



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

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

**EFFECTO NUTRICIONAL Y ANTIPARASITARIO DE DOS EXTRACTOS ACUOSOS DE
ARBOLES FORRAJEROS EN OVINOS**

TESIS

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

PRESENTA:

M en CARN AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México, Mayo de 2014.



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

EFECTO NUTRICIONAL Y ANTIPARASITARIO DE DOS EXTRACTOS ACUOSOS DE
ARBOLES FORRAJEROS EN OVINOS

TESIS

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

PRESENTA:

M en CARN AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ

TUTOR ACADÉMICO:

DR. ROLANDO ROJO RUBIO

TUTORES ADJUNTOS:

DR. ABDEL-FATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM

DR. ERNESTO MORALES ALMARAZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México, Mayo de 2014.

Derechos Reservados, Olmedo 2014®.

RESUMEN

Se utilizaron extractos acuosos liofilizados de *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce*, en una evaluación *in vitro* sobre la eclosión de huevecillos, desarrollo y migración larvaria de nemátodos gastrointestinales de ovinos. Los tratamientos fueron: 0, 125, 250 y 500 µg de TCL/ mL de cada extracto; control positivo (Levamisol 1 %, para eclosión de huevecillos y Albendazol 1 % para desarrollo y migración larvaria); control negativo (solución básica fosfatada: SBF y Dimetil sulfoxido: DMSO). Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y en la comparación de medias por la prueba de Tukey ($P < 0.05$). El extracto de *L. acapulcensis*, en todos sus niveles presentó mejor efecto de inhibición ($P < 0.05$) sobre la eclosión de huevecillos. En el desarrollo larvario ambos extractos mostraron efecto larvicida en los diferentes niveles ($P < 0.05$). En la migración larvaria, las dosis de 250 y 500 µg/ mL del extracto de *L. acapulcensis* respondieron igual al levamisol. El extracto de *P. dulce* presentó un efecto larvicida menor ($p \leq 0.05$) a levamisol y el extracto de *L. acapulcensis*.

Por otra parte, se determinó el valor nutricional *in vitro* e *in vivo* de una dieta basal para ovinos adicionando diferentes niveles de taninos condensados libres ($T_0=0$; $T_1= 2.5$; $T_2 = 5.0$ y $T_3=7.5$ g/ d), en forma de extracto liofilizado de hojas de Tepehuaje (*Lysiloma acapulcensis*). Para ambos ensayos se utilizaron las mismas dosis. La evaluación *in vitro* se determinó por producción de gas utilizando botellas de vidrio y para el ensayo *in vivo* se usaron 4 ovinos (60 ± 3 Kg de peso vivo), fistulados en rumen. Los datos fueron analizados mediante un diseño completamente al azar y cuadrado latino respectivamente. Para los resultados *in vitro*, se observaron diferencias significativas sobre los parámetros de fermentación ($P < 0.05$), en donde la asíntota de producción de gas (b) fue más alta en T_1 . En la tasa de producción de gas (c), los tratamientos T_2 y T_3 , presentaron los valores más bajos (0.03 h) en comparación a los del control (T_0) y T_1 (0.04). Sobre el gas producido, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las horas 24, 48 y 96 registrando los mayores volúmenes de gas la dieta que no contenía extracto (T_0). El contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y energía metabolizable (EM), se redujo en los en los tratamientos que contenían los diferentes niveles del extracto (2.97 mmol; 10.35 MJ, respectivamente). En el ensayo *in vivo* se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), sobre la digestibilidad aparente de la proteína cruda (DAPC), T_2 obtuvo los valores más altos (790 g/ Kg de MS). Por otra parte se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃), en las horas 0, 4, 20 y 24, siendo los tratamientos T_3 y T_0 con las concentraciones más bajas (9.5, 4.67, 6.91 y 6.89 mg/ dL, respectivamente). Las poblaciones de protozoarios fueron diferentes ($P < 0.5$) en los tratamientos que contenían extracto, en las horas 0, 4, 8 y 12 posteriores a la alimentación de los animales. Se concluye que, los extractos acuosos de

ambas especies presentaron efectos antiparasitarios, lo cual revela su potencial para el control de nemátodos gastrointestinales de ovinos criados bajo condiciones subtropicales. De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* e *in vivo* se deduce que la adición de TCL bajo estas dosis, mejoran la digestibilidad de la proteína cruda, aumentan los niveles de N-NH₃, disminuyen algunos parámetros de fermentación (AGCC y EM), así mismo tienen efecto estimulador sobre el crecimiento de los protozoarios ruminales, por lo tanto estas dosis podrían ser utilizadas como aditivos para ovinos en fase de crecimiento. No obstante se tienen que realizar más estudios a detalle para conocer a fondo el efecto, que tienen los TCL del extracto de *L. acapulcensis* sobre el metabolismo en los microorganismos del rumen.

SUMMARY

The used Lyophilized aqueous extracts of *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce*, on *in vitro* evaluation of hatching eggs, larval development and migration of gastrointestinal nematodes of sheep were used. The treatments were: 0, 125, 250 and 500 mg of TCL/mL of each extract; positive control (Levamisole 1% for hatching eggs and Albendazole 1% for larval development and migration), negative control (phosphate basic solution: PBS and dimethyl sulfoxide: DMSO). Data were analyzed by analysis of variance and comparison of means by Tukey test ($P < 0.05$). The extract of *L. acapulcensis*, at all levels provided better inhibition effect ($P < 0.05$) on the hatching of eggs. Larval development in both extracts showed larvicidal effect at different levels ($P < 0.05$). In larvae migration, doses of 250 and 500 mg/mL of extract of *L. acapulcensis* responded alike levamisole. The extract of *P. dulce* presented a larvicida lower ($P < 0.05$) that levamisole and *L. acapulcensis* extract.

Moreover, the *in vitro* and *in vivo* the nutritional value of a basal diet for adding different levels sheep condensed tannin free ($T_0=0$; $T_1= 2.5$; $T_2 = 5.0$ y $T_3=7.5$ g/d) nutritional value were determined in the form of lyophilized leaf extract Tepehuaje (*Lysiloma acapulcensis*). For both assay the same doses were used. The assessment was determined by *in vitro* gas production using glass bottles and the *in vivo* test 4 sheep (60 ± 3 kg BW) were used fistulated rumen. Data were analyzed using a completely randomized design and Latin square respectively. For the *results in vitro*, significant differences on fermentation parameters ($P < 0.05$), where the asymptotic gas production (b) was higher in T_1 were observed. The rate of gas production (c), the T_2 and T_3 treatments had the lowest values (0.03 h) compared to the control (T_0) and T_1 (0.04). About the gas produced, significant differences ($P < 0.05$) in the hours 24, 48 and 96 were found to record higher volumes of gas diet containing no extract (T_0). The content of short-chain fatty acids (SCFA) and metabolizable energy (ME), was reduced in the treatments containing different levels of the extract (2.97 mmol, 10.35 MJ, respectively). The *in vivo* assay significant differences ($P < 0.05$) on the digestibility of crude protein (DCP), were found T_2 obtained the highest values (790 g / kg DM). Moreover significant differences ($P < 0.05$) in the concentrations of ammonia nitrogen ($NH_3 - N$), in the hours 0, 4, 20 and 24, were observed to be the T_0 and T_3 treatments with lower concentrations (9.5, 4.67, 6.91 and 6.89 mg/ dL, respectively). Protozoa populations were different ($P < 0.05$) in the treatments containing extract, at hours 0, 4, 8 and 12 after the feeding of the animals. It is concluded that the aqueous extracts of both species had anthelmintic effects, revealing its potential for the control of gastrointestinal nematodes of sheep raised under subtropical conditions. According to the results obtained in *in vitro* and *in vivo* experiments it appears that the addition of

these low doses TCL improve digestibility of crude protein, increase the levels of N- NH₃, decrease some fermentation parameters (SCFA and ME), also have a stimulatory effect on growth of rumen protozoa, thus these doses may be used as additives for ovine growth phase. However you have to make more detailed studies to fully understand the effect, with the TCL from *L. acapulcensis* extract metabolism in the rumen microorganisms

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca que me otorgo durante mis estudios doctorales.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología COMECYT, por la beca otorgada para la impresión del presente trabajo de tesis.

A la Universidad Autónoma del Estado de México por brindarme cobijo durante estos tres años del doctorado.

A la Estación Experimental Indio Hatuey, Matanzas, Cuba, por brindarme sus instalaciones, para fortalecer mis conocimientos científicos.

Al Dr. Rolando Rojo por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Javier Arece por brindarme su apoyo incondicional para la realización de los experimentos *in vitro* de parasitología. GRACIAS AMIGO

Al Dr. Salem por su apoyo en la revisión de los trabajos científicos.

A mis amigos y compañeros, AGUSTIN, CESAR, CARLOS, URIEL, JHONATAN, DANIEL, JORGE, OMAR; gracias por su apoyo en la fase experimental de este trabajo.

INDICE DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1. Principales especies de tricostrongilos de los rumiantes y su localización en el tubo digestivo.	23
Cuadro 2. Dieta basal en base seca.	47

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Estructura base de un tanino hidrolizable.	17
Figura 2. Estructura química de subclases de flavonoides biológicamente activos.	18
Figura 3. Síntesis de los taninos condensados.	19
Figura 4. Representación esquemática del ciclo biológico de los strongílidos gastrointestinales de pequeños rumiantes.	24
Figura 5. Escala utilizada para diagnosticar el grado de anemia debido a los nemátodos gastrointestinales.	33
Figura 6. Uso adecuado de la carta Famacha para diagnosticar a los animales que necesitan desparasitarse.	33
Figura 7. Esquema para conteo fecal de huevecillos de nemátodos gastrointestinales.	33

ABREVIATURAS

ABZ	Albendazol
AQP	Análisis químico proximal
AHs	Antihelmínticos
DIVMO	Degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica
DIVMS	Degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia seca
DMSO	Dimetilsulfóxido
°C	Centígrado
CFH	Conteo fecal de huevecillos
D	Densidad
EM	Energía metabolizable
E/S	Excreción- secreción
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
G	Gramo
H	Hidrogeno
H	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
Kg	Kilogramo
kDa	Kilo Dalton
L ₁	Larva de primer estadio
L ₂	Larva de segundo estadio
L ₃	Larva de tercer estadio o infestiva
L ₄	Larva de cuarto estadio
LA	<i>Lysiloma acapulcensis</i>
LV	Levamisol
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
NaOH	Hidróxido de sodio
NGI	Nematodos gastrointestinales
OH	Hidroxilos
PBS	Solución básica fosfatada
PC	Proteína cruda
PEH	Prueba de eclosión de huevos
PD	<i>Pithecellobium dulce</i>
PML	Prueba de migración larvaria
TC	Taninos condensados
TCF	Taninos condensados ligados a la fibra
TCP	Taninos condensados ligados a la proteína
TCT	Taninos condensados totales
TH	Taninos hidrolizables
TL	Tanino libre
S ₅	Larva de quinto estadio o estado pre- adulto
μL	Micro litro
VCA	Volumen celular aglomerado

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIAS	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE CUADROS	viii
ABREVIATURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA	14
2.1. Uso de los extractos en la dieta de los rumiantes	14
2.2. Origen de los compuestos secundarios	15
2.3. Los fenoles y polifenoles	16
2.4. Taninos	16
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas	16
2.4.1.1. Solubilidad	16
2.4.1.2. Enlaces con las proteínas	17
2.4.2. Clasificación de los taninos	17
2.4.3. Síntesis de los taninos condensados	19
2.4.4. Proantocianidinas	20
2.5. Mecanismos de acción de los herbívoros que consumen plantas ricas en metabolitos secundarios	21
2.6. Los nematodos gastrointestinales de los rumiantes (NGI)	22
2.6.1. Características morfológicas	23
2.6.1.1. Tracto digestivo	23
2.6.1.2. Sistema nervioso	23
2.6.1.3. Aparato excretor	24
2.6.2. Ciclo biológico	25
2.6.3. La fase de vida libre	26
2.6.4. La fase parasitaria	26
2.6.5. Biología de las larvas infestantes	27
2.7. Consecuencias de los estrongilosis gastrointestinales en los rumiantes	28

2.7.1. Cuadro clínico de los estrongílicos gastrointestinales	28
2.7.2. Mecanismos fisiopatológicos y patogénicos	28
2.7.3. Impacto sobre las producciones	29
2.8. Efectos de los NGI sobre la fisiología digestiva	29
2.8.1. Disminución de la ingestión	29
2.8.2. Mala digestión y mala absorción	29
2.8.3. Modificaciones y reorientaciones del metabolismo.	30
2.8.4. Los mecanismos patogénicos	31
2.9. Los efectos mecánicos	31
2.10. Efectos de los productos de excreción-secreción	31
2.11. Estrategias del control integrado de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes en sistemas de producción extensivos subtropicales	32
2.11.1. Control parasitario mediante la epizootiología	32
2.11.2. Examen microscópico de las heces	34
2.12. Papel de los factores zootécnicos en las parasitosis y su control	35
2.13. Métodos alternativos al uso de los antihelmínticos (AHs)	36
2.13.1. Reducir las fuentes de contaminación de los animales	36
2.13.2. Mejorar la resistencia de los hospederos	37
2.13.3. La vacunación	37
2.13.4. La selección de animales genéticamente resistentes	38
2.13.5. Plantas con propiedades antihelmínticas	38
III. JUSTIFICACIÓN	41
IV. HIPÓTESIS	42
V. OBJETIVOS	43
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	44
6.1. Experimento 1	44
6.1.2. Zona de estudio	44
6.1.3. Preparación de los extractos	44
6.1.4. Análisis químico proximal (AQP) y determinación de taninos condensados.	44
6.1.5. Tratamientos y diseño experimental.	45
6.1.6. Prueba de eclosión de huevos (PEH).	45
6.1.7. Prueba de desarrollo larvario (PDL).	45
6.1.8. Prueba de migración larvaria (PML).	46

6.1.9. Análisis de los datos.	46
6.2. Experimento 2	46
6.2.1. Efecto del extracto de <i>Lysiloma acapulcensis</i> sobre la digestibilidad de los nutrientes y parámetros de fermentación en ovinos.	46
6.2.2. Zona de estudio	46
6.2.3. Preparación de los extractos	47
6.2.4. Tratamientos	47
6.2.5. Experimento <i>in vitro</i>	47
6.2.5.1. Degradabilidad de la materia seca, cinética de degradación y parámetros de fermentación	48
6.2.6. Experimento <i>in vivo</i>	48
6.2.6.1. Animales y tratamientos	48
6.2.6.2. Colecta de muestras de heces	49
6.2.6.3. Colecta de líquido ruminal	49
6.2.6.4. Análisis de los datos	49
VII. RESULTADOS	50
7.1. Artículo 1. <i>In vitro</i> activity of <i>Pithecellobium dulce</i> and <i>Lysiloma acapulcensis</i> on exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep	50
7.2. Digestibilidad y parámetros de fermentación ruminal en ovinos recibiendo diferentes niveles de taninos condensados libres de <i>Lysiloma acapulcensis</i> .	57
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	84
8.1. Extractos de <i>L. acapulcensis</i> y <i>P. dulce</i> como antihelmínticos	84
8.1.1. Eclosión de huevecillos	84
8.1.2. Desarrollo y migración larvaria	84
8.2. Efecto nutricional del extracto de <i>L. acapulcensis</i>	86
8.2.1. Degradabilidad de la materia seca y orgánica, parámetros de fermentación y producción de gas	86
8.2.2. Digestibilidad de los nutrientes	87
8.2.3. Nitrógeno amoniacal (N-NH ₃)	88
8.2.4. Protozoarios	88
IX. CONCLUSIÓN GENERAL	89
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	90

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que presentan los pequeños rumiantes en regiones de clima tropical bajo condiciones de sistema extensivo es de estado nutricional y parasitológico. Diferentes plantas arbóreas de los géneros *Acacia*, *Lysiloma* (Martínez-Ortiz de-Montellano *et al.*, 2010), *Salix*, *Leucaena* (Jiménez Peralta *et al.*, 2011) han demostrado que pueden producir beneficios nutracéuticos en rumiantes; a pesar de que existe evidencia sobre los efectos nocivos de los mismos en los animales (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005). No obstante, los beneficios o efectos negativos van a depender de múltiples factores, tales como su concentración y la estructura química de los compuestos secundarios de la planta. Por ejemplo, los taninos hidrolizables son más tóxicos que los taninos condensados, debido a su rápida absorción. En lo que se refiere a problemas de tipo parasitario que tienen los rumiantes en este tipo de clima, se ha observado la prevalencia de nemátodos gastrointestinales (NGI), principalmente *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, que son resistentes a los antihelmínticos tradicionales (Arece *et al.*, 2004). El uso de extractos de plantas que contienen alta cantidad de compuestos secundarios ha demostrado ser una opción para el control de NGI. Dentro de estos compuestos secundarios, se tienen a los taninos condensados libres (TCL) a los cuales se les atribuye la función antiparasitaria (Alonso-Díaz *et al.*, 2008; Martínez-Ortiz de-Montellano *et al.*, 2010). El efecto de los taninos condensados en el control de NGI se ha evaluado *in vitro* e *in vivo*. Extractos de diversas plantas han inhibido la migración larvaria, disminuido la excreción de huevos en heces y disminuido la fertilidad de las hembras adultas (Hoste *et al.*, 2006; Brunet *et al.*, 2008). Alonso- Díaz *et al.* (2008), evaluaron la acción antihelmíntica de *Lysiloma latisiliquum* observando efecto directo sobre *H. contortus* y *T. colubriformis* en el establecimiento larvario, inhibición del desvaine e inhibición de la migración larvaria. Otras especies como *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce*, han sido evaluadas desde el punto de vista nutricional, a pesar de presentar alto contenido de compuestos secundarios, entre ellos los taninos condensados (Camacho *et al.*, 2010), por lo que resulta interesante evaluarlas desde el punto de vista antihelmíntica y nutricional, mismo que fue la esencia de la presente investigación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Uso de los extractos en la dieta de los rumiantes

En la actualidad existen diversos aditivos que son utilizados en las dietas de los rumiantes, para mejorar su productividad y salud. Considerando, que el término aditivo incluyen sustancias tan diversas como antibióticos, vitaminas, minerales, antioxidantes, enzimas y extractos de plantas, entre otros (Cardozo, 2004). Dentro del grupo de los antibióticos están aquellos que se utilizan como promotores de crecimiento (monensina sódica, lasolacida y salinomicina), debido al uso indiscriminado de estos aditivos, ha generado un aumento de la resistencia de las bacterias y otros organismos patógenos, provocando así una reducción en la eficacia de estos productos para combatir enfermedades (Kamel, 2001). Debido al uso inadecuado de los antibióticos en diversos países del mundo se ha prohibido su uso como aditivo en la producción animal.

Hoy en día, el éxito de la producción animal sin poner en peligro su bien estar y salvaguardando la seguridad sanitaria del consumidor dependerá en un futuro inmediato, de la inclusión en el alimento de componentes que mejoren la productividad y que sean considerados seguros para el consumo humano. Una alternativa, es el uso de sustancias naturales extraídas de las plantas que no solo proporcionen una simple respuesta a la reducción de la eficacia productiva como consecuencia de la prohibición de los aditivos sintéticos, sino que aporten soluciones sin riesgo de toxicidad, ni residuos en el producto final, ni de resistencias microbianas a los antibióticos (Losa, 2000).

En la última década existe un creciente interés en explorar los productos naturales como aditivos para incorporarlos en las raciones de los animales con la finalidad de modificar la eficiencia de la utilización de los nutrientes y mejorar la producción. Muchas especies de plantas producen metabolitos secundarios que les sirven como sistema de defensa frente a enfermedades, parásitos e insectos (Harbone *et al.*, 1999). Diversos metabolitos secundarios son utilizados en medicina humana y por la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos (Shapiro *et al.*, 1994). Existe evidencia del uso de extractos con presencia de compuestos secundarios (taninos, saponinas, terpenos, etc.), mejoran la eficiencia del metabolismo de los nutrientes, reducción en la producción de metano en el rumen y protección de las proteínas por la degradación de las bacterias ruminales (Jiménez *et al.*, 2011).

2.2. Origen de los compuestos secundarios

Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos que conducen a la formación de compuestos primarios tales como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, proteínas y lípidos que son parte del proceso vital de la planta. Así mismo algunos grupos taxonómicos han desarrollado sustancias o compuestos denominados metabolitos secundarios. Sin embargo, debido a que los metabolitos secundarios se derivan biosintéticamente de ciertos compuestos primarios y que, en cada caso, el precursor es utilizado también para la biosíntesis de otros metabolitos primarios. Tradicionalmente, los metabolitos secundarios se han considerado como sustancias de desecho carentes de una función específica (Curtin *et al.*, 1991). Algunas de estas sustancias, sirven a la planta como mecanismo de defensa frente a microorganismos, insectos y/o herbívoros. Entre otros casos proporcionan el olor característico a la planta o son responsables de la pigmentación (quinonas) (Schmid, 1982), el sabor (aceites esenciales), o de actividades anti fúngicas, antibacterianas (ácidos fenólicos y fenoles simples) y antivíricas (Van Soest, 1982; Wild, 1994).

Los extractos naturales de plantas contienen sustancias químicas que actúan de diversas maneras sobre la fisiología y el metabolismo de los animales. Estos representan una alternativa ante la prohibición de los aditivos de origen sintético. Entre ellos se encuentran ligninas, fenoles, alcaloides, taninos, aceites esenciales, saponinas y esteroides (Cowan, 1999).

En el metabolismo primario sintetizan pequeñas moléculas (ácido siquímico, acetato, aminoácidos) que constituyen el punto de partida de las rutas del metabolismo secundario. Por ejemplo, la ruta del ácido siquímico da origen a muchos compuestos aromáticos (aminoácidos aromáticos, ácidos cinámicos y ciertos polifenoles). El acetato es precursor de los ácidos grasos y de los policétidos a través de la ruta del acetato-malonato, y de terpenos o isoterpenoides a través de la ruta acetato-mevalonato. Los aminoácidos son precursores de los alcaloides y de antibióticos peptídicos que incluyen las penicilinas y cefalosporinas (Piñol *et al.*, 2000).

Los extractos naturales que pueden tener efectos sobre la fermentación ruminal, contienen grupos fenólicos, terpenos o aminoácidos aromáticos de manera individual. Sin embargo pueden estar asociados con otros compuestos secundarios como alcaloides, taninos o cumarinas, entre otros (Cowan, 1999).

2.3. Los fenoles y polifenoles

Los fenoles y polifenoles son los metabolitos más simples, compuestos de un anillo aromático al que se unen diversos grupos sustituyentes como hidroxilos, carboxilos y metoxilos (Cowan, 1999). 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). La gran cantidad de grupos hidroxilo hace que los fenoles sean muy reactivos, proporcionándoles numerosos puntos de anclaje para formar puentes de hidrogeno, formando así asociaciones reversibles con otras moléculas. Los fenoles tienen mayor afinidad por las proteínas debido a la fuerte tendencia a formar puentes de hidrogeno entre los grupos hidroxilo de los fenoles y el oxígeno del grupo carbonilo de los péptidos (Van Soest, 1982). Además, se atribuye a la mayoría de los compuestos fenólicos propiedades antimicrobianas, antioxidantes y terapéuticas (Helander *et al.*, 1998; Davidson y Naidu, 2000), actuando como desacopladores de la membrana celular externa y provocando así un gasto de ATP intracelular hasta el punto de provocar la muerte celular (Davidson y Naidu, 2000).

2.4. Taninos

Los taninos son un conjunto de componentes naturales que producen algunas plantas capaces de vincularse principalmente con las proteínas en menos intensidad con algunos iones de metal, aminoácidos y polisacáridos (Makkar *et al.*, 2007; Rochfort *et al.*, 2008). Los taninos forman parte de la fuerte interacción bioquímica entre la mayoría de las plantas contra herbívoros, bacterias, hongos e insectos (Eck *et al.*, 2001; Heil *et al.*, 2002).

2.4.1. Propiedades fisicoquímicas

2.4.1.1. Solubilidad

Son solubles en agua y su solubilidad depende del peso molecular y el grado de polimerización (Bruneton, 1999). También son solubles en acetona y alcohol, por esta razón la extracción de los taninos es normalmente a través de una solución acetona-agua o metanol-agua (Makkar, 2000).

2.4.1.2. Enlaces con las proteínas

Los taninos libres se fijan a casi la totalidad de las proteínas, formando así complejos insolubles al pH fisiológico (pH 7.4). Además de formar vínculos directos con las proteínas, los taninos establecen puentes entre las proteínas (formando puentes de hidrogeno entre sus grupos hidroxilo y los sitios electronegativos de la proteína) lo que produce la precipitación de las mismas (Zimmer y Cordesse, 1996).

No obstante, el grado de unión entre los taninos y las proteínas depende de la estructura y de la configuración de las moléculas implicadas (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Waterman, 1999; Poncet-Legrand *et al.*, 2006). En cuanto a los taninos, un peso molecular alto y un impedimento estérico, no le permitiría fijarse a las proteínas (Hagerman, 1992; Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992). La unión de la proteína depende igualmente de la naturaleza química de los taninos (Bravo, 1998; Bennick, 2002). En el caso de las proteínas, los taninos son muy afines a las proteínas de conformación abierta, de un peso molecular superior a los 20 kDa y ricas en aminoácidos como la prolina y la hidroxiprolina (Hagerman, 1992; Zimmer y Cordesse, 1996; Clauss *et al.*, 2005). Además, la precipitación de las proteínas se ve favorecida en pH isoeléctrico de las proteínas implicadas (Hagerman, 1992; Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Zimmer y Cordesse, 1996).

2.4.2. Clasificación de los taninos

De acuerdo a su biología los taninos se clasifican en hidrolizables (TH) y condensados (TC) o proantocinidinas. Sin embargo, esta clasificación es convencional y simplista. Los TH consisten en un núcleo central de carbohidrato, al cual se unen ácidos fenólicos carboxílicos mediante enlaces éster. Estos últimos son ésteres de azúcares de ácidos gálico o elágico (Figura 1). Estos taninos pueden ser fácilmente hidrolizados con ácidos, álcalis, agua caliente o enzimas (Makkar, 2006). A los TH, se les atribuyen los principales efectos negativos en los rumiantes que los consuman, provocando intoxicación, que afecta hígado y riñones, pudiendo ocasionar la muerte (Waghorn y McNabb, 2003). Sin embargo también se ha reportado que los TH mejoran la absorción de los nutrientes (Lowry *et al.*, 1996), tienen amplia actividad biológica y farmacológica (Okuda, 2005) e incluso son más potentes como agentes biológicos que los taninos condensados (Haslam, 2007).

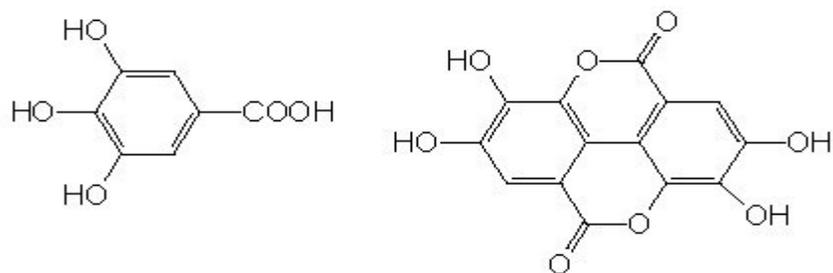


Figura 1. Estructura base de un tanino hidrolizable (Makkar, 2006)

Los TC, son polímeros resultantes de la condensación de Flavonoles-3 (polifenoles). Los flavonoles forman flavonoides que son componentes naturales de las plantas. Más de 4,000 flavonoides han sido aislados de plantas briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas. La mayoría de las plantas vasculares contienen flavonoides (Aoki *et al.*, 2000). Los flavonoides, se clasifican en diversas subclases como las chalconas, flavononas, flavones, dihidroflavones, flavonoles, antiocinidinas y proantocinidinas (unidades de catequinas que forman taninos condensados). Los flavonoides pueden sufrir modificaciones en su estructura, formando así otros compuestos como los isoflavones y neoflavones, dando origen a ambas partes de los flavonoides (figura 2). Los TC consisten en oligómeros de dos o más flavan-3-oles, tales como la catequina epicatequina o la correspondiente galocatequina. Dependiendo de su estructura química de la unidad monómerica, en particular del número de radicales hidroxilo, son clasificados en cuatro grupos, los dos más comunes son las procianidinas y prodelfinidinas (Makkar, 2006). La combinación de los grupos OH y H con los radicales de la molécula química, producen una gran variedad de estructuras químicas, que a su vez, afectan las propiedades físicas y biológicas de los TC (Min y Hart, 2002).

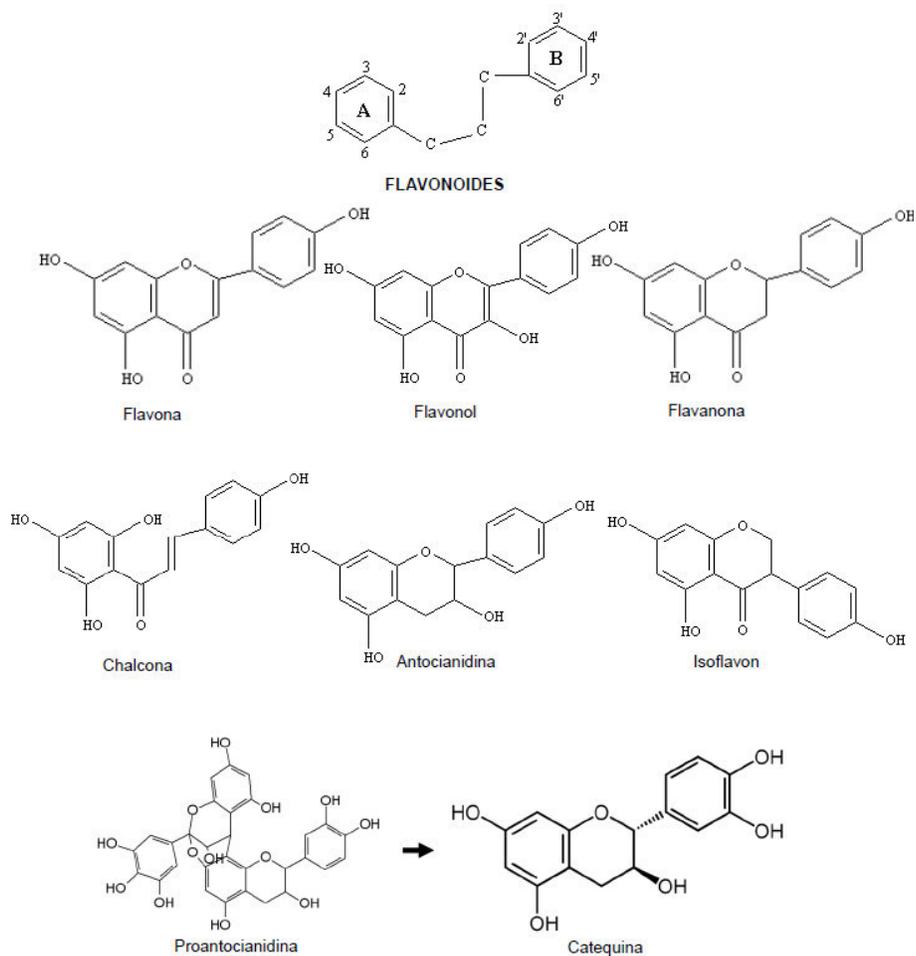


Figura 2. Estructura química de subclases de flavonoides biológicamente activos (Aoki *et al.*, 2000)

2.4.3. Síntesis de los taninos condensados

La formación de los TC implica flavan-3,4-diols que son moléculas muy reactivas. Estos flavan-3,4-diols pasan carbocationes que reaccionan sobre los carbonos nucleofílicos en la posición 8 ó 6 de un flavan-3-ol (Bruneton, 1999; Schofield *et al.*, 2001). Biogenéticamente, los flavan-3-óls y los TC son parte de la vía metabólica de un fenilpropanoide (Weisshaar y Jenkins, 1998), que conducen igualmente a la síntesis de flavonoides (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Bruneton, 1999). Sin embargo, sí bien la biosíntesis de los flavonoides es conocida, las etapas de condensación y de polimerización de los TC aún nos son del todo bien definidas (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992; Hagerman, 2002). Los precursores de la síntesis de flavonoides son la fenilalanina y el acetato (Mueller-Harvey y Mc Allan, 1992). Las primeras etapas de la síntesis de los flavan-3-óls son comúnmente las antocianinas y tendrán lugar en el citoplasma, la maduración y polimerización de

los TC tendrá lugar en la vacuola (Figura 3) de las células vegetales (Aerts *et al.*, 1999; Waghorn, 2008).

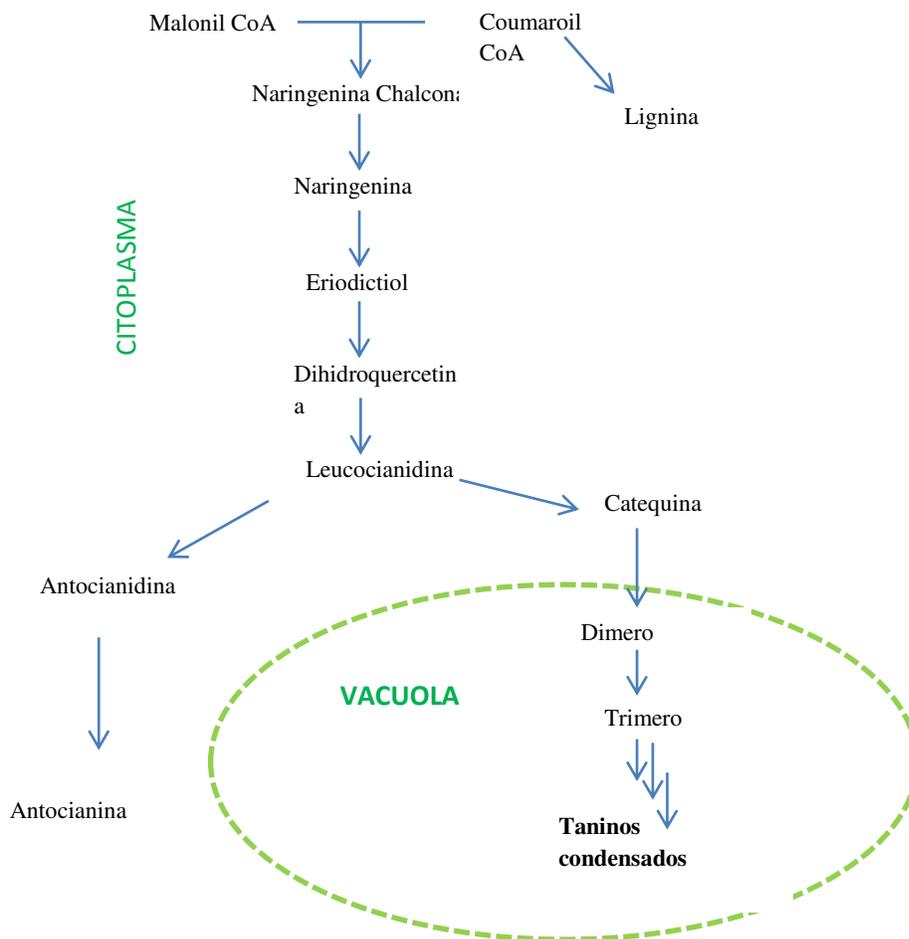


Figura 3. Síntesis de los taninos condensados, en las plantas (Aerts *et al.*, 1999; Waghorn, 2008)

2.4.4. Proantocianidinas

Las proantocianidinas son polímeros de las unidades flavan-3-ol, con variaciones en su estructura que dependen del tipo de especie (Molan *et al.*, 2003). Investigaciones recientes han demostrado que las proantocianidinas de diferentes forrajes pueden inhibir el crecimiento y división celular de los microorganismos del rumen con efectos adversos sobre la salud del animal, observándose un decremento en el consumo voluntario (Molan *et al.*, 2001; Priolo *et al.*, 2005). El efecto de las proantocianidinas depende de su concentración en la dieta.

Cuando el alimento contiene concentraciones entre 20-40 g/kg de MS en la dieta de los rumiantes se ha observado incrementos significativos sobre la eficiencia en la respuesta productiva (Nguyen *et al.*, 2005). Se ha demostrado, que pequeñas cantidades de proantocianidinas incrementa la disponibilidad de proteína de sobrepeso en el intestino delgado (Min *et al.*, 2003). Así mismo, cuando los niveles de proantocianidinas son mayores a 50 g/kg de MS, se observan efectos antinutricionales, (por ejemplo depresión en el consumo voluntario) y a nivel ruminal afectan el metabolismo de los nutrientes principalmente la degradación de la proteína (Nguyen *et al.*, 2005). A esos niveles las proantocianidinas se ligan con altas cantidades de proteína en el rumen lo cual resulta una baja degradación y absorción de aminoácidos en el rumen, afectando el consumo voluntario del animal (Priolo *et al.*, 2000).

2.5. Mecanismos adaptativos en los herbívoros que consumen plantas con metabolitos secundarios

En los herbívoros, se han desarrollado adaptaciones fisiológicas y etológicas que han permitido reducir el efecto perjudicial de los compuestos secundarios (Provenza *et al.*, 1990; Provenza, 1995). Al mismo tiempo, su peculiaridad, tanto intraespecífica como interespecífica, ha provocado que estos animales reaccionen de forma diversa ante las dosis (Duncan *et al.*, 1997) o compuestos tóxicos distintos (Cheeke y Palo, 1995).

Numerosas especies de animales silvestres o domésticos (rumiantes en pastoreo) basan su alimentación en plantas con un elevado contenido de taninos (arbustos, árboles) y prácticamente en todas ellas, se ha reportado que en la saliva se encuentran proteínas ricas en prolina (Robbins *et al.*, 1987). Este tipo de proteínas muestran alta afinidad por los taninos formando complejos solubles tanino-proteína (Austin *et al.*, 1989; Pérez- Maldonado *et al.*, 1995), que, al contrario de los demás complejos tanino proteína, son estables en el rango de pH del aparato gastrointestinal (Austin *et al.*, 1989), lo que contribuiría a anular el efecto adverso de los taninos en la palatabilidad y, por tanto, en la ingestión del alimento, y en el proceso digestivo subsiguiente (Robbins *et al.*, 1991; Cheeke y Palo, 1995). Aunque la extensión e incidencia de las proteínas ricas en prolina en la defensa de los herbívoros frente a los taninos no parece estar muy clara (Mole *et al.*, 1990), resulta indudable que la ingestión de plantas con altos contenidos en taninos desencadena cambios morfológicos y bioquímicos en las glándulas parótidas conducentes a la producción de dichas proteínas (Mehansho *et al.*, 1992; Silanikove *et al.*, 1996).

Las diferencias interespecíficas son claramente manifiestas en este terreno. Se cree, por ejemplo, que las cabras deben tener algún otro tipo complementario de mecanismo detoxificador de los taninos ya que no presentan ninguna consecuencia lesiva, a pesar de sus conocidos hábitos ramoneadores en arbustos y árboles con alto contenido en taninos y de no secretar, de modo específico, proteínas ricas en prolina en su saliva (Cheeke y Palo, 1995).

Un posible medio detoxificador sería el rumen, en el cual se ha identificado una cepa de la bacteria *Selenomonas ruminantium* subsp. *ruminantium* provista de enzimas con actividad tanino acilhidrolasa y, por ello, capaz de crecer en medios con ácido tánico o taninos condensados como única fuente de energía (Skene y Brooker, 1995), si bien, es probable que sea necesario un consorcio de microorganismos para metabolizar los taninos (Skene y Brooker, 1995). En efecto, el medio ruminal representa un lugar eficiente de detoxificación para un amplio rango de compuestos secundarios de las plantas (terpenos, fenoles, ácidos, etc), de modo que la toxicidad de las plantas consumidas por los rumiantes puede ser modificada significativamente después de los cambios químicos sufridos por los compuestos potencialmente tóxicos en el rumen (Duncan y Milne, 1992; Domínguez-Bello, 1996). La composición de la población microbiana del rumen es dinámica y puede diferir sensiblemente entre especies, entre poblaciones, a lo largo del tiempo, y como adaptación a la ingestión de determinados compuestos en la dieta. Esto puede, evidentemente, tener una importante influencia en la transformación de los compuestos secundarios y, por ende, en la toxicidad de los alimentos. De hecho, las diferencias interespecíficas en las reacciones metabólicas han sido señaladas como uno de los factores responsables de las diferencias interespecíficas en la selección y preferencia de la dieta (Kronberg y Walker, 1993).

2.6. Los nematodos gastrointestinales de los rumiantes (NGI)

Los nematodos gastrointestinales son gusanos que se encuentran extensamente distribuidos en una gran variedad de *hábitats*. Algunos tienen vida libre, otros son parásitos de plantas y de animales vertebrados o invertebrados. Los NGI de los animales domésticos, tienen gran importancia económica, debido a la frecuencia y elevada morbilidad con que se presentan en las diferentes especies. Generalmente tienen carácter crónico y la mayoría interfiere con un buen crecimiento (Quiroz, 2012).

2.6.1. Características morfológicas

La cutícula es una estructura acelular secretada por la capa de las células que están inmediatamente debajo (hipodermis). La cutícula está formada por varias capas cuyo número varía de acuerdo con la especie de que se trate; está compuesta de proteínas como la albumina, matricina, colágena, queratina y glicoproteínas.

La hipodermis es una delgada capa con cuatro engrosamientos tubulares, denominados cordón dorsal, dos laterales y uno ventral. Contiene células que secretan las capas de la cutícula.

El sistema muscular está formado por dos tipos de músculos especializados y no especializados o somáticos, estos ocupan una posición próxima a la hipodermis de las áreas entre los cordones, formando una sola capa de células que tienen un importante papel en los movimientos del cuerpo. Según la manera, aspecto y forma en que se agrupan estas células, los nematodos son polimíarios, meromíarios y holomíarios (Quiroz, 2012).

2.6.1.1. Tracto digestivo

Está formado por estructura tubular e inicia por la apertura oral, situada en el extremo anterior del nemátodo. Puede presentar labios o no; los cuales, varían en número y posición según la especie. La boca es la primera parte del aparato digestivo, cápsula bucal o faringe. Tanto la boca como el esófago están cubiertos por una capa de cutícula (Quiroz, 2012).

2.6.1.2. Sistema nervioso

Lo integran los ganglios en la región del esófago con interconexiones que forman una serie de anillos alrededor del mismo y cordones nerviosos longitudinales en número de seis anteriores y cuatro posteriores que están intercomunicados. Tienen terminaciones nerviosas en las papilas, actuando como órganos sensoriales (Quiroz, 2012).

2.6.1.3. Aparato excretor

El aparato o sistema excretor tiene función osmoreguladora; está formado por canales laterales que se unen para formar un conducto excretor con una o dos glándulas excretoras.

Los nemátodos, parásitos del tubo digestivo en los rumiantes domésticos, comúnmente conocidos como estróngilos gastrointestinales, constituyen la mayor patología de estos animales en pastoreo. Estos nemátodos pertenecen a dos familias distintas del orden Strongyloidea: Los Trihostrongyloidea (principales géneros: *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Cooperia*, *Trichostrongylus* y *Nematodirus*) y los Strongyloidea (género: *Oesophagostomum*) (Urquhart *et al.*, 1996)

Cuadro 1. Principales especies de tricostrongilos de los rumiantes y su localización en el tubo digestivo.

Sub Familia	Especies	Localización en el hospedero	Hospederos
Haemonchinae	<i>Haemonchus contortus</i>	Abomaso	Ovinos y caprinos
	<i>Haemonchus placei</i>		Bovinos
	<i>Haemonchus longistipes</i>		Dromedarios
Trichostrongylinae	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Intestino delgado	Ovinos, caprinos y bovinos
	<i>Trichostrongylus axei</i>	Abomaso	Ovinos, caprinos, bovinos, cerdos y caballos
Ostertagiinae	<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	Intestino delgado	Ovinos y caprinos
	<i>Trichostrongylus capricola</i>	Intestino delgado	Ovinos y caprinos
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	Abomaso	Ovinos y caprinos
	<i>Ostertagia ostertagi</i>		Bovinos
	<i>Ostertagia occidentalis</i>		Ovinos
Cooperiinae	<i>Ostertagia trifurcata</i>	Intestino delgado	Ovinos y caprinos
	<i>Cooperia curticei</i>		Ovinos y caprinos
	<i>Cooperia oncophora</i>		Bovinos
Nematodirinae	<i>Cooperia punctata</i>	Intestino delgado	Bovinos
	<i>Nematodirus battus</i>		Ovinos y bovinos
	<i>Nematodirus helvetianus</i>		Bovinos
	<i>Nematodirus spathiger</i>		Ovinos, caprinos y bovinos
Oesophagostominae	<i>Nematodirus fillicolis</i>	Ciego y colon	Ovinos y caprinos
	<i>Oesophagostomum venulosum</i>		Ovinos y caprinos
	<i>Oesophagostomum columbianum</i>		Ovinos y caprinos
Chabertiinae	<i>Oesophagostomum radiatum</i>	Colon	Bovinos y búfalos
	<i>Chabertia ovina</i>		Ovinos, bovinos y caprinos

Urquhart *et al.*, 1996

Los estróngilos gastrointestinales son las especies más importantes en los diversos órganos del sistema digestivo en los animales domésticos.

Los NGI tienen una distribución mundial con el predominio variable de especies según las grandes zonas climáticas. En zonas templadas los géneros de Trichostrongilos más frecuentes en los sistemas de producción de pequeños rumiantes son *Teladorsagia* spp: *T. circumcincta*, *T. trifurcata* (especies abomasales), *Trichostrongylus* spp: *T. colubriformis*, *T. vitrinus*, *T. capricola* (especies abomasales o del intestino) y *Cooperia* spp: *C. curticei*, *C. oncophora*, *C. punctata* (especies intestinales) (Chartier y Reche, 1992; Gasnier *et al.*, 1997; O'connor *et al.*, 2006). *Haemonchus contortus*, que es la especie más patógena del abomaso, es menos frecuente en zonas templadas; en Francia, por ejemplo, aparece en aproximadamente el 40% de las unidades de producción de pequeños rumiantes (Chartier y Reche, 1992).

Lo inverso ocurre en zonas tropicales y subtropicales, donde *H. contortus* es la especie de mayor incidencia y prevalencia en los sistemas de producción ovinos y caprinos en pastoreo (Urquhart *et al.*, 1996; O'connor *et al.*, 2006, Arece *et al.*, 2004). *T. colubriformis* y *O. columbianum* son regularmente encontradas en zonas calientes y húmedas (Arece *et al.*, 2007).

2.6.2. Ciclo biológico

El ciclo biológico de los NGI (figura 4) de los rumiantes es monoxeno (posee un solo hospedero definitivo) y comprende dos fases: una libre en el medio exterior (fase exógena) y otra parasitaria en el hospedero (fase endógena) (Urquhart *et al.*, 1996).

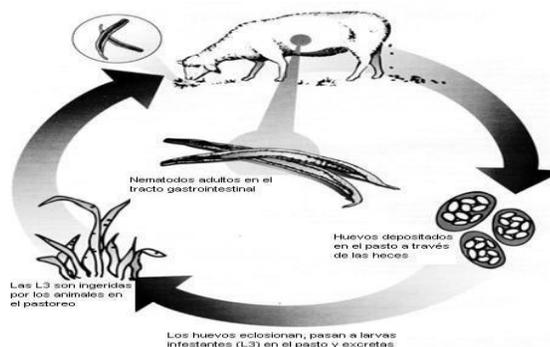


Figura 4. Representación esquemática del ciclo biológico de los estróngílicos gastrointestinales en pequeños rumiantes.

2.6.3. La fase de vida libre

Esta fase exógena del ciclo de vida de los NGI, se inicia por la eliminación de los huevecillos ovipositados por las hembras adultas, a través de las heces, al medio exterior. Este proceso asegura la contaminación de las praderas, las cuales en muchas ocasiones presentan condiciones climáticas favorables (temperatura mínima de 10°C; humedad relativa de 60%) para que los huevos embrionen y eclosionen liberando larvas del primer estadio (L₁) (Euzéby, 1963; Smith y Sherman, 1994; Urquhart *et al.*, 1996). Después de dos mudas sucesivas, las L₁ evolucionan hasta la larva del tercer estadio o larva infestante (L₃). Contrariamente a los huevos y las larvas L₃, las L₁ y L₂ son poco resistentes a las condiciones adversas del medio ambiente. En zonas templadas y según las condiciones ambientales, las L₃ pueden sobrevivir varios meses en las praderas (O'Connor *et al.*, 2006). Al contrario, en zonas tropicales o subtropicales, la sobrevivencia de las L₃ es menor pudiendo ser de algunas semanas debido al incremento de la actividad física favorecida por las elevadas temperaturas y humedad que agota sus reservas lipídicas (Urquhart *et al.*, 1996; O'Connor *et al.*, 2006).

2.6.4. La fase parasitaria

Esta fase comienza después de la ingestión de las larvas L₃ por el hospedero. La primera etapa de la invasión al tubo digestivo por las L₃, corresponde a su desenvainamiento (pérdida de la vaina procedente de las L₂). Este fenómeno marca la transición entre la vida libre y la vida parasitaria (Sommerville y Rogers, 1987; Hertzberg *et al.*, 2002). Después del desenvainamiento, las L₃ penetran en la mucosa de los órganos digestivos, para cambiar su estadio a larvas L₄. Inmediatamente alcanzan el estado 5 (S₅), también denominado estado pre-adulto o adulto juvenil. El paso del S₅ al estado adulto corresponde a la adquisición de la madurez sexual. Después de la fecundación por los machos, las hembras ovipositan y se repite el ciclo (Euzéby, 1963).

La cronología del desarrollo de los estados parasitarios de los NGI difiere en función de la especie, de la importancia a la infestación o del hospedero (resistencia). El tiempo entre la ingestión de las L₃ por el hospedero y la primera puesta de huevos por los adultos se denomina periodo prepatente. En general, este dura de 2 a 3 semanas por la mayor parte de las especies de los ovinos y caprinos. Puede durar hasta cinco semanas para ciertas especies de *Strongyloidea* de los bovinos, por ejemplo, *Oesophagostomum radiatum* (Urquhart *et al.*, 1996).

En periodos invernales, en zonas templadas o durante un prolongado periodo seco en zonas tropicales, es muy frecuente que las larvas se enquisten dentro de la mucosa digestiva y entran en hipobiosis larvaria lo cual retarda su desarrollo. Estas larvas enquistadas continúan su evolución en la primavera o en los periodos lluviosos siguientes (Euzéby, 1963; Smith y Sherman, 1994). En este caso, la duración del periodo prepatente pasa de 3 semanas a 3 o 4 meses.

2.6.5. Biología de las larvas infestantes

En el pasto, las larvas L₃ de los NGI poseen una vaina que es un vestigio de la cutícula de la L₂. Por la presencia de esta vaina, las L₃ son más resistentes a las condiciones exteriores (O'Connor *et al.*, 2006). La sobrevivencia de las L₃ depende de la especie de parásito, de las condiciones climáticas y del ambiente externo (O'Connor *et al.*, 2006). En general, las L₃ de *H. contortus*, sobreviven de 10 a 15 semanas en la primavera, mientras que durante el periodo seco y caluroso este periodo se acorta a 3 o 4 semanas. Los musgos y la materias fecales ofrecen condiciones óptimas para la sobrevivencia de las L₃, por la creación de condiciones microclimáticas favorables (Rogers y Sommerville, 1963).

Además de los factores físicos, las larvas L₃ son muy resistentes a los agentes químicos o biológicos. Sin embargo, estas larvas son presas o sustratos naturales de otros organismos bacterianos (*Bacillus thuringiensis*) o ciertos hongos calificados como nematófagos (*Duddingtonia flagrans*) (Larsen, 2000; Fontenot *et al.*, 2003; Chandrawathani *et al.*, 2004).

Las L₃ son muy móviles y se desplazan horizontal y verticalmente sobre la hierba siguiendo un hidrotropismo positivo (en busca de la humedad), un fototropismo negativo (huyen fuertemente de la luz) y un geotropismo negativo (Euzéby, 1963; Rogers y Sommerville, 1963). Este movimiento favorece la ingestión de los animales de cantidad considerables de larvas y por tanto lograr la parasitación de los rumiantes. Sin embargo, estos movimientos constantes son perjudiciales para la sobrevivencia de las L₃ ya que estas son incapaces de nutrirse, por lo que agotan sus reservas energéticas en esos movimientos (Rogers y Sommerville, 1963; O'Connor *et al.*, 2006).

La infestación del hospedero por las L₃ se inicia con el desenvainamiento. Este fenómeno ocurre en el órgano digestivo que le antecede. De este modo, las larvas L₃ de las especies abomasales se desenvainan en el rumen, mientras que las especies intestinales en el abomaso (Rogers y Sommerville, 1963; Rahman y Collins, 1990). El desenvainamiento ocurre de 60-80 minutos después de la ingestión de la larva infestante (Dakkak *et al.*, 1981; Hertzberg *et al.*, 2002).

2.7. Consecuencias de los estrongilosis gastrointestinales en los rumiantes

Las consecuencias de la infestación por estrongídeos gastrointestinales difieren según la tasa de infestación del hospedero. En general, las estrongilosis digestivas evolucionan de una forma crónica, de expresión subclínica y provoca serios daños económicos. En el caso de infestaciones masivas, el parasitismo de NGI puede mostrar signos clínicos visibles, conllevando en muchos casos a la muerte de los animales más susceptibles.

El grado de estas consecuencias depende de factores ligados al hospedero (especie, edad, estado fisiológico o nutricional) o a los parásitos (cantidad de parásitos, cantidad de otros parásitos en órganos del sistema digestivo), aunque el nivel de infestación (carga global parasitaria) sigue siendo el factor más importante.

2.7.1. Cuadro clínico de los estrongídeos gastrointestinales

La evolución generalmente crónica de las estrongilosis digestivas conducen a un deterioro del estado general de los animales que pueden conducir a la muerte si no son identificados y tratados oportunamente. Inicialmente, aparecen síntomas generales como pérdida del apetito, una emaciación progresiva, debilidad o signos de desnutrición (Urquhart *et al.*, 1996).

Los signos de gastroenteritis son también acompañados de diarreas agudas, situación muy común en estas infestaciones parasitarias (Rahman y Collins, 1990). Los síntomas más específicos pueden ser constatados con las especies de nematodos presentes (Urquhart *et al.*, 1996). Así, la especie hematófaga muestra signos de anemia visible y edemas submandibulares (Smith y Sherman, 1994; Urquhart *et al.*, 1996). Se ha estimado que una oveja parasitada por 5000 *Haemonchus* pierde el equivalente a 250 mL de sangre al día (Urquhart *et al.*, 1996).

2.7.2. Mecanismos fisiopatológicos y patogénicos

Los retrasos o síntomas observados en los animales zootécnicos infectados con los nematodos se explican por una combinación de varios trastornos de la fisiología digestivo. Si los principales procesos fisiopatológicos implicados frente a estas entidades han sido ampliamente estudiados, los mecanismos patogénicos en el origen de estos trastornos a menudo están mal descritos (Urquhart *et al.*, 1996).

2.7.3. Impacto sobre las producciones

En términos económicos, los estrongílicos gastrointestinales son reconocidos a escala global como una de las primeras patologías de los rumiantes, debido a las pérdidas económicas que ellos ocasionan. En los sistemas productivos de pequeños rumiantes, la presencia de estos vermes perturba a la vez la cantidad y la calidad de sus producciones.

El parasitismo por los NGI son responsables de un retardo del crecimiento en los ovinos y cabritos jóvenes (Kyriazakis *et al.*, 1996, Torres- Acosta, 1999) que se traducen en reducciones del peso de sacrificio de los animales, combinado con la disminución de la calidad de las canales y las carnes. En las hembras lecheras, las infestaciones por tricostrongilos gastrointestinales están regularmente asociadas con bajas en la producción de leche (Hoste y Chartier, 1993; Chartier y Hoste, 1994; Veneziano *et al.*, 2007) y, a veces en alternaciones en su composición (Chartier y Hoste, 1994), sobre todo observado en los animales mejores productores de un rebaño.

Finalmente, múltiples estudios en el hemisferio Sur han mostrado que el parasitismo digestivo en los ovinos está asociado también a alteraciones de la calidad de la lana (Knox *et al.*, 2006).

2.8. Efectos de los NGI sobre la fisiología digestiva

2.8.1. Disminución de la ingestión

En general, las infestaciones por los NGI están asociadas a una pérdida del apetito. Entonces, las infestaciones severas esta disminución del apetito puede llevar a una anorexia total (Urquhart *et al.*, 1996; Hoste *et al.*, 1997; Kahn y Díaz-Hernández, 2000; Knox *et al.*, 2006). Sin embargo, los mecanismos patogénicos implicados siguen siendo poco identificados, aunque el posible papel de hormonas peptídicas secretadas por las células digestivas (por ejemplo, la gastrina, colecistoquinina) a veces se ha mencionado, pero rara vez confirmado (Symons y Hennessy, 1981; Fox *et al.*, 1989).

2.8.2. Mala digestión y mala absorción

Los nematodos que parasitan los diversos órganos digestivos inducen las lesiones mayores en los epitelios. En el abomaso, la presencia de vermes está asociada a modificaciones de las glándulas

gástricas, incluyendo una menor densidad de células diferenciadas, especialmente las células que producen el ácido clorhídrico (HCl).

Las mayores alteraciones descritas en el intestino a escala tisular o celular son abrasiones de las vellosidades, con hiperplasia de las glándulas Lieberkühn y, una alteración severa (menor diferenciación) de los eritrocitos (Hoste *et al.*, 1997).

Lógicamente, esas modificaciones estructurales poseen repercusiones funcionales notables sobre la digestión de los alimentos y la absorción de los nutrientes a lo largo del tracto digestivo. En el estómago funcional de los rumiantes (abomaso), el parasitismo gastrointestinal provoca un aumento del pH gástrico dando lugar a una caída de la actividad de la pepsina, así como un agotamiento profundo de las actividades enzimáticas asociadas con enterocitos intestinales. La presencia de los vermes son el origen de las alteraciones de la permeabilidad de los epitelios y los trastornos del peristaltismo que reducen el tiempo de contacto entre las membranas mucosas y la quimo (Hoste *et al.*, 1997).

La combinación de estos diversos procesos que afectan tanto las estructuras o funciones digestivas, explica los fenómenos de la mala digestión/absorción clásica que se describe en las infestaciones por NGI strongílidos (Hoste *et al.*, 1997; Coop y Kyriazakis, 2001; Knox *et al.*, 2006).

2.8.3. Modificaciones y reorientaciones del metabolismo.

Mientras los efectos negativos del parasitismo en la ingestión y digestión de los alimentos aumentan, ocurre un cambio en la reorientación del metabolismo del hospedero (Hoste *et al.*, 1997). La reducción de la ingestión y de la absorción resultan en una disminución de nutrientes. Paralelamente, la presencia de los parásitos aumentan las necesidades nutricionales de los hospederos para mantener la homeostasis sanguínea (en el caso de los vermes hematófagos) y la integridad de sus epitelios y mucosas digestivas y, también para desarrollar una respuesta inmunitaria efectiva (Fox, 1997; Kahn y Diaz-Hernandez, 2000; Coop y Kyriazakis, 2001). La conjugación de estos fenómenos, conducen a una demanda de nutrientes, especialmente proteínas para reparar las lesiones provocadas a nivel de los sitios de acción de los parásitos, en detrimento de los sitios habituales de síntesis de proteínas por los hospederos (glándula mamaria, folículo piloso, músculo), lo cual aumenta las pérdidas en producción.

Estas profundas perturbaciones del metabolismo energético y proteico contribuyen a mantener las pérdidas zootécnicas por las infestaciones parasitarias (Fox, 1997; Hoste *et al.*, 1997). Además, Knox *et al.* (2006) sugirieron que el metabolismo del fósforo, del calcio y del hierro también se modifica por la presencia de los NGI.

2.8.4. Los mecanismos patogénicos

Las perturbaciones patofisiológicas son el resultado de efectos puramente mecánicos asociados a los efectos de excreción-secreción de los nematodos.

2.9. Los efectos mecánicos

Las lesiones de la mucosa digestiva se deben en parte al efecto mecánico de los vermes, relacionado con su adhesión a los epitelios ocasionando daños a las estructuras anatómicas especializadas del hospedero (Hoste *et al.*, 1997). Determinadas especies de *Strongylidae* (*Chabertia ovina*, por ejemplo), presentan una cápsula bucal bien desarrollada que le permite fijarse al epitelio digestivo (Euzéby, 1963; Urquhart *et al.*, 1996).

Sin embargo, *Trichostrongyloidea* posee una cápsula bucal reducida. Sólo los hematófagos como *H. contortus* presentan una neoformación dental. Por otra parte, para las especies intestinales como *Trichostrongylus* o *Cooperia* spp., ha sido descrito un efecto abrasivo de su cutícula sobre los enterocitos (Durette-Desset, 1985; Hoste *et al.*, 1997).

2.10. Efectos de los productos de excreción-secreción

La mayoría de los nematodos gastrointestinales liberan dentro de su ambiente productos de excreción-secreción (E/S). La naturaleza bioquímica de estos productos están dotados de propiedades enzimáticas (proteasas, acetyl-colinoesterasas) (Rogers, 1982; Hoste *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2010), pero también glicoproteínas y monosacáridos, lípidos, prostanoideos (Yatsuda *et al.*, 2003; Garretson, 2007).

El papel de estos productos de E/S no está del todo claro, pero se sospecha de su participación en la instalación de las L₃, su nutrición y la reproducción de los parásitos adultos en el hospedero (Huby *et al.*, 1999; Hoste *et al.*, 1995).

Algunas moléculas liberadas también afectan las mucosas del hospedero, participando en la génesis de las perturbaciones patofisiológicas, y también contribuyen a mantener el equilibrio parásito-hospedero (Huby *et al.*, 1999).

2.11. Estrategias del control integrado de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes en sistemas de producción extensivos subtropicales

2.11.1. Control parasitario mediante la epizootiología

El parasitismo interno en los ovinos constituye una de las limitantes de mayor importancia en el desarrollo exitoso de la producción ovina. El primer paso para lograr un control parasitario está relacionado con el estudio de la epizootiología de los agentes etiológicos, y entre ellos el conocimiento de las especies que circulan en los rebaños. El empleo de la información epizootiológica, obtenida como resultado de una investigación dinámica en determinadas condiciones, constituye la piedra angular para el establecimiento de los planes de control parasitario (Arece, 2007). Sin embargo se debe de considerar que los NGI, aun siendo del mismo género presentan diferente comportamiento, por ejemplo, en el caso de los estromgílicos gastrointestinales, su ciclo biológico difiere al del *Dictyocaulus viviparus*, ya que los estadios infestantes logran sobrevivir mucho más tiempo en el pasto, incluso en condiciones adversas.

El control parasitario en los rebaños ovinos se realiza de forma arbitraria y en la mayoría de las situaciones, de manera indiscriminada, con la consecuente respuesta de los parásitos a estos errores: la aparición de la resistencia a los antiparasitarios (Arece, 2004; Gonzales, 2006).

El primer paso para el diseño correcto de un plan de control parasitario es el conocimiento de las especies de parásitos que circulan en el rebaño, lo que permitirá dirigir los tratamientos de forma racional. Las especies de parásitos presentan un determinado comportamiento, como resultado de la existencia de diferentes fenómenos de lucha de contrarios: el parásito por sobrevivir, el animal por expulsarlo. De este modo se establecen relaciones entre ellos, que en función de determinadas condiciones fisiológicas, nutricionales o de naturaleza multifactorial, hacen que desaparezca el equilibrio teórico existente entre huésped y parásito.

Es reconocido que los animales jóvenes son más susceptibles a la infestación por parásitos, ya que poseen un sistema inmunológico con un desarrollo insuficiente para modular la infestación parasitaria. El fenómeno parasitario es de naturaleza compleja y la coexistencia de diferentes factores, entre ellos los relacionados con el manejo, parece definir el futuro de la infestación. En este sentido, en unidades de producción donde se aplica el sistema de amamantamiento y pastoreo restringido, la infestación parasitaria en las crías disminuye, con la consiguiente disminución de la mortalidad en dicha categoría (Arece, 2007).

A nivel práctico existen diferentes metodologías para diagnosticar animales con parásitos dentro de los cuales destaca la prueba FAMACHA[®], una carta que mide la coloración de la mucosa ocular de los ovinos y caprinos, dicha carta consta de 5 niveles de coloración (figura 5), donde 1 y 2 indica que el animal se encuentra libre de NGI, 3 nos indica que el animal podría desparasitarse, valorando la condición corporal y peso del animal, 4 y 5 indica que se debe desparasitar inmediatamente. Se ha comprobado que esta prueba FAMACHA[®] es confiable siempre y cuando sean tomados en cuenta otros factores a medir, tales como la condición corporal, estado fisiológico y edad del animal (figura 6). Así mismo en el laboratorio mediante el conteo fecal de huevecillos (CFH), volumen celular aglomerado (VCA) y conteo de eosinófilos, se puede diagnosticar eficazmente la presencia de NGI, dado que la mayoría son gusanos hematófagos; es decir son consumidores de sangre, de ahí que es necesario hacer dichas pruebas en el laboratorio.

La estrategia del tratamiento químico selectivo sobre la base del método FAMACHA[®] ha mostrado excelentes resultados en diferentes países (Kaplan *et al.*, 2004; Mahieu *et al.*, 2007; Van Wyk, 2002). Su principio radica en la identificación de animales anémicos como resultado de la infestación por *Haemonchus contortus* (estrongílido altamente hematófago) lo cual se realiza con la ayuda de una carta de colores FAMACHA. El tratamiento selectivo no sólo reduce el número de animales a tratar con el consecuente ahorro de medicamentos, sino que además permite, de forma indirecta, prolongar la eficacia de los medicamentos por incrementarse la población larvaria en “refugio” (población larvaria de parásitos en el pasto que no está en contacto con el medicamento) (Kenyon *et al.*, 2009).



Categoría clínica	Color	VCA (hematocrito)	Recomendación para Desparasitación
1	Rojo	≥ 28	No
2	Rojo-Rosado	23-27	No
3	Rosado	18-22	?
4	Rosado-Blanco	13-17	Si
5	Blanco	≤ 12	Si

Figura 5. Escala utilizada para diagnosticar el grado de anemia debido a los nematodos gastrointestinales



Figura 6. Uso adecuado de la carta Famacha para diagnosticar a los animales que necesitan desparasitarse

2.11.2. Examen microscópico de las heces

El análisis coprológico es un método de diagnóstico práctico y barato que normalmente se realiza *in vivo* (García-Romero *et al.*, 2005); sin embargo, tiene el inconveniente de que la eliminación de formas parásitas en las heces no siempre se corresponde con el nivel de infestación del animal y, por tanto, no indica de una forma fiable la intensidad de parasitación.

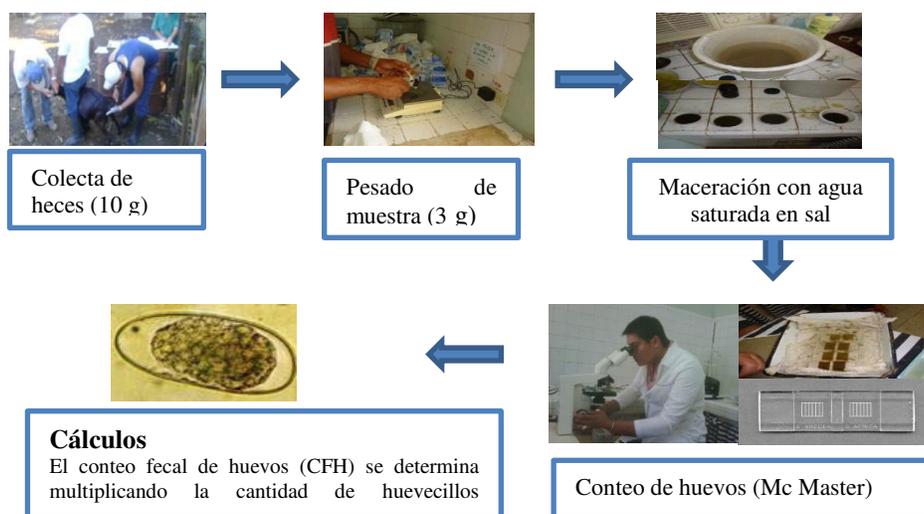


Figura 7. Esquema para conteo fecal de huevecillos de nematodos gastrointestinales

En todo el mundo el conteo fecal de huevos (CFH) es el indicador más empleado para el estudio de las parasitosis gastrointestinales en rumiantes (Rossanigo y Gruner, 1994). Obviamente esto se justifica, entre otras razones, porque es una variable de baja exigencia tecnológica. La técnica de McMaster es el método cuantitativo de mayor difusión y empleo en el mundo. Su principio físico es

que se cuentan los huevos que aparecen en las áreas rayadas de la cámara de McMaster y se estima el número de huevos contenidos en un gramo de heces (figura 7), mediante un algoritmo matemático que se basa en la cantidad de heces utilizadas, el volumen de solución salina y las características de la cámara (Arece *et al.*, 2002). Estos autores emplearon 3 g de heces, 42 mL de solución salina ($d= 1\ 200\text{g/L}$) y en estas condiciones cada huevo encontrado equivale a 50 huevos por gramo de heces.

2.12. Papel de los factores zootécnicos en las parasitosis y su control

Los factores zootécnicos tienen un papel de primer orden en el comportamiento de la incidencia e intensidad de invasión parasitaria. Las características de las instalaciones y el área destinada a la explotación pecuaria, el tipo y la forma de alimentación, el sistema de crianza y las medidas higiénicas, ejercen una influencia decisiva en la conformación del cuadro parasitológico de cualquier rebaño (Van Houtert *et al.*, 1995).

En especial, la alimentación contribuye significativamente en este proceso, por ser la vía oral el principal acceso de los estadios infestantes al organismo. El tipo y la forma de alimentación tienen, por lo tanto, una especial importancia, aún más cuando el pasto es la base alimenticia del ganado en los países tropicales. Los forrajes también pueden constituir una fuente de infestación si provienen de áreas que han sido fertilizadas con excretas o residuales contaminados por estos parásitos (Van Houtert *et al.*, 1995).

Muchos autores le han brindado atención a la relación alimentación-parasitismo y resaltan su importancia para crear en los animales una inmunidad que les permita enfrentar estas helmintiasis. En este contexto, según Van Houtert *et al.* (1995) y Coop y Kyriazakis (2001), la nutrición de los animales, en especial las proteínas, las vitaminas y los minerales, son considerados como los factores que más influyen en la relación huésped-parásito, donde una alimentación adecuada disminuye la susceptibilidad y prevalencia de las infestaciones en los hospederos y aumenta la resistencia, con respuestas inmunológicas adecuadas contra estas parasitosis.

Otro de los factores importantes que se deben tener en cuenta, es el manejo de los pastizales. El pastoreo rotacional contribuye a la disminución de la infestación parasitaria en los pastos; sin embargo, un comportamiento diferente ocurre en el pastoreo permanente (Thamsborg *et al.*, 1999). En este contexto, Stromberg y Gasbarre (2006) aseguran que la rotación de pasturas con largos períodos de descanso disminuye la infestación por estos parásitos, ya que el pastoreo rotacional

intensivo, con menos de 28 días de reposo, obliga al ganado a consumir todo el forraje disponible cercano a las excretas.

El pastoreo alterno y el mixto (bovino-ovino y de bovinos jóvenes y adultos) también han sido señalados como excelentes alternativas de manejo que han contribuido a la disminución de la infestación parasitaria en los animales y en el pasto (Waller, 1997). Sin embargo, Arece *et al.* (2004) afirma que el pastoreo mixto es mucho más eficaz para el control de los nematodos internos, ya que este tipo de asociación disminuye de forma considerable las infestaciones por *Haemonchus* sp.

2.13. Métodos alternativos al uso de los antihelmínticos (AHs)

El conocimiento del creciente desarrollo de resistencia a las drogas AHs de síntesis, los investigadores están enfocados en reactualizar y desarrollar métodos alternativos de lucha contra los NGI. Estos métodos se apoyan en tres principios generales de prevención y tratamiento dirigidos a: 1) Reducir el origen o fuentes de contaminación, 2) Aumentar la resistencia de los hospederos y, 3) Eliminar los parásitos (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

2.13.1. Reducir las fuentes de contaminación de los animales

El objetivo de este método está dirigido a bloquear el ciclo biológico de los NGI y su importancia se manifiesta en las larvas del tercer estadio (L₃) o larvas infestantes en el medio exterior (reducción de la infestación de las áreas de pastoreo), a fin de limitar al máximo los riesgos de contacto entre las L₃ y los hospederos susceptibles (Hoste *et al.*, 1997; Heckendorn, 2007). Estos objetivos se pueden lograr mediante dos métodos principales (Barger, 1999; Pomroy, 2006):

- ✓ La prevención. Consiste en llevar los animales sanos, libres de parásitos a áreas de pastoreo no contaminadas, como por ejemplo áreas post cosechas o áreas marginales como guardarrayas de áreas cañeras u otro tipo de cultivo como los sistemas silvícolas
- ✓ La evasión. Se trata de la transferencia de animales tratados con AHs de praderas contaminadas a áreas de pastoreo de baja carga parasitaria como las mencionadas anteriormente.

Estos principios de prevención o de evasión suponen la disponibilidad de áreas de pastoreo libres de parásitos o de bajos niveles de infestación. Un medio para tener este tipo de praderas es tener

prolongados periodos de reposo que permita la muerte natural de las L₃ presentes en la hierba antes que los animales retornen a la misma parcela (Hoste *et al.*, 2004; Pomroy, 2006; Legarto y Leclerc, 2007). Este proceso adquiere mayor importancia en las zonas tropicales en donde la duración media de las L₃ es más reducida (alrededor de dos meses) comparado con climas templados (vida promedio de 6 a 12 meses) (Hoste *et al.*, 1999; Barger *et al.*, 1990; Mahieu *et al.*, 2007).

- ✓ La dilución que va dirigida a reducir el riesgo de infestación por las L₃ en disminución de su concentración en el pastoreo.

La dilución de la infestación del pastoreo puede ser considerado con lograr una disminución de la densidad de animales (Ettet *et al.*, 2000). Sin embargo, la mezcla de animales susceptibles y resistentes según criterios como la edad, el pastoreo mixto, alternado o simultaneo, entre dos especies de hospederos que muestren diferencias de especificidad hospedadora para los NGI (Niezen *et al.*, 1996; Barger, 1999; Waller y Thamsborg, 2004; Mahieu *et al.*, 2007; Hoste *et al.*, 2010).

Por otro lado, una reducción activa de la infestación parasitaria puede ser obtenida a través del uso de métodos químicos, pero también físicas (explotación de pastoreos de áreas pos cosechas (Hoste *et al.*, 2004; Hounzangbe-Adote, 2004). También se pueden usar medios de lucha biológicos en los que la mayoría de los estudios se han concentrado en las propiedades nematófagas de determinados hongos microscópicos (ej. *Duddingtonia flagrans*) que capturan las L₃ entre su micelio, favoreciendo así la contaminación de las áreas de pastoreo (Niezen *et al.*, 1996; Thamsborg *et al.*, 1999; Waller y Thamsborg, 2004).

2.13.2. Mejorar la resistencia de los hospederos

Hasta la fecha se ha enfatizado en tres estrategias fundamentales dirigidas a mejorar la resistencia (natural o adquirida) de los hospederos, 1) El desarrollo de vacunas, 2) La selección de animales resistentes a los NGI y, 3) Mejora de la nutrición del hospedero.

2.13.3. La vacunación

El principio de la vacunación consiste en poner en contacto preventivo al hospedero con dosis de antígenos parasitarios para estimular sus defensas inmunitarias y así protegerlos de las infestaciones futuras por los NGI (Waller y Thamsborg, 2004; Jackson y Miller, 2006).

El concepto dirigido a encontrar vacunas eficaces para el control de los NGI en rumiantes no es una tarea reciente, sino que desde el año 1960 se desarrollaron para validar el empleo de L₃ irradiadas de *H. contortus* y de *T. colubriformis* para proteger los animales (Mulligan *et al.*, 1989). Posteriormente aparecen estudios más recientes destinados a aislar antígenos de tejidos específicos del tubo digestivo de los NGI (Knox *et al.*, 2005; Smith y Zarlenga, 2006; Smith 2008).

2.13.4. La selección de animales genéticamente resistentes

La selección de animales resistentes a los NGI es un enfoque que ha sido acogido fuertemente en el hemisferio Sur para reducir el empleo de AHs sintéticos (Windon, 1996; Baker *et al.*, 1998; Pomroy, 2006), y se basa en la selección de los animales más resistentes; este concepto se ha desarrollado incluso entre razas.

Un proceso consistente de selección aplicado durante varios años debe conduciría a una teoría de reducción de infestación en los hospederos y una disminución progresiva de la disminución de las áreas de pastoreo (Windon, 1996; Baker *et al.*, 1998).

2.13.5. Plantas con propiedades antihelmínticas

En la mayoría de los continentes, fundamentalmente en países en vías de desarrollo, la medicina tradicional se basa en el conocimiento empírico del uso de plantas (etnomedicina veterinaria) y es ampliamente difundida (Hounzangbe-Adote, 2004; Githiori *et al.*, 2006). Por otro lado, en los países desarrollados apuestan por una agricultura sostenible y biológica, que logren reducir los residuos químicos en los alimentos de origen animal (Waller y Thamsborg, 2004).

Otro aspecto a considerar en el empleo de métodos alternativos de control parasitario es la reducción de la presión de selección al minimizar su uso pues presentan ventajas comparativas como 1) la disponibilidad de recursos de este tipo, 2) la ausencia actual de resistencia a los compuestos activos y, 3) escasa disponibilidad de antiparasitarios de calidad en los países en desarrollo.

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 nutraceuticos, 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 infestados por un periodo corto. Los nutraceuticos 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 (Waller *et al.*, 2001). Su incorporación en la ración, por periodos más prolongados (de varios días a un mes) es generalmente concebido con fines preventivos.

Los estudios sobre el efecto de las plantas con propiedades antiparasitarias han permitido confirmar el interés potencial del ajo (*Allium sativa*), de saifoin (*Onobrychis viciifolia*), papaya (*Carica papaya*), hoja de yuca (*Manihot sculenta*), o algunas arbóreas tropicales como *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*, *Lysiloma latisiliquum*, *Pithecellobium dulce* y *Lysiloma acapulcensis*, entre otras), (Paolini *et al.*, 2004; Hounzangbe-Adote *et al.*, 2005; Githiori *et al.*, 2006; Marie-Magdeleine, 2010; Brunet *et al.*, 2008; Olmedo *et al.*, 2013).

El empleo potencial de las plantas con principios bioactivos presenta también sus limitantes. La primera de ella resulta la escasez de información científica sobre los compuestos activos, su modo de acción y los factores que influyen en su efectividad. Otro elemento es la toxicidad eventual en los animales de algunas especies y la adecuada posología para encontrar su efecto benéfico (Waller *et al.*, 2001; Waller, 2004; Githiori *et al.*, 2005)

Sin embargo, debido a la su explotación como forrajes, los efectos nutraceuticos a menudo se consideran de bajo riesgo tóxico. La variabilidad inherente de las plantas de acuerdo a las condiciones ambientales o de crecimiento en función de las especies o variedades utilizadas deben también ser consideradas y estudiadas a fin de estandarizar los mejores tratamientos fitoterapéuticos, de acuerdo a la planta, las condiciones climáticas y las prácticas de crianza de los animales (Rochfort *et al.*, 2008). Una última limitación es el riesgo ecológico posible. Los casos de sobre-explotación de las plantas por sus propiedades medicinales ya han sido reportadas con un impacto ambiental relacionada con el riesgo de extinción de las especies de plantas o de ecotipos de interés en ciertas regiones (Hounzangbe-Adote, 2004).

La naturaleza de las moléculas activas de estas plantas es a menudo mal identificado, aunque un metabolito principal por lo general es mencionado. Generalmente se sospecha de moléculas que pertenecen a clases de diferentes proteasas (Steppek *et al.*, 2004), como los alcaloides (Githiori *et al.*, 2006), saponinas (Deepak *et al.*, 2002), o polifenoles o taninos condensados (Paolini *et al.*, 2003; Barrau *et al.*, 2005).

Por citar algunos ejemplos, Chagas *et al.* (2008) demostraron, en ovejas como los alcaloides son responsables del efecto antihelmíntico del árbol del Neem (*Azadirachta indica*). Las Lactonas sesquiterpenos se sospecha sean los responsables de las propiedades antiparasitaria de achicoria (*Cychorium intybus*) (Marley *et al.*, 2003, 2006). Por su parte, Githiori *et al.* (2006) informaron que los compuestos responsables de la actividad antiparasitaria de *Calotropis procera* y *Terminalia glaucescens* parecen ser alcaloides y antraquinonas, respectivamente.

En la temática del uso de plantas con propiedades antiparasitarias en los últimos 20 años se ha puesto de manifiesto que la explotación de las propiedades bioactivas de las plantas antiparasitarias son una alternativa válida para el empleo de los AHs sintéticos (Niezen *et al.*, 1996; Kahn y Díaz Hernández, 2000; Githiori *et al.*, 2006; Hoste *et al.*, 2006; Ketzis *et al.*, 2006). En particular, los resultados más alentadores se presentan en el valor potencial de las plantas, incluidas las leguminosas, ricas en taninos condensados.

III. JUSTIFICACIÓN

El uso de plantas arbóreas con propiedades 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. Las plantas o sus extractos han sido usadas durante siglos en medicina veterinaria, tanto de forma interna como externa para el tratamiento de diversas patologías. Las plantas elaboran una multitud de moléculas orgánicas (glúcidos, lípidos, ácidos, sustancias pépticas, saponinas, alcaloides, polifenoles, terpenos, esteroides, vitaminas y elementos minerales). Estos metabolitos son necesarios para su funcionamiento y para su relación con el medio externo.

Entre ellos, los metabolitos secundarios (saponinas, alcaloides, polifenoles, terpenos, esteroides, ácidos y aminos no proteicas, glucósidos cianogénicos, y otros heterósidos) son como su denominación lo indica: compuestos que no son estrictamente indispensables para las funciones principales de la planta. Estos metabolitos secundarios son actualmente asociados a la defensa de la planta, denotándose entre las principales funcionales: la defensa contra los insectos herbívoros, microorganismos (bacterias, hongos y virus), contra otras plantas en la competencia por los nutrientes y la luz, la protección contra los efectos nefastos de los rayos ultra violetas, entre otros (Fraenkel, 1969; Wink, 1988).

Dentro de los principales metabolitos secundarios a los cuales se le atribuyen efectos antiparasitarios aparecen los taninos condensados libres (Wolstenholme *et al.*, 2004). El Tepehuaje (*L. acapulcensis*), es una leguminosa arbórea con elevados niveles de este metabolito (Camacho *et al.*, 2010), lo cual pudiera constituir una planta con potencial para el control parasitario; esta hipótesis alcanza mayor magnitud ya que los TC presentes en ella no necesitan ser desactivados (adición de propilen-glicol o NaOH) al ser adicionados en forma de extracto acuoso en pequeños rumiantes (Olmedo *et al.*, 2013).

Otras plantas que en algunas zonas del país constituyen una alternativa para la alimentación animal son el Huaje (*Leucaena leucocephala*), Pinzan (*Pithecellobium dulce*), Cocohuite (*Gliricidia sepium*), Guazima (*Guazuma umifolia*), Parota (*Enterolobium cyclocarpum*) y Huizache (*Acacia farnesiana*).

IV. HIPÓTESIS

- La adición de extractos acuosos de *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce* tienen acción antihelmíntica sobre nematodos gastrointestinales (NIG) presentes en los ovinos.
- El uso de extracto acuoso de *Lysiloma acapulcensis* tiene efectos positivos en la digestibilidad y parámetros de fermentación de los nutrientes de una dieta basal para ovinos.

V. OBJETIVOS

- Determinar *in vitro* el efecto de los extractos acuosos de *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce* en la eclosión de huevos, desarrollo y migración larvaria de nematodos gastrointestinales de ovinos.
- Determinar el efecto del extracto acuoso de *Lysiloma* en la degradabilidad, digestibilidad y parámetros de fermentación en ovinos.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1. EXPERIMENTO 1

Efecto *in vitro* de la actividad antihelmíntica de los extractos *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce* sobre la eclosión de huevecillos y desarrollo larvario de *Haemonchus contortus*.

6.1.2. Zona de estudio

Este estudio se llevó cabo en las instalaciones del laboratorio de bromatología del Centro Universitario UAEM - Temascaltepec, este lugar presenta una altura media sobre el nivel del mar de 1740 m, con un clima del tipo cálido sub-húmedo con presencia de lluvias en verano (Aw).

6.1.3. Preparación de los extractos

Los extractos de *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce* se obtuvieron de árboles de la zona sur del Estado de México colectados al azar (49 árboles, considerando 7 repeticiones verdaderas. Se colectaron hojas frescas (jóvenes y maduras), se almacenaron y trasladaron en refrigeración para evitar cambios en su composición (FAO, 2000).

Los extractos se prepararon mediante la metodología propuesta por Salem *et al.* (2006). Las hojas se secaron a 45°C mediante una estufa de aire forzado, posteriormente se molieron y se prepararon los extractos, utilizando como solvente PBS (pH 7.0) (10 g de hojas: 100 ml de PBS), y se incubaron en baño maría a temperatura ambiente (23°C) durante 48 horas y se liofilizaron.

6.1.4. Análisis químico proximal (AQP) y determinación de taninos condensados.

A las muestras liofilizadas se les realizó un AQP por triplicado y por unidad experimental (árbol) así como la concentración de taninos condensados y su fraccionamiento.

Para determinación de materia orgánica (MO) y proteína cruda (PC) fueron mediante los procedimientos del AOAC (1990). Las fracciones de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de determinaron por los métodos de Van Soest *et al.* (1991).

Así mismo se calcularon: el total de taninos condensados (TTC) se analizaron mediante el método de butanol-HCl (Terril *et al.*, 1992), con las modificaciones de López *et al.* (2004), utilizando como

patrones internos al *Lysiloma acapulcensis*. Los análisis de taninos libres (TL) se determinaron por el método de Porter *et al.* (1986), la purificación de taninos se realizó con Sephadex LH-20 como lo describen Asquith y Butler (1985), con las modificaciones realizadas por Hedqvist *et al.* (2000).

6.1.5. Tratamientos y diseño experimental.

Para determinar el efecto de cada planta en las fases exógenas de nematodos gastrointestinales de ovinos se evaluaron tres concentraciones de cada extracto liofilizado (0.0, 12.5, 25 y 50 mg/ mL). Estos se disolvieron en PBS (pH 7.0) y este se empleó como control negativo. Adicionalmente se utilizó Levamisol y Albendazol como control positivo según ensayo. Todas las investigaciones *in vitro* se diseñaron sobre la base de un diseño completamente aleatorizado.

6.1.6. Prueba de eclosión de huevos (PEH).

Se empleó una modificación de la técnica propuesta por Marie-Magdeleine *et al.* (2010). Para ello se utilizaron nueve tratamientos que corresponden a las tres concentraciones para *P. dulce* (**PD-500**, **PD-250** y **PD-125**), *L. acapulcensis* (**LA-500**, **LA 250** y **LA 125**), solución **PBS** (control negativo, solvente de los extractos), Albendazol 1% (**ABZ**, control positivo) y Dimetilsulfóxido, **DMSO** (control negativo, solvente del ABZ).

Se colectaron huevos de estrogilidos de un animal donante infestado artificialmente con una mezcla de estrogilidos gastrointestinales (95% de *Haemonchus contortus*, 2% de *Trichostrongylus colubriformis* y 3% de *Oesophagostomum columbianum*) y, se depositaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos para ser enfrentados con los tratamientos experimentales con seis réplicas por tratamiento. Se incubaron por 48 h y transcurrido ese tiempo se detuvo la eclosión con 100 µL de solución de Lugol. Se contaron larvas y huevos en 20 alícuotas de 10 µL, y se determinó el porcentaje de eclosión.

6.1.7. Prueba de desarrollo larvario (PDL)

Se empleó la modificación realizada por Assis *et al.* (2003) a la técnica propuesta por Hubert y Kerboeuf (1992). Se emplearon los mismos tratamientos experimentales y diseño que en la PEH. Su principio se basa en exponer las soluciones a evaluar en huevos eclosionados para evaluar el efecto en el desarrollo de las larvas desde estadios L₁/L₂ hacia L₃ o larvas infestantes. Se obtuvieron las L₁/L₂ a través del procedimiento descrito para PEH y se alimentaron a las 48 h con una solución nutritiva a base de jugo de heces y Anfotericina B. A las 48h se aplicaron las soluciones a evaluar y

transcurridos 8 días se detuvo el proceso de muda con 100 µL de solución de Lugol. Se contaron las L₁/L₂ y las L₃ y se determinó el porcentaje de las larvas infestivas.

6.1.8. Prueba de migración larvaria (PML).

El principio de esta prueba consiste en enfrentar las larvas del tercer estadio (L₃) obtenidas mediante coprocultivos (Roberts y O'Sullivan, 1952) a las tres concentraciones de los extractos, un control positivo (PBS) y uno negativo a base de Levamisol (LV) en tres concentraciones (**LV-500**, **LV-250** y **LV-125**). Para ello se empleó el método descrito por Marie-Magdeleine *et al.* (2010) que consiste en enfrentar una cantidad conocida de larvas L₃ a las soluciones por 2 horas en un tubo de ensayo Falcon® cónico y, después de sucesivos lavados con PBS ponerlas a migrar a través de un tamiz de 20 µm en un dispositivo preparado para este fin. Posteriormente se determina la cantidad de larvas migradas y se calcula el porcentaje de migración.

6.1.9. Análisis de los datos

Para el análisis de los datos, primero fueron transformados ($\text{Arcoseno}\sqrt{X}$) después fueron analizados por un diseño completamente al azar, utilizando un modelo lineal general (PROC GLM), mediante el paquete estadístico SAS (2006) y para la comparación de medias se usó el procedimiento Tukey a un nivel de significación de $p < 0.05$.

EXPERIMENTO 2.

6.2.1. Efecto del extracto de *Lysiloma acapulcensis* sobre la digestibilidad de los nutrientes y parámetros de fermentación en ovinos.

6.2.2. Zona de estudio

Este estudio se realizó en el laboratorio de bromatología y parasitología del Centro Universitario UAEM Temascaltepec y en el área metabólica de la posta zootécnica del mismo centro.

6.2.3. Preparación de los extractos

Los extractos de *Lysiloma acapulcensis* se obtuvieron de árboles de la zona sur del Estado de México colectados al azar (49 árboles, considerando 7 repeticiones verdaderas). Se colectaron hojas frescas (jóvenes y maduras), se almacenaron y trasladaron en refrigeración para evitar cambios en su composición (FAO, 2000).

Los extractos se prepararon mediante la metodología propuesta por Salem *et al.* (2006). Las hojas se secaron a 45°C mediante una estufa de aire forzado, posteriormente se molieron y se prepararon los extractos, utilizando como solvente agua destilada (10 g de hojas: 100 ml de agua) y se incubaron en baño maría a temperatura ambiente (23°C) durante 48 horas, posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización.

6.2.4. Tratamientos

Los tratamientos de los extractos fueron: 0.0, 2.5, 5.0 y 7.5 g de TCL/kg MS. En el ensayo *in vitro* las dosis se ajustaron al sustrato que se incubo y se aplicaron en forma liofilizada diluida en agua destilada, para el caso del ensayo *in vivo* los extractos fueron aplicados directamente en el rumen de forma liofilizada, dividiendo las dosis de cada tratamiento correspondiente en tres aplicaciones (antes de alimentar a los animales) en horarios de 7:00, 13:00 y 19:00 horas. Para ambos ensayos se utilizó una dieta base (Cuadro 3), para ovinos en crecimiento con base a las recomendaciones del NRC (2007) para pequeños rumiantes.

6.2.5. Experimento *in vitro*

Este experimento fue realizado mediante la técnica de producción de gas siguiendo la metodología propuesta por Theodorou *et al.* (1994). El líquido ruminal se obtuvo del rumen de cuatro ovinos fistulados. Una vez colectado el líquido, fue llevado al laboratorio donde se gasificó con CO₂. Para iniciar la incubación se mezcló el líquido ruminal (10 ml) y el medio nutritivo (90 ml), en botellas de 160 ml que contenían 1 gramo de sustrato. Se utilizaron 12 botellas por tratamiento y tres blancos, tomando mediciones de gas por un periodo de 96 h. y fueron depositadas en una incubadora a 39 °C. El volumen de gas producido fue tomado durante las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 48, 72 y 96 h con un transductor de presión (EXTECH, Modelo 407910) .

6.2.5.1. Degradabilidad de la materia seca, cinética de degradación y parámetros de fermentación

Los cálculos para determinar la degradabilidad de la materia seca y orgánica (DIVMS y DVMO), fueron determinados de forma gravimétrica (sustrato incubado menos sustrato degradado). La cinética de producción de gas fue estimada utilizando el modelo de France *et al.* (2000), para la transformación de la base de datos de PSI a ml/g MS, se usó el modelo NLIN (SAS, 2006). La energía metabolizable (EM) fue calculada por el modelo de Menke y Steingass (1988). Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), se calcularon por la fórmula de Getachew *et al.* (2002).

6.2.6. Experimento *in vivo*

6.2.6.1. Animales y tratamientos

Para la determinación de la digestibilidad *in vivo* se utilizó una dieta base (cuadro 2) más los extractos. Se utilizaron 4 ovinos fistulados en rumen, por un tiempo de 60 días divididos en 4 periodos, los animales fueron previamente adaptados por 15 días alimentados con una dieta basal similar a la que se usó durante la fase experimental. En cada periodo, los últimos 5 días se colectaron las muestras de heces y liquido ruminal.

Cuadro 2. Dieta basal en base seca*

% de inclusión	Tratamientos			
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
H. maíz	15.00	15.00	15.00	15.00
H. avena	15.00	15.00	15.00	15.00
Maíz	40.65	40.65	40.65	40.65
Salvado	12.00	12.00	12.00	12.00
Soya	5.00	5.00	5.00	5.00
Melaza	10.36	10.36	10.36	10.36
Urea	0.50	0.50	0.50	0.50
² Premezcla	1.49	1.49	1.49	1.49
Tanino condensado libre/día (TCL)	0	2.5	5.0	7.5

*Proteína cruda= 15.06; EM= 2.59

¹ Consumo voluntario de 2.5 kg para ovinos con un peso promedio de 60 kg

² Calcio (18.66 %); Fosforo (9.66 %); Sodio (2.73 %); Potasio (15.33%); Magnesio (2.63 %); Azufre (8 %); Cobalto (3.66 ppm); Yodo (15.33 ppm); Hierro (1733.33 ppm); Manganeso (566.66 ppm); Selenio (19.33 ppm)

6.2.6.2. Colecta de muestras de heces

Se hicieron muestreos de heces totales durante los últimos 5 días de cada periodo experimental para determinar la digestibilidad aparente de los nutrientes (MS, MO, PC, FDN y FDA). Se colectaron 100 g de heces totales de 24 horas, de las cuales se obtuvieron submuestras de 20 g para determinar materia seca (MS) y digestibilidad aparente de los nutrientes.

6.2.6.3. Colecta de líquido ruminal

La colecta de fluido ruminal fue al final de cada periodo experimental (día 15), se colectaron 100 ml de líquido durante 24 horas divididas en 7 tiempos considerando como la hora cero 7:00 h (después de alimentar a los animales). El líquido se obtuvo directamente del rumen por la abertura de la cánula ruminal de los ovinos con la ayuda de una bomba de vacío. Una vez obtenido el fluido ruminal de los animales, una parte de líquido fue acidificado con ácido clorhídrico al 50 % a un volumen de 50 ml de líquido: 1 ml de ácido. Y para conteo de protozoarios se tomó 1 ml de líquido al cual se le agrego 1 ml de solución Coleman. Posteriormente las muestras se procesaron en el laboratorio, para determinar pH, Nitrógeno amoniacal y conteo de protozoarios.

6.2.6.4. Análisis de los datos

Los datos del experimento *in vitro* fueron analizados mediante un diseño completamente al azar y el ensayo *in vivo* mediante cuadrado latino utilizando el paquete estadístico SAS (2006) y la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey a un nivel de significancia $P < 0.05$ (Steel y Torrie, 1980)

VII. RESULTADOS

Los resultados de esta investigación se presentan en dos artículos:

1.- Artículo científico aceptado en la revista *Italian Journal of Animal Science* intitulado “***In vitro* activity of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep**”. En donde se evaluaron las fases exógenas de los nematodos gastrointestinales (eclosión de huevos, desarrollo larvario y migración larvaria).



Italian Journal of Animal Science
Journal
of the Animal Science and Production Association
The Editor-in-chief

Prof. Rosanna Scipioni
Via Amendola, 2
42100 Reggio Emilia (Italy)
rosanna.scipioni@unimore.it

CERTIFICATE

I attest that the article 3104 “***In vitro activity of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep***”, signed by Agustín Olmedo-Juárez, Rolando Rojo-Rubio, Javier Arece-García, Abdelfattah Z.M. Salem, Ahemd E. Kholif and Ernesto Morales-Almaraz, was accepted on 17 January, 2014, for the Open Access publication as paper on the volume 13 (2014) of Italian Journal of Animal Science.

Prof. Rosanna Scipioni

Reggio Emilia, 18 January 2014

PAPER

***In vitro* activity of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep**

Agustín Olmedo-Juárez,¹Rolando Rojo-Rubio,¹Javier Arece-García,²Abdelfattah Z.M. Salem,^{3,4}Ahmed E. Kholif,⁵Ernesto Morales-Almaraz³

¹Centro Universitario Universidad Autónoma del Estado de México, Temascaltepec, Mexico

²Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Matanzas, Cuba

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Mexico

⁴Faculty of Agriculture, Alexandria University, Egypt

⁵Dairy Science Department, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt

Abstract

An experiment was conducted to evaluate the effects of two lyophilised aqueous extracts of *Lysiloma acapulcensis* (LAE) and *Pithecellobium dulce* (PDE) tree leaves on *in vitro* assessment of hatching of eggs, larval development and migration of gastrointestinal nematodes of sheep using a general linear model. Treatments contained extracts from both species at concentrations of 0, 125, 250 and 500 µg/mL. Both albendazole and levamisole were used at a level of 1% as positive control. The extract of LAE, compared to PDE, showed better inhibition ($P < 0.05$) of egg hatching. Different doses of both the LAE and PDE extracts showed a larvicidal effect ($P < 0.05$) on all larvae exposed to different doses of the extracts. In the larval migration assay, a similar effect with levamisole at doses of 250 and 500 µg/mL occurred with the LAE extract. The extract of *P. dulce* had a lower larvicidal effect ($P < 0.05$) than levamisole and *L. acapulcensis* extracts. Using aqueous extracts of both species of *L. acapulcensis* and *P. dulce* could be a promising alternative to synthetic anthelmintics as treatments of gastrointesti-

nal nematodes of sheep in organic and conventional production systems under subtropical conditions.

Introduction

Gastrointestinal parasitism in small ruminants in tropical regions has been classified as a major health and welfare problem. Helminthic infections are a major cause for reduced productivity in livestock, particularly those owned by poor farmers (Hounzangbe-Adote *et al.*, 2005). Development of resistant strains of nematodes to synthetic anthelmintics (Jackson and Coop, 2000) and the move to organic farming systems over the past few years have increased the demand for alternatives to chemoprophylaxis as a means of reducing the use of anthelmintic drugs to control parasites (Athanasiadou *et al.*, 2000; Waller and Thamsborg, 2004).

Use of plants containing high levels of condensed tannins (CT) or CT extracts (CTE) are potential alternative methods to reduce the worm burden, nematode female fecundity and egg hatchability (Athanasiadou *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2005; Githiori *et al.*, 2006). These plants, with anthelmintic properties, are promising due to their beneficial effects on health, rather than for their direct nutritional value. Both *L. acapulcensis* and *P. dulce* are native tree species widely distributed in the semi-arid regions of Mexico, which have high condensed tannins concentrations (Camacho *et al.*, 2010), and constitute a substantial part of the diet consumed by grazing goats and sheep.

The objective of the present study was to evaluate the anthelmintic effects of *Lysiloma acapulcensis* (LAE) and *Pithecellobium dulce* (PDE) on egg hatching, larval development and migration of gastrointestinal nematodes of sheep.

Materials and methods

Plant materials

Fresh leaves of *L. acapulcensis* and *P. dulce* were harvested in July 2011 from an area located at the Centro Universitario Universidad Autónoma del Estado de México, Temascaltepec, Mexico. Geographically, this is located at 19°02'04" west longitude at an elevation of 1720 m asl. The climate is moderately humid with an average temperature of 15 to 18°C an annual rainfall of 950 to 1000 mm (García, 1987).

Corresponding author: Prof. Abdelfattah Z.M. Salem, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto literario N. 100, C.P. 50000, Col. Centro, Toluca, Mexico.
Tel. +521.722.2965542 - Fax: +521.722.1806194.
E-mail: asalem70@yahoo.com

Key words: Anthelmintic, Extract, Nematodes, Sheep.

Received for publication: 11 September 2013.
Accepted for publication: 17 January 2014.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution NonCommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0).

©Copyright A. Olmedo-Juárez *et al.*, 2014
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Animal Science 2014; 13:3104
doi:10.4081/ijas.2014.3104

Preparation of plant extracts

Plant extracts were prepared according to Salem *et al.* (2006). Briefly, 100 g of each plant species leaves were chopped and extracted with distilled water (100 mL of water: 10 g of leaves). This solution was incubated for 48 h at room temperature, and then filtered through three layers of cheesecloth. Finally, the remaining fractions were lyophilised and kept refrigerated at 4°C in air-tight containers until use for biological assays.

Chemical composition and condensed tannins determination

Lyophilised samples of LAE and PDE were analysed for dry matter (DM) (method 934.01), organic matter (OM) (method 942.05), crude protein (CP) (method 954.01) according to AOAC (1990). Neutral (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were determined by the method of Van Soest *et al.* (1991). Total condensed tannins (TCT) were analysed using the butanol-HCL method (Terrill *et al.*, 1992), as modified by López *et al.* (2004), as internal standards using *L. acapulcensis*. Analyses of the free (FCT1), protein- (PCT) and fibre- (FCT2) bound CT were conducted following Porter *et al.* (1986). Purification was with Sephadex LH-20 as described by Asquith and Butler (1985), with the modifications of Hedqvist *et al.* (2000).

Gastrointestinal nematodes eggs recovery

A mixture of gastrointestinal nematodes (95% *Haemonchus contortus*, 2% *Trichostrongylus colubriformis* and 3%

Oesophagostomum columbianum) was recovered as described by Hubert and Kerboeuf (1992). Faeces (~1000 g) were obtained from two sheep, maintained as experimental donors, by hanging a faecal collection bag on the sheep overnight. The fresh faeces were suspended in water and cleared of organic debris by filtration through 250, 150, 100 and 60 µm sieves. Eggs were collected on a 32 µm sieve and the organic debris was further cleared by centrifugation (3500 *xg* for 5 min) in saline solution. The concentration in the suspension was estimated by counting the number of eggs in 200 µL samples, where the eggs suspension was adjusted to 400 eggs/mL.

Treatments

Nine treatments were evaluated, being: *P. dulce* (PD-125, PD-250 and PD-500 µg/mL), *L. acapulcensis* (LA-125, LA-250 and LA-500 µg/mL), phosphate buffer solution (PBS), was used as negative control and solvent of extracts, albendazole and levamisole both at 1% (ABZ and LV, were used as positive control) and dimethyl sulphoxide (DMSO, was used as negative control and solvent of ABZ).

Eggs hatch assay

The *in vitro* egg hatch assay was based on the method of Marie-Magdeleine et al. (2010). One mL of egg suspension was distributed in each well of 48 well plates containing ~400 eggs/well, and mixed with the same volume of plant extracts (i.e., 125, 250, 500 µg/mL). Albendazole at a 1% concentration was used as the positive control. The plates were incubated at 25°C for 48 h, when one drop of Lugol's iodine solution was added to stop egg hatching. All the eggs and first stage larvae (L₁), in each plate were counted with three replicates for each concentration and control.

Larval development assay

The procedure used was described by Hubert and Kerboeuf (1992) with modification of Assis et al. (2003). One thousand larvae (L₁ and L₂) were distributed into the wells of the 48 well plates. Larvae were recovered by the procedures described for eggs hatch assay and feed for 48 h in a nutritive solution of fecal juice and Amphotericin B to avoid fungal devel-

opment. At this time, the same volume of plants extracts (i.e., 125, 250, 500 µg/mL) were added and albendazole was used as the positive control as previously. There were three replicates for each treatment. Third-stage larvae (L₃) were obtained 7 d later. At this time, the parasites were counted under an inverted microscope by separation of the larvae into third stage larvae (L₃), and larvae of other development stages (L₁ and L₂).

Larval migration assay

The procedure used was that of Marie-Magdeleine et al (2010). One thousand live L₃ were added to centrifuge tubes (total of 30 tubes) containing negative control (PBS), a positive control (Levamisole at 1% concentration) and each extract to be tested (i.e., 125, 250, 500 µg/mL). Use of PBS aimed to avoid interference with any non-specific effect due to pH change. All incubations were for 3 h at 25°C. Thereafter, the L₃ from each tube was washed with PBS and centrifuged (5000 *xg* for 5 min) three times. Larvae were then transferred to sieves (inserts equipped with a 20 µm mesh positioned a conical tube). After 3 h at room temperature, the numbers of L₃ larvae which migrated through the mesh were counted in an optical microscope at 40 x in a 20% aliquot. The percentage migration was calculated as: total number of L₃ deposited in the sieve.

Statistical analyses

Data were transformed into and analysed with a completely randomised design using SAS (2006), where mean comparisons used Tukey's test at a confidence level of 95% (Steel and Torrie, 1980).

Results and discussion

Chemical composition and condensed tannins

The leaves of *Lysiloma acapulcensis* had higher concentrations of OM, NDF, ADF, FCT1, PCT and TCT than leaves of *Pithecellobium dulce* which had a higher content of CP and FCT2 (Table 1).

Eggs hatch assay

Both aqueous extracts of LAE and PDE, in addition to the negative and positive controls (i.e., PBS, ABZ, and DMSO), affected gastrointestinal nematodes egg hatching. Phosphate buffer solution and DMSO had the highest (P<0.05) egg hatching (96.7 and 68.1%, respectively) followed by PDE and LAE (P<0.05), with ABZ having the lowest (P<0.05) hatching percentage, i.e. 30.5% (Figure 1). Within PDE extract doses, there was increased hatching as the dose of extract increased (62.7, 59.6, and 56.3% for PD-125, PD-250, and PD-500, respectively) while, in LAE, the highest hatching (47.4%) was with the highest extract dose (i.e., 500 µg/mL) compared to the intermediate dose of 250 µg/mL which had the lowest value (32.6%; Figure 1).

Larval development and migration assay

Both the LAE and PDE extracts at different doses, and ABZ, resulted in almost no larval development (P<0.05) compared to 100 and 86.4% larval development for DMSO and PBS, respectively (Figure 2). The highest (P<0.05) larval migration was with PBS (79.3%) compared to other treatments which had values (P<0.05) of 2.9% for LV-500 and 16.1% with PD-500. The lowest (P<0.05) larval migration was with LV at all doses (4.6, 6.7, and 2.9% for LV-125, LV-250, and LV-500, respectively; Figure 3).

Eggs hatch and larval development assay

This study examined the *in vitro* bioactive properties of aqueous extracts from *Lysiloma acapulcensis* and *Pithecellobium dulce* on common gastrointestinal nematodes of sheep. Results showed that LAE has an ovicidal effect with doses of 250 and 500 µg/mL, which may be due to the condensed tannins in *L. acapulcensis* (116.3 g/kg DM; Table 1). Ademola and Eloff (2011), in their study with *Vernonia amygdalina* acetone extracts, inhibited egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus* larvae at a concentration of 957 µg/mL. It is well known that CT of tanniferous plants varies in their molecular weight and

Table 1. Chemical composition and concentration of condensed tannins (g/kg DM) in leaves of *L. acapulcensis* and *P. dulce*.

Species	OM	CP	NDF	ADF	FCT1	PCT	FCT2	TCT
<i>L. acapulcensis</i>	945.9	177.0	607.3	500.8	116.3	67.8	3.7	187.8
<i>P. dulce</i>	909.6	261.5	495.8	365.7	36.6	21.8	4.1	62.8

OM, organic matter; CP, crude protein; NDF, neutral detergent fiber; ADF, acid detergent fibre; FCT1, free condensed tannins; PCT, protein-bound condensed tannins; FCT2, fibre-bound condensed tannins; TCT, total condensed tannins.

composition (Mueller-Harvey, 2006; Gea *et al.*, 2011). Thus possible anthelmintic effects of tanniferous plants may depend on their CT contents as well as on other CT parameters such as the monomeric composition and degree of polymerisation (*i.e.*, average size of tannin molecules). Molan *et al.* (2003) and Brunet and Hoste (2006) suggested that prodelphinidin-rich tannins and their monomers have a stronger anthelmintic activity against sheep nematodes than do procyanidin-rich tannins and their monomers.

In our study, LAE showed anthelmintic properties with reduced egg hatching (32.6%), although the dose of 250 µg/mL was higher than that of PDE at 59.6%. Alonso-Díaz *et al.* (2008) showed that extracts of some tropical tanniferous plants (*i.e.*, *Acacia pennulata*, *Lysiloma latissiliqum*, *Leucanena leucocephala*), had *in vitro* anthelmintic effects against gastrointestinal nematodes using egg hatching and larval development assays. The hatching of nematode eggs is initiated by environmental stimuli which cause release of enzymes, such as proteases, lipases and chitinases, by the larvae which function to degrade the egg membrane (Mansfield *et al.*, 1992). The tanniferous compounds which are in extracts of *L. acapulcensis* may act to inhibit activity of these enzymes. Both LAE and PDE are more potent inhibitors of larval development than of egg hatching. Indeed results were similar to those of Molan *et al.* (2002), who found that extracts of *Lotus pendunculatus*, *Lotus corniculatus*, *Hedychium coronarium* and *Onobrychis vicifolia*, were more potent in inhibiting larval development (91%) than of egg hatching (34%). Unfortunately the design of this study did not include confirmation of the role of tannins in the anthelmintic effect observed using polyvinyl-pyrrolidone or polyethylene glycol as tannin blocking agents. However, it is possible to speculate that the more specific and strong actions of the tannin-rich extracts on larval development is related to the presence of proline and hydroxiprolin rich proteins in the nematode larval sheath and cuticle, and the high affinity of tannins to those proteins (Page, 2001).

Larval migration assay

The LAE (250 and 500 µg/mL) was more consistent on larval migration. Purified condensed tannins from several plant species were used *in vitro* against *T. colubriformis* and *T. circumcincta* (Molan *et al.*, 2000). The viability, motility and migration ability of the L₃ larvae of these nematodes were severely affected by the presence of CT in their environment. Lorimer *et al.* (1996) found that CT extracts reduced

migration of L₃ larvae of *T. colubriformis*. Other *in vitro* studies have shown that both purified condensed tannins and terpenoids from several legumes reduced the mobility, and consequent migration ability, of ovine nematode larvae (Molan *et al.*, 2000, 2003). In our study *L. acapulcensis*, a legumes with a

high CT content, was probably responsible for its anthelmintic properties.

Tannins are biochemical structures with a nature consistent with its constitutive monomer (flavan-3-ol). Condensed tannins can be distinguished into four classes: i) prodelphinidins, ii) procyanidins, iii) prorobe-

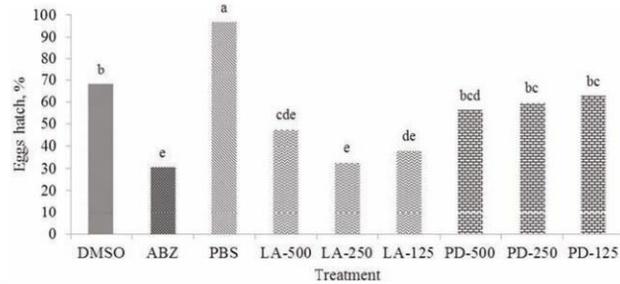


Figure 1. Effects of aqueous extracts of *L. acapulcensis* and *P. dulce* on egg hatching of gastrointestinal nematodes of sheep. Averages with different letters differ at P<0.05.

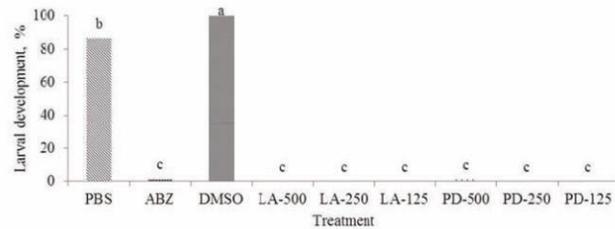


Figure 2. Effects of aqueous extracts of *L. acapulcensis* and *P. dulce* on larval development of gastrointestinal nematodes of sheep. Averages with different letters differ at P<0.05.

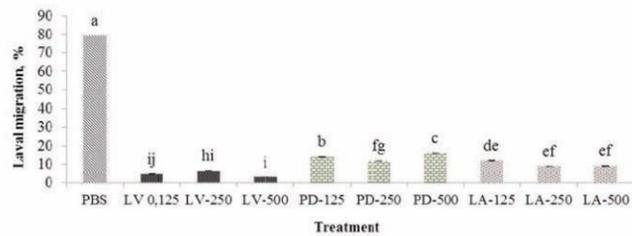


Figure 3. Effects of aqueous extracts of *L. acapulcensis* and *P. dulce* on larval migration of gastrointestinal nematodes of sheep. Averages with different letters differ at P<0.05.



tinidins, and iv) profisetinidins. In legume forages, both prodelphinidins and procyanidins are commonly present. However their ratios strongly differ among plant species and/or varieties (Mueller Harvey et al., 2006). By experimentally measuring effects of the different flavan-3-ols (monomers) which constitute either prodelphinidins or procyanidins, some data suggests that prodelphinidins have more potent anthelmintic activity than do procyanidins (Molan et al., 2003; Brunet et al., 2006, 2008). This hypothesis is also supported by the reality that legume fodders with a high content of prodelphinidin and/or procyanidins (e.g. sainfoin, sericea lespedeza, *Lotus pedunculatus*) have shown more consistent anthelmintic activity than species with a low prodelphinidin and/or procyanidins ratio (*Lotus corniculatus*; Molan et al., 2003).

In vitro and *in vivo* assays indicate that tannins disturb the two early steps of nematode establishment, being larval exsheathment (Brunet and Hoste, 2006; Brunet et al., 2007) and penetration of the exsheathed larvae within the digestive mucosae (Brunet et al., 2008). These functional modifications have been associated with major changes in larval ultrastructure. Similarly, observations of transmission and scanning electron microscopy on adult *H. contortus*, after *in vitro* and/or *in vivo* contact with tree rich plants, have shown modifications to the cuticle, the digestive tract and the female reproductive tract, which may explain their negative consequences on adult worm populations, particularly those affecting egg excretion (Brunet et al., 2011).

Ovicidal and larvicidal activity against gastrointestinal strongyles in our study showed evidence that extracts of the two trees have anthelmintic activity. This is of vital importance in southern Mexico State, and other areas of the world, where the production systems of sheep and goats during the dry period depend mainly on feeding animals trees and shrubs, among which the two species which we studied dominate. That is why use of extracts of both species tested may represent an alternative to control of gastrointestinal nematodes in sheep, reducing indiscriminate use of synthetic wormers. However *in vivo* studies are required to support the promising *in vitro* assay data of our study.

Conclusions

Aqueous extracts of *Lysitoma acapulcensis* and *Phitecellobium dulce* species could be beneficial as phytogetic anthelmintics in sheep,

and could be used to control gastrointestinal nematodes in sheep under subtropical conditions.

References

- Ademola, I.O., Eloff, J.N., 2011. Anthelmintic activity of acetone extracts and fractions of *Veronia amigdalina* against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Trop. Anim. Health Pro.* 43:521-527.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet. Parasitol.* 153:313-319.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Asquith, T.N., Butler, L.G., 1985. Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *J. Chem. Ecol.* 11:1535-1544.
- Assis, L.M., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Vieira, L.S., Costa, C.T.C., Souza, J.A.L., 2003. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 117:43-49.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000. Consequences of long term feeding with condensed tannins on sheep parasitized with *Trichostrongylus colubriformis*. *J. Parasitol.* 30:1025-1033.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* 99:205-219.
- Brunet, S., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, I., Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract. *Parasitology* 134:1253-1262.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agr. Food Chem.* 54:7481-7487.
- Brunet, S., Hoste, H., Arroyo López, C., Manolaraki, F., Martínez-Ortiz de Montellano, C., Sotiraki, S., Torres-Acosta, F., 2011. The anthelmintic properties of tannin-rich legume forages: from knowledge to exploitation in farm conditions. In: J.M. Ranilla (ed.) *Challenging strategies*

to promote the sheep and goat sector in the current global context. CIHEAM/CSIC/Universidad de León/FAO, Zaragoza, Spain, pp 295-304.

- Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., 2008. Effects of sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38:783-790.
- Camacho, L.M., Rojo, R., Salem, A.Z.M., Provenza, F.D., Mendoza, G.D., Avilés, F., Montañez-Valdez, O.D., 2010. Effect of season on chemical composition and *in situ* degradability in cows and in adapted and unadapted goats of three Mexican browse species. *Anim. Feed Sci. Tech.* 155:206-212.
- García, E., 1987. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.
- Gea, A., Stringano, E., Brown, R.H., Mueller-Harvey, I., 2011. *In situ* analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) tannins for high throughput germplasm screening. *J. Agr. Food Chem.* 59:405-503.
- Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet. Parasitol.* 139:308-320.
- Hedqvist, H., Mueller-Harvey, I., Reed, J.D., Krueger, C.G., Murphy, M., 2000. Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Anim. Feed Sci. Tech.* 87:41-56.
- Hounzangbe-Adote, M.S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H., 2005. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Res. Vet. Sci.* 78:155-160.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A micro larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 130:442-446.
- Jackson, F., Coop, R.L., 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120:95-107.
- López, J., Tejada, I., Vázquez, C., De Dios, G., Shimada, A., 2004. Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their *in vitro* biological activity. *J. Sci. Food Agric.* 84:295-299.
- Lorimer, S.D., Perry, N.B., Foster, L.M., Burgess, E.J., 1996. A nematode larval



- motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. *J. Agr. Food Chem.* 44:2842-2845.
- Mansfield, L.S., Gamble, H.R., Fetterer, R.H. 1992. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*-I. Structural components. *Comp. Biochem. Physiol.* 103b:681-686.
- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., Archimede, H., 2010. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 173:85-92.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 33:1691-1698.
- Molan, A.L., Waghorn, G.C., Min, B.R., McNabb, W.C., 2000. The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. *Folia Parasit.* 47:39-44.
- Molan, A.L., Waghorn, G.C., Min, B.R., McNabb, W.C., 2002. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Vet. Rec.* 150:65-69.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agr.* 86:2010-2037.
- Nguyen, T.M., Van Binh, D., Ørskov, E.R., 2005. Effect of foliages containing condensed tannins on gastrointestinal parasites. *Anim. Feed Sci. Tech.* 121:77-87.
- Page, A.P., 2001. The nematode cuticle: synthesis, modification and mutants. In: M.W. Kennedy and W. Harnett (eds.) *Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology*. CAB, London, UK, pp 167-193.
- Porter, L.J., Hirstich, L.N., Chan, B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25:223-230.
- Salem, A.Z.M., Salem, M.Z.M., El-Adawy, M.M., Robinson, P.H., 2006. Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and in vivo digestibility in sheep and goats. *Anim. Feed Sci. Tech.* 127:251-267.
- SAS, 2006. *SAS user's guide: statistics*. Version 9.0. SAS Inst., Cary, NC, USA.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980. *Bioestadística: principios y procedimientos*. McGraw-Hill Interamericana, Santa Fé, Mexico.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58:321-329.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:583-597.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M., 2004. Nematode control in green ruminant production systems. *Trends Parasitol.* 20:493-497.

Artículo 2. Enviado para su revisión y arbitraje a la Revista Universidad y Ciencia.

**DIGESTIBILIDAD Y PARAMETROS DE FERMENTACION RUMINAL EN OVINOS RECIBIENDO
DIFERENTES NIVELES DE TANINOS CONDENSADOS LIBRES DE *Lysiloma acapulcensis*.**



Agustín Olmedo <aolmedoj@gmail.com>

Rv: Acuse de recibo 1057

1 mensaje

Rolando Rojo <dr_rojo70@yahoo.com.mx>

5 de marzo de 2014, 15:15

Responder a: Rolando Rojo <dr_rojo70@yahoo.com.mx>

Para: AGUSTIN OLMEDO <aolmedoj@yahoo.com.mx>, Agustín Olmedo <aolmedoj@gmail.com>

Estimado Agustín, te envío acuse de recibido de segundo Artículo.

Dr. Rolando Rojo Rubio
PROFESOR INVESTIGADOR TC
Universidad Autónoma del Estado de México

El Miércoles, 5 de marzo, 2014 14:17:30, REVISTA UNIVERSIDAD Y CIENCIA

<universidadyciencia@ujat.mx> escribió:

Dr. Rolando Rojo Rubio

PROFESOR INVESTIGADOR TC

Universidad Autónoma del Estado de México

Tengo el agrado de comunicar que recibimos copia electrónica del manuscrito:

1057UC DIGESTIBILIDAD Y PARAMETROS DE FERMENTACION RUMINAL EN
OVINOS RECIBIENDO DIFERENTES NIVELES DE TANINOS DE Lysiloma
acapulsensis

Agradecemos el envío del manuscrito para su posible publicación, y en breve le
estaremos enviando comentarios editoriales o confirmando si pasa al proceso de
arbitraje.

Lic. Misael Hernández

Coordinador Editorial

Revista Universidad y Ciencia

<http://www.universidadyciencia.ujat.mx>

<http://www.conacyt.gob.mx/Indice/Paginas/Indice8.aspx>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Revista en el Índice CONACYT

Av. 27 de Febrero No. 626, Col, Centro,

Villahermosa, Tabasco, México.

Tel./Fax: 01 993 3 58 15 00 ext. 5041

universidadyciencia@ujat.mx

Email secured by Check Point

**DIGESTIBILIDAD Y PARAMETROS DE FERMENTACION RUMINAL EN OVINOS RECIBIENDO
DIFERENTES NIVELES DE TANINOS CONDENSADOS LIBRES DE *Lysiloma acapulcensis***

**DIGESTIBILITY AND RUMINAL FERMENTATION IN SHEEP WITH CONSUMING DIFFERENT
LEVELS OF FREE CONDENSED TANNINS FROM *Lysiloma acapulcensis***

Agustín Olmedo Juárez¹, Rolando RojoRubio^{1*}, Javier Arece García², Abdel Zeidan Mohamed
Salem³, Ernesto MoralesAlmaraz³, Benito Albarrán Portillo¹

¹Centro Universitario UAEM-Temascaltepec, Universidad Autónoma del Estado de México, km 67.5

Carr. Fed. Toluca-Tejupilco, Estado de México, 51300 Temascaltepec, México, México

dr_rojo70@yahoo.com.mx

²Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Indio Hatuey, Matanzas, CUBA

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México

RESUMEN

El objetivo fue evaluar *in vitro* e *in vivo* el valor nutricional de una dieta basal para ovinos adicionada con diferentes niveles de taninos condensados libres (TCL) ($T_0=0$; $T_1= 2.5$; $T_2 = 5.0$ y $T_3=7.5$ g d⁻¹) provenientes de *Lysiloma acapulcensis*. Para el experimento *in vitro* se utilizó la técnica de producción de gas y en el ensayo *in vivo* a cuatro ovinos (60 ± 3 Kg de peso vivo) canulados en rumen. Los datos se analizaron mediante un diseño completamente al azar y cuadrado latino respectivamente. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$), sobre los parámetros de fermentación (asíntota y tasa de producción de gas), T_2 y T_3 , presentaron los valores más bajos (0.03 h) en comparación a T_0 y T_1 (0.04 h). El contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y energía metabolizable (EM), se redujo en los en los tratamientos que contenían TCL. La digestibilidad aparente de la proteína cruda (DAPC), fue diferente ($P < 0.05$); T_2 presentó los valores más altos (790 g kg⁻¹ de MS). Las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) fueron menores ($P < 0.05$), en T_3 y T_0 , en las horas 0, 4, 20 y 24 (9.5, 4.67, 6.91 y 6.89 mg dL⁻¹). Las poblaciones de protozoarios fueron superiores ($P < 0.5$) en los tratamientos con TCL (0, 4, 8 y 12 postalimentación). Se concluye que la adición de TCL mejora la DAPC, aumentan los niveles de N-NH₃, disminuyen los AGCC, EM y estimulan el crecimiento de protozoarios ruminales.

Palabras clave: Digestibilidad, nutrientes, cinética de fermentación ruminal, taninos condensados libres, ovinos

ABSTRACT

In order to evaluate *in vitro* and *in vivo* the nutritional value of a basal diet for sheep adding with different levels of free condensed tannins (FCT) ($T_0 = 0$, $T_1 = 2.5$, $T_2 = 5.0$, $T_3 = 7.5$ g d⁻¹) in form *Lysiloma acapulcensis* extract. For in vitro experiment the gas production technique was used and in vivo assay four sheep (60 ± 3 kg BW) equipped with rumen cannula. Data were analyzed using a

completely randomized design and a Latin square respectively. Significant differences ($P < 0.05$) on the fermentation parameters (asymptotic and gas production rate), T_2 and T_3 , had the lowest values (0.03 h) compared to T_0 and T_1 (0.04 h) were observed. The content of short-chain fatty acids (SCFA) and metabolizable energy (ME), was reduced in the treatments containing FCT. Apparent digestibility of crude protein (ADCP) was different ($P < 0.05$), T_2 showed the highest values ($790 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$). The concentrations of ammonia nitrogen ($\text{NH}_3 - \text{N}$), were lower ($P < 0.05$) in T_3 and T_0 , at hours 0, 4, 20 and 24 (9.5, 4.6, 6.91 and 6.89 mg dL^{-1}). Protozoa populations were higher ($P < 0.5$) in the treatment with FCT (0, 4, 8 and 12 post feeding). It is concluded that the addition of FCT enhance the DACP, increase levels of N- NH_3 , decrease SCFA and ME but stimulate growth of ruminal protozoa .

Key words: Digestibility, nutrients, kinetics ruminal fermentation, free condensed tannins, sheep

INTRODUCCIÓN

El uso de aditivos en la producción de rumiantes es un tema ampliamente estudiado, se han utilizado con el objetivo de mejorar el aprovechamiento de los nutrientes. Dentro de los principales aditivos implementados en la producción animal se encuentran los ionoforos, antibióticos, enzimas y extractos de plantas ricas en taninos. El uso de extractos a nivel experimental ha tenido un creciente interés en los últimos años, debido a que es un aditivo natural, al cual se atribuyen diferentes propiedades benéficas en el animal, ejemplo de ellos son los taninos condensados (TC), que mejoran la eficiencia de utilización de la proteína, al convertirla en proteína de sobrepaso. Así mismo tienen actividad antihelmíntica en nematodos gastrointestinales (NGI) de ovinos y caprinos (Ademola y Eloff 2011; Novobilský *et al.* 2011, Olmedo *et al.* 2013). Desde el punto de vista metabólico se ha observado que los TC reducen la degradación de los carbohidratos estructurales al disminuir la población de bacterias celulolíticas (Makkar *et al.* 1995), evitando la adherencia microbiana sobre las partículas de los alimentos, afectando así, la degradación de la celulosa. Por otra parte estudios *in vitro* han demostrado que los taninos a concentraciones superiores al 7% en la dieta, tienen efecto defaunador. El principal factor que tienen los TC en el rumen es el formar complejos con las proteínas de los alimentos, bacterias y protozoarios, es por ello que los efectos en concentraciones superiores a los 50 g TC kg⁻¹ MS en el rumen, disminuyen las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃), adicionalmente tienen capacidad para secuestrar los compuestos nitrogenados reduciendo la actividad proteolítica de las bacterias ruminales. En este sentido, debido al contenido de TC en las leguminosas arbóreas, resulta importante evaluarlas a pesar de que se han hecho investigaciones en géneros como *Leucaena* y *Lysiloma*; sin embargo, los resultados son contradictorios, por tal motivo la presente investigación evaluó el efecto de los TCL del extracto de *Lysiloma acapulcensis*, a diferentes dosis en ensayos *in vitro* e *in vivo*, sobre la degradabilidad de los

nutrientes, parámetros de fermentación ruminal y población de protozoarios en ovinos recibiendo una dieta basal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización geográfica del sitio experimental. Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de bromatología y área metabólica de la posta zootécnica del Centro Universitario UAEM - Temascaltepec, el cual se localiza al sur poniente de la capital del Estado, la altura sobre el nivel del mar es de 1740 m, clima cálido sub-húmedo con presencia de lluvias en verano (*Aw*) (García, 1981).

Colección del material vegetal y preparación de los extractos de *Lysiloma acapulcensis*. Las muestras del material vegetal (hojas tiernas y maduras) se obtuvieron de 49 árboles (siete repeticiones de siete árboles cada una). Este material fue colectado por la mañana y depositado en una hielera para trasladarse al laboratorio para evitar cambios en su composición (FAO 2000). Los extractos se prepararon mediante la metodología propuesta por Salem *et al.* (2006). Las hojas se secaron a 45°C en una estufa de aire forzado, posteriormente se molieron y se prepararon los extractos, utilizando como solvente agua destilada (10 g de hojas en 100 ml de agua) y se incubaron en baño maría a temperatura ambiente (23°C) durante 48 horas, posteriormente se sometieron a un proceso de liofilización.

Análisis químico proximal (AQP) y determinación de taninos condensados. A las muestras liofilizadas de *Lysiloma acapulcensis*, se les se realizó el análisis químico proximal (g kg⁻¹ MS)(materia orgánica (MO): 945.9, Proteína cruda (PC): 177.0, Fibra detergente neutro (FDN): 607.3, Fibra detergente ácido (FDA): 500.8; y concentración de taninos condosados y su

fraccionamiento(g kg⁻¹ MS): Taninos condensados libres (TCL); 116.3, Taninos condensados adheridos a la proteína (TCP); 67.8, Taninos condensados adheridos a la fibra (TCF); 3.7 y Taninos condensados totales (TCT); 187.8.. Para la determinación de materia orgánica (MO) y proteína cruda (PC) se utilizó el procedimiento del AOAC (1990). Las fracciones de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) por el método de Van Soest *et al.* (1991). El total de taninos condensados (TTC) se analizaron mediante el método de butanol-HCl (Terril *et al.* 1992), modificado por López *et al.* (2004), utilizando como patrón interno *L. acapulcensis*. Los análisis de taninos condensados libres (TCL) se determinaron por el método de Porter *et al.* (1986), la purificación de taninos se realizó con Sephadex LH-20 como lo describen Asquith y Butler (1985), según Hedqvist *et al.* (2000).

Tratamientos. Los tratamientos fueron: T₀=0; T₁= 2.5; T₂ = 5.0 y T₃=7.5 g d⁻¹ de TCL kg⁻¹ MS. En el experimento *in vitro* las dosis se ajustaron al sustrato que se incubo y se aplicaron en forma liofilizada diluida en agua destilada. Para el caso del ensayo *in vivo* el extracto fue aplicado directamente al rumen de forma liofilizada, dosificada a tres frecuencias (7:00, 13:00 y 19:00 horas) antes de ofrecer el alimento. Para ambos ensayos se utilizó una dieta base (Tabla 1), para ovinos en crecimiento (NRC, 2007).

Experimento *in vitro*. En este experimento se utilizó la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.* (1994). El líquido ruminal se obtuvo del rumen de cuatro ovinos fistulados. Una vez colectado el líquido, fue llevado al laboratorio donde se gasificó con CO₂, de manera constante durante su mezclado con el medio nutritivo en una relación de 1:9 (10 ml de líquido ruminal y 90 ml de medio nutritivo), en botellas de 160 ml a las cuales previamente se les había depositado un gramo de sustrato aproximadamente. Se utilizaron 12 botellas por tratamiento, misma que fueron consideradas

como repeticiones independientes, con la finalidad de disminuir el error experimental; la incubación, se repitió tres ocasiones, considerándola como criterio de bloqueo. El registro del gas producido producto de la degradación del sustrato se midió durante 96 h, a intervalos de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 48, 72 y 96 h. La incubación se realizó en una incubadora All Tech 2030 a 39 °C y el volumen de gas producido fue registrado con la ayuda de un transductor de presión EXTECH, Modelo 407910.

Degradabilidad de la materia seca, orgánica, cinética de degradación y parámetros de fermentación. Los cálculos para determinar la degradabilidad de la MS y MO (DIVMS y DIVMO), fueron determinados de forma gravimétrica (sustrato incubado menos sustrato degradado). La cinética de producción de gas fue estimada utilizando el modelo de France *et al.* (2000), para la transformación de la base de datos de PSI a ml g⁻¹ MS, se usó el modelo NLIN (SAS 2006). La energía metabolizable (EM) fue calculada por el modelo de Menke y Steingass (1988). Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), se calcularon por la fórmula de Getachew *et al.* (2002).

Experimento *in vivo*

Animales. Para la determinación de la digestibilidad *in vivo* se utilizó una dieta base (Tabla 1), la cual fue proporcionada a cuatro ovinos fistulados en rumen, durante 60 días, divididos en cuatro periodos de 15 días para cada uno, de los cuales 10 fueron para adaptación a la dieta y 5 de toma de muestras (alimento, heces y líquido ruminal).

Colecta de muestras de heces y alimento. La colección total de heces se realizó durante cuatro días de los cinco de muestreo, utilizando arneses individuales, la colecta se realizó a intervalos de 12 horas (7 am y 7 pm). Diariamente se tomaron 20 g de heces frescas para determinar MS y hacer

un pool por animal de los cuatro días. Muestras de alimento también fueron tomadas por periodo y sometidas al análisis químico proximal y de esta forma determinar la digestibilidad aparente de los nutrientes (MS, MO, PC, FDN y FDA).

Colecta de líquido ruminal. La colección de líquido ruminal se realizó en el quinto día de muestreo, con la ayuda de una bomba de vacío (V-3020), el esquema de muestreo durante 24 horas fue dividido en siete tiempos, considerando las 7 am como el tiempo cero. La cantidad de líquido ruminal tomado fue de 100 ml, al cual se le midió el pH inmediatamente (Potenciómetro Orion 3020), posteriormente fue filtrado con una manta de cielo en cuatro capas; después de esto, una porción fue acidificada con ácido clorhídrico al 50 % en una relación de 4:1, para determinar nitrógeno amoniacal. Para el conteo de protozoarios a un ml de líquido ruminal se le adicionó un ml de solución Coleman, todas las muestras fueron mantenidas en refrigeración hasta su análisis posterior en el laboratorio.

Diseño experimental y análisis de la información. En el experimento *in vitro* se utilizó un diseño de bloque completo al azar (la incubación repetida tres veces, considerada como criterio de bloqueo) y para el ensayo *in vivo* se usó el diseño de cuadro latino (Steel y Torrie 1980). Toda la información se analizó con el paquete estadístico SAS (2006), cuando existieron diferencias entre tratamientos, la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey a un nivel de significancia $P < 0.05$ (Steel y Torrie 1980).

RESULTADOS

Degradabilidad de la materia seca, orgánica, parámetros de fermentación y producción de gas. No se observaron diferencias ($P > 0.05$), en la degradabilidad de la materia seca y orgánica (Tabla2). En la tasa de producción de gas (b) hasta alcanzar la asíntota, el tratamiento donde se incluyeron 2.5 g d⁻¹ de TCL, fue el que menor volumen produjo ($P < 0.05$). La tasa fraccional de producción de gas (c) fue mayor ($P < 0.05$) en los tratamientos que contenían 0.0 y 2.5 g TCL, comparada con los tratamientos que contenían 5 y 7.5 g d⁻¹. En lo que se refiere a la fase *Lag* no se encontraron efectos ($P > 0.05$). Los AGCC, fueron mayores ($P < 0.05$) en la dieta sin extracto (2.97 mmol). La producción de gas en la hora 24 fue mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento control (267.91 ml g⁻¹ de MS) y en la hora 48 el tratamiento que presentó menor producción de gas fue la dosis de 2.5 g TCL. El total del gas producido a las 96 h de fermentación fue más alto en el tratamiento que incluyó el nivel de 5.0 g d⁻¹ de TCL.

Digestibilidad aparente de los nutrientes. En la tabla 3 se observan las diferencias ($P < 0.05$) en la digestibilidad aparente de la proteína cruda. Se aprecia un efecto cuadrático, encontrando los mejores resultados en la dosis de 5 g de TCL (79.40 g kg⁻¹ de MS).

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃). Se observaron diferencias ($P < 0.05$) en las hora 0, 4, 20 y 24, siendo los tratamientos 7.5 y 0.0 con las concentraciones más bajas (9.5, 4.67, 6.91 y 6.89 mgdL⁻¹, respectivamente).

Protozoarios. En la tabla 4 se muestran los resultados de la concentración de protozoarios ruminales en diferentes horas. Se observó un efecto lineal ($P < 0.05$), en la hora 0, 4 8 y 12 y un efecto cuadrático ($P < 0.05$) en la hora 24, encontrándose efectos estimulatorios con estas dosis de TCL.

DISCUSIÓN

Degradabilidad de la materia seca y orgánica, parámetros de fermentación y producción de gas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los diferentes niveles de extracto mostraron efecto nulo en la degradabilidad *in vitro* de la materia seca y orgánica. Sin embargo, en estudios realizados por Hervás *et al.* (2003), utilizando extractos de quebracho (*Schinopsis spp.*) a concentraciones de 28, 83 y 166 g kg⁻¹ MS de alimento, encontraron efectos negativos en la degradación de la materia seca y orgánica en la dosis más alta, debido a los elevados niveles de taninos condensados (76%) que posee esta especie los cuales se conoce que interfieren en la degradabilidad de la MS .

En el presente estudio, a pesar de haberse reportado para esta planta elevadas concentraciones de compuestos secundarios, principalmente taninos totales (187,8 g kg⁻¹ de MS) no se encontró interferencia en la degradación de la MS y MO. En contraste, McSweeney *et al.* (2001), han demostrado que el uso de extractos con alto contenido de taninos condensados (TC) (>6% kg de MS) tiene efecto negativo sobre la degradación de la MS y MO. Por otra parte, en los parámetros de producción de gas (figura 1), la acumulación de gas producido a las 96 horas, se observó una mayor producción en el tratamiento que no contenía extracto, lo que significa que el extracto tiene efecto negativo sobre la producción de gas acumulado. Este fenómeno se basa en estudios evaluados por diversas investigaciones (Hess *et al.* 2003; Wina *et al.* 2005), en ensayos *in vitro* e *in vivo* utilizando extractos de diferentes plantas, a nivel de rumen, disminuyen la concentración de las bacterias que producen metano y en efecto se observa un aumento en la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGCC), además de un efecto protector de la proteína. Sin embargo, en las dosis usadas de extractos en este ensayo se redujo la concentración de AGCC, encontrándose la mayor concentración en la dieta que no contenía extracto. Otros estudios realizados por Cardozo *et al.* (2004), utilizando diferentes dosis de extractos de plantas (*Yucca schidigera*, *Allium sativa*, *Cinnamomum cassia*), han demostrado no tener efectos negativos sobre el contenido total de ácidos

grasos de cadena corta. Esto se podría explicar debido a la cantidad y tipo de componentes moleculares que contenían estos (carvacol, eugenol, taninos). En contraste Busquet *et al.* (2005), evaluaron extractos de esas plantas a dosis más altas (3000 mg L⁻¹), observándose un decremento en la concentración de AGCC.

En lo que se refiere al contenido de energía metabolizable (EM), los resultados obtenidos en este ensayo, presentaron el mismo efecto que el contenido de AGCC, comportamiento que puede ser explicado al efecto que tienen los taninos condensados libres sobre el secuestro de carbohidratos, especialmente las fracciones de fibra, formando complejos, que podrían presentar mayor resistencia a la degradabilidad por parte de las enzimas producidas por los microorganismos ruminales, lo que se traduce en menor producción de AGCC, como sucedió en el presente estudio donde se incluyeron los diferentes niveles de TCL, efecto que se reflejó en el gas acumulado durante las primeras 24 h de fermentación. Con esto se demuestra que en dietas basales donde se incluyen taninos condensados libres se podría estar afectando la cantidad de energía disponible para el animal en forma de AGV de cadena corta. Sin embargo, no se debe olvidar que no precisamente a mayor cantidad de gas acumulado, se tendría mayor disponibilidad de energía, dado que también se produce productos inútiles como CH₄ y el CO₂ (Van Soest 1982), que contribuyen a la ineficiencia energética en el metabolismo de los nutrientes contenidos en la dieta de los animales rumiantes.

Digestibilidad aparente de los nutrientes. El efecto de los taninos condensados sobre la digestibilidad de la proteína es debido a la capacidad que tienen los TCL para interactuar con el grupo amino de los aminoácidos que constituyen las proteínas (McSweeney *et al.* 1999), formando complejos estables a pH neutros, pero inestables a pH ácidos, teniendo un efecto positivo en la digestibilidad de los compuestos nitrogenados a ciertas concentraciones (mayores a 50 g kg⁻¹ de MS). Ahora bien, el efecto de los taninos varía, de acuerdo al estado fisiológico del animal y la

estructura química de los taninos ingeridos (Clausen *et al.* 1990; Provenza *et al.* 1990; Hagerman y Butler 1991). En este estudio se observó un aumento de la digestibilidad de la proteína cruda con la dosis de cinco gramos de TCL, esto pudo ser debido a la formación de complejos tanino-proteína, previniendo el ataque a la proteína de los microorganismos ruminales, lo cual puede ser benéfico para el aprovechamiento de la proteína a nivel duodenal (Mueller-Harvey 2006).

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃). Los efectos cuadráticos encontrados en este estudio demuestran la disparidad de cambios que tienen los taninos condensados. Algunos autores han indicado que los efectos principales que tienen los taninos condensados libres en el rumen de ovinos, incluyen una reducción en la proteólisis de la proteína del alimento y una pérdida subsecuente en la concentración de nitrógeno amoniacal en el fluido ruminal (Min *et al.* 2003, Waghorn 2008).

Protozoarios. Los efectos estimulatorios de la población de protozoos en este experimento, probablemente fueron debido a las dosis utilizadas. En otros trabajos se ha reportado la capacidad defaunante de algunas plantas utilizadas en la alimentación de rumiantes, a las cuales se les ha encontrado compuestos como taninos, saponinas, alcaloides (McSweeney *et al.* 1999). Sin embargo la defaunación de extractos de ciertas plantas han mostrado efectos variables, debido a que en algunas se ha reportado un efecto positivo al eliminar o reducir la población de protozoarios del rumen (Newbold *et al.* 1997), mientras que en otras, los mismos extractos no la afectaron; en otros en cambio, aumentaron la concentración ruminal de protozoarios (McSweeney *et al.* 1999; Galindo *et al.* 2000). Todo esto depende de la naturaleza de los metabolitos secundarios y concentración en las plantas (Makkar *et al.* 1995).

CONCLUSIONES

Se concluye que la adición de TCL, mejoran la digestibilidad de la proteína cruda, aumentando los niveles de N-NH₃, afecta algunos parámetros de fermentación (AGCC y EM), así mismo tienen efecto estimulador sobre el crecimiento de los protozoarios ruminales, por lo tanto estas dosis podrían ser utilizadas como aditivos para ovinos en fase de crecimiento.

LITERATURA CITADA

- Ademola IO, Eloff JN (2011) Anthelmintic activity of acetone extract and fractions of *Veronia amygdalina* against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Tropical Animal Health and Production* 43: 521-527.
- Ademola IO, Fagbemi BO, Idowu SO (2005) Anthelmintic activity of extracts of *Spondias mombin* against gastrointestinal nematodes of sheep: Studies *in vitro* and *in vivo*. *Tropical Animal Health and Production* 37: 223-235.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Hoste H (2008) In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology* 153: 313-319.
- Arece J, Mahieu M, Archimède H, Aumont G, Fernández M, González E, et al.(2004) Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Research* 5 (1-2): 61-67.
- Asquith TN, Butler LG (1989) Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *Journal of Chemistry Ecology* 11: 1535–1544.
- Assis LM, Bevilaqua CML, Morais SM, Vieira LS, Costa CTC, Souza JAL (2003) Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 117: 43-49.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists)(1997) *Official Methods of Analysis*, 16th edition. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL (2001) Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology* 99: 205–219.

- Brunet S, Hoste H (2006). Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal Agricultural Food Chemistry* 54: 7481-7487.
- Brunet S, Aufrere J, El Babili F, Fouraste I, Hoste H (2007) The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract. *Parasitology* 134: 1253-1262.
- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2005) Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology* 124: 597–613.
- Camacho LM, Rojo R, Salem AZM, Provenza FD, Mendoza GD, Avilés F, et al. (2010) Effect of season on chemical composition and *in situ* degradability in cows and in adapted and unadapted goats of three Mexican browse species. *Animal Feed Science and Technology* 155: 206-212.
- Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2004) Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science* 82: 3230–3236.
- Clausen TP, ProvenzaFD, Burrit EA, Reichardt PB, Bryant. JP (1990) Ecological implications of condensed tannin structure: a case study. *Journal of Chemistry and Ecology* 16: 2381-2392.
- Food and Agriculture Organization (2000) www.fao.org.
- France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, Lopez S, Bannink A (2000) Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition* 83: 143–150.
- García ME (1986) *Apuntes de climatología*, 5^a Edición. Enriqueta García de Miranda, México, D.F. 155 p.

- Getachew G, Makkar HPS, Becker K (2002) Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science* 139: 341–352.
- Gea A, Stringano E, Brown RH, Mueller-Harvey I (2011) In situ analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) tannins for high throughput germplasm screening. *Journal Agricultural Food Chemistry* 59: 405-503.
- Githiori JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM (2006) Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology* 139: 308–320.
- Hedqvist H, Mueller-Harvey I, Reed JD, Krueger CG, Murphy M (2000) Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology* 87: 41–56.
- Hervás G, Frutos P, Giráldez FJ, Mantecón AR, Álvarez Del Pino MC (2003) Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology* 109: 65-78.
- Hess HD, Kreuzer M, Diaz TE, Lascano CE, Carulla JE, Soliva CR, et al. (2003) Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology* 109: 79–94.
- Hagerman AE, Butler LG (1991) Tannins and lignins. In: G.A. Rosenthal and M. R. Berenbaum (Ed.) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites. Vol. I: The Chemical Participants*. Academic Press, New York. pp: 355-388.
- Hubert J, Kerboeuf D (1992) A micro larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record* 130: 442-446.

- López J, Tejada I, Vázquez C, De Dios G, Shimada A (2004) Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their *in vitro* biological activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 295–299.
- McSweeney CS, Palmer B, McNeill DM, Krause DO (2001) Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science Technology* 91: 83–93.
- Makkar HPS, Blümmel M, Becker K (1995) *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69: 481-493.
- Meagher LP, Lane G, Sivakumaran S, Tavendale MH, Fraser K (2004) Characterization of condensed tannins from *Lotus* species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry. *Animal Feed Science and Technology* 117: 151-163.
- Menke KH, Steingass H (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28: 7–55.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106: 3–19.
- Molan AL, Meagher LP, Spencer PA, Sivakumaran S (2003) Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal of Parasitology* 33: 1691-1698.
- Molan AL, Alexander RA, Brookes IM, McNabb WC (2000) Effect of an extract from sulla (*Hedysarum coronarium*) containing tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes *in vitro*. *Process New Zealand Society Animal* 60: 21-25.
- Mueller-Harvey I (2006) Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal Science Food Agricultural* 86: 2010-2037.

- Novobilský A, Muller-Harvey I, Milan ST (2011) Condensed tannins act against cattle nematodes. *Veterinary Parasitology* 182: 213-220.
- NRC (2007) Nutrient Requirements of Small Ruminants. Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Animal Nutrition Series. The National Academy Press. Washington, DC, USA. 362 pp.
- Olmedo JA, Rojo R, Arece J, Salem AZM, Morales E, Aviles F, et al. (2013) In vitro anthelmintic activity of crude aqueous extracts of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* against gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Journal of Animal Science* 91: 53-54.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25: 223-230.
- Provenza FD, Burritt EA, Clausen TP, Bryant JP, Reichardt PB, Distel RA (1990) Conditioned flavor aversion: a mechanism for goats to avoid condensed tannins in black brush. *Am. Nat.* 136: 810-828.
- Salem AZM, Salem MZM, El-Adawy MM, Robinson PH (2006) Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goat. *Animal Feed Science and Technology* 127: 251-267.
- SAS Institute (2006) *SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0.* SAS Institute. Cary, N.C. USA. 956 p.
- teel RGD, Torrie JH (1980) *Bioestadística: Principios y procedimientos.* Mc Graw-Hill. México. 181-184 pp.
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.

- Thompson DP, Geary, TG (1995) The structure and function of helminthic surface. In: J. J. Marr and M. Muller, (eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*, Academic Press, New York. 203-232 pp.
- Van Soest PJ (1982) *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Comstock, Cornell Univ. Press, New York, NY.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 583- 597.
- Wina E, Muetzel S, Hoffmann E, Makkar HPS, Becker K (2005) Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 121: 159–174.
- Waghorn GC, (2008) Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147: 116–139.
- Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, Von Samson Himmelstjerna G, Sangster NC (2004) Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* 20: 469–476.

Tabla 1. Dieta basal*(MS) y tratamientos utilizados en el experimento *in vitro* e *in vivo*, adicionada con cuatro niveles de taninos condensados libres.

% de inclusión	Tratamientos, nivel de TCL (g d ⁻¹)			
	0	2.5	5.0	7.5
H. maíz	15.00	15.00	15.00	15.00
H. avena	15.00	15.00	15.00	15.00
Maíz	40.65	40.65	40.65	40.65
Salvado	12.00	12.00	12.00	12.00
Soya	5.00	5.00	5.00	5.00
Melaza	10.36	10.36	10.36	10.36
Urea	0.50	0.50	0.50	0.50
² Premezcla	1.49	1.49	1.49	1.49

*Proteína cruda= 15.06; EM= 2.59.² Calcio (18.66 %); Fosforo (9.66 %); Sodio (2.73 %); Potasio (15.33%); Magnesio (2.63 %); Azufre (8 %); Cobalto (3.66 ppm); Yodo (15.33 ppm); Hierro (1733.33 ppm); Manganeso (566.66 ppm); Selenio (19.33 ppm), TCL, Taninos condensados libres (g día⁻¹).

Tabla 2. Degradabilidad de la materia seca y orgánica, cinética de fermentación y producción de una dieta basal para ovinos en crecimiento adicionada con diferentes niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*

Variable	Nivel de TCL (g d ⁻¹)				EEM
	0	2.5	5.0	7.5	
DIVMS	807.20	808.81	806.38	811.17	7.31
DIVMO	871.98	875.14	872.53	877.91	8.11
b	442.00 ^a	412.25 ^b	464.25 ^a	441.73 ^a	6.00
c	0.04 ^a	0.04 ^a	0.03 ^b	0.03 ^b	0.001
Lag	2.30	2.96	2.60	2.96	0.17
EM	10.35 ^a	9.84 ^b	9.81 ^b	9.61 ^b	0.09
AGCC	2.97 ^a	2.76 ^b	2.74 ^b	2.66 ^b	0.03
Gas24	267.91 ^a	249.31 ^b	248.09 ^b	240.76 ^b	3.57
Gas48	373.27 ^a	347.79 ^c	363.42 ^{ab}	349.63 ^{bc}	3.64
Gas96	431.21 ^{ab}	402.13 ^c	442.10 ^a	422.01 ^b	4.77

b, Producción de gas hasta alcanzar la asíntota (ml/g DM); c, tasa fraccional de producción de gas (ml/h); L, fase lag (h); DIVMS, degradabilidad *in vitro* de la materia seca; DIVMO, Degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica; EM, Contenido de energía metabolizable (MJ kg⁻¹ MS); AGCC, Ácidos grasos de cadena corta (mmol L⁻¹); Gas24, Gas48, Gas96, producción de gas acumulado (ml g⁻¹ MS) a las 24, 48 y 96 h respectivamente; TCL, Taninos condensados libres (g día⁻¹).

Medias en la misma columna con diferente literal difieren (P<0.05)

Tabla 3. Digestibilidad aparente *in vivo* de los nutrientes de una dieta basal para ovinos en crecimiento adicionada con diferentes niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*

Variable	Nivel de TCL (g d ⁻¹)				EEM ^a	Contraste	
	0	2.5	5.0	7.5		EL ^b	EC ^c
MS	77.78	76.11	77.34	75.48	0.11	0.92	0.36
MO	78.97	77.54	78.72	76.77	0.11	0.96	0.32
PC	72.24 b	74.95 ab	79.40 a	76.40 ab	0.11	0.07	0.05
FDN	50.72	42.71	47.82	41.78	0.33	0.31	0.46
FDA	56.66	50.04	56.23	50.73	0.42	0.32	0.68

TCL, Taninos condensados libres, ^a Error estándar de la media, ^b Efecto lineal, ^c Efecto cuadrático

Tabla4. Concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL⁻¹) en ovinos recibiendo una dieta basal adicionada con diferentes niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*

Concentración de N-NH ₃	Nivel de TCL (g/d)				EEM ^a	Contraste	
	0	2.5	5.0	7.5		EL ^b	EC ^c
Hora de muestreo							
0	14.63 a	10.56	14.01 a	9.25 b	0.09	0.14	0.02
		ab					
4	4.67 b	9.13 a	6.70 ab	7.51 ab	0.09	0.03	0.07
8	9.37	10.64	10.67	7.10	0.16	0.90	0.96
12	10.28	8.01	10.59	9.42	0.22	0.58	0.45
16	10.67	13.11	10.44	15.38	0.21	0.40	0.13
20	6.91 b	13.26 a	11.48 a	10.67 a	0.15	0.03	0.20
24	6.89 b	9.95 a	9.61 ab	9.57 ab	0.05	0.29	0.08

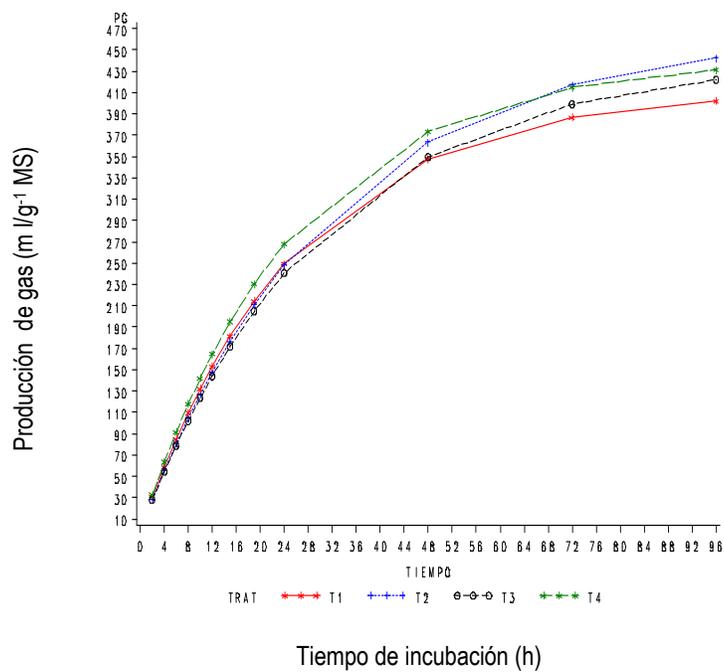
TCL, Taninos condensados libres, ^a Error estándar de la media, ^b Efecto lineal, ^c Efecto cuadrático

Tabla 5. Concentración de protozoarios ruminales ($\times 10^4 \text{ ml}^{-1}$) en ovinos recibiendo una dieta basal adicionada con diferentes niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*

	Nivel de TCL (g d^{-1})				EEM ^a	Contraste	
	0	2.5	5.0	7.5		EL ^b	EC ^c
Hora de muestreo							
0	71.1	78.0	86.3	127.0	0.69	0.07	0.17
4	80.7	91.1	93.5	144.0	2.59	0.21	0.79
8	85.6	86.9	84.9	107.0	2.23	0.42	0.92
12	59.5	100.0	71.6	144.0	3.46	0.53	0.72
16	48.1	76.4	64.8	85.6	1.99	0.76	0.74
20	52.2	66.3	59.9	97.4	0.91	0.48	0.42
24	62.8	83.9	59.3	98.9	0.53	0.24	0.06

TCL, Taninos condensados libres, ^aError estándar de la media, ^bEfecto lineal, ^cEfecto cuadrático

Figura 1. Cinética de degradación de una dieta basal para ovinos con diferentes niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*



VIII. DISCUSIÓN GENERAL

8.1. Extractos de *L. acapulcensis* y *P. dulce* como antihelmínticos

El uso de plantas que contiene taninos es un tema ampliamente estudiado sobre la eficacia contra los nematodos gastrointestinales de los ovinos. Sin embargo los resultados han sido contradictorios, debido a la ausencia de estudios más profundos sobre el efecto que tienen los TC sobre los NGI. En el presente estudio se evaluaron las fases exógenas de algunos NGI con la finalidad de conocer la acción de los TCL:

8.1.1. Eclosión de huevecillos

Los resultados indican que los extractos tienen efecto ovicida, *L. acapulcensis* presentó mayor efecto con la dosis 250 y 500 µg/ mL, resultados que podrían estar relacionados con su mayor contenido de taninos condensados libres. El efecto inhibitorio de la eclosión de los huevecillos, desarrollo larvario y migración larvaria de estrongídeos debido a la presencia de metabolitos secundarios (taninos, lecitinas, terpenoides y flavonoides) en las plantas herbáceas y arbóreas ha sido reportado (Molan *et al.*, 2003; Ademola *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2005; Ríos de Álvarez *et al.*, 2012). El principal metabolito al cual se le atribuye el efecto contra los nematodos es el tanino condensado libre, dentro de los taninos condensados libres se encuentra el flavan-3-ol (procianidina y prodelfinidina) (Makkar 2006). Los taninos se fijan a casi la totalidad de las proteínas, formando así complejos insolubles al pH fisiológico (pH 7.4) (Zimmer y Cordesse, 1996). Además de formar vínculos directos con las proteínas, los taninos establecen enlaces entre las proteínas (formando puentes de hidrogeno entre sus grupos hidroxilo y los sitios electronegativos de la proteína), lo que produce la precipitación de las mismas (Zimmer y Cordesse 1996). Ahora bien, la eclosión de huevos de los nematodos se inicia a partir de un medio ambiente ácido que estimulan la liberación de enzimas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, mismas que las larvas utilizan para degradar la membrana del huevo, por consiguiente los compuestos taniníferos que están presentes en *L. acapulcensis* podrían estar actuando en la inhibición de estas enzimas, propiciando un medio adecuado para formar complejos con las enzimas ricas en proteína (proteasas) y así de ese modo es como se inhibe la eclosión de huevos.

8.1.2. Desarrollo y migración larvaria

Los resultados del presente estudio indican que *L. acapulcensis* y *P. dulce* poseen efectos antihelmínticos en las fases de desarrollo y migración larvaria. Aun cuando los resultados son

similares en las dos especies de árboles se aprecia que *L. acapulcensis* presentó efectos antiparasitarios más consistentes. Estos resultados coinciden con lo reportado por Molan *et al.* (2000) con extractos de *Lotus pedunculatus*, *Lotus corniculatus*, *Hedychium coronarium* y *Onobrychis viciifolia*, redujeron la tasa de desarrollo larvario (de huevos a larvas L₃) en un 91%, además afectaron en 34 % la tasa de eclosión de los huevecillos y disminuyó la capacidad de movilidad de las larvas en un 30 %. Así mismo, resultados similares a los reportados en el presente estudio fueron encontrados por Alonso-Díaz *et al.* (2008), en ensayos *in vitro* e *in vivo* con extractos acuosos de diferentes árboles forrajeros (*Lysiloma latisiliquum*, *Leucaena leucocephala* y *Acacia pennatula*) que también contienen niveles considerables de taninos condensados.

Por otra parte en lo que respecta a la migración larvaria, los taninos parecen ser los principales responsables de la actividad inhibitoria, misma que se ha tratado de explicar bajo dos hipótesis; primero, posibles efectos de los taninos para formas complejos con las proteínas gastrointestinales de los (Mueller-Harvey, 2006), reduciendo la cantidad de nutrientes para el mantenimiento, desarrollo y reproducción del parásito, pudiéndole ocasionar la muerte; o bien, la adherencia de los taninos a la cutícula de la larva que es rica en glicoproteínas causando la muerte de la larva (Cala *et al.*, 2012), inclusive se ha reportado que los taninos pueden adherirse al aparato reproductor de los parásitos hembras adultas, en virtud de que en esta parte anatómica se encuentra el aminoácido prolina, el cual forma complejos con los taninos, disminuyendo la capacidad fecundativa, evitando la reproducción y por consecuencia la disminución de la población en el hospedero (Martínez-Ortíz de Motellano *et al.*, 2010; Manolaraki *et al.*, 2010). Así mismo afecciones en el aparato bucal, lo que podría estar interfiriendo en la alimentación del parásito, su desnutrición y muerte (Martínez-Ortíz de Montellano, 2013), mecanismos que constituyen las teorías más aceptadas en estudios *in vivo* de corta duración o en estudios *in vitro*. Otros estudios realizados por Molan *et al.* (2000), encontraron que los taninos tienen más potencia inhibitoria sobre la eclosión de huevecillos y desarrollo larvario comparado con la migración larvaria, sin embargo los resultados que se arrojaron en este estudio demuestran todo lo contrario, se observa que los extractos de *P. dulce* y *L. acapulcensis*, presentaron mejores efectos sobre el desarrollo y migración larvaria que en la eclosión de huevos. Esto podría deberse a que las larvas L₃ de los nematodos, su vaina está compuesta por ciertas proteínas como la prolina y la hidroxiprolina, de tal modo que los taninos tienen alta afinidad a esas proteínas y así de esa forma es como ligan a dichas proteínas inhibiendo el movimiento del parásito (Thompson y Geary 1995).

En los estudios *in vitro* se utilizan soluciones tamponadas con pH neutro y, es conocido que los taninos condensados presentan mayor actividad para unirse a proteínas en pH próximos a la

neutralidad (Jones y Mangan 1977). También es conocido que los enlaces que se forman entre los TC y las proteínas se disocian a pH inferiores a 3.5 (Min *et al.*, 2003), lo cual ocurre o por lo general en el caso de los rumiantes en el abomaso. En tal sentido, es probable que los principales efectos de estos metabolitos secundarios estén relacionados con los taninos condensados libres que en las plantas estudiadas representan el 61.9 y 57.8% del total de TC, para *L. acapulcensis* y *P.dulce*, respectivamente.

Se ha comprobado que los taninos condensados de diferentes plantas taníferas son variantes en cuanto a su composición y peso molecular (Meagher *et al.*, 2004; Mueller-Harvey 2006, Gea *et al.*, 2011). Así es posible que los efectos antihelmínticos de las plantas taníferas pueden depender no solo del contenido de taninos condensados, sino de su composición numérica y grado de polimerización. Se ha mencionado previamente que los taninos ricos en prodefidina y su correspondiente composición monómerica posee fuerte actividad antihelmíntica contra nematodos de ovinos, esto en comparación a los taninos ricos en procianidina y sus monómeros (Molan *et al.*, 2003; Brunet y Hoste 2006).

8.2. Efecto nutricional de extracto de *L. acapulcensis*

8.2.1. Degradabilidad de la materia seca y orgánica, parámetros de fermentación y producción de gas

De acuerdo a los resultados obtenidos, los diferentes niveles de extracto mostraron efecto nulo en la degradabilidad *in vitro* de la materia seca y orgánica. Sin embargo, en estudios realizados por Hervás *et al.* (2003), utilizaron extractos de quebracho (*Schinopsis spp.*) a concentraciones de 28, 83 y 166 g/Kg MS de alimento, encontraron efectos negativos en la degradación de la materia seca y orgánica en la dosis más alta, debido a los elevados niveles de taninos condensados (76%) que posee esta especie los cuales se conoce que interfieren en la degradabilidad de la MS .

En el presente estudio, a pesar de haberse reportado para esta planta elevadas concentraciones de compuestos secundarios, principalmente taninos totales (187,8 g/kg de MS) no se halló interferencia en la degradación de la MS y MO. En contraste, McSweeney *et al.* (2001), han demostrado que el uso de extractos con alto contenido de taninos condensados (TC) (>6% kg de MS) tiene efecto negativo sobre la degradación de la MS y MO. Por otra parte, en los parámetros de producción de gas, la acumulación de gas producido a las 96 horas, se observó una mayor producción en el tratamiento que no contenía extracto, lo que significa que el extracto tiene efecto negativo sobre la

producción de gas acumulado. Este fenómeno se basa en estudios evaluados por diversas investigaciones (Hess *et al.*, 2003; Wina *et al.*, 2005), en ensayos *in vitro* e *in vivo* utilizando extractos de diferentes plantas, a nivel de rumen, disminuyen la concentración de las bacterias que producen metano y en efecto se observa un aumento en la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGCC), además de un efecto protector de la proteína. Sin embargo, en las dosis usadas de extractos en este ensayo se redujo la concentración de AGCC, encontrándose la mayor concentración en la dieta que no contenía extracto. Otros estudios realizados por Cardozo *et al.* (2004), utilizando diferentes dosis de extractos de plantas (*Yucca schidigera*, *Allium sativa*, *Cinnamomum cassia*), han demostrado no tener efectos negativos sobre el contenido total de ácidos grasos de cadena corta. Esto se podría explicar debido a la cantidad y tipo de componentes moleculares que contenían estos (carvacol, eugenol, taninos). En contraste Busquet *et al.* (2005), evaluaron extractos de esas plantas a dosis más altas (3000 mg/L), observándose un decremento en la concentración de AGCC.

En lo que se refiere al contenido de energía metabolizable (EM), los resultados obtenidos en este ensayo, presentaron el mismo efecto que el contenido de AGCC, dado que los microorganismos del rumen producen gases, los cuales son el resultado de los productos de la fermentación de los nutrientes y por lo tanto es obtenida la energía (Van Soest, 1982).

8.2.2. Digestibilidad de los nutrientes

En la digestibilidad de la proteína cruda, se observó un efecto cuadrático, encontrando los mejores resultados en las dosis de 5 g de TCL (79.40 g/ kg de MS). El efecto de los taninos condensados sobre la digestibilidad de la proteína es debido a la capacidad que tienen los TCL sobre los puentes de hidrogeno de las proteínas. Sin embargo, en estudios *in vitro* e *in vivo*, se han encontrado resultados negativos sobre la digestibilidad de la proteína, debido a principalmente, a las concentraciones de las dosis utilizadas superiores a 50 g/ kg de MS. En este estudio el efecto positivo sobre la digestibilidad de la proteína cruda se observaron efectos similares a los del grupo control. Ahora bien, el efecto de los taninos varía, tanto con la particular fisiología del animal como con la estructura de los taninos ingeridos (Clausen *et al.*, 1990; Provenza *et al.*, 1990; Hagerman y Butler, 1991). En este estudio se observó un aumento de la digestibilidad de la proteína cruda con la dosis de 5 g de TCL, esto pudo ser debido a la formación de complejos tanino-proteína, previniendo el ataque a la proteína de los microorganismos ruminales, lo cual puede ser benéfico para el aprovechamiento de la proteína a nivel duodenal (Mueller-Harvey, 2006).

8.2.3. Nitrógeno amoniacal ($N-NH_3$)

Los efectos cuadráticos encontrados en este estudio demuestran la disparidad de cambios que tienen los taninos condensados. Algunos autores han indicado que los efectos principales que tienen de los taninos condensados libres en el rumen de ovinos, incluyen una reducción en la proteólisis de la proteína del alimento y una pérdida subsecuente en la concentración de nitrógeno amoniacal en el fluido ruminal (Min *et al.*, 2003; Waghorn, 2008).

8.2.4. Protozoarios

Los efectos estimuladores de la población de protozoos en este experimento, probablemente fueron debido a las dosis utilizadas. En otros trabajos se ha reportado la capacidad defaunantes de algunas plantas utilizadas en la alimentación de rumiantes, a las cuales se les ha encontrado compuestos como taninos, saponinas, alcaloides (McSweeney *et al.*, 1999). Sin embargo la defaunación del extracto de ciertas plantas han mostrado efectos variables, debido a que en algunas se ha reportado un efecto positivo al eliminar o reducir la población de protozoarios del rumen (Newbold *et al.*, 1997), mientras que en otras, los mismos extractos no la afectaron; en otros en cambio, aumentaron la concentración ruminal de protozoarios (McSweeney *et al.*, 1999; Galindo *et al.*, 2000). Todo esto depende de la naturaleza de los metabolitos secundarios y concentración en las plantas (Makkar *et al.*, 1995).

IX. CONCLUSIÓN GENERAL

En la actualidad existen evidencias de que las platas ricas en taninos reducen las infestaciones parasitarias, lo cual representan una alternativa dentro de las estrategias del control parasitario de mayor interés en un futuro inmediato debido a la alta resistencia a los antiparasitarios a nivel mundial. La actividad ovicida y larvicida contra los estrongílicos revelan en este estudio evidencias que los extractos de los dos árboles poseen actividad antihelmíntica. Esta situación adquiere vital importancia en los sistemas productivos de ovejas y cabras 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 de ambas especies evaluadas puede representar una alternativa para el control de nematodos gastrointestinales de ovinos.

Por otra parte en el valor nutricional del extracto de *L. acapulcensis*, según los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* e *in vivo* se deduce que la adición de TCL bajo estas dosis, mejoran la digestibilidad de la proteína cruda, aumentan los niveles de N-NH₃, disminuyen algunos parámetros de fermentación (AGCC y EM), así mismo tienen efecto estimulador sobre el crecimiento de los protozoarios ruminales, por lo tanto estas dosis podrían ser utilizadas como aditivos para ovinos en fase de crecimiento. No obstante se tienen que realizar más estudios a detalle para conocer a fondo el efecto, que tienen los TCL del extracto de *L. acapulcensis* sobre el metabolismo en los microorganismos del rumen.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ademola, I.O., Fagbemi, B.O., Idowu, S.O. 2005. Anthelmintic Activity of Extracts of *Spondias mombin* Against Gastrointestinal Nematodes of Sheep: Studies *In Vitro* and *in Vivo*. *Tropical Animal Health and Production*. 37, 223-235.
- Aerts, R.J.; Barry, T.N.; Mc Nabb, W.C. 1999. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 75,1-12.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H. 2008. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*. 153, 313-319.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1997. *Official Methods of Analysis*, 16th edition. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Aoki, T., Akashi, T., Ayabe, S. 2000. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity and biosynthesis. *Journal of Plant Research*. 113, 475-488.
- Arece, J., González, E., Cáceres, O. 2002. Eficacia de LABIOMECC® en el parasitismo en ovinos, terneros y quinos en condiciones de producción. *Pastos y Forrajes*. 25(3), 223-229
- Arece, J., Mahieu, M., Archimède, H., Aumont, G., Fernández, M., González, E., Cáceres, O. & Menéndez-Buxadera, A. 2004. Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Research*. 5(1-2), 61.
- Arece, G.J., Rodriguez, D.J.G., Torres, H.G, Mahieu, M., Gonzalez, G.E, Gonzalez, G.R. 2007. The epizootiology of ovine gastrointestinal strongyles in the province of Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Research*. 72, 119–126.
- Assis, L.M., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Vieira, L.S., Costa, C.T.C., Souza, J.A.L. 2003. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 117, 43-49.

- Asquith, T.N., Butler, L.G. 1985. Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *Journal of Chemistry Ecology*. 11, 1535–1544.
- Austin, P.J., L.A. Suchar, C.T. Robbins and A.E. Hagerman. 1989. Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. *Journal Chemistry and Ecology*. 15, 1335-1347.
- Baker, R.L., Mwamachi, D.M., Audho, J.O., Aduda, E.O., Thorpe, W. 1998. Resistance of Galla and Small East African goats in the sub-humid tropics to gastrointestinal nematode infections and the peri-parturient rise in fecal egg counts. *Veterinary Parasitology*. 79, 53-64.
- Barger, I.A. 1999. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *International Journal for Parasitology*. 29, 41-47.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H. 2005. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*. 131, 531-538.
- Bennick, A. 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 13, 184-196.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56, 317-333.
- Brunet, S., Hoste, H. 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 54, 7481-7487.
- Brunet, S., Martínez-Ortíz de Montellano, C., Torres-Acosta, J.F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H. 2008. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*. 157, 81-88.
- Bruneton, J. 1999. Tanins. En: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3th. Edition. Pp. 307-404.

- Cala, C., Chagas, A.C.S., Oliveira, M.C.S., Matos, A.P., Borges, L.M.F., Sousa, L.A.D., Souza, F.A., Oliveira, G.P. 2012. In vitro Anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* against sheep gastrointestinal nematodes. *Experimental Parasitology*. 130, 98-102.
- Camacho, L.M., Rojo, R., Salem, A.Z.M., Provenza, F.D., Mendoza, G.D., Avilés F., Montañez-Valdez, O.D. 2010. Effect of season on chemical composition and in situ degradability in cows and in adapted and unadapted goats of three Mexican browse species. *Animal Feed Science and Technology*. 155, 206-212.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation. *Journal of Animal Science*. 82, 3230-3236.
- Chagas, A.C., Vieira, L.S., Freitas, A.R., Araujo, M.R., Araujo-Filho, J.A., Aragao, W.R. , Navarro, A.M. 2008. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes (R) in Morada Nova sheep. *Veterinary Parasitology*. 151 (1), 68-73.
- Chandrawathani, P., Jamnah, O., Waller, P.J., Larsen, M., Gillespie, A.T., Zahari, W.M. 2004. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*. 117:173-183.
- Chartier, C., Hoste, H. 1994. Anthelmintic treatments against digestive tract nematodes in grazing dairy goats with high or low levels of milk production. *Veterinary Research*. 25, 450-457.
- Chartier, C., Reche, B. 1992. Gastrointestinal helminths and lungworms of french dairy goats: prevalence and geographical distribution in Poitou-Charentes. *Veterinary Research Communications*.16, 327-335.
- Cheeke, P.R. and R.T. Palo. 1995. Plant toxins and mammalian herbivores: co-evolutionary relationships and antinutritional effects. In: M. Journet, E. Grenet, M-H. Farce, M. Thériez, C. Demarquilly (Ed.) Recent developments in the Nutrition of Herbivores. Proceedings of the IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores pp: 437- 456. INRA Editions, Paris.

- Clauss, M., Gehrke, J., Hatt, J.M., Direnfeld, E.S., Flach, E.J., Hermes, R., Castell, J., Streich, W.J., Fickel, J. 2005. Tannin-binding salivary proteins in three captive rhinoceros species. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140, 67-72.
- Coop, R.L., Kyriasakis, I. 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematodes parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology*. 17, 325-330.
- Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*. 12, 564-582.
- Curtin, C. H., Mottet, N. K., Pontecorvo, P., Sistrun, W. R. 1991. *Diccionario de Ciencias*. 996 pp. Mc Graw-Hill, Madrid, España.
- Dakkak, A., Fioramonti, J., Bueno, L. 1981. *Haemonchus contortus* third-stage larvae in sheep: kinetics of arrival into the abomasum and transformation during ruminomasal transit. *Research in Veterinary Science*. 31, 384-385.
- Davidson, P. M., Naidu, A. S. 2000. Phyto-phenols. Pages 265-293. In: *Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu, A. S. ed. CRC Press. Boca Raton. FL.
- Duncan, A.J. and J.A. Milne. 1992. Rumen microbial degradation of allyl cyanide as a possible explanation for the tolerance of sheep to brassica-derived glucosinolates. *Journal Science Food Agricultural*. 58, 15-19.
- Duncan, A.J., P. Frutos and S.A. Young. 1997. Rates of oxalic acid degradation in the rumen of sheep and goats in response to different levels of oxalic acid administration. *Animal Science*. 65: 451-455.
- Durette-Desset, M.-C., Baker, J.R., Muller, R. 1985. Trichostrongyloid nematodes and their vertebrate hosts: Reconstruction of the phylogeny of a parasitic group. *Advances in Parasitology*. 24, 239-306.
- Etter, E., Chartier, C., Hoste, H., Pors, I., Lefrileux, Y., Broqua, C., Vallade, S., Goudeau, C. 2000. Parasitisme par les nématodes du tube digestif et utilisation du pâturage: Epidémiologie de

- l'infestation dans les troupeaux caprins laitiers en France. *Epidémiologie et Santé Animale*. 37, 75-86.
- Euzéby, J., 1963. Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leur incidence sur la pathologie humaine, tome II : maladies dues aux plathelminthes, fascicule premier :Cestodes. Vigot frères éditeurs, Paris (p 664).
- Food and Agriculture Organization. 2000. www.fao.org.
- Fontenot, M.E., Miller, J.E., Pena, M.T., Larsen, M., Gillespie, A., 2003. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology*. 118, 203-213.
- Fox, M.T., Gerrelli, D., Shivalkar, P., Jacobs, D.E. 1989. Effect of omeprazole treatment on feed intake and blood gastrin and pepsinogen levels in the calf. *Research in Veterinary Science*. 46, 280-282.
- Fox, M.T. 1997. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. *Veterinary Parasitology*. 72, 285-308.
- France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., Lopez, S., Bannink, A. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*. 83, 143–150.
- Garcia, S.F. 2005. Parasitología bovina. Resistencia antihelmíntica, endectocidas y control alternativo. Tabasco, México: Instituto para el desarrollo de sistemas de producción del trópico húmedo de Tabasco.
- Garretson, D.P. 2007. Role of p-glycoproteins in *Haemonchus contortus* anthelmintic resistance. Master of Science Submitted to the office of graduate studies of Texas A&M University (p 115).

- Gasnier, N., Cabaret, J., Chartier, C., Reche, B., 1997. Species diversity in gastrointestinal nematode communities of dairy goats: species-area and species-climate relationship. *Veterinary Research*. 28, 55-64.
- Gea, A., Stringano, E., Brown, R.H., Mueller-Harvey, I. 2011. In situ analysis and structural elucidation of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) tannins for high throughput germplasm screening. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 59, 405-503.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2002. Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *Journal of Agricultural Science*. 139, 341–352.
- Githiori, J. B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M. 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*. 139, 308–320.
- González, G.R, Arece, G.J., Morteo, G.R., Torres, H.G. 2006. Manejo de antihelmínticos para ovinos de pelo en el trópico. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Hagerman, A.E. 1992. Tannin protein interactions. In: Phenolic compounds in food and their effects on health: Analysis, occurrence and chemistry, HO, LEE et HUANG (Eds.), American chemical society, Washington DC, Pp. 236-247.
- Hagerman, A.E. 2002. Tannin Chemistry. Disponible en URL: <http://www.users.muohio.edu/hagerman>
- Harbone, J. B., Baxter, H., Moss, G. P. 1999. *Phytochemical Dictionary. A Handbook of bioactive compounds from plants.* (2da Ed.) Taylor and Francis. pp 976. Padstow. UK.
- Haslam, E. 2007. Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry*. 68, 2713-2721.
- Heckendorn, F. 2007. The control of gastrointestinal sheep nematodes with tanniferous forage plants. PhD Thesis of Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Suisse . 73 p.

- Hedqvist, H., Mueller-Harvey, I., Reed, J.D., Krueger, C.G., Murphy, M. 2000. Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology*. 87, 41–56. *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Vol. I: The Chemical Participants Academic Press, New York. 355-388 pp.
- Heil, M., Baumann, B., Andary, C., Linsenmair, K.E., McKey, D. 2002. Extraction and quantification of condensed tannins as a measure of plant anti-herbivore defense? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften*. 89, 519-524.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, M., Von Wright A. 1998. Characterization of the selected essential components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46, 3590-3595.
- Hertzberg, H., Huwylar, U., Kohler, L., Rehbein, S., Wanner, M., 2002. Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology*. 125, 65-70.
- Hounzangbe-Adote, M.S., Paolini, V., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H. 2005. In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. 78, 155-160.
- Hoste, H., Chartier, C. 1993. Comparison of the effects on milk production of concurrent infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in high- and low-producing dairy goats. *American Journal of Veterinary Research*. 54, 1886-1893.
- Hoste, H., Nano, J.L., Mallet, S., Huby, F., Fournel, S., Rampal, P. 1995. Stimulation of HT29-D4 cell growth by excretory/secretory products of the parasite nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Epithelial Cell Biology*. 4, 87-92.
- Hoste, H., Huby, F., Mallet, S. 1997. Strongyloses gastro-intestinales des ruminants: conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. *Le Point Vétérinaire*. 28, 53-59.

- Hoste, H., Le Frileux, Y., Pommaret, A., Gruner, L., Van Quackebecke, E., Koch, C. 1999. Importance du parasitisme par des strongles gastro-intestinaux chez les chèvres laitières dans le Sud-Est de la France. *INRA Productions Animales*. 12, 377-389.
- Hoste, H., Paolini, V., Paraud, C., Chartier, C. 2004. Gestion non-chimique du parasitisme par les nématodes chez les petits ruminants. *Bulletin G.T.V. Hors-série Parasitologie des ruminants laitiers*, 131-135.
- Hoste, H, Jackson, F, Athanasiadou, S, Thamsborg, S M, Hoskin, S O. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*. 22, 253-261.
- Hoste, H., Sotiraki, S., Landau, S.Y., Jackson, F., Beveridge, I. 2010. Goat-nematode interactions: think differently. *Trends in Parasitology*. 26, 376-381.
- Hounzangbe-Adote, S. 2004. Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. Université d'Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Benin.
- Hubert, J. and Kerboeuf, D. (1992). A micro larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*. 130, 442-446
- Huby, F., Nano, J.L., Mallet, S., Hoste, H. 1999. Effects of the excretory/secretory products of *Trichostrongylus colubriformis* on the growth of different cell lines. *International Journal for Parasitology*. 29, 697-702.
- Jones, W.T., Mangan, W.T. 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 28, 126 - 136.
- Jackson, F., Miller, J. 2006. Alternative approaches to control-Quo vadit?. *Veterinary Parasitology*. 139, 371-384.
- Jiménez-Peralta, F.S., Salem, A.Z.M., Mejía-Hernández, P., González-Ronquillo, M., Albarrán-

- Portillo, B., Rojo-Rubio, R., Tinoco-Jaramillo, J.L. 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on in vitro gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *Livestock. Production Science.* 136, 192-200.
- Kamel, C. 2001. Tracing modes of action and roles of plant extracts in non-ruminants. Page 135 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P. C. Garnsworthy, and J. Wiseman, ed. Nottingham Univ. Press, Nottingham, U.K.
- Kahn, I.P., Díaz-Hernández, A. 2000. Tannins with anthelmintic properties. *Proceedings of an International Workshop. Australia.* Pp. 130-138.
- Kaplan, R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology.* 20, 477-481.
- Ketzis, J.K., Vercruyse, J., Stromberg, B. E., Larsen, M., Athanasiadou, S., Houdijk, J. G.M. 2006. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminthic control strategies in ruminants. *Veterinary Parasitology.* 139, 321-335.
- Knox, D.P., Smith, S.K., Redmond, D.L., Smith, W.D. 2005. Protection induced by vaccinating sheep with a thiol-binding extract of *Haemonchus contortus* membranes is associated with its protease components. *Parasite Immunology.* 27, 121-126.
- Knox, M.R., Torres-Acosta, J.F., Aguilar-Caballero, A.J. 2006. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology.* 139, 385-393.
- Kronberg, S.L. and J.W. Walker. 1993. Ruminal metabolism of leaf spurge in sheep and goats: a potential explanation for differential foraging on spurge by sheep, goats and cattle. *Journal of Chemistry and Ecology.* 19, 2007-2017.
- Kenyon F., Greer A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., Van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercruyse, J., Jackson, F. 2009. The role of targeted selective treatments in the development of refugia based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology.* 164, 3-11.

- Kyriazakis, I., Anderson, D.H., Oldham, J.D., Coop, R.L., Jackson, F. 1996. Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. *Veterinary Parasitology*. 61, 297-313.
- Larsen, M. 2000. Biological control of helminths. *International Journal of Parasitology*. 29, 139-146.
- Legarto, J., Leclerc, M.C. 2007. Guide pour la conduite du pâturage caprin. Institut de l'Elevage. 211 p.
- Losa, R. 2000. The use of essential oils in animal nutrition. In III Conference show feed manufacturing in the Mediterranean region. From feed to food. pp 22-24. March. Reus. España. 54, 45-53.
- López, J., Tejada, I., Vázquez, C., De Dios, G., Shimada, A. 2004. Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their in vitro biological activity. Part 1. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84, 295–299.
- Lowry, J.B., McSweeney, C.S., Palmer, B. 1996. Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply on the ruminant. *Australian Journal of Agriculture Research*. 47, 829-842.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinical Chemistry Acta*. 17, 297-304.
- Mahieu, M., Arquet, R., Kandassamy, T. Mandonnet, Nathalie, Hoste, H. 2007. Evaluation of targeted drenching using Famacha© Creole goat: Reduction of anthelmintic use, and on kid production and pasture contamination. *Veterinary Parasitology*. 146, 135-147.
- Makkar, H.P.S. 2000. Quantification of tannins in tree foliage: Working document. En: FAO/ IAEA, Vienna.
- Makkar, H. 2006. Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites. BSAS Publication 34. En: C. Sandoval-Castro, F. D. Howell, J. J. Torres-

- Acosta, & A. Ayala-Burgos (Eds.), The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. Nottingham University Press. pp. 235- 249.
- Makkar, H.P.S., Francis, G., Becker, K. 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in: Livestock and aquaculture production systems. *Animal*. 1, 1371-1391.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H. 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology*. 137, 685-696.
- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., Archimede, H. 2010. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 173, 85-92.
- Marley, C.L., Cook, R., Keatinge, R., Barrett, J. et Lampkin, N.H. 2003. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Chicorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. *Veterinary Parasitology*. 112 (1-2), 147-155.
- Marley, C.L., Cook, R., Barrett, J., Keatinge, R. et Lampkin, N.H. 2006. The effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Chicorium intybus*) when compared with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on ovine gastrointestinal parasite development, survival and migration. *Veterinary Parasitology*. 138 (3-4), 280-290.
- Martínez-Ortiz de-Montellano, C, Vargas-Magaña, J.J., Canul-Ku, H.L., Miranda-Soberanis, R., Capetillo-Leal, C., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J. 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 172, 283-290.
- Martínez-Ortiz de Montellano, C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H. 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Experimental Parasitology*. 133, 281-286.

- Meagher, L.P., Lane, G., Sivakumaran, S., Tavendale, M.H., Fraser, K. 2004. Characterization of condensed tannins from *Lotus* species by thiolytic degradation and electrospray mass spectrometry. *Animal Feed Science and Technology*. 117, 151-163.
- Mehansho, H., T.N. Asquith, L.G. Butler, J.C. Rogler and D.M. Carlson. 1992. Tannin-mediated induction of proline-rich protein synthesis. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 40, 93-97
- Menke, K.H., Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28, 7-55.
- Min, B.R., Hart, S. P. 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*. 81, 102-109.
- Molan, A.L., Waghorn, G.C., Min, B.R., McNabb, W.C. 2000. The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. *Folia Parasitology*. 47, 39-44.
- Molan, A.L., Attwood, G.T., Min, B.R., McNabb, W.C. 2001. The effect of condensed tannins from *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* on the growth of proteolytic rumen bacteria in vitro and their possible mode of action. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 626-633.
- Molan, A.L., Duncan, A.J., Barry, N.T., McNabb, W.C. 2003. Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parasitology International* 52, 209-218.
- Mole, S., L.G. Butler and G. Iason. 1990. Defense against dietary tannins in herbivores: a survey for proline rich salivary proteins in mammals. *Biochem. Systema. Ecol.* 18, 287-293.
- Mueller-Harvey, I., Mc Allan, A.B. 1992. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. *Advances in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology*. 1,151-217.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal Science Food Agricultural*. 86, 2010-2037.

- Mulligan, W., Gorrell, M.D., Richard, M.D., Brandon, M. 1989. The use of irradiated larvae as immunising agents in *Haemonchus contorts* and *Trichostrongylus colubriformis* infections in sheep. Australian Journal of Agricultural Research. 12, 1175-1187.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Mackay, A.D., Leathwick, D.M. 1996. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: Approaches, experiences and prospects. International Journal for Parasitology. 26, 983-992.
- Nguyen, T.M., Binh, D.V., Ørskov, E.R. 2005. Effects of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. Animal Feed Science and Technology. 121, 77-87.
- NRC. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants. Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Animal Nutrition Series. The National Academy Press. Washington, DC, USA pp. 362 .
- O'Connor, L.J., Walkden –Brown, S.W., Kahn, L.P. 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. Veterinary of Parasitology. 142:1–15
- Okuda, T. (2005). Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. Phytochemistry. 66, 2012-2031.
- Olmedo, J. A., Rojo, R., Arece, J, Salem, A.Z.M., Morales, E., Aviles, F., Hernández, J., Albarrán, B., Vázquez, F. 2013. In vitro anthelmintic activity of crude aqueous extracts of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* against gastrointestinal nematodes in small ruminants. Journal of Animal Science. 91, 53-54.
- Pérez-Maldonado, R.A., B.W. Norton and G.L. Kerven. 1995. Factors affecting in vitro formation of tanninprotein complexes. Journal of Science and Food Agricultural. 69, 291-298.
- Paolini, V., Bergaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, Ph., Hoste, H. 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology. 113, 253-261.

- Paolini, V., Fouraste I., Hoste, H. 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on thirdstage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*. 129,67-77.
- Piñol, M. T., Palazón, J., Cram, D. J., Hammond, G. S. 2000. *Química Orgánica*. (4ta Ed.) Mc Graw-Hill. México DF.
- Pomroy, W.E. 2006. Anthelmintic resistance in New Zealand: A perspective on recent findings and options for the future. *New Zealand Veterinary Journal*. 54, 265-270.
- Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J.L., Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., Vernhet, A. 2006. Poly (Lproline) interactions with flavan-3-ols units: influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*. 20,687-697.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G. 1986. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*. 25, 223-230.
- Priolo, A., Waghorn, G.C., Lanza, M., Biondi, L., Pennisi, P. 2000. Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *Journal Animal Science*. 78, 810-816.
- Priolo, A., Bella, M., Lanza, M., Galofaro, V., Biondi, L., Barbagallo, D., Ben Salem, H., Pennisi, P. 2005. Carcass and meat quality of lambs fed fresh sulla (*Hedysarum coronarium* L.) with or without polyethylene glycol or concentrate. *Small Ruminant Research*. 59, 281-288.
- Provenza, F.D., E.A. Burritt, T.P. Clausen, J.P. Bryant, P.B. Reichardt and R.A. Distel. 1990. Conditioned flavor aversion: a mechanism for goats to avoid condensed tannins in black brush. *Am. Nat.* 136, 810-828.
- Provenza, F.D. 1995. Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. *J. Range Manage.* 48, 2-17.
- Quiroz, R. H. 2012. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Limusa. 876 p.

- Rahman, W.A., Collins, G.H., 1990. Changes in liveweight gain, blood constituents and worm egg output in goats artificially infected with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. *British Veterinary Journal*. 146, 543-550.
- Ramírez-Restrepo, C.A., Barry, T.N. 2005. Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 120, 179-201.
- Ríos de Álvarez, L., Jackson, F., Greer, A., Bartley, Y., Bartley, D.J., Grant, G.J., Huntley, F. 2012. *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Veterinary Parasitology*. 186, 390-398.
- Robbins, C.T., T.A. Hanley, A.E. Hagerman, O. Hjeljord, D.L. Baker, C.C. Schwartz and W.W. Mautz. 1987. Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. *Ecology*. 68, 98- 107.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 69, 299-322.
- Rogers, W.P., Sommerville, R.I. 1963. The infective stage of nematode parasites and its significance in parasitism. *Advances in Parasitology* 1, 109-171.
- Rogers, W.P. 1982. Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. *International Journal for Parasitology*. 12, 495-502.
- Rossanigo, C.E., Gruner, L. 1994. Relative effect of temperature and moisture on the development of strongyle eggs to infective larvae in bovine pastures in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 55, 317-325.
- Salem, A.Z.M., Salem, M.Z.M., El-Adawy, M.M., Robinson, P.H. 2006. Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats *Animal Feed Science and Technology*. 127, 251-267.
- SAS Institute, 2002. SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary, N.C., USA.

- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 91, 21-40.
- Scmid, G. 1982. *Química biológica , Las bases químicas de la vida*. pp 525-529. Interamericana, Granfur S. A., Madrid, España.
- Shapiro, S., A. Meier, A., Guggenheim. 1994. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*. 9, 202-208.
- Silanikove, N., Nitsan, Z. and Perevolotsky, A. 1994. Effect of a daily supplementation of polyethylene glycol on intake and digestion of tannin-containing leaves (*Ceratonia siliqua*) by sheep. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42, 2844-2847.
- Skene, I.K. and J.D. Brooker. 1995. Characterization of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe*. 1, 321-327.
- Smith, M.C., Sherman, D.M., 1994. *Goat Medecine*. Lea & Febiger, Baltimore, USA (p 825).
- Smith, W.D., Zarlenga, D.S. 2006. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology*. 139, 347- 359.
- Smith, W.D. 2008. Recent vaccine related studies with economically important gastrointestinal nematode parasites of ruminants. *Tropical Biomedicine*. 25, 50-55.
- Sommerville, R.I., Rogers, W.P., 1987. The nature and action of host signals. *Advances in Parasitology*. 26, 239-293.
- Steel, R. G. D., Torrie J. H. 1980. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. McGraw-Hill. México. 181-184 pp.
- Stepek, G., Behnke, J.M., Buttle, D.J., Duce, I.R. 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics ?. *Trends in Parasitology*. 20 (7), 322-327.

- Stromberg, B.E., Gasbarre, L.C. 2006. Gastrointestinal nematode control programs with an emphasis on cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* 22, 543-565.
- Symons, L.E.A., Hennessy, D.R. 1981. Cholecystokinin and anorexia in sheep infected by the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal for Parasitology.* 11, 55-58.
- Thamsborg, S.M., Roepstorff, A., Larsen, M., 1999. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Veterinary Parasitology.* 84, 169-186.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology.* 48, 185–197.
- Thompson, D.P., Geary, T.G. 1995. The structure and function of helminth surface. In: J. J. Marr and M. Muller, (eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*, Academic Press, New York. 203-232 pp.
- Torres-Acosta, J.F. 1999. Supplementary feeding and the control of gastrointestinal nematodes of goats in Yucatan. *The Royal Veterinary College. University of London, London, U.K.*
- Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H. 2008. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research.* 77, 159- 173.
- Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W., 1996. *Veterinary Parasitology*, 2nd ed., Oxford, UK, Blackwell Science Ltd. 224-234 p.
- Van Houtert, M.F.J., Barger, I.A., Steel, J.W., Windon, R.G., Emery, D.L. 1995. Effects of dietary protein intake on responses of young sheep to infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology.* 56 (1-3), 163-180.

- Van Wyk, J.A., Bath, G.F. 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*. 33, 509-529.
- Van Soest, P. J. 1982. *Nutritional Ecology of the ruminant*. (2da Ed.) pp 253-280. Comstock Publishing Associates a Davison of Cornell University Press. London. UK.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74, 583- 597.
- Veneziano, V., Rinaldi, L., Caputo, A.R., Fedele, V., Gringoli, G. 2007. Effects of gastrointestinal strongyle parasitism on milk quality. In: the quality of goat products (IGA-CRA, Ed.), Bella, Italy, pp. 142-145.
- Waller, P.J., 1997. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 72, 391-412.
- Waller P.J., Knox, M.R., Faedo, M. 2001. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasite of sheep: feeding an block studies with *Duddigoniaflagens*. *Veterinary Parasitology*. 102(4), 321-330.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M. 2004. Nematode control in green ruminant production systems. *Trends in Parasitology*. 20, 493-497.
- Waghorn, G., Mc Nabb, W.C. 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of Nutrition Society*. 62, 383-392.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 174, 116-139.
- Waterman, P.G. 1999. The tannins - An overview. En: *Tannins in Livestock and Human Nutrition*. Proceedings of an International Workshop, BROOKER (Ed.), Adelaide, Australia, Pp. 10-13.

- Weisshaar, B., Jenkins, G.J. 1998. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion Plant Biology*. 1, 251-257.
- Wild, R., 1994. The complete book of natural and medicinal cures. Rodale Press. Inc., Emmaus, Pa.
In: Cowan, M. M. 1994. Plants Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbniologic Reviews*. pp 564-582.
- Wendon, R.G. 1996. Genetic control of resistance to helminths in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 54, 245-254.
- Yan, F., Xu, L., Liu, L., Yan, R., Song, X., Li, X. 2010. Immunoproteomic analysis of whole proteins from male and female adult *Haemonchus contortus*. *The Veterinary Journal*. 185, 174-179.
- Yatsuda, P.A., Krijgsveld, J., Cornelissen, W.C.A.A., Heck, J.R.A., Vries, E. 2003. Comprehensive analysis of the secreted proteins of the parasite *Haemonchus contortus* reveals extensive sequence variation and differential immune. *The Journal of Biological Chemistry*. 278, 16941-16951.
- Zimmer, N., Cordesse, R. 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Production Animale*. 9, 167-179.