / μL and CL₉₀ of 1.04 mg / μL are observed, and for the ethanolic extract an LC₅₀ of 0.014 mg / μL and CL₉₀ of 0.14 mg / μL, are observed, respectively. The results show a concentration-dependent effect in the different extracts, however, comparatively between the two extracts it can be seen that the lethal concentrations of the ethanolic extract were lower compared to acetonic extract, which may indicate that the polar compounds extracted of the *C. coriaria* fruits by the ethanolic solvent, turned out to be more lethal against the eggs of the parasite. Al - Rawahi *et al.*, (2013) report that the solubility of polyphenols is affected by the type of solvents used and their polarity, resulting in extracts with different properties despite being made from the same plant. Dai and Mumper, (2010) and Al-Farsi *et al.*, (2007) observed that 100% acetone extracted flavonoid and phenolic compounds of low polarity. Ringuelet and Viña (2013) mentions that ethanol is a solvent of excellent solubility to extract polar compounds. The same phenomenon was observed by Castillo-Mitre *et al.*, (2017) who reported different effect of extracts made with *A. cochliacantha* leaves using different solvents, against eggs of *H. contortus* and attributed it to polar and non-polar compounds present in the different fractions. Sánchez-Carranza *et al.* (2017) reported that fruits and leaves of *C. coriaria* are a rich source in TC, such as gallic acid, ethyl gallate and tannic acid, as a basis of hydrolysable tannins, so the biological activity reported in this study could be related to these metabolites.

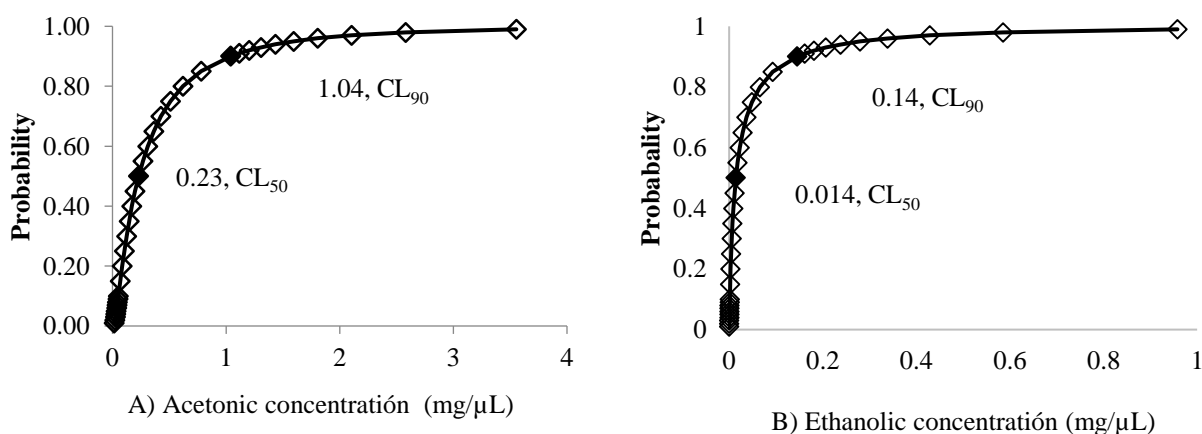


Figure 1. Lethal concentrations of the acetonic (A) and ethanolic (B) extract elaborated with *Caesalpinia coriaria* fruits on the egg hatching inhibition of *Haemonchus contortus*.

CONCLUSION

It is concluded that the extract elaborated with *C. coriaria* fruits in acetic and ethanol solvents inhibits the hatching of *H. contortus* eggs, so it could be an option in the treatment of nematodes in small ruminants, however, it requires more research as antiparasitic for direct and reliable use in animals. The findings found in this study will allow an identification of the compounds responsible for ovicidal activity by means of studies of identification of bioactive compounds by HPLC liquid layer chromatography.

Referencias

- Ademola I.O. and. Eloff J.N. (2011). Ovicidal and larvicidal activity of *Cassia alata* leaf acetone extract and fractions on *Haemonchus contortus*: *In vitro* studies. *Pharmaceutical Biology*, 2011; 49(5): 539–544.
- Akkari H, Rtibi K, B’chir F, Rekik M, Darghouth M. A, Gharbi M. (2014). *In vitro* evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet Res Commun* (2014) 38:249–255.
- Al-Farsi M, Alasalvar C, Al-Abid M, Al-Shoaily K, Al-Amry M, Al-Rawahy F (2007) Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. *Food Chem* 104:943-947.
- Al-Rawahi AS, Rahman MS, Guizani N, Essa MM (2013) Chemical composition, water sorption isotherm, and phenolic contents in fresh and dried pomegranate peels. *Drying Technol* 31:257–263.
- Cabardo Jr. D. E, Portugaliza H. P. (2017). Anthelmintic activity of *Moringa oleifera* seed aqueous and ethanolic extracts against *Haemonchus contortus* eggs and third stage larvae.
- Canul-Ku, H.L., Rodríguez-Vivas, R.I., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar- Caballero, A.J, Pérez-Cogollo, L.C. and Ojeda-Chi, M.M., (2012). Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. *Veterinary Parasitology*, 183, 292–298.

- Carvalho C. O, Chagas A. C. S, Cotinguiba F, Furlanc M, Brito L. G., Chaves F C.M, Stephan M. P, Bizzo H. R, Amarante A. F.T. (2011). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology* 183 (2012) 260– 268.
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313–7352.
- De Jesús-Martínez X, Olmedo-Juárez A, Olivares-Pérez J, Zamilpa A, Mendoza de Gives P, López-Arellano M. E, Rojas-Hernández S, Villa-Mancera A, Camacho-Díaz L.M, and Cipriano-Salazar M. (2018). In Vitro Anthelmintic Activity of Methanolic Extract from *Caesalpinia coriaria* J. Willd Fruits against *Haemonchus contortus* Eggs and Infective Larvae. *Hindawi. BioMed Research International* Volume 2018, Article ID 7375693, 6 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/7375693>
- Delgado A, Niñez O, Aguilera V L, Palacios D, Salas R J, Berbert G, González M, Fernández N., (2016). Acción ovicida in vitro del extracto hidro-alcoholico crudo de la semilla de *Pouteria sapota* (mamey colorado) contra huevos de *Haemonchus contortus*. Primer reporte. *Rev. Prod. Anim.*, 28 (2-3). Pag. 51-54, 2016.
- Fitz-Aranda, J.A., Mendoza-de-Gives, P., Torres-Acosta, J.F.J., Liebano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Sandoval-Castro, C.A., Quiroz-Romero, H. (2015). *Duddingtonia flagrans* chlamydo spores in nutritional pellets: effect of storage time and conditions on the trapping ability against *Haemonchus contortus* larvae. *Journal of Helminthology*. 89: 13-18.
- García-Ortiz, N., Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., López-Arellano, M.E., Bautista-Garfias, C.R., González-Garduño, R. (2015). *In vitro* predatory activity of *Lasioseius penicilliger* (Arachnida: Mesostigmata) against three nematode species: *Teladorsagia circumcincta*, *Meloidogyne sp.* and *Caenorhabditis elegans*. *Veterinaria México*. 2: 1-8.
- León-Castro Y, Olivares-Pérez J, Rojas-Hernández S, Villa-Mancera A, Valencia-Almazán M.T, Hernández-Castro E. (2015). Efect of three fodder trees on *Haemonchus*

contortus control and weight variations in kids. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 2: 193-201.

Muñiz-Lagunés, A., González-Garduño, R., López-Arellano, M.E., Ramírez-Valverde, R., Ruíz-Flores, A., García-Muñiz, G., Ramírez-Vargas, G., Mendoza-de Gives, P., Torres Hernández, G. (2015). Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, Mexico. *Trop Animal Health and Production*. 47: 1049-1054.

Olivares P.J, Gutiérrez S.I, Rojas H.S, Valencia A.M.T, Míreles M.E.J, Córdova I.A (2012) Seasonal prevalence of *Strongyle* in Creole goats of the Tierra Caliente region, State of Guerrero, México. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences* 2: 216-220.

Olmedo J.A, Rojo R.R., Arece, G.J, Mohamed A.Z.S., Kholif E.A, Morales A.E (2014). In vitro of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Italian Journal of Animal Science*. 13: 303-307.

Pérez- Pérez C, Hernández-Villegas MM, Cruz- Burelo P, Hernandez-Bolio, Bolio-Lopez G.I (2014). Efecto antihelmitico in vitro del extracto metanólico e hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gastrointestinales de ovinos. *Tropical and subtropical agroecosystems* 17(2014):105-111.

Poné J. W, Florence K. T, Mbida M, Tedonkeng E. P, Bilong Bilong CF. (2011). In vitro activities of acetic extracts from leaves of three forage legumes (*Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena diversifolia*) on *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* (2011)125-128.

Ringuelet J y Viña S, (2013) *Productos Naturales Vegetales*. Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata. Pag. 16.

Sánchez-Carranza JN, Álvarez L, Marquina-Bahena S, Salas-Vidal E, Cuevas V, Jiménez EW, Rafael A, Veloz G, Carraz M, González-Maya L. (2017). Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest

differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules*. 22, 666.

Veloz-García R. A, Martin-Martínez R, Veloz-Rodríguez R, Muñoz-Sánchez C. I, Guevara-Olvera L, Miranda-López R, González-Chavira M. M, Torres-Pacheco I, Guzmán-Maldonado S. H, Cardador-Martínez A, Loarca-Piña L. and Guevara-González R. G (2004). Antimutagenic and antioxidant activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics. *J Sci Food Agric* 84:1632–1638 (online: 2004) DOI: 10.1002/jsfa.1852.

Von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M.A., Mendoza-de-Gives, P., Valles-de la Mora, B., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Castillo-Gallegos, E. (2015). Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia spp.* *Veterinary Parasitology*. 214: 89-95.

Zabré G, Kaboré A, Bayala B, Katiki L. M, Costa-Junior L. M, Tamboura H. H., Adrien M.G. Beleme, Adibe L. Abdalla, Vincent Niderkorn, Hoste H, and Louvandini H. (2017). Comparison of the in vitro anthelmintic effects of *Acacia nilotica* and *Acacia raddiana*. *Parasite* 2017, 24, 44.

Zapata S R, Velásquez V R, Herrera O L V, Ríos O L, Polanco E D N. (2015). Prevalencia de Nematodos Gastrointestinales en Sistemas de Producción Ovina y Caprina bajo Confinamiento, Semiconfinamiento y Pastoreo en Municipio de Antioquia, Colombia. *Rev. Inv. Vet. Peru.*, 27 (2). Pag. 344-354.

X. CONCLUSIONES

En la actualidad existen evidencias de una variedad de plantas ricas en metabolitos secundarios (Taninos condensados e hidrolizables), que reducen las infestaciones parasitarias, lo esto nos indica una alternativa dentro de las estrategias para el control de las parasitosis que afectan principalmente a los pequeños rumiantes y es de mayor interés en un futuro debido a la alta resistencia a los antiparasitarios a nivel mundial.

La actividad ovicida y larvicida contra los nematodos gastrointestinales revelan en este estudio evidencias que los extractos de *Caesalpinia coriaria* posee actividad antihelmíntica contra *Haemonchus contortus*. Esta situación adquiere vital importancia en los sistemas productivos de pequeños rumiantes donde los forrajes de árboles y arbustos forman parte de la dieta de los animales, aportando nutrientes y compuestos secundarios que ayudan a mejorar el *estatus* nutricional y control parasitario. Es por ello que el uso de extractos esta especie evaluada puede representar una alternativa para el control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes.

XI. BIBLIOGRAFÍAS

1. Arispe E, Arriojas L, De Venanzi J (2008). Los taninos en las plantas forrajeras y estrategia adaptativa de rumiantes. Universidad central de Venezuela. <http://190.169.94.11:8080/jspui/bitstream/123456789/5527/1/arispe%20de%20venanzi.pdf>.
2. Arroyo LC., (2015). Efecto de recursos ricos en taninos sobre la biología y las comunidades de los parásitos gastrointestinales. Universidad autónoma de Madrid.
3. Asma -Hamed, H.M., Mohmed-Elimam, E., (2009). Effects of Rabaa ash alkali treatment of sesame straw on chemical composition and degradation in the rumen of Nubian goats. Pak. J. Nutr. 8, 1344–1348
4. Assis L M, Bevilaqua C M L, Morais S M, Vieira L S, Costa C T C, Souza J A L., (2003). Ovicida an larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* linn. Extracts on *Haemonchus contortus*. Veterinary parasitology. Vol. 117, issues 1-2. Pp. 42-49.
5. Avalos GA, Perez-urrial CE., (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (biología). Serie fisiológica Vegetal. 2 (3): 119.145.
6. Baldizan A, Dominguez C, Garcia DE, Chacon E, Aguilar L., (2006). Metabolismos secundarios y patrón de selección de dietas en el bosque decidui tropical de los llanos centrales venezolanos. Zootecnia Trop. Vol. 24 N°3.
7. Barrientos R I, Vargas R J J, Rodríguez R A, Ochoa R H G, Navarro A F, Zorrilla J., (2012). Evaluación de las características del fruto del huizache (*acacia farnesiana*) para su posible uso en curtiduría o alimentación animal. Madera y Bosques. Vol. 18. N° 3. Pp. 23-35.
8. Boubaker E R, Akkari H, B´chir F, Gharbi M, Mhadhbi M, Awadi S, Aziz D M., (2013). *Thymus capitatus* from Tunisian arid: chemical composition and *in vitro* antihelmintic effects on *Haemonchus contortus*. Veterinary parasitology. Vol. 197. Issues 1-2. Pp. 374.378.
9. Cab J F E., (2011). Morfología y potencial forrajero de leguminosas no convencionales, nativas de mexico, para la producción en pastoreo extensivo en el trópico. Colegio de posgraduados. Campus montecillo.
10. Camacho D L M, De Jesús R C O, Cipriano S M, Cruz L B., (2015). Taninos condados del cascalote (*Caesalpina coriaria jacq*) y su efecto sobre el contenido

- de ácido linoleico conjugado (CLA) en la leche de vacas de doble propósito. Medio Ambiente y Recursos Naturales. Vol. 1. N° 2.
11. Carranza M M, Sánchez V L, Pineda L R, Cuervas G R., (2003). Calidad y potencial forrajero de especies del bosque tropical caudifolio de las sierra de Manantlán, México. Agrocencias. Vol. 37. N° 2. Pp. 208-210.
 12. Carrion J A V, García G C R., (2010). Preparación de extractos vegetales determinación de eficiencia de metódica. Facultad de Ciencias Químicas de Ecuador.
 13. CEDAF (2015). *Caesalpinia coriaria*. árboles en la republica dominicana. http://www.cedaf.org.do/arboles_dominicanos/index_ncientifico.php?cientifico=Caesalpinia+coriaria
 14. CONABIO (1806). *Acacia farnesiana (L) Willd.* Species Plantarum. Ed.4 (2):1083-1084. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/38-legum4m.pdf
 15. CONABIO (2015). *Acacia farnesiana*. <http://naturalista.conabio.gob.mx/taxa/47446-Acacia-farnesiana>
 16. Delgado D C, Hera R, Cairo J, Orta Y., (2014). *Samanea saman*, árbol multipropósito con potencialidades como alimento alternativo para animales de interés productivo. Rev. Cubana de Ciencia Agrícola. Tomo 48. N° 3. Pp. 205-212.
 17. EFSA Journal (2014). Scientific Opinion on the safety and efficacy of tannic acid when used as feed flavouring for all animal species. <https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/FinRep-FAD-2010-0123.pdf>
 18. Escaray FJ., (2012). Taninos condensados en leguminosas del género *Lotus*: estudio de sus funciones biológicas y evaluación de su utilidad en el mejoramiento de la calidad forrajera de especies de importancia agronómica. Universidad de buenos aires.
 19. Escareño S L M, Wurzinger Mm, Pastor L F, Salinas H, Solkner J y Iniguez L., (2011). La cabra y los sistemas de producción caprina de los pequeños productores de la comarca Lagunera, en el norte de México. Rev. Chapingo. Vol. 17.
 20. Ferreira L E, Castro P M N, Chagas A C S, Franca S C, Belebóni R O., (2013). *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L.

- (*annonaceae*). Against *Haemonchus contortus*. Experimental parasitology. Vol. 134, issue 3. Pp. 327-332.
21. Finney, D. J., (1971). Probit Analysis, P. 318. 3rd Ed, Cambridge University Press, London, UK.
 22. Flores N M D J, Sánchez G A, Echeverría C G F, Gutiérrez L R, Rosales N A, Salinas G H. (2016). Producción y calidad de forrajes en mezclas de veza común con cebada, avena y triticale en cuatro etapas fenológicas. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 7 (3). Pp. 275.291.
 23. Forero E, Romero C., (2005). Estudios en leguminosas colombianas. Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales. Pp. 16-28.
 24. Frutos P, Hervás F. Giráldez J, Mantecón R., (2004). Review. Tannins and ruminant nutrition. Spanish journal of agricultural research. 2(2), 191-202.
 25. Galindo J, Delgado D, Pedraza R, García DE., (2005). Impacto de los árboles, los arbustos y otras leguminosas en la ecología ruminal de animales que consumen dietas fibrosas. Pastos y Forrajes. Vol. 28. N° 1. Pp. 59- 68.
 26. García D E y Medina G M., (2006). Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez arboles forrajeros. Zootecnia Trop. Vol. 24. N° 3.
 27. García D E, Medina M G, Humbria J, Domínguez C, Baldizan A, Cova L, Soca M., (2012). Composición proximal, niveles de metabolitos secundarios y valor nutritivo del follaje de algunos árboles forrajeros tropicales. Archivos de Zootecnia. Vol. 55. N° 212.
 28. García D E, Medina M G, Moratinos P, Cova L J, Torres A, Santos O y Perdomo D., (2009). Caracterización químico- nutricional de forrajes leguminosos y de otras familias botánicas empleando análisis descriptivo y multivariado. Avances en investigación Agropecuaria. 13(2).
 29. García D E, Medina M G., (2006). Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez arboles forrajeros. Zootecnia Trop. Vol. 24 (3).
 30. García D E., (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y Forrajes. Vol. 27. N°1. Pp. 1-12.

31. García D E., (2004). Principales factores antinutricionales de las leguminosas forrajeras y su forma de cuantificación. Pastos y Forrajes. Vol. 27. N°2.
32. Gonzales J F E., (2010). Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de CHIA (*Salvia hispánica*), mediante electroforesis capilar. Instituto Politécnico Nacional de México.
33. González R G, Cordero O J C, Torres H G, Arce G J, Mendoza de Gives P. (2010). Efecto del hipoclorito de sodio y extracto de cítricos en la reducción de la infestación con nematodos gastrointestinales resistentes a antihelmínticos en ovinos de pelo. Rev Mex Cienc Pecu 2010;1(2):179-187
34. Gurbuz Y., (2009). Efecto del contenido de taninos condensados de algunas especies de leguminosas en la emisión de gas metano. Rev. Cubana de Ciencias Agrícolas. Vol. 43, N° 3. Pp 265-272.
35. Hervás G., (2001). Los taninos condensados de quebracho en la nutrición de ovejas, efecto sobre la fermentación en el rumen y la digestibilidad, toxicidad y utilización como protectores frente a la degradación ruminal. Universidad de león y CSIC. Memoria. PP. 9-40.
36. Hussein I M A, Salem M Z M, Gohar Y M, El-Sayed A B, Sahmawy N A., (2012). Efficacy of Methanolic Extract and its Fractions of some Tree Species for Potential in Vitro Antibacterial Activity. International journal of agricultural and food research. Vol. 1 No. 1. Pp 12.27.
37. INIA., (1982). Diagnóstico de la problemática de cultivo de maíz en la región de tierra caliente (Guerrero y Michoacán). Mimoe. Cd. Altamirano Gro. Mex.
38. Jalali A R, Norgaard P, Weisbjerg M R Nielsen M O., (2012). Effect of forage quality on intake, chewing activity, faecal particle size distribution, and digestibility of neutral detergent fiber in sheep, goats, and llamas. Rev. Small Ruminant Research. Vol. 103. Pp. 143-151.
39. Kondo M, Hirano Y, ikai N, Kita K, Jayanegara A, Hiro-omi Y., (2014). Assessment of anti-nutritive activity of tannins in tea by-products base don *in vitro* rumen fermentation. Journal Animal Sciencie. Vol. 27. No. 11: 1571-1576.

40. Lorenz M M, Alkhafadji L, Stringano E, Nilsson S, Mueller- Harveyd I, Udena P., (2013). Relationship between condensed tannin structures and their ability to precipitate feed proteins in the rumen. Research Article.
41. Lu, D.C., Kawas, R.J. Mahgoub, G.O., (2008). Recent advancements in fiber digestion and utilization in goats, *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 9, 65–72.
42. Márquez L D, Suarez L A., (2008). El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. *Revista veterinaria*. N° 16. Pp. 1-16.
43. Martínez-valverde I, Periago MJ, Ros G., (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *ALAN*. Vol. 50. N° 1. Caracas. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00040622200000010001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
44. McSweeney C S, Palmer B, McNeill D M, Krause D O., (2001). Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science Technology*. 91. Pp. 83-93.
45. Mederos a, Montossi F, De Barbieri I, Cuadro R., (2004). Efecto de la utilización de leguminosas con taninos condensados en el manejo integrado de los parásitos gastrointestinales en ovinos: resultados preliminares. *Seminario Parasitología*. INIA Tacuarembó. Pp. 11-19.
46. Mora B I., (2007). *Nutrición Animal*. Editorial EUNED. Costa Rica. Pp. 21-24.
47. Narvaez N y Lazcano C E (2004). Caracterización química de especies arbóreas tropicales con potencial forrajero en Colombia. *Pasturas Tropicales*. 26 (3). pp. 1-8.
48. Nogueira S C., (2011). Suplementación con mezclas comerciales de taninos de quebracho y castaño en vacas lecheras. *Facultad de ciencias agrarias*. Universidad católica argentina. Pp. 6-22.
49. Noro M, Strieder B C, Reyes G, Weschenfelder M, Cucunubo LG, Sanchez J L., (2013). Respuesta metabólica y productiva de vacas lecheras en pastoreo suplementadas con taninos de quebracho (*Schinopsis balansae*). *Rev. Científica, FCV-LUZ*. Vol. XXII. N° 5.
50. NRC. (1987). Predicting feed intake of food. *Producing Animals*.

51. Oba M. Allen M S., (1999). Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: Effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows.
52. Olivares P, Avilés N F, Albarran P B, Rojas H S y Castelan O O A., (2011). Identificación, usos y medición de leguminosas arbóreas forrajeras en ranchos ganaderos del sur del Estado de México. Trop. Subtrop. Agroecosyt. Vol. 14. N° 2.
53. Otero MJ, Graciela H L., (2004). Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parásitos gastrointestinales. Livestock reserarch for Rural development 16 (2). <http://www.Irrd.cipav.org.col/Irrd16/2/oter1602.htm>
54. Palmar M J y Román L., (2001). Frutos de especies arbóreas leguminosas y no leguminosas para alimentación de rumiantes. II conferencias electrónicas sobre agroforesteria para la producción animal. America latina. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/y4435s/y4435s07.pdf>
55. Patra K A and Saxenab J., (2011). Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. Journal of the science of food and agricultura 91:24-37.
56. Piluzza G, Sulas L, Bullitta S., (2013). Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. John willey y sons ltd. Grass and Forage science. 10-11.
57. Pinto R, Ramírez L, Ku V J C, Ortega L., (2002). Especies arbóreas y herbáceas forrajeras del sureste de Mexico. Pastos y Forrajes. Vol. 24. N°3. Pp. 170-180.
58. Puerto M L S., (2012). Evaluación química de tres especies con potencial forrajero del trópico alto y medio. Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente zootecnia. Bogota.
59. Quiroz C F, Rojas H S, Olivares P J, Hernández C E, Jiménez G R, Córdova I A, Villa M A y Abdel F S., (2015). Composición nutricional, consumo e índice de palatabilidad relativa de los frutos de tres acacias en la alimentación de ovejas y cabras. Arc. Med. Vet. 47.
60. Quiroz C F, Rojas H S, Olivares P J, Jiménez G R, Gutiérrez S I y Valencia A M T (2014). Consumo de nutrientes de caprinos alimentados con bloques

- multinutricionales con frutos de acacias. XLI Reunión Nacional del Sistema Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A.C (AMPA).
61. Rojas H S, Olivares P J, Quiroz C F, Villa M A, Cipriano S M, Camacho D L, Reynoso P A., (2016). Diagnosis of the palatability of fruits of three fodders the in ruminants. ERA. 3 (7): 121-127.
 62. Romero L C E., (2000). Efecto de pastoreo con ovinos sobre la concentración de taninos condensados de *Gliricidia sepium* (jacq) Walp en el trópico seco. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia de colima.
 63. SAGARPA., (2001). Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Delegación Estatal en Guerrero de los Agostaderos del Estado de Guerrero.
 64. Salem, A. Z. M, Olivares, M., López, S., González-Ronquillo, M., Rojo, R, Camacho, L. M., Cerrillo, S. M. A, Mejía, H. P., (2011). Effect of natural extracts of *Salix babylonica* and *Leucaena leucocephala* on nutrient digestibility and growth performance of lambs. Animal Feed Science and Technology. 170: 27-34.
 65. SAS Institute (2006). SASUser'sGuide:Statistics.Ver 9.0.SASInstitute.Cary. 956 p.
 66. Scull I, Savon L., (2003). Determinación de polifenoles totales y taninos condensados en harina de forraje de cuatro variedades de *Vigna unguiculata*. Rev. Cubana de Ciencias Agrícolas. Vol. 37. N°4. Pp. 403-407.
 67. Soares de oliveira A, Detmann E, De Souza C M, Dos Santos P D, De Souza M S, Geraldo C M., (2011). Meta- analise do impacto da fibra em detergente neutra sobre o consumo, a digestibilidad e desempenho de vacas leiteras em lactacas. Re. Brasileira de Zootecnia. Vo. 40 No. 7 pp. 1587-1595.
 68. Tedesse E, Tedesse D, Gidav M., (2011). *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg- hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 137. Issue 1. Pp. 108.113.
 69. Tezén R P A., (2008). Determinación del contenido tánico en la corteza de cinco especies forestales aprovechadas en el aserradero de la asociación de cooperativas forestales de peten. Universidad de San Carlos de Guatemala.
 70. Torres A , Felipe de J J, Alonso-Díaz, Miguel A, Hoste H, Sandoval C C A, Aguilar C A J., (2008). Efectos negativos y positivos del consumo de forrajes ricos en taninos

- en la producción de caprinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. Vol. 9. N° 1. PP. 83-90.
71. Velásquez A J, Pérez G R, Velasco Z M E, Zaragoza M L y Rodríguez G G., (2005). Evaluación de vainas de quebracho (*acacia farnesiana*) en alimentación de ganado lanar. *Arc. Zootec.* 54.
72. Velásquez A.J, Gonzales M, Pérez G R, Borquez J y Domínguez I., (2011). Producción, digestibilidad y rentabilidad en corderos de dietas con vainas de *A. farnesiana*. *Arch. Zootec.* Vol 60 N°. 231.
73. Velázquez M M., (2013). Taninos de forrajes de árboles y su efecto en producción y calidad de la carne de bocino y ovino. Colegio de postgrados del Estado de México.
74. Villa M C I, Tena M M J, Ochoa S M, Val A D., (2014). Diez especies de arboles forrajeros utilizadas en la alimentación de ganado Cebú. <http://bmeditores.mx/diez-especies-de-arboles-forrajeros-utilizadas-en-la-alimentacion-de-ganado-cebu/>
75. Villa M C I, Tena M M J, Tzintzun R R L, Val A D., (2010). Evaluación de la digestibilidad de diferentes tipos de forrajes de dos regiones del estado de Michoacán. *Ciencia Nicolaita*. N°. Especial 2010.
76. Williams A R, Ropiak H M, Fryganas C, Desrues O, Mueller I H, Thamsborg S M., (2014). Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasites y vectores.* 7;518.
77. Zalacain A A., (2001). Estudios de extractos tánicos obtenidos a partir de hoja de zumaque (*Rhus coriaria* L). universidad castilla-la mancha.
78. Zamora S, García J, Bonilla G, Aguilar H, Harvey C A y Ibrahim M., (2001). Como utilizar los frutos de Guanacaste (*Enterolobium cylocarpum*), Guacimo (*Guazuma ulmifolia*), Genizaro (*Pithecellobium saman*) y Jicaro (*Crescentiana alata*) en alimentación animal.
79. Zapata S R, Gonzales A C, Mosquera C L N, Usuga T I Y, Polanco E D, Araque M P., (2013). Actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos oleosos de *Azadirachta indica* y extractos acuosos de *Nicotiana tabacum* sobre nematodos gastrointestinales de cabras. *Rev. Med. Vet.* No. 26 Bogotá.