



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DEL PERFIL METABOLÓMICO E
IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS
ANTIHELMÍNTICOS DE *Lysiloma latisiliquum* (L.)
Benth. (Tzalam)**

Tesis que presenta

GLORIA IVONNE HERNÁNDEZ BOLIO

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México,
2017

LUIS MANUEL PEÑA RODRÍGUEZ
JUAN FELIPE DE JESÚS TORRES ACOSTA

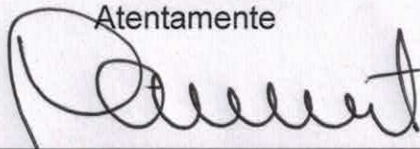
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **GLORIA IVONNE HERNÁNDEZ BOLIO**, titulado “**Análisis del perfil metabólico e identificación de productos antihelmínticos de *Lysiloma latisiliquum* (tzalam)**” fue realizado en la Unidad de Biotecnología, dentro de la línea de Farmacobiología en las instalaciones del Laboratorio de Química Orgánica del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y del Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



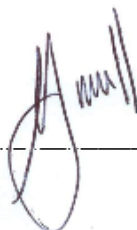
Dr. Manuel Martínez Estevez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de mayo de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos, y de Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



GLORIA IVONNE HERNÁNDEZ BOLIO

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Análisis del perfil metabolómico e identificación de productos antihelmínticos de *Lysiloma latisiliquum* (*tzalam*) en el que participé bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y el Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero a través de la beca mensual y beca mixta con número 255076.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por las facilidades para la realización de este proyecto, en especial a la Unidad de Biotecnología y a la Dirección de Posgrado por su amable atención siempre.

A la Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UADY – FMVZ), así como al personal del Laboratorio de Parasitología, Unidad de Diagnóstico, por las instalaciones y facilidades para llevar a cabo los ensayos biológicos de este proyecto.

Al Departamento de Química de la Universidad Técnica de Múnich (Technische Universität München) así como al Dr. Wolfgang Eisenreich y a la Dra. Erika Kutzner por el préstamo de equipo e instalaciones, entrenamiento y amables atenciones durante la estancia en Alemania (2013) para la realización del análisis metabólico.

Al Laboratorio de Química Analítica del Instituto Tecnológico de Mérida (ITM) a cargo del Dr. Enrique Sauri, así como a los IBQ. César A. Can-Cauich and Cesia D. Gutiérrez-Canul, por el préstamo de equipo y entrenamiento en el análisis de fenoles totales y HPLC.

A los miembros de mi Comité tutorial, Dra. Luz María Calvo Iribién y Dr. Alexandre Cardoso-Taketa por sus valiosas aportaciones al desarrollo de este trabajo y el tiempo que dedicaron a mi formación académica y personal.

A mi Comité revisor, Dra. Cecilia M. Rodríguez García, Dr. Carlos A. Sandoval Castro, Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y Dr. Alberto Sánchez Medina por enriquecer este trabajo con sus oportunas observaciones.

A los técnicos Fabiola Escalante y Karlina García, por su amable apoyo en las tareas del laboratorio, análisis cromatográficos y espectroscópicos.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Orgánica, los que están y los que ya se fueron, Janet, Martha, Mercedes, Mickel, Radamés, Erick, Alejandrina y Augusto. A los estudiantes Ema Gladiola, Hugo Sargento y José Josué, así como a mi hermana Ivette, quienes, durante su estancia, compartieron conmigo en la investigación sobre *Lysiloma*.

Por último, quisiera agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y el Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta, el haberme aceptado como su estudiante. Siempre recibí de Uds. palabras sinceras, frases de ánimo y críticas constructivas que, a lo largo de cuatro años, hicieron posible mi formación como investigadora, pero también como persona.

DEDICATORIAS

A Elías y Javier

A mis padres, hermanos y abuelos

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
1.1 HELMINTOS.....	3
1.2 NEMATODOS GASTROINTESTINALES.....	3
1.3 ESPECIES DE NGI QUE AFECTAN A PEQUEÑOS RUMIANTES	4
1.4 <i>Haemonchus contortus</i>	4
1.6 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS NGI.....	7
1.7 MÉTODOS DE CONTROL DE NGI.....	7
1.7.1 ANTIHELMÍNTICOS.....	7
1.7.1.1 RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA.....	11
1.7.2 MÉTODOS DE CONTROL ALTERNATIVO DE NGI.....	12
1.7.2.1 MÉTODOS DIRIGIDOS A REDUCIR EL CONTACTO DEL HUÉSPED CON LA ETAPA INFECTIVA DE LOS NGI.....	12
1.7.2.2 MÉTODOS QUE BUSCAN MEJORAR LA RESPUESTA DEL HUÉSPED CONTRA LAS INFECCIONES OCASIONADAS POR NGI.....	13
1.7.2.3 MÉTODOS DIRIGIDOS A CONTROLAR LA POBLACIÓN DE PARÁSITOS UTILIZANDO MATERIALES ANTIHELMÍNTICOS NO CONVENCIONALES	14
1.8 PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIHELMÍNTICAS	15
1.9 PLANTAS FORRAJERAS RICAS EN TANINOS.....	17
1.10 PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL CON ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA	18
1.11 PLANTAS FORRAJERAS DE LA SELVA BAJA CADUCIFOLIA YUCATECA....	20
1.12 <i>Lysiloma latisiliquum</i>	21
1.12.1 GENERALIDADES.....	22
1.12.2 CONOCIMIENTO FITOQUÍMICO DE <i>L. latisiliquum</i>	23
1.12.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE <i>L. latisiliquum</i>	23
1.13 ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA	24
1.13.1 AISLAMIENTO FITOQUÍMICO	24
1.13.2 AISLAMIENTO BIODIRIGIDO	25
1.13.3 METABOLÓMICA	25

1.14 EL DESENVAINA LARVAL DE <i>H. contortus</i> COMO MODELO PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA	27
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
CAPÍTULO II	33
EFFECTO DE LOS MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE POLIFENOLES EN LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL DESENVAINA <i>IN VITRO</i> DE <i>LYSILOMA LATISILIQUM</i> CONTRA LARVAS DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i>*	33
2.1 RESUMEN	33
2.3 INTRODUCTION	35
2.4 EXPERIMENTAL	36
2.4.1 EXPERIMENTAL DESIGN	36
2.4.2 PLANT MATERIAL	36
2.4.4 TANNIN AND POLYPHENOL REMOVAL	37
2.4.5 LARVAL EXSHEATMENT INHIBITION ASSAY (LEIA)	38
2.4.6 ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS	38
2.4.7 TOTAL PHENOL CONTENT OF EXTRACTS	39
2.4.8 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) OF <i>L. LATISILIQUM</i> EXTRACTS	39
2.4.8.1 DATA PROCESSING OF HPLC PROFILES	39
2.4.8.2 STATISTICAL ANALYSES	40
2.5 RESULTS AND DISCUSSION	40
2.5.1 INFLUENCE OF DRYING METHODS OF PLANT MATERIAL ON TANNIN CONTENT	40
2.5.2 POLYPHENOL REMOVAL METHODS	41
2.5.3 HPLC ANALYSES OF <i>L. LATISILIQUM</i> CRUDE EXTRACTS AND POLYPHENOL-FREE FRACTIONS	42
2.6 CONCLUSION	44

2.7 REFERENCES.....	45
CAPÍTULO III	49
EL USO DE METABOLÓMICA POR ¹H-NMR PARA OPTIMIZAR LA EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE LOS PRODUCTOS ANTIHELMÍNTICOS DE LAS HOJAS DE <i>LYSILOMA LATISILIQUM*</i>.....	49
3. 1 RESUMEN.....	49
3.2 ABSTRACT	51
3.3 INTRODUCTION	51
3.4 MATERIALS AND METHODS	53
3.4.1 GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES.....	53
3.4.2 PLANT MATERIAL	53
3.4.3 PREPARATION OF PLANT EXTRACTS	53
3.4.4 TANNIN REMOVAL	54
3.4.5 CALCULATION OF THE DIELECTRIC CONSTANT (ϵ) AS MEASURE OF SOLVENT POLARITY	54
3.4.6 GENERATION OF ¹H-NMR METABOLIC PROFILES AND MULTIVARIATE ANALYSIS.....	54
3.4.7 LARVAL EXSHEATHMENT INHIBITION ASSAY (LEIA)	55
3.4.8 BIOASSAY-GUIDED ISOLATION OF ANTHELMINTIC PRODUCTS	56
3.4.9 STATISTICAL ANALYSIS	56
3.5 RESULTS AND DISCUSSION.....	56
3.6 CONCLUDING REMARKS	62
3.7 REFERENCES.....	63
3.8 SUPPORTING INFORMATION	68
CAPÍTULO IV	73
4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	73
4.2 CONCLUSIONES.....	81
4.3 PERSPECTIVAS	83
REFERENCIAS.....	85

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. <i>Haemonchus contortus</i> . a. Adulto. b. Huevos.....	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>H. contortus</i> en pequeños rumiantes.....	6
Figura 3. Estructura química de los bencimidazoles más comunes. a. albendazol. b. fenbendazol	8
Figura 4. Estructura química de los antihelmínticos que actúan como agonistas nicotínicos. a. pirantel. b. morantel. c. levamisol.	8
Figura 5. Estructura química de las lactonas macrocíclicas. a. ivermectina, mezcla de las avermectinas B1a y B1b. b. moxidectina.	9
Figura 6. Estructura química de otros fármacos empleados como antihelmínticos. a. closantel. b. rafoxanida. c. PF1002A. d. monepantel.	10
Figura 7. <i>Lysiloma latisiliquum</i> “tzalam”	22
Figura 8. Diagrama de la estrategia experimental para la identificación de los productos antihelmínticos de <i>L. latisiliquum</i>	31
Figura 9. Características estructurales de los taninos condensados: a) tamaño, b) tipo de unidades que lo constituyen (PC o PD) y c) estereoisomería del anillo C (cis o trans).....	74

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Géneros y especies de NGI que afectan a los ovinos y caprinos.....	4
---	---

ABREVIATURAS

ϵ	Constante dieléctrica
$^1\text{H-RMN}$	Resonancia magnética nuclear de protón
AcOEt	Acetato de etilo
AH	Antihelmíntico (a)
An	Acetona
EHA	Ensayo de eclosión de huevos
EtOH	Etanol
Hx	<i>n</i> -Hexano
IC ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
LEIA	Ensayo de inhibición del desenvaine larval
LMIA	Ensayo de inhibición de la migración larval
MeOH	Metanol
NGI	Nematodos gastrointestinales
OPLS-DA	Análisis discriminante de los cuadrados parciales ortogonales
PC	Procianidinas
PCA	Análisis de componentes principales
PD	Prodelfinidinas
TC	Taninos condensados
TH	Taninos hidrolizables

RESUMEN

Los forrajes ricos en taninos han sido investigados recientemente como una alternativa importante para el control de nematodos gastrointestinales (NGI) en pequeños rumiantes. Yucatán posee una gran variedad de especies de plantas forrajeras ricas en taninos que son consumidas por ovinos y caprinos que representan un recurso interesante en la búsqueda de antihelmínticos no convencionales. *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth. (Leguminosae), conocido como *tzalam*, ha demostrado actividad antihelmíntica (AH) *in vitro* e *in vivo* contra *Haemonchus contortus*, uno de los NGI más importantes del trópico. Ensayos fitoquímicos preliminares sugieren que los taninos condensados (TC) son los metabolitos responsables de la actividad AH de las hojas de esta planta. Sin embargo, estudios recientes sugieren que a la actividad contribuyen otros metabolitos secundarios. La metabolómica por ¹H-RMN permite agilizar la detección e identificación de metabolitos bioactivos en plantas, por lo que el presente trabajo utilizó la metabolómica por ¹H-RMN para el aislamiento e identificación de metabolitos responsables de la actividad AH de *L. latisiliquum* usando el desenvaine de *H. contortus* como bioensayo. Los resultados del primer experimento mostraron que los extractos libres de TC, obtenidos de hojas secas de la planta, muestran mayor actividad AH que los obtenidos a partir de material vegetal fresco o liofilizado, y que la eliminación de polifenoles en los extractos libres de TC, no resulta en una mayor actividad. Estos resultados sugieren que los TC no son necesarios para la actividad AH de las hojas de la planta, pero que algunos polifenoles contribuyen a la misma. El estudio metabolómico por ¹H-RMN de los extractos de hojas liofilizadas de *L. latisiliquum* permitió identificar a los disolventes hidrofílicos como los más adecuados para la extracción de los metabolitos con actividad AH, en tanto que el análisis de componentes principales indicó que los metabolitos bioactivos son productos glicosilados de alta polaridad. El análisis discriminante de los cuadrados parciales ortogonales facilitó la detección de señales relacionadas con la actividad AH, las cuales pudieron asignarse a los metabolitos glicosilados quercitrina y arbutina, obtenidos mediante fraccionamiento biodirigido. Con base en lo anterior, se concluye que la metabolómica por ¹H-RMN puede ser una herramienta útil en la detección de metabolitos relacionados con la actividad AH en plantas, aun cuando no se tenga conocimiento fitoquímico previo de éstas.

ABSTRACT

Tannin-rich forages have recently been investigated as an important alternative for the control of gastrointestinal nematodes (GIN) in small ruminants. Yucatán has a great diversity of tannin-rich forage species normally consumed by sheep and goats; these plants represent a valuable resource in the search for non-conventional anthelmintics. *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth (Leguminosae), commonly known as *tzalam*, is a forage species recognized for its anthelmintic (AH) activity *in vitro* and *in vivo* against *Haemonchus contortus*, one of the most important GIN in tropical regions. Preliminary phytochemical analyses suggested condensed tannins (CT) as the metabolites responsible for the AH activity of this plant; however, recent investigations indicated that other secondary metabolites might contribute to the AH activity of the leaves. ¹H-NMR metabolomics is a technique that allows simplifying the detection and identification of bioactive metabolites in plants, however, to date, it has been mainly used in plants with previous phytochemical studies. In this investigation, we studied the effect of the tannins in the AH activity of *L. latisiliquum* leaves and, subsequently, analyzed the metabolomic profile by ¹H-NMR of different leaf extracts of the plant to optimize the extraction and favor the identification of AH products. The results showed that CT-free extracts, obtained from oven-dried leaves of the plant, exhibit a high AH activity when compared to those from fresh or lyophilized leaves, and that the removal of other polyphenols in the CT-free extract does not lead to a higher AH activity. The ¹H-NMR metabolomic study of different leaf extracts of *L. latisiliquum* allowed the identification of hydrophilic solvent mixtures as the best suited for the extraction of AH products, whereas the principal component analysis of the data indicated that the bioactive metabolites are high-polarity glycosylated products. The orthogonal partial least squares discriminant analysis of the data enabled the detection of AH activity-related signals, which were assigned to the glycosylated metabolites quercitrin and arbutin, obtained by bioassay-guided fractionation. The results of this investigation confirm metabolomics as a useful tool in the detection of AH activity-related metabolites in plants without previous phytochemical studies.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) representan una amenaza importante para la producción de pequeños rumiantes en pastoreo a nivel mundial. Los NGI habitan en los diferentes segmentos del tracto digestivo y su ciclo de vida incluye etapas infectivas que ocurren en los potreros donde los animales se infectan al consumir los pastos y otros follajes infectados (Jaimez-Rodríguez, 2016). Los NGI son responsables de daños patofisiológicos severos en los animales y se les reconoce como responsables de pérdidas económicas importantes (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

Haemonchus contortus es una especie de NGI de importancia mundial, particularmente en regiones tropicales (Miller y Horohov, 2006). Para el control de *H. contortus* se utilizan antihelmínticos comerciales convencionales como bencimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas. Sin embargo, las poblaciones de *H. contortus* y otros NGI han desarrollado resistencia a estos tratamientos. Además, existe el interés de la sociedad moderna por consumir productos de origen animal que tengan la menor cantidad posible de productos químicos sintéticos. Ambos aspectos han estimulado la exploración de métodos alternativos para el control de los parásitos (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

Entre los métodos alternativos para el control de NGI se encuentra el uso de plantas forrajeras con propiedades antihelmínticas. Los primeros estudios sobre la actividad AH de estas plantas se realizaron en regiones de clima templado, en donde especies como *Hedysarium coronarium*, *Lotus* spp., *Lespedeza cuneata* y *Onobrychis viciifolia* se evaluaron contra los principales NGI que afectan a los pequeños rumiantes (Hoste, 2005). Estos forrajes son ricos en taninos, por lo que posteriormente se llevaron a cabo estudios en los que se correlacionó el contenido de los mismos con la actividad AH de estas plantas y de esta manera se confirmó la influencia de los taninos en la expresión de la actividad AH de diversas especies forrajeras.

Numerosas especies de plantas forrajeras nativas de la península de Yucatán que son comúnmente consumidas por los rumiantes tienen contenidos elevados de taninos. Ante esta disponibilidad de plantas ricas en taninos se comenzó a estudiar el potencial AH de plantas que son consumidas por los rumiantes. *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth, conocida comúnmente como *tzalam*, es una de las plantas que se ha evaluado

por su efecto AH sobre huevos, larvas e individuos adultos de *H. contortus*.

Algunos estudios iniciales señalaban a los taninos condensados (TC) como responsables de la actividad AH tanto *in vitro* como *in vivo* de las hojas de *L. latisiliquum* (Alonso-Díaz *et al.*, 2008; Brunet *et al.*, 2008; Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*, 2010). Sin embargo, el papel de estos metabolitos no es claro, dado que estudios recientes realizados sobre larvas y huevos de *H. contortus* indican que la eliminación de los CT mejora la actividad AH de la planta en la prueba *in vitro* de inhibición del desenvaine (Vargas-Magaña, 2013).

El presente trabajo permitió, a través de diversos métodos de eliminación de taninos y polifenoles, determinar el efecto de estos metabolitos en la actividad AH de *L. latisiliquum*. Adicionalmente, el estudio metabolómico por ¹H-RMN de diferentes extractos de hoja permitió detectar e identificar metabolitos secundarios que influyen en la actividad AH de la planta.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 HELMINTOS

La forma de vida parasitaria es considerada la más común en la naturaleza. Algunos autores estiman que al menos la mitad de los organismos del planeta presentan esta estrategia (Price, 1980). Los helmintos son gusanos parásitos que viven dentro o fuera de sus hospederos. Su nombre se deriva del griego “helmins” o “helminthos” que significa gusano y se usa para referirse a las especies pertenecientes al *phylum* Platyhelminthes (trematodos y cestodos) y Nematelminthes (gusanos redondos). Los principales parásitos que influyen en la crianza de animales son los Nematelminthes que incluyen varias superfamilias de importancia veterinaria (Soulsby, 1982).

1.2 NEMATODOS GASTROINTESTINALES

Los NGI son los helmintos de mayor importancia dado que éstos parasitan animales de consumo humano. Los nematodos o gusanos redondos son organismos endoparásitos generalmente pequeños, elongados, cilíndricos y no segmentados. Poseen una capa dura llamada cutícula. Pueden encontrarse en cualquier tejido del cuerpo como la piel, los riñones, los pulmones, la vejiga, el sistema nervioso, la sangre y más comúnmente en los intestinos (Lynn *et al.*, 2003).

Los NGI que afectan a pequeños rumiantes pertenecen al orden Strongylida, mayormente a la superfamilia Trichostrongylidae y se alojan principalmente en el abomaso y los intestinos grueso y delgado (Zajac, 2006). A pesar de que todos los animales que pastan poseen NGI, cuando la carga parasitaria es baja no existe un impacto en la salud de los mismos; sin embargo, a medida que la carga se incrementa, se observan signos como reducción en la ganancia de peso y disminución del apetito, y en etapas posteriores aparecen síntomas como pérdida de peso, diarrea, anemia y edema submandibular (mandíbula de botella) (Mekkonen, 2007). En los países en desarrollo algunas de las especies de NGI provocan altos índices de mortalidad, especialmente en corderos. Los animales jóvenes, así como aquellos cuyo sistema inmune se encuentra comprometido, son más susceptibles de infección por NGI (Torres-Acosta y Aguilar-Caballero, 2005).

1.3 ESPECIES DE NGI QUE AFECTAN A PEQUEÑOS RUMIANTES

Los parásitos que afectan el tracto gastrointestinal de los pequeños rumiantes se presentan en el Cuadro 1. Es importante considerar que en condiciones naturales se presentan infecciones mixtas (Torres-Acosta y Aguilar-Caballero, 2005).

Cuadro 1. Géneros y especies de NGI que afectan a los ovinos y caprinos (Aguilar-Caballero *et al.*, 2009).

Órganos digestivos	Géneros	Especies
Abomaso	<i>Haemonchus</i>	<i>H. contortus</i>
	<i>Teladorsagia (Ostertagia)</i>	<i>T. circumcincta</i>
	<i>Trichonstrongylus</i>	<i>T. axei</i>
Intestino delgado	<i>Cooperia</i>	<i>C. curticei</i>
	<i>Trichonstrongylus</i>	<i>T. colubriformis, T. vitrinus</i>
	<i>Nematodirus</i>	<i>N. filicollis, N. spathiger</i>
	<i>Bunostomum</i>	<i>B. trigoncephalum</i>
	<i>Strongyloides</i>	<i>S. papillosus</i>
Intestino grueso	<i>Oesophagostomum</i>	<i>O. columbianum, O. globulosa</i>
	<i>Trichuris</i>	<i>T. ovis</i>

1.4 *Haemonchus contortus*

Clasificación taxonómica (Uniprot Consortium, 2016):

Reino: Metazoa

Filo: Nematoda

Clase: Chromadorea

Orden: Rhabditida

Suborden: Strongylida

Superfamilia: Trichostrongyloidea

Familia: Haemonchidae

Subfamilia: Haemonchinae

Género: *Haemonchus*

Especie: *Haemonchus contortus*

El más importante de los nematodos estrogilidos a nivel mundial es *Haemonchus contortus*, también conocido como “gusano polo de barbero” o “gusano alambre” (Zajac, 2006). *H. contortus* es un parásito hematófago abomasal de pequeños rumiantes que puede causar grandes pérdidas en el ganado ovino, especialmente en áreas tropicales y

subtropicales. Los adultos se identifican por su localización específica en el abomaso y por su tamaño entre dos y tres centímetros; en las hembras los ovarios blancos se encuentran rodeando el intestino plétórico de sangre en forma de espiral otorgándole la apariencia característica de “polo de barbero” (Figura 1) (Castaño Zubieta, 2005).

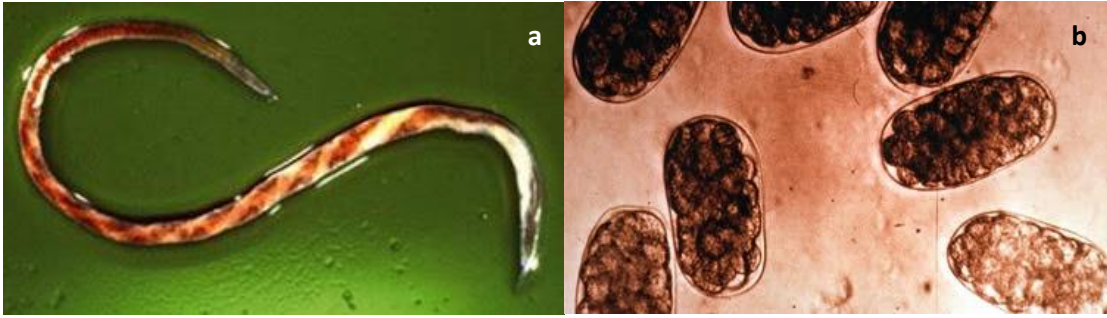


Figura 1. *Haemonchus contortus*. a. Adulto. b. Huevos

La infección por *H. contortus* o haemoncosis puede ser clasificada como hiperaguda, aguda o crónica. En la fase hiperaguda puede ocurrir la muerte del animal en la primera semana de infección sin la presencia de síntomas aparentes. La fase aguda se caracteriza por una severa anemia acompañada por edema generalizado. La anemia es también característica de la infección crónica, así como la pérdida de peso, abomaso edematoso y el aumento del pH, causando disfunción abomasal (Merck Sharp y Dohme Corp., 2016).

1.5 CICLO DE VIDA DE *H. contortus*

En el ciclo de vida de *H. contortus* (Figura 2), los huevos, producidos por parásitos hembras, son liberados en las heces y eclosionan bajo condiciones favorables de temperatura y humedad liberando larvas de primer estadio (L_1). Las L_1 se alimentan de materia orgánica dentro de las heces y mudan a L_2 , las cuales continúan alimentándose hasta realizar la muda a L_3 , la forma infectiva. Esta última larva no se alimenta debido a que retiene la cutícula que le sirve como vaina protectora y que le permite sobrevivir por largos períodos de tiempo (incluso meses), ya sea en las heces o en las pasturas. Las L_3 en las pasturas son ingeridas durante el pastoreo; posteriormente desenvainan en el

rumen y se abren paso al abomaso penetrando la mucosa donde mudan a L₄. En condiciones naturales las L₄ migran de regreso al lumen y mudan al estadio de adulto inmaduro (L₅), donde posteriormente desarrollan a adultos reproductivos para completar su ciclo de vida (Miller y Horohov, 2006).

En condiciones adversas, especialmente al final del verano y durante el otoño, las L₄ que penetran las mucosas entran a una fase de inhibición o interrupción del desarrollo llamada también hipobiosis (Fernández *et al.*, 1999), en donde no se alimentan de sangre o tejidos. Estas larvas hipobióticas completan su desarrollo hasta la llegada de la primavera, particularmente cuando llegan los partos y comienza la producción de leche y el sistema inmune del animal está deprimido. A este período se le conoce como periparturiento (Shulaw *et al.*, 2012).

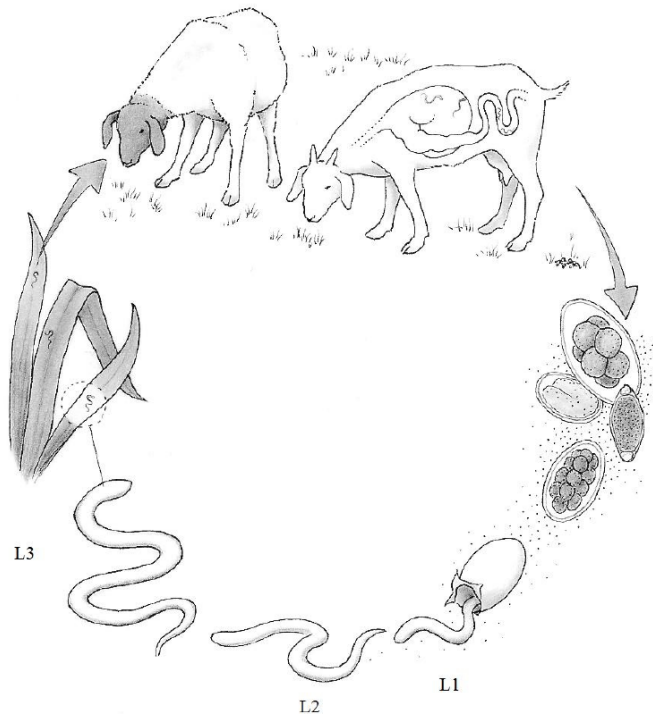


Figura 2. Ciclo de vida de *H. contortus* en pequeños rumiantes (tomado de Mekonnen, 2007). L₁, L₂ y L₃ se refieren al primer, segundo y tercer estadio larval, respectivamente.

1.6 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LOS NGI

Los NGI pueden ocasionar pérdidas directas en los animales por un descenso de la producción y la mortalidad de los mismos. Sin embargo, las pérdidas económicas más importantes ocurren por las infecciones subclínicas que pasan desapercibidas por el productor (Jabbar *et al.*, 2006). Con las infecciones subclínicas ocurren reducciones en la ganancia de peso, la producción de leche y la producción de pelo y lana (Torres-Acosta y Aguilar-Caballero, 2005).

En México, el costo de los NGI solamente se ha estimado en caprinos, observándose pérdidas de 3 a 5 dólares por cabrito infectado con NGI (de Montellano *et al.*, 2007; Torres-Acosta *et al.*, 2004).

El establecimiento de un sistema de control de NGI es de especial importancia económica en los sistemas de producción de pequeños rumiantes en todo el mundo. Estudios realizados en los tres principales países productores de ovinos, Australia, Sudáfrica y Uruguay, clasificaron a los NGI como la enfermedad infecciosa más importante en el ganado ovino, con pérdidas anuales estimadas en US \$222, US \$45 Y US \$42 millones de dólares respectivamente (Waller, 2006)

1.7 MÉTODOS DE CONTROL DE NGI

1.7.1 ANTIHELMÍNTICOS

Los antihelmínticos disponibles para ovinos y caprinos se dividen en tres clases de acuerdo a su modo de acción y estructura química.

a) Bencimidazoles

El primero de su clase, tiabendazol, fue descubierto en 1961 y posteriormente un gran número de bencimidazoles fueron introducidos al mercado como antihelmínticos de amplio espectro (Holden-Dye y Walker, 2005). Algunos de los más importantes son: mebendazol, flubendazol, fenbendazol, oxfendazol, oxibendazol, albendazol, sulfóxido de albendazol, tiabendazol, tiofanato, febantel, netobimin y triclabendazol. Sin embargo, hasta el momento sólo el albendazol (Figura 3a) ha sido aprobado para su uso en ovinos y el febendazol (figura 3b) para uso en caprinos en Estados Unidos. Debido a que posee

efectos embriotóxicos, el uso de este fármaco está contraindicado en los primeros 30 días de gestación (Zajac, 2006). Su principal modo de acción es la unión selectiva y de alta afinidad con la subunidad β de la proteína que constituye los microtúbulos, inhibiendo la formación de los mismos (Köhler, 2001).

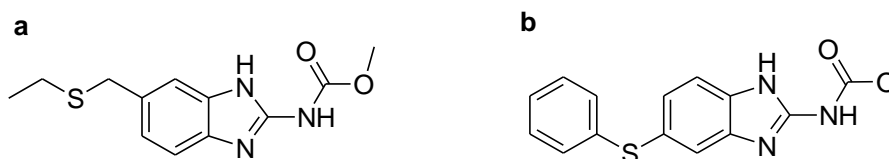


Figura 3. Estructura química de los bencimidazoles más comunes. a. albendazol. b. fenbendazol

b) Tetrahidropirimidinas/imidazotiazoles

Este grupo de antihelmínticos incluye a las tetrahidropirimidinas pirantel (Figura 4a) y morantel (Figura 4b), así como al levamisol (Figura 4c), un imidazotiazol. Su mecanismo de acción consiste en actuar como agonistas de los receptores nicotínicos y disparar la parálisis muscular de los parásitos debido a la activación de los receptores de nicotinacetilcolina en las células de la pared muscular (Holden-Dye y Walker, 2005; Zajac, 2006).

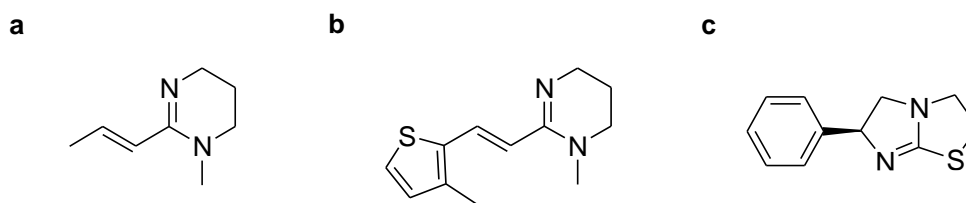


Figura 4. Estructura química de los antihelmínticos que actúan como agonistas nicotínicos. a. pirantel. b. morantel. c. levamisol.

c) Lactonas macrocíclicas

Las lactonas macrocíclicas incluyen dos productos aprobados para su uso oral en ovinos: ivermectina (0.2 mg/kg), que consiste en una mezcla de dos avermectinas (Figura 5a) y moxidectina (0.2 mg/kg; Figura 5b). Otros macrólidos aprobados para su uso en ganado son eprinomectina y doramectina. A pesar de que estos productos no han sido aprobados

para caprinos, su uso es cada vez más amplio, lo que podría contribuir al aumento de parásitos resistentes (Zajac, 2006). El mecanismo de acción de las lactonas macrocíclicas consiste en interferir con la neurotransmisión a través de los canales de cloruro-GABA (Harder y von Samson-Himmelstjerna, 2001).

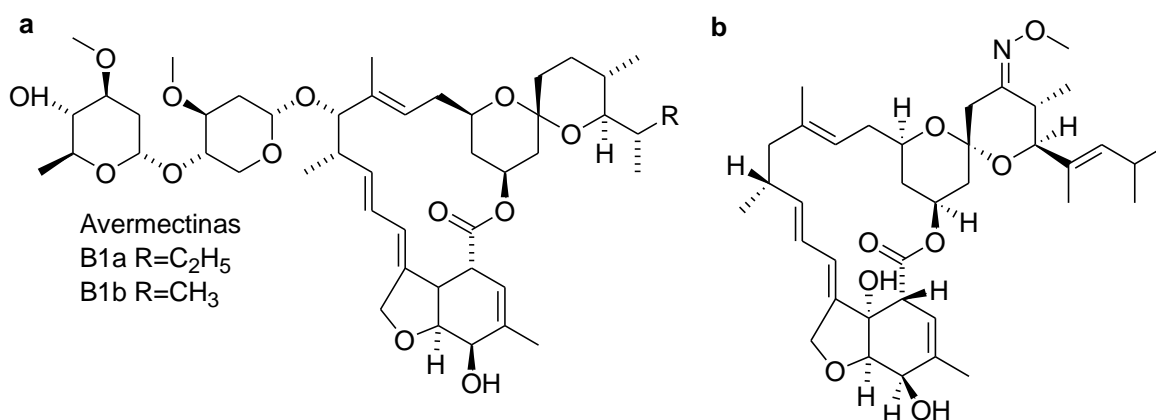


Figura 5. Estructura química de las lactonas macrocíclicas. a. ivermectina, mezcla de las avermectinas B1a y B1b. b. moxidectina.

d) Otros fármacos

Recientemente, han surgido nuevos tipos de moléculas con actividad antihelmíntica entre los cuales se encuentran las salicilanilidas y los ciclooctadepsipéptidos. Dentro del primer grupo, el closantel (Figura 6a) y la rafoxanida (Figura 6b) representan los productos más importantes y han sido usados extensivamente para el control de *H. contortus* y *Fasciola spp.* en ovinos y bovinos en varias partes del mundo. Su mecanismo de acción se basa en el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones en la fosforilación oxidativa (Swan, 1999). Por otro lado, en 1992 se reportó el aislamiento y elucidación estructural del producto PF1022A (Figura 6c), perteneciente a la clase de los ciclooctadepsipéptidos *N*-metilados de 24 miembros, consistentes en cuatro residuos alternados de *N*-metil-*L*-leucina, dos residuos de *D*-lactato y dos residuos de *D*-fenillactato. La actividad antihelmíntica de este producto ha sido observada *in vitro* e *in vivo*. En ovinos PF1022A demostró ser altamente efectivo contra *H. contortus* a una dosis

oral de 5 mg/kg y contra *T. colubriformis* a una dosis de 10 mg/kg. El modo de acción de los ciclooctadepsipéptidos es diferente al de los antihelmínticos existentes dado que consiste en el antagonismo de la afluencia de calcio inducida por latrotoxina en el receptor de latrofilina (Harder y Von Samson-Himmelstjerna, 2002).

En 2009 se introdujo al mercado el monepantel (Figura 6d), perteneciente a una nueva clase de antihelmínticos, los derivados de amino-acetonitrilo, para uso en ovinos. Monepantel ha demostrado ser altamente eficaz (99.9%) contra especies multirresistentes como *T. colubriformis* y *H. contortus* a una dosis de 2.5 mg/kg (Kaminsky *et al.*, 2011). Su mecanismo de acción se basa en la interferencia con la subunidad ACR-23 del grupo DEG-3 de receptores de acetilcolina específicos para nematodos (Kaminsky *et al.*, 2008).

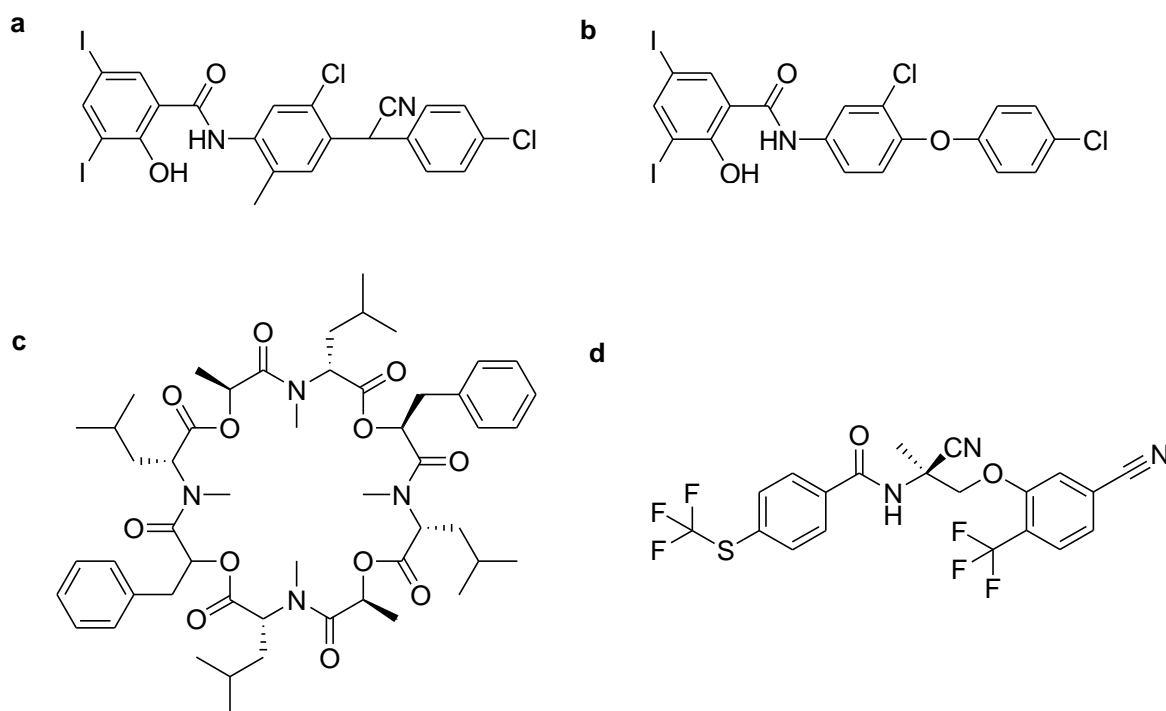


Figura 6. Estructura química de otros fármacos empleados como antihelmínticos. a. closantel. b. rafoxanida. c. PF1002A. d. monepantel.

A pesar de que existe una gran variedad de antihelmínticos disponibles, su uso constante y repetitivo, así como la subdosificación, han propiciado la aparición de nematodos resistentes o multirresistentes a los tratamientos convencionales, poniendo en riesgo la sustentabilidad de los sistemas de control de parásitos en pequeños rumiantes.

1.7.1.1 RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA

La resistencia a los antihelmínticos convencionales se ha convertido en uno de los mayores problemas para la medicina veterinaria y amenaza tanto la economía de los agricultores como el bienestar animal (Wolstenholme *et al.*, 2004); ésta se presenta cuando una elevada frecuencia de parásitos tolera mayor dosis de un producto en comparación con una población normal de la misma especie y además dicha tolerancia es heredable (Prichard *et al.*, 1980).

La resistencia se desarrolla durante los tratamientos antihelmínticos cuando un número reducido de parásitos sobrevive; estos parásitos más resistentes de la población contaminan las pasturas con un gran número de larvas resistentes y sus generaciones, y gradualmente dan lugar a una presión selectiva hacia la resistencia (Papadopoulos, 2008).

Los mecanismos involucrados en la resistencia antihelmíntica pueden incluir un cambio en el blanco molecular, de modo que la droga no logra reconocer el blanco y se vuelve ineficaz, un cambio en el metabolismo que desactiva o elimina la droga, un cambio en la distribución de la droga en el organismo blanco que evita que la droga pueda acceder a su sitio de acción, o la amplificación de genes blanco para superar la acción de la droga (Wolstenholme *et al.*, 2004).

En la actualidad existen más de 40 países con casos de resistencia antihelmíntica, en muchos casos los NGI muestran múltiple resistencia ante los tres grupos de antihelmínticos comercialmente disponibles: bencimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas (Várady *et al.*, 2011). Los parásitos más comunes de cabras y ovejas han sido ya reportados con resistencia, sin embargo, hay una particular prevalencia en aquellos más importantes desde el punto de vista económico como *H. contortus*, *Trichonstrongylus* spp. y *Teladorsagia circumcincta* (Jackson *et al.*, 2012).

En Yucatán se ha reportado la presencia de NGI resistentes a los bencimidazoles e imidazotiazoles. En un estudio realizado por Torres-Acosta *et al.* (2003) se encontraron aislados de *H. contortus* resistentes al bencimidazol, mientras que aislados de *Trichstrongylus spp.* y *Oesophagostomum spp.* Mostraron resistencia al levamisol, de acuerdo a la prueba de reducción de cuentas de huevos en heces fecales.

1.7.2 MÉTODOS DE CONTROL ALTERNATIVO DE NGI

La aparición de poblaciones de NGI resistentes a los antihelmínticos sintéticos, aunado a la inquietud en cuanto al uso y abuso de productos químicos en la industria agrícola, han estimulado la exploración de métodos alternativos para el control de estos parásitos. Los métodos utilizados se basan en tres principios de acción: a) aquellos dirigidos a reducir el contacto de los huéspedes con las larvas en etapa infectiva a través de técnicas de pastoreo, b) los que buscan mejorar la respuesta del huésped contra las infecciones ocasionadas por NGI, ya sea mediante un enfoque genético o nutricional, y c) los que buscan controlar la población de parásitos utilizando materiales antihelmínticos no convencionales e.g. productos vegetales o minerales (Hoste y Torres-Acosta, 2011; Torres-Acosta y Hoste, 2008; Waller y Thamsborg, 2004).

1.7.2.1 MÉTODOS DIRIGIDOS A REDUCIR EL CONTACTO DEL HUÉSPED CON LA ETAPA INFECTIVA DE LOS NGI

a) Manejo del pastoreo

Dado que las larvas sobreviven en las pasturas por un período de tiempo limitado, es posible desarrollar sistemas de pastoreo rotacional con el fin de introducir animales al potrero sólo cuando las poblaciones de larvas infectivas, que se han desarrollado de los huevos previamente depositados, han disminuido en número debido a su tasa natural de mortalidad (Torres-Acosta y Hoste, 2008). Otro enfoque es realizar rotaciones cortas con el objetivo de retirar a los animales antes de que los huevos desarrollen a larvas L₃ (Eysker *et al.*, 2005).

Aunque el manejo del pastoreo es una herramienta útil en el tratamiento de infecciones causadas por NGI, posee algunas limitantes. Su aplicación es difícil en muchos sistemas de producción extensiva y de pastoreo común, debido a que no siempre hay espacio

suficiente para las rotaciones o el número de animales es inadecuado para asegurar que no haya contaminación por parásitos en las pasturas (Jackson y Miller, 2006).

b) Hongos nematófagos

El objetivo de usar hongos nematófagos como control biológico es reducir la población de parásitos en las pasturas a niveles que no afecten el rendimiento y bienestar de los animales. En la actualidad se conocen dos tipos: los hongos depredadores, como *Duddingtonia flagrans*, que atrapan las larvas de los nematodos y los hongos endoparásitos, cuyas esporas germinan en las larvas al ser ingeridos por el huésped (Jackson y Miller, 2006). Los hongos pasan a través del tracto gastrointestinal del huésped sin perder su viabilidad, de este modo pueden inhibir el desarrollo larval de los nematodos en las heces y en las pasturas (Sanyal *et al.*, 2008). Sin embargo, en los ambientes donde las poblaciones larvales persisten por varios meses, el control biológico por hongos nematófagos debe considerarse como una estrategia a largo plazo, ya que los beneficios de ésta se perciben hasta la estación siguiente (Jackson y Miller, 2006).

1.7.2.2 MÉTODOS QUE BUSCAN MEJORAR LA RESPUESTA DEL HUÉSPED CONTRA LAS INFECCIONES OCASIONADAS POR NGI

a) Vacunas

A partir de la aparición del "Dictol", una vacuna que consiste en un gusano atenuado por radiación (*Dictyocaulus viviparus*), se hicieron varios intentos por extender este método a los helmintos gastrointestinales. Como resultado, se obtuvo una protección inducida contra *H. contortus* y *T. colubriformis* en ovejas maduras en condiciones experimentales. Sin embargo, en condiciones de campo el efecto protector fue muy débil o variable, particularmente en corderos jóvenes (Smith y Zarlenga, 2006).

b) Selección genética

Entre las últimas estrategias para el control de parásitos de manera sustentable se encuentra el uso de la selección genética de huéspedes (Waller y Thamsborg, 2004). Dicha estrategia busca aumentar la inmunidad de los huéspedes contra los NGI mediante la selección de líneas de animales, ya sea dentro de una raza o, con la introducción de

una raza resistente, para producir cruza que posean una mejor capacidad de regular sus poblaciones de endoparásitos (Jackson y Miller, 2006). Sin embargo, se tiene como desventaja que al realizar la selección también se corre el riesgo de descartar animales con mayor producción (Morris *et al.*, 2003).

c) Nutrición

La manipulación nutricional es considerada como una herramienta que puede ayudar en el control de infecciones por NGI, tanto en ovejas como en cabras, reduciendo su dependencia por los antihelmínticos convencionales (Torres-Acosta *et al.*, 2012). El principio de esta estrategia es remediar el desbalance nutricional ocurrido al final de la gestación y/o inicio de la lactancia, donde los nutrientes son destinados a cubrir las necesidades de la descendencia en lugar de fortalecer al sistema inmunológico, ocurriendo así una disminución en la capacidad de respuesta inmune y de alterar la biología de los parásitos (Coop y Kyriazakis, 1999). El mejoramiento de la dieta del huésped se asocia con dos beneficios potenciales: primero, proveer los nutrientes necesarios para desarrollar una buena respuesta inmune contra los nematodos y segundo, contribuir a mantener la homeostasis en tejido y sangre, además de mantener la producción a pesar de la presencia de los parásitos (Hoste, 2005).

1.7.2.3 MÉTODOS DIRIGIDOS A CONTROLAR LA POBLACIÓN DE PARÁSITOS UTILIZANDO MATERIALES ANTIHELMÍNTICOS NO CONVENCIONALES

a) Agujas de cobre

Las agujas de óxido de cobre, inicialmente usadas para tratar la deficiencia de cobre en ovejas y cabras, han demostrado ser un medio efectivo para el control de NGI y actualmente ya se encuentran disponibles guías de uso para los productores (Burke *et al.*, 2007). Se han llevado a cabo varios estudios en donde se confirma una importante eficiencia de estas partículas contra *H. contortus* en ovejas y cabras, sin embargo, no se ha observado el mismo efecto para otros géneros de nematodos como *Teladorsagia* o *Trichostrongylus* (Chartier *et al.*, 2000). Aunque el uso de las agujas de cobre está ganando cada vez mayor credibilidad, hay cierta preocupación acerca de su

administración en animales que no tienen deficiencia de cobre, ya que podría causar toxicidad y afectar la calidad de la carne (Vatta *et al.*, 2009).

b) Plantas con actividad antihelmíntica

Debido al elevado costo de los antihelmínticos convencionales y la resistencia que los parásitos han ofrecido a los mismos, se ha desarrollado un creciente interés en antihelmínticos alternativos derivados de plantas (Tariq y Tantry, 2012). La selección de las mismas se realiza tomando en cuenta la información etnoveterinaria existente, *e.g.* seleccionando plantas utilizadas en medicina veterinaria como nutracéuticos, fitoterápicos, o tomando en cuenta su información quimiotaxonómica, *e.g.* plantas reconocidas por su contenido de un grupo en particular de metabolitos bioactivos (Sandoval-Castro *et al.*, 2012). A menudo las plantas elegidas han sido evaluadas administrándolas directamente (Brunet *et al.*, 2008; Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2010), en forma de extractos (Hördegen *et al.*, 2006) o como suplementos alimenticios (Galicia-Aguilar *et al.*, 2012).

1.8 PLANTAS CON PROPIEDADES ANTIHELMÍNTICAS

El uso de plantas, partes de plantas o extractos para evaluar su actividad antihelmíntica ha sido ampliamente documentado (Athanasiadou *et al.*, 2007; Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2005; Ghisalberti, 2002; Githiori *et al.*, 2006; Sandoval-Castro *et al.*, 2012).

Las plantas han sido evaluadas contra diversos nematodos como *Strongyloides* spp. (Carvalho *et al.*, 2012) y *Trichostrongylus* spp. (Moreno-Gonzalo *et al.*, 2013b; Moreno *et al.*, 2012), así como contra infecciones por múltiples especies entre las que se encuentran (*T. colubriformis*, *T. axei*, *O. columbianum*, *S. papillosus* y *Trichuris ovis* (Hussain *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2006). Sin embargo, el modelo más utilizado para evaluar actividad antihelmíntica contra NGI es *H. contortus* debido a su importancia económica y para la producción en los trópicos.

Las plantas completas, o partes de ellas, se administran frescas o secas. Por ejemplo, el consumo de hojas de ajeno (*Artemisia brevifolia*) en forma de polvo resultó en una reducción del 62% en la cuenta de huevos de *H. contortus* en ovejas. De manera similar, *Lespedeza cuneata*, una leguminosa nativa del este asiático, mostró un gran potencial antihelmíntico al ser administrada a cabras en fresco o como heno (Lange *et al.*, 2006;

Min *et al.*, 2004). En experimentos *in vivo*, la administración de extractos ha sido oral mediante alícuotas o cápsulas. Por ejemplo, la fracción soluble en agua de látex de papaya fue administrada a borregos infectados causando una reducción del 98% en la cuenta de parásitos (Buttle *et al.*, 2011), mientras que el extracto etanólico de *Phytolacca icosandra* se administró en cápsulas de gelatina a cabras resultando en una reducción del 72% en la cuenta de huevos fecales (Hernández-Villegas *et al.*, 2012).

Dado que los metabolitos secundarios se encuentran presentes en bajas cantidades en el material vegetal, se ha optado por la preparación de extractos, que varía desde simples extracciones acuosas hasta extracciones con disolventes orgánicos en gradiente de polaridad. Por ejemplo, los extractos acuoso y etanólico de *Spigelia anthelmia* demostraron poseer actividad antihelmíntica *in vitro* e *in vivo* contra *Strongyloides* spp., *Oesophagostomum* spp., *Trichuris* spp., *Haemonchus* spp. y *Trichostrongylus* spp. (Ademola *et al.*, 2007). En otro estudio se prepararon decocciones de *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* y *Tagetes minuta* y se evaluaron contra larvas y huevos de *H. contortus*, en donde *A. zerumbet*, *M. villosa* y *T. minuta* mostraron actividad inhibitoria en el desenvaine larval y la eclosión de huevos (Macedo *et al.*, 2012). Por otro lado, la extracción con acetona de hojas, tallo y corteza de *Peltophorum africanum*, dieron como resultado una inhibición de la eclosión de huevos, así como del desarrollo larval de *T. colubriformis* (Bizimenyera *et al.*, 2006).

Para la identificación de especies con propiedades antihelmínticas contra *H. contortus* se han evaluado también extractos de plantas que son empleadas en la medicina tradicional, e.g. Kamaraj *et al.* (2011) evaluaron extractos metanólicos de *Andrographis paniculata*, *Anonna squamosa*, *Datura metel* y *Solanum torvum*, las cuales demostraron un 100% de inhibición en el ensayo de eclosión de huevos (EHA). En otro estudio se evaluaron los extractos etanólicos de 25 especies de plantas medicinales de Sudáfrica y como resultado *Lespedeza cuneata* mostró un 70% de mortalidad larval (Ahmed *et al.*, 2013). Además de las hojas también se ha evaluado el extracto etanólico de las semillas de *Jatropha curcas*, el cual inhibió en un 99.8% la eclosión de huevos de *H. contortus* (Monteiro *et al.*, 2011). Otro enfoque ha sido probar los aceites esenciales de ciertas especies, como el de *Artemisia lancea*, cuyo componente principal, el 1,8-cineol inhibió la migración larval en un 77% y también tuvo una moderada actividad ovicida (Zhu *et al.*, 2013).

La importancia de la elección de disolventes para la preparación de extractos radica en los metabolitos secundarios que éstos son capaces de extraer. Dependiendo del tipo de estudio, se han evaluado sistemas de disolventes que extraen metabolitos de un amplio rango de polaridad, mientras que en otros emplean disolventes en los cuales se obtiene una fracción enriquecida con metabolitos bioactivos (Brusotti *et al.*, 2014).

Otro aspecto importante a tomar en cuenta en la preparación de extractos es la concentración de los metabolitos activos, que tiende a variar de acuerdo al proceso de extracción y la polaridad de los disolventes. Estas condiciones pueden alterar los resultados de los bioensayos, por esta razón, es importante conocer los componentes activos de las plantas ya sea con el fin de estandarizar su concentración en los extractos o investigar si la actividad de los mismos mejora al encontrarse puros y así dar lugar a posibles fármacos.

1.9 PLANTAS FORRAJERAS RICAS EN TANINOS

Los taninos son un grupo de polifenoles caracterizados por su habilidad de formar complejos con otras macromoléculas (e.g. proteínas) y pueden dividirse en dos grupos: taninos hidrolizables (TH) y taninos condensados (TC). Los TH son polímeros de ácido gálico o elágico unidos a un residuo de azúcar, mientras que los TC están constituidos por flavonoides unidos mediante enlaces carbono-carbono (Muetzel y Becker, 2006).

Las plantas forrajeras ricas en taninos han atraído particularmente la atención de diversos grupos de investigación debido a la gran eficacia antihelmíntica que han demostrado y a la capacidad que tienen para incrementar, en algunos casos, la resistencia del hospedero a las infecciones por NGI (Hoste *et al.*, 2006). Los estudios iniciales se llevaron a cabo con especies vegetales de clima templado, cuando un grupo de investigación neozelandés advirtió las propiedades antihelmínticas de *Hedysarium coronarium* (Leguminosae) y posteriormente demostró que las mismas estaban influenciadas por el contenido de TC de la planta (Molan *et al.*, 2000). A partir de estos resultados, se detectaron otras especies de leguminosas con un gran potencial para el desarrollo de antihelmínticos no convencionales. Como ejemplo se encuentran *Onobrychis viciifolia* (sanfoin), *Lotus corniculatus*, *Lotus pedunculatus* y *Lespedeza cuneata* (Hoste *et al.*, 2006). Algunos efectos antihelmínticos del consumo de estas especies son: la reducción

del establecimiento de larvas infectivas en los hospederos, la disminución en la excreción de huevos y la inhibición del desarrollo de huevos a larvas, lo que provoca la reducción también de la infectividad de las pasturas (Hoste *et al.*, 2011)

Con el objetivo de entender mejor los procesos que experimentaban los NGI al estar en contacto con materiales ricos en taninos se desarrolló el ensayo de inhibición del desenvaine larval (LEIA), en el cual se observó que extractos de plantas ricas en taninos eran capaces de inhibir el desenvaine larval de diversos NGI (Hoste *et al.*, 2012), por lo que se pensaba que este bioensayo era específico para detectar actividad AH de taninos. La confirmación de esos resultados mediante el uso de agentes inhibidores de taninos, como polivinilpolipirrolidona (PVPP) o polietilenglicol (PEG) reforzó esta creencia (Bahuaud *et al.*, 2006), sin embargo, estudios posteriores permitieron sugerir que existían otros grupos de metabolitos con actividad AH sobre el desenvaine (Ojeda-Robertos *et al.*, 2010).

1.10 PRODUCTOS DE ORIGEN NATURAL CON ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA

La posibilidad de usar metabolitos bioactivos de plantas para controlar las parasitosis por NGI, es un tema de reciente y amplio desarrollo (Sandoval-Castro *et al.*, 2012). De acuerdo a esto, se han realizado varias revisiones que explican la importancia de la identificación de nuevas moléculas que muestren una elevada actividad biológica y que al mismo tiempo muestren un modo de acción selectivo hacia los nematodos (Rochfort *et al.*, 2008; Ghisalberti, 2002)

Los productos evaluados contra NGI pertenecen a diversos grupos como enzimas, péptidos y metabolitos secundarios; aunque son los taninos las moléculas a las que se les ha prestado mayor atención, ya que se les atribuyen las propiedades antihelmínticas de una gran variedad de plantas (Hoste *et al.*, 2009; Hernández-Orduño *et al.*, 2008; Paolini *et al.*, 2003).

Múltiples investigaciones han reportado la actividad de taninos condensados (TC) aunque con muy poca información acerca de la composición específica de dichas moléculas. Como ejemplo de este tipo de metabolitos se encuentran los aislados a partir de *Camelia sinensis* (Theaceae), entre los cuales (-)-epigallocatequina-(2 β →O→7',4 β →8')-

epicatequin-3'-O-galato mostró una $LC_{50} = 49 \mu\text{mol/L}$ contra *Caenorhabditis elegans* en un bioensayo *in vitro* (Mukai *et al.*, 2008). Otro ejemplo son los taninos aislados en el estudio del sainfoin (*Onobrychis viciifolia*; Fabaceae), una planta que ha mostrado tener actividad contra varias especies de nematodos *in vitro*. Como resultado del estudio biodirigido se detectó que parte de la actividad era debida a un tanino con una masa molecular mayor a 2,000 Da. Al mismo tiempo se identificaron flavonoides glicosilados como rutina, nicotiflorina y narcissina, los cuales contribuían a la actividad biológica presentada por el extracto metanólico (Barrau *et al.*, 2005).

Entre las enzimas reportadas con actividad antihelmíntica se pueden citar las cisteín-proteasas papaína, caricaína, ficina, ficaína, ananaína y bromelaína aisladas de *Carica papaya*, *Ficus spp.* y *Ananas comosus* (Behnke *et al.*, 2008). Estas enzimas han demostrado ser altamente efectivas en estudios *in vitro* e *in vivo* contra diversos nematodos parásitos (Steppek *et al.*, 2007).

En otro trabajo de investigación se aislaron ciclótidos, una familia de péptidos circulares ricos en disulfuro producidos por las familias Violaceae y Rubiaceae. Uno de ellos, kalata B6 exhibió una actividad comparable a la de antihelmínticos comerciales con un $IC_{50} = 1.7 \mu\text{M}$, en un bioensayo contra *H. contortus* y *T. colubriformis* (Colgrave *et al.*, 2008).

En el estudio fitoquímico de *Struthiola argentea* (Thymelaceae) la flavona 5,6,2',5',6'-pentametoxy-3',4'-metilenedioxiflavona exhibió la mejor actividad con respecto a otros flavonoides aislados, con una $IC_{90} = 3.1 \mu\text{g/mL}$ en el bioensayo *in vitro* contra *H. contortus* (Ayers *et al.*, 2008).

En la investigación del potencial ovicida del aceite esencial de *Ocimum gratissimum* se aisló eugenol, un monoterpeno. Este y el aceite esencial mostraron la máxima inhibición en la eclosión de huevos de *H. contortus* a una concentración de 0.50%, con lo que se sugiere que la administración del aceite esencial de esta planta puede ser de gran ayuda en el tratamiento de helmintosis gastrointestinales (Pessoa *et al.*, 2002).

Por otro lado, el bioensayo de inhibición del desenvaine larval permitió la identificación de quercetina y luteolina como flavonoides activos contra *H. contortus*, además se observó

un mecanismo sinérgico de estas moléculas al ser añadidas a fracciones ricas en taninos condensados de extractos vegetales (Klongsiriwet *et al.*, 2015).

Estos reportes ponen de manifiesto el potencial de los productos aislados de plantas para el control de NGI, al exhibir actividades similares o mejores a los antihelmínticos sintéticos que existen en la actualidad. La identificación de productos antihelmínticos a partir de las plantas es un campo que recientemente comienza a explorarse y, al igual que para la medicina humana, estos metabolitos pueden servir en el diseño de fármacos y como biomarcadores de actividad biológica en la estandarización de extractos vegetales.

1.11 PLANTAS FORRAJERAS DE LA SELVA BAJA CADUCIFOLIA YUCATECA

La civilización maya se extendió por el sur de la península de Yucatán, parte de Guatemala y Honduras entre los años 1000 a.C. y 320 d.C. Su legado en materia de artes, cultura y ciencias permanecen vigentes tanto en la sociedad moderna como en los pueblos mayas que aun habitan en la región. El conocimiento de los elementos relacionados con la agricultura, como la clasificación de suelos y manejo de las plantas que los rodean, les permite hacer un mejor uso de ellos, por lo que actualmente son investigados con el fin de aplicarlos en la producción agrícola o animal (Bautista *et al.*, 2005; García de Miguel, 2000).

En este contexto, Flores y Bautista (2012) publicaron una lista de 196 plantas forrajeras que son empleadas por las comunidades mayas de Yucatán en la alimentación del ganado bovino, equino, caprino, porcino, aves y conejos. De estas plantas, 29 especies se reportan como forraje para el ganado caprino. Asimismo, se ha demostrado que los pequeños rumiantes pueden ingerir un gran número de especies de la selva baja caducifolia con diversos niveles de preferencia (González-Pech *et al.*, 2015). Algunas de estas especies y otros forrajes han sido estudiadas tanto *in vitro* como *in vivo* para investigar su potencial antihelmíntico en NGI de pequeños rumiantes mostrando una actividad promisorio. Como ejemplo, el follaje de *Havardia albicans* fue ofrecido como suplemento a borregos infectados con *H. contortus* y se observó que redujo el tamaño y la fecundidad de las hembras de este parásito (Galicia-Aguilar *et al.*, 2012). Por otra parte, extractos de hojas de *Acacia gaumeri*, *Brosimum alicastrum*, *H. albicans* y *Leucaena*

leucocephala se evaluaron en el ensayo de migración larval (LMIA) de *H. contortus*, en donde *A. gaumeri* y *H. albicans* demostraron un efecto dosis dependiente en la migración (Alonso-Díaz *et al.*, 2011). En otro estudio, se evaluaron extractos de hojas de *Acacia pennatula*, *Lysiloma latisiliquum*, *Piscidia piscipula* y *L. leucocephala* demostrando interferir con el proceso de desvaine y migración larval de *H. contortus* (Alonso-Díaz *et al.*, 2008). Posteriormente, se confirmó la actividad *in vivo* de *L. latisiliquum* y *B. alicastrum* mediante el ensayo de establecimiento larval en cabras, donde se obtuvo que ambas especies redujeron significativamente el establecimiento de larvas L₃ de *H. contortus* comparadas con el grupo control (Brunet *et al.*, 2008). Otros estudios confirmaron mediante microscopía electrónica de barrido, los daños estructurales que ocasiona *L. latisiliquum* a individuos adultos de *H. contortus*, así como su interferencia en el desarrollo larval (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2013; 2010).

A partir de estos datos, es posible sugerir que en el campo yucateco existen varias especies vegetales que podrían resultar de gran interés para la búsqueda de nuevos agentes antihelmínticos y representan una gran oportunidad para su investigación fitoquímica, debido a que varias han resultado activas en ensayos antihelmínticos sin que se elucide con precisión los metabolitos responsables de la actividad.

Entre las especies más estudiadas se encuentra *L. latisiliquum*, la cual ha demostrado una promisoriosa actividad antihelmíntica contra *H. contortus*, sin embargo, se conoce poco acerca de su fitoquímica y los metabolitos responsables de esta actividad, por lo que se propone su estudio como una fuente de antihelmínticos alternativos.

1.12 *Lysiloma latisiliquum*

Una de las especies de plantas forrajeras consumidas por cabras en el campo yucateco es *L. latisiliquum* (Flores y Bautista, 2012). Esta especie ha sido estudiada principalmente en bioensayos *in vitro* e *in vivo* con el fin de evaluar su actividad contra *H. contortus* (Martínez Ortiz de Montellano *et al.*, 2010; 2013; Brunet *et al.*, 2008; Alonso-Díaz *et al.*, 2008a).

1.12.1 GENERALIDADES

La clasificación taxonómica de *L. latisiliquum* es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Mimosoideae

Tribu: Ingeae

Género: *Lysiloma*

Especie: *L. latisiliquum* (L.) Benth.

Lysiloma latisiliquum (Figura 7) es un árbol de porte mediano que mide de 7 a 20 m, de tronco recto, ramas ascendentes y copa con apariencia redondeada. La madera es dura y pesada de color crema amarillenta. Las hojas están dispuestas en espiral, bipinadas de 11 a 20 cm de largo incluyendo el pecíolo, compuestas por 3 a 6 pares de folíolos, cada uno de ellos formado por 18 a 35 pares de folíolos secundarios. Las inflorescencias son cabezuelas solitarias o agrupadas, axilares o terminales. Los frutos son vainas dehiscentes, aplanadas, agudas de color pardo moreno, brillantes y contienen numerosas semillas (Pennington y Sarukhán, 2005). Como especie caribeña se distribuye en el extremo sureste de Estados Unidos (Florida), la península de Yucatán, Belice y el este de Guatemala (Gale y Pennington, 2013). Se le puede encontrar en hábitats como sabana, selva mediana subcaducifolia, selva mediana subperenifolia, selva baja caducifolia y como vegetación secundaria (Duno *et al.*, 2010)



Figura 7. *Lysiloma latisiliquum* “tzalam”.

Se utiliza tradicionalmente como fuente de sombra, para construcción de casas, para leña, como planta melífera, forrajera para ganado bovino y equino, para poste de cercas vivas y su corteza se utiliza para curtir piel (Arellano Rodríguez, 2003). Recibe el nombre común de *tzalam*, falso tamarindo, adormido o candelón (USDA-GRIN, 2016).

1.12.2 CONOCIMIENTO FITOQUÍMICO DE *L. latisiliquum*

Hasta la fecha no se ha reportado un estudio donde se lleve a cabo la identificación, aislamiento o elucidación de los metabolitos secundarios de esta especie o del género, sin embargo, existen algunos reportes que evalúan el contenido principalmente de taninos y polifenoles totales.

En 2006, García y Medina estudiaron la composición química y valor nutritivo de *L. latisiliquum*, reportando que el contenido total de polifenoles y de taninos totales fue de 5.70% y 5.32%, respectivamente, mientras que los taninos que precipitan proteínas estuvieron presentes en un 0.91%. Por otra parte, se detectaron también taninos condensados (5.25%), taninos hidrolizables (0.65%), saponinas (1.82%) y alcaloides (0.05%). Cabe mencionar que *L. latisiliquum* mostró el mayor nivel de taninos entre todas las especies estudiadas.

1.12.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *L. latisiliquum*

Lysiloma latisiliquum ha sido objeto de varios ensayos de actividad biológica, principalmente para evaluar su actividad antihelmíntica contra NGI en cabras, en modelos *in vitro* e *in vivo*.

En 2008, se evaluó el efecto *in vitro* de *L. latisiliquum* en la migración larval y desenvaine del *H. contortus*. Se encontró que el extracto de acetona-agua (70:30) inhibió la migración larval en un modo dosis dependiente, asimismo, interfirió con el desenvaine larval (Alonso-Díaz *et al.*, 2008). De acuerdo al contenido de taninos condensados del extracto, se sugirió que la actividad se debe a los mismos, lo cual se comprobó con la disminución de la actividad al añadir polivinilpirrolidona (PVPP) (Alonso-Díaz *et al.*, 2008). Sin embargo, en estudios más recientes, se observó que la incubación con PVPP no disminuyó la actividad del mismo extracto, el cual mostró una mayor actividad cuando se

evaluó en el ensayo de inhibición de huevos de aislados con diferente susceptibilidad de *H. contortus* (Vargas-Magaña, 2013).

En una investigación posterior, se estudió el efecto de consumo de hojas de *L. latisiliquum* en el establecimiento de poblaciones de *H. contortus* y *T. colubriformis* en cabras. Como resultado se obtuvo que el consumo de esta especie redujo significativamente el establecimiento larval de ambas especies de nematodos, comparado con el grupo control (Brunet *et al.*, 2008).

Con base en el estudio anterior, se llevó a cabo la evaluación del consumo de *L. latisiliquum* en cabras, teniendo como objetivo determinar si el efecto antihelmíntico consistía en modificar la biología de los parásitos o en aumentar la resistencia de los huéspedes. Los resultados indicaron que el consumo de *L. latisiliquum* afecta la biología de parásitos adultos de *H. contortus*, reduciendo el tamaño de los mismos y la fecundidad de las hembras. También se observó que los animales infectados consumieron más de este forraje que los sanos (Martínez Ortiz de Montellano *et al.*, 2010).

1.13 ESTRATEGIAS PARA LA DETECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La identificación de metabolitos activos en un extracto, la posibilidad de estimar su concentración en el material vegetal y, posteriormente, determinar su biodisponibilidad en el huésped, son pasos esenciales para consolidar la evidencia de la actividad antihelmíntica reportada para una especie vegetal. Por lo anterior, el primer paso, constituido por la detección de metabolitos activos se vuelve determinante al iniciar el estudio de la actividad antihelmíntica de una planta.

1.13.1 AISLAMIENTO FITOQUÍMICO

El primer enfoque usado para identificar metabolitos activos de plantas lo constituyó el aislamiento de metabolitos por el método fitoquímico. Este método involucra procedimientos de extracción, fraccionamiento, purificación y aislamiento de metabolitos de plantas. Sin embargo, algunos de los productos recuperados pueden o no poseer actividad biológica al ser aislados del extracto u organismo.

El primer paso es establecer la identificación taxonómica de la planta de estudio, así como realizar búsquedas sobre las propiedades etnofarmacológicas o etnomédicas de las mismas. Posteriormente, pueden realizarse pruebas para detectar la presencia de diversos grupos de metabolitos como terpenoides, alcaloides, flavonoides, saponinas, glicósidos, taninos, etc. Como siguiente paso se lleva a cabo el fraccionamiento del extracto y aislamiento por medio de múltiples técnicas, e.g. destilación, cristalización, extracción con disolventes, extracción líquido-líquido, particiones y cromatografía. Una vez que los metabolitos han sido aislados, se prueba su bioactividad en algún bioensayo, e.g. antibacteriano, antifúngico o antioxidante y se caracteriza su estructura química mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas (Olufunke, 2012).

1.13.2 AISLAMIENTO BODIRIGIDO

En este enfoque, el proceso de aislamiento de metabolitos bioactivos inicia con la elección de un ensayo apropiado para evaluar el extracto crudo. Algunos de estos bioensayos son antiprotozoarios, anticáncer, de citotoxicidad, de germinación, etc.; su característica es que deben ser sencillos, específicos y rápidos. Una vez extraído el material, el componente bioactivo debe ser separado de los demás componentes, para lo cual se utilizan métodos como partición, cromatografía de polaridad, de exclusión molecular o afinidad. Las fracciones producidas por estos métodos son evaluadas de nuevo en el bioensayo para localizar aquellas que son bioactivas. La purificación final implica técnicas de cromatografía, recristalización, sublimación o destilación, seguidas de la elucidación estructural del metabolito y la confirmación de la actividad mediante el bioensayo elegido (Colegate y Molyneux, 2007). Este proceso puede durar de meses a años y su desventaja es que la realización de bioensayos en cada etapa del fraccionamiento del extracto puede retrasar o dificultar el aislamiento.

1.13.3 METABOLÓMICA

Una de las más recientes y poderosas herramientas para el estudio de productos naturales derivados de plantas es la metabolómica, que consiste en el estudio del perfil de metabolitos totales en un sistema (célula, tejido u organismo) bajo ciertas condiciones (Goodacre *et al.*, 2004). Para realizar este tipo de estudio, la metabolómica usa el análisis estadístico de espectros ($^1\text{H-RMN}$, IR) o cromatogramas (HPLC, CG-EM) de mezclas

complejas de metabolitos secundarios con el fin de detectar características del espectro que se correlacionen con una propiedad fenotípica o biológica y su respuesta a un estímulo (Robinette *et al.*, 2012).

En el estudio de plantas medicinales de uso humano o animal, la metabolómica ha sido utilizada para apoyar en la detección e identificación de metabolitos activos, al simplificar las tareas de aislamiento mediante la correlación de la composición de las diferentes fracciones obtenidas durante los procesos de fraccionamiento y purificación, con los resultados de su actividad biológica detectada en el bioensayo de interés, *e.g.* la identificación de metabolitos con actividad ansiolítica y sedativa de *Galphimia glauca* (Sharma *et al.*, 2012), el uso etnofarmacológico de *Artemisa afra* (Liu *et al.*, 2010) y la búsqueda de metabolitos bioactivos en moras (Stewart *et al.*, 2007).

Por otro lado, el potencial de la metabolómica en la medicina veterinaria se ha documentado recientemente, reportándose su aplicación en toxicología y farmacocinética, así como en la identificación de biomarcadores de enfermedades y de metabolitos bioactivos con potencial aplicación en el descubrimiento de nuevos fármacos (Jones y Cheung, 2007).

En este sentido, la resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) es una técnica muy conveniente porque permite la detección de diversos grupos de metabolitos secundarios (flavonoides, alcaloides, terpenoides, etc.). Además, en un espectro de RMN, las señales son proporcionales a su concentración molar, haciendo posible la comparación de los mismos sin necesidad de usar curvas de calibración para cada metabolito (Kim *et al.*, 2010). Entonces, los componentes químicos presentes en el extracto vegetal se pueden ver simultáneamente como una “huella metabólica” en un espectro de RMN. La compleja “huella metabólica” puede ser visualizada mediante la aplicación de los métodos estadísticos multivariados con el objetivo de reducir la complejidad de los datos (Wang *et al.*, 2004).

Una de las técnicas de estadística multivariada es el análisis de componentes principales o PCA, por sus siglas en inglés, que permite comparar sets de espectros de RMN para identificar grupos similares en las gráficas de *score plot*, las cuales describen cómo los diferentes valores en las observaciones se relacionan entre sí. Por otro lado, las

identidades de los metabolitos responsables por las diferencias entre clases pueden conocerse mediante el análisis de *loading plot*, el cual revela qué variables son responsables de los patrones o agrupamientos encontrados en la gráfica de *scores* (Ward *et al.*, 2007).

Adicionalmente, existen análisis quimiométricos que permiten relacionar directamente la variación en los perfiles metabólicos por $^1\text{H-RMN}$ con valores de actividad biológica, y mediante modelos matemáticos, detectar señales relacionadas con la actividad del extracto vegetal, haciendo posible predecir el nivel de actividad de un extracto mediante la obtención de su perfil metabólico (Bailey *et al.*, 2004). Uno de ellos es el OPLS-DA (por sus siglas inglés, análisis discriminante de los cuadrados parciales ortogonales). Este análisis busca separar la variación sistemática de la matriz de datos X en dos partes, una que está linealmente relacionada a la variable (actividad biológica) y una que no está relacionada (ortogonal), con el objetivo de facilitar la interpretación de los resultados (Eriksson *et al.*, 2013).

1.14 EL DESENVAINA LARVAL DE *H. contortus* COMO MODELO PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA

Para los nematodos trichostrongílicos, el desenvaine de las larvas L_3 es un paso crucial en el ciclo de vida, ya que representa la transición de la fase de vida libre a la parasítica (Bahuaud *et al.*, 2006). Este desenvaine ocurre en los órganos del tracto gastrointestinal anteriores a los digestivos y se ha demostrado que la mayoría de las larvas se encuentran desenvainadas a la hora posterior a su ingestión (Hertzberg *et al.*, 2002). Los factores que desencadenan el desenvaine de las larvas L_3 son principalmente el balance de ácido carbónico/bicarbonato así como el pH del contenido luminal. Recientemente se ha sugerido que la composición de la dieta puede modular también el proceso de desenvaine (DeRosa *et al.*, 2005). Por lo anterior, y debido a que se ha reportado un gran número de plantas consumidas regularmente por ovinos y caprinos que poseen también algunas propiedades antihelmínticas, se ha diseñado un ensayo biológico con el que es posible evaluar la interacción de los materiales consumidos por los pequeños rumiantes y las larvas L_3 . Este ensayo es conocido como ensayo de inhibición del desenvaine larval o LEIA, por sus siglas en inglés.

Hasta ahora, la inhibición del desenvaine larval de *H. contortus* ha demostrado poseer mayor sensibilidad, haciendo posible el cálculo de concentraciones medias inhibitorias (IC₅₀) (Alonso-Díaz *et al.*, 2011). De esta manera, la actividad inhibitoria ha sido reportada en el desenvaine de gran diversidad de plantas (Aissa *et al.*, 2016; Alonso-Díaz *et al.*, 2008; Bahaud *et al.*, 2006; Castañeda-Ramírez, 2014; Chan-Pérez *et al.*, 2016; Moreno-Gonzalo *et al.*, 2013a; Oliveira *et al.*, 2011), siendo confirmada esta actividad para algunas de las plantas evaluadas por ensayos *in vivo* de establecimiento larval (Brunet *et al.*, 2008). Recientemente, se ha reportado también la actividad sobre el desenvaine de algunos productos naturales como quercetina y luteolina, los cuales exhibieron un IC₅₀ de 21 y 17 µg/mL, respectivamente (Klongsiriwet *et al.*, 2015). Sin embargo, el mecanismo por el cual los metabolitos secundarios de las plantas inhiben el desenvaine larval de *H. contortus* aún no está elucidado.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la resistencia antihelmíntica en poblaciones de NGI de pequeños rumiantes en los sistemas de producción extensiva se ha convertido en una amenaza mundial, siendo más prevalente en regiones tropicales. Las consecuencias de esta resistencia son: la ineficacia de los antihelmínticos disponibles y los efectos de los parásitos sobre la salud y bienestar de los animales; así como también las pérdidas económicas debidas al retraso en el crecimiento, la disminución de la producción y en casos graves muerte de los animales.

Una de las alternativas en el control de NGI que está recibiendo creciente atención es la utilización de plantas con propiedades antihelmínticas reconocidas. Aun cuando existen numerosas plantas forrajeras nativas del campo yucateco que han sido investigadas por sus propiedades antihelmínticas, hasta ahora los metabolitos responsables de la actividad no han sido identificados. Una de estas especies es *Lysiloma latisiliquum*, una leguminosa de amplia distribución en la península. Esta especie ha mostrado poseer actividad antihelmíntica *in vitro* e *in vivo* contra el NGI *H. contortus* y su alta eficacia se ha atribuido a su contenido de taninos; sin embargo, estudios recientes han sugerido que podría haber otros componentes implicados en su actividad biológica, por lo que el presente estudio

propone investigar los metabolitos secundarios que se encuentran relacionados con la actividad antihelmíntica de esta planta. Para este fin, es preciso determinar la influencia que poseen los taninos en la actividad biológica de esta especie, así como establecer cuáles son las condiciones óptimas de extracción de los metabolitos bioactivos. Una técnica que permite resolver de manera conjunta estas interrogantes es la metabolómica, la cual, mediante la correlación de perfiles obtenidos por $^1\text{H-RMN}$ y la actividad biológica de cada una de las muestras, hace posible la exploración de diversos sistemas de extracción simultáneamente, identificando aquellos que, por sus características, favorecen la extracción de los metabolitos bioactivos. Por otro lado, la metabolómica aporta información de gran importancia para el posterior aislamiento y elucidación de los metabolitos de interés, mediante la correlación de los perfiles metabólicos por $^1\text{H-RMN}$ y el nivel de actividad biológica de los extractos vegetales.

De manera particular, este trabajo aportará información acerca de la influencia de los taninos en la actividad antihelmíntica de plantas, sirviendo como base para la elección de métodos de procesamiento de extractos vegetales. Asimismo, se evaluará el potencial de la metabolómica como herramienta para identificar metabolitos bioactivos en una especie sin conocimiento fitoquímico previo.

HIPÓTESIS

Dado que el extracto de hojas de *Lysiloma latisiliquum* muestra actividad antihelmíntica aun después de eliminar o bloquear el efecto de los taninos, es posible que la actividad del extracto libre de taninos se deba a otros metabolitos secundarios bioactivos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Utilizar metabolómica para el aislamiento e identificación de metabolitos responsables de la actividad antihelmíntica de *Lysiloma latisiliquum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de los taninos en la actividad antihelmíntica de *L. latisiliquum*.
2. Estudiar el efecto de diversos disolventes de extracción en la actividad antihelmíntica de *L. latisiliquum*.
3. Correlacionar los datos del estudio metabolómico de *L. latisiliquum* para guiar la purificación e identificación de los metabolitos con actividad antihelmíntica.
4. Confirmar la actividad antihelmíntica de los metabolitos purificados contra *H. contortus* mediante ensayos de inhibición de desenvaine larval (LEIA).

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo el estudio de la influencia de TC y otros polifenoles en la actividad AH de *L. latisiliquum* evaluando diferentes métodos de secado del material vegetal y de eliminación de polifenoles como tratamiento con PVPP, partición con una disolución de cloruro de sodio (NaCl), procesamiento con columnas de poliamida C6 y cromatografía de exclusión molecular con Sephadex LH-20. Los diferentes métodos se compararon de

acuerdo a su actividad AH de las fracciones resultantes, así como su contenido de fenoles totales y TC, actividad antioxidante y por su perfil en HPLC. Posteriormente, se llevó a cabo el estudio metabólico de *L. latisiliquum* utilizando hojas de tres individuos de la población Xmatkuil, de los cuales se colectaron tres muestras para hacer un total de nueve. Cada muestra se extrajo con nueve sistemas para generar un total de 81 extractos, a partir de los cuales se obtuvo actividad antihelmíntica por ensayo de desovación larval y perfil por resonancia magnética de protón. Los resultados de ambos análisis se correlacionaron mediante técnicas multivariadas como PCA y OPLS-DA, las cuales permitieron en un inicio la discriminación de extractos de acuerdo a su polaridad y actividad y, en una etapa posterior, la identificación preliminar de los productos antihelmínticos de *L. latisiliquum*.

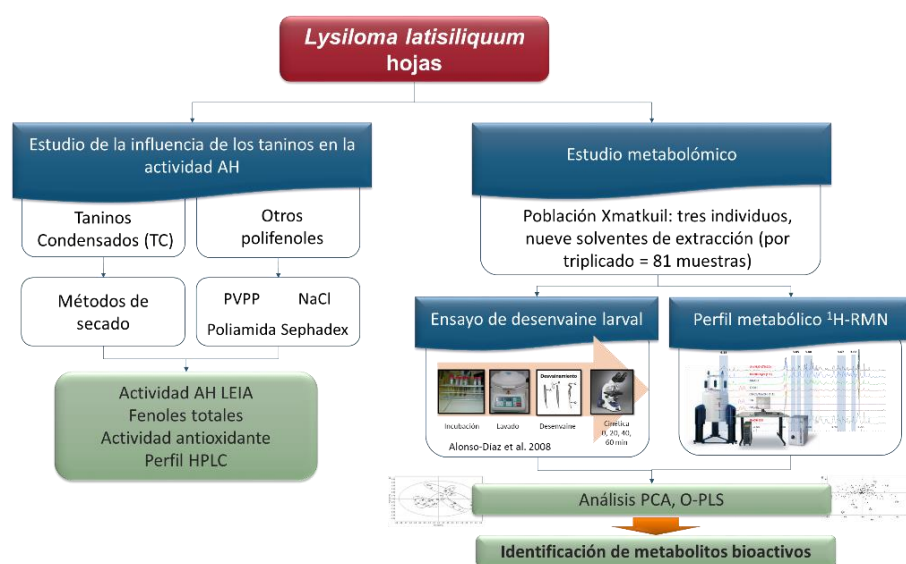


Figura 8. Diagrama de la estrategia experimental para la identificación de los productos antihelmínticos de *L. latisiliquum*.

CAPÍTULO II

EFFECTO DE LOS MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE POLIFENOLES EN LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL DESENVAINO *IN VITRO* DE *LYSILOMA LATISILYQUUM* CONTRA LARVAS DE *HAEMONCHUS CONTORTUS**

2.1 RESUMEN

Se ha sugerido que la actividad antihelmíntica (AH) de los forrajes ricos en taninos se relaciona con su contenido de taninos. Sin embargo, algunos reportes sobre forrajes tropicales como *Lysiloma latisilyquum* describen la misma actividad AH después de la adición de agentes bloqueadores de taninos, sugiriendo que la actividad puede depender del método de bloqueo/eliminación de taninos, o bien, se debe a otros metabolitos secundarios. El presente estudio comparó el efecto del secado del material vegetal, así como de diferentes métodos de eliminación de polifenoles en la actividad AH contra *Haemonchus contortus* de extractos de acetona-agua de *L. latisilyquum*. Los resultados mostraron que la extracción de hojas de *L. latisilyquum* secadas al horno (OD) produjo un extracto libre de taninos condensados con alta actividad AH. No obstante, la eliminación de otros polifenoles produjo fracciones con actividad AH similar o menor a la exhibida por el extracto original OD. Los análisis por HPLC de extractos y fracciones confirmaron que metabolitos fenólicos comunes no contribuyen a la actividad AH de *L. latisilyquum*.

*Publicado en Natural Product Research como: Effects of polyphenol removal methods on the *in vitro* exsheathment inhibitory activity of *Lysiloma latisilyquum* extracts against *Haemonchus contortus* larvae. Autores: Gloria Ivonne Hernández Bolio, Karlina García Sosa, Fabiola Escalante Erosa, Gloria Sarahí Castañeda Ramírez, Enrique Sauri Duch, Juan Felipe de Jesús Torres Acosta y Luis Manuel Peña Rodríguez.

Effects of polyphenol removal methods on the *in vitro* exsheathment inhibitory activity of *Lysiloma latisiliquum* extracts against *Haemonchus contortus* larvae

Gloria Ivonne Hernández-Bolio,^a Karlina García-Sosa,^a Fabiola Escalante-Erosa,^a Gloria Sarahi Castañeda-Ramírez,^b Enrique Sauri-Duch,^c Juan Felipe de Jesús Torres-Acosta,^b Luis Manuel Peña-Rodríguez,^{a*}

^a *Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán. 97200, México*

^b *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México.*

^c *Instituto Tecnológico de Mérida, Av. Tecnológico km 41/2, Mérida, Yucatán, C.P. 97118, México*

** to whom correspondence should be addressed: lmanuel@cicy.mx; tel.: +52-999-9428330; fax: +52-999-9813900*

2.2 ABSTRACT

It has been suggested that the anthelmintic (AH) activity of tannin-rich forages is related to their tannin content. However, reports on tropical fodders such as *Lysiloma latisiliquum* describe the same AH activity after the addition of tannin-blocking agents, suggesting that the activity either depends on the method of tannin blocking/removal or is due to other type of secondary metabolites. This study compared both the effect of the drying process of the plant material and the effect of different polyphenol removal methods on the AH activity of *L. latisiliquum* acetone-water extracts when tested against *Haemonchus contortus*. The results showed that the extraction of oven-dried (OD) leaves of *L. latisiliquum* yielded a CT-free extract with high AH activity. However, polyphenol-free fractions showed similar or lower AH activity levels as those of the original OD extract. HPLC analysis confirmed that common polyphenolic metabolites are not responsible for the AH activity of *L. latisiliquum*.

Keywords: Tannins; polyphenols; anthelmintic activity; *Haemonchus contortus*

2.3 INTRODUCTION

Tannins are plant polyphenols characterized by their ability to form complexes with other macromolecules; these complex metabolites are divided in two groups, hydrolysable tannins (HT), which are polymers of gallic or ellagic acid esters linked to a sugar residue, and condensed tannins (CT), formed by carbon-carbon linked polymers of flavonoid structures (Muetzel and Becker 2006). Tannin-rich (TR) forages from temperate climates have been studied as a valuable alternative to commercial drugs for the control of gastrointestinal nematodes (GIN) (Hoste *et al.* 2012) since TR extracts, and particularly those rich in CT, have shown significant anthelmintic (AH) activity when tested against *Haemonchus contortus* (Barrau *et al.* 2005, Min *et al.* 2004). However, for the case of tropical TR forage plants the correlation between their tannin content and the AH activity of their extracts is not clear; although initial *in vitro* and *in vivo* studies using larval migration and egg hatching inhibition assays and fecal egg count, respectively, appeared to confirm the importance of tannins and other polyphenols in the expression of AH activity of tropical TR forage plants (Alonso-Díaz *et al.* 2008, Hernández-Orduño *et al.* 2008, Hounzangbe-

Adote *et al.* 2005, Marie-Magdeleine *et al.* 2010), recent evaluations of the *in vitro* AH activity of acetone-water extracts of *Lysiloma latisiliquum* (Leguminosae) and other tropical TR forage plants using larval exsheathment inhibition and egg hatching inhibition assays, have shown that the addition of tannin-blocking agents such as PVPP to the extracts failed to block, in part or completely, the AH effect against GIN (Vargas-Magana *et al.* 2014, Vargas-Magaña 2013). These differential results suggested that either tannins are not the only secondary metabolites responsible for the AH activity of the plant extract or that the tannin-blocking agents fail to block all the tannins in the extract. Presently there exist a number of very simple and commonly used methods to block or remove polyphenols from plant extracts; these include the use of tannin-complexing agents such as PVPP (Makkar 2003), partitioning with sodium chloride (Wall *et al.* 1996), filtering through polyamide C6 (loset *et al.* 2011), or using gel-permeation chromatography with Sephadex LH-20. Comparing the AH activity of the tannin-free fractions obtained by each of these methods can confirm whether the biological activity in the plant extract is due to tannins or other polyphenolic metabolites. We wish to report herein on the role of CT and other polyphenols on the AH activity of *L. latisiliquum* acetone-water extracts.

2.4 EXPERIMENTAL

2.4.1 EXPERIMENTAL DESIGN

Three acetone-water extracts obtained from either fresh, freeze dried or oven dried leaves of *L. latisiliquum* were prepared, evaluated for AH activity and compared according to the following criteria: total phenols and CT content and antioxidant activity. Further polyphenol removal of the most active extract was carried out comparing four different polyphenol removal methods: PVPP treatment, NaCl partition, Sephadex LH-20 gel permeation chromatography, and polyamide C6 filtration. Polyphenol-free fractions were evaluated for their AH activity and compared on the basis of their total phenol content and antioxidant activity. Finally, the HPLC chromatographic profiles of the polyphenol-free fractions analysis were determined.

2.4.2 PLANT MATERIAL

Leaves of *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth (Leguminosae) were collected in May 2013 in the grounds of “Unidad de Recursos Naturales-Centro de Investigación Científica de

Yucatán”. A voucher specimen (PSimá 3151) has been deposited in the herbarium of the same institution.

2.4.3 EXTRACTION OF LEAVES

Extraction of oven dried leaves. The collected plant material was first dried for three days at room temperature and then oven dried (OD) for 24 h at 50°C. The OD leaves (100 g) were ground and extracted two times with acetone/water (An/H₂O) 70:30 v/v (400 mL of solvent/20 g of plant material) at room temperature for 72 h. The solvent was eliminated under reduced pressure to produce 26.95 g (26.95%) of the corresponding OD extract.

Extraction of lyophilized leaves. The collected leaves (20 g) were frozen by immersion in liquid nitrogen and lyophilized in a FreeZone freeze dry system (Labconco®). The freeze-dried leaves (9.6 g) were ground and extracted as described in section 1.2.1 to yield 1.94 g (20.18%) of the corresponding LP extract.

Extraction of fresh leaves. The extraction was carried using the procedure reported by (Vargas-Magana *et al.* 2014). Briefly, 500 g of fresh leaves were ground and mixed with three liters of An/H₂O (70:30, v/v). The mixture was sonicated for 20 min using a water-bath (Branson 5510®) and then filtered. The filtrate was partitioned four times with 500 mL of methylene chloride; the organic fractions were combined (total volume: 2 L) and the solvent was evaporated under reduced pressure to produce a lipophilic fraction which was discarded. The remaining hydrophilic (aqueous) fraction was lyophilized to obtain 0.5342 g (0.11%) of the corresponding FR extract.

2.4.4 TANNIN AND POLYPHENOL REMOVAL

NaCl solvent partition (Wall *et al.* 1996). A portion (800 mg) of the OD extract of *L. latisiliquum* was first dissolved in 20 mL of 90% MeOH and defatted by partitioning with hexane (3:1, 1:1, 1:1, v/v). The methanol fraction was then partitioned between 20% MeOH/chloroform/H₂O (30 mL) and the chloroform fraction was washed with 1% NaCl (15 mL). The organic solvent was then evaporated to dryness to produce 3.1 mg (1.73%) of the polyphenol-free fraction.

Gel permeation chromatography (Wall *et al.*, 1996). A portion (100 mg) of OD extract of *L. latisiliquum* was dissolved in 1.5 mL of 80% ethanol (EtOH) and applied to a column (1.1

cm diameter) containing Sephadex LH-20 (10 g) pre-equilibrated with EtOH. Elution was carried out using EtOH (100 mL, tannin free fraction), followed by 50 mL of a 1:1 mixture of An/H₂O (tannin containing fraction). Evaporation of the EtOH fraction yielded 61.6 (61.60%) of the polyphenol-free fraction.

Polyvinylpolypirrolidone (PVPP) method (Alonso-Díaz *et al.* 2008). A mixture of the OD extract (12 mg) of *L. latisiliquum* dissolved in 5 mL of distilled water (2400 µg/mL) and 50 mg PVPP/mL was stirred for 2 h at room temperature and then centrifuged to collect the supernatant (about 4.5 mL). Lyophilizing of the supernatant resulted in 9.2 mg (38.30%) of the polyphenol-free fraction.

Polyamide C6 method (loset *et al.* 2011). A portion (50 mg) of OD extract of *L. latisiliquum* was dissolved in 1600 µL of methanol (MeOH) and applied to a polyamide C6 column (0.5 g). The column was washed three times with MeOH (800 µL) and the combined eluates were evaporated to dryness using a flow of nitrogen to produce 41.4 mg (64.68%) of the polyphenol-free fraction.

2.4.5 LARVAL EXSHEATHMENT INHIBITION ASSAY (LEIA)

One thousand ensheathed *H. contortus* (Paraiso isolate) L₃ larvae (1-8 weeks old) were incubated with each extract at different concentrations (1200, 800, 600, 400, 200, 100) µg/mL in PBS) for 3 h at 20° C. After incubation, the larvae were washed and centrifuged (1000 rpm) three times in PBS (pH 7.2). The larvae were subjected to an artificial exsheathment process by contact with a solution of sodium hypochloride (2%, w/v) and sodium chloride (16.5%, w/v) diluted 1:300 in PBS as described by (Bahuaud *et al.* 2006). The kinetics of larval exsheathment in the different experimental treatments was then monitored by microscopic observation (40x). Exsheathed larvae were identified at 0, 20, 40 and 60 min. Four replicates were run for each extract to examine the changes in proportion of exsheathed larvae with time (Alonso-Díaz *et al.* 2008).

2.4.6 ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS

Evaluations were carried out following the method reported by (Brand-Williams *et al.* 1995) with slight modifications for the reduction of the of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH). Briefly, different concentrations of each extract were prepared (1×10^{-1} to 1×10^{-4} g extract/mL ethanol) and 20 µL were added to 180 µL of DPPH (0.1 mM in ethanol). After

30 min the absorbance was measured at 540 nm using a microplate reader, and the percentage of remaining DPPH was calculated using the formula $\% \text{ (DPPH)} = \frac{[(\text{Abs DPPH } 0.1 \text{ mM})_{t=0}/(\text{Abs DPPH sample})_{t=30}]}{1} * 100$. Spectrometric measurements were made using methanol as a blank and ascorbic acid (1%) as a positive control. The assay was run three times for each extract.

2.4.7 TOTAL PHENOL CONTENT OF EXTRACTS

Folin-Ciocalteu method (Makkar 2003). The quantification of phenols was carried out using a UV-Vis spectrometer and reading at 765 nm (Agilent Cary60). Standard solutions were formulated with the Folin-Ciocalteu reagent and a calibration curve was prepared using gallic acid. The total phenol content was expressed as gallic acid equivalents.

Vanillin assay (Price *et al.* 1978). A calibration curve was prepared using catechin and the quantification of CT was made using a UV spectrophotometer reading at 520 nm. The CT was expressed as catechin equivalent.

2.4.8 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) OF *L. LATISILIQUM* EXTRACTS

The HPLC analyses were carried out using a 1220 Infinity LC equipment with a variable wavelength detector (Agilent Technologies). Separations were performed on a ZORBAX Eclipse XDB-C18 C₁₈ column (250 × 4.6 mm × 5 μm) and detection wavelength was set at 280 nm. The mobile phase consisted of formic acid 1% (A) and acetonitrile (B). Gradient elution started with 98:2 (A:B) reaching 100% B in 70 minutes. The column temperature was set at 25°C ± 0.2 and the flow rate at 0.5 mL/min. Twenty microliters of each extract at a concentration of 0.5 mg/mL were injected. Standards of common plant polyphenolic compounds such as gallic acid, caffeic acid, ellagic acid, trans-cinnamic acid, quercetin, (+)-catechin, epicatechin, ferulic acid and kaempferol (Sigma-Aldrich) were used for identification of phenolic metabolites in the extracts.

2.4.8.1 DATA PROCESSING OF HPLC PROFILES

For baseline correction and peak alignment, the raw data of chromatographic profiles from crude extracts and the polyphenol removal methods resultant fractions containing UV intensity values of 21,000 sampling points were exported to ASC format by OpenLab

software (v. A.01.04) and imported to Excel (2013, Microsoft). The baseline correction was performed using Adaptive Iteratively Reweighted Penalized Least Squares (AirPLS) algorithm for MATLAB (v. R2013b, The Mathworks Inc.) (Zhang *et al.* 2010). The alignment of chromatographic data was done using Correlation Optimized Warping (COW) algorithm for MATLAB.

2.4.8.2 STATISTICAL ANALYSES

The concentration of extract required to inhibit 50% of the larval exsheathment rate (EC_{50}) and statistical differences were calculated using the Polo Plus 1.0 (LeOra software) statistical program. For LEIA, the GLM statistical test was performed to determine the difference in the mean percentage of exsheathment rates between the control and different dose groups at 60 minutes using the Statgraphics Centurion XVI 16.1.15 statistic package (Statpoint Technologies, 2011). For antioxidant activity and total phenol content a one-way ANOVA was made followed by a Tukey's post hoc range comparison test (SPSS 15.0.1, 2006), to assess the difference between the extracts and fractions.

2.5 RESULTS AND DISCUSSION

2.5.1 INFLUENCE OF DRYING METHODS OF PLANT MATERIAL ON TANNIN CONTENT

It is well known that the method used to dry plant foliage has a direct influence in the yield of extracted tannins (Hagerman 1988, Salminen 2003). Furthermore, it has been reported that oven drying decreases the extractability of CT from tannin rich fodders (Jackson *et al.* 1996, Palmer *et al.* 2000). In this investigation, crude extracts obtained from fresh leaves (FR), oven-dried leaves (OD) and lyophilized (LP) leaves of *L. latisiliquum* were compared in terms of their CT and total phenol content, as well as for their AH and antioxidant activities using the larval exsheathment inhibition assay (LEIA) and reduction of DPPH assays, respectively. Although there is a possibility that the bioactive metabolites detected when using different *in vitro* assays (e.g. egg hatching inhibition, larval migration inhibition or larval developmental) against *H. contortus* can be different (Hoste *et al.* 2015), the LEIA assay was selected to evaluate the AH activity of the different samples because it has been reported to be sensitive, simple and based on the interactions between tannins and flavonoids with the nematode infective larvae (Alonso-Diaz *et al.* 2011). As expected, the

OD crude extract was free of CT, while the LP and FR extracts showed similar CT contents (Table 1). However, the higher total phenol contents of the FR and OD extracts, when compared to that of the LP extract (Table 1), coincide with reports that extracts from freeze-dried leaves show a lower content of total phenols than those obtained from air-dried leaves (Mulinacci *et al.* 2011). While the low total phenol content of the LP extract can explain its low antioxidant activity, the coincidence between the high antioxidant and AH activities of the CT-free OD extract (Table 1) suggests that CT are not crucial for the AH activity of *L. latisiliquum*. These results coincide with recent reports about the AH activity of *L. latisiliquum* not being affected after the addition of tannin blocking agents (Vargas-Magana, Torres-Acosta, Aguilar-Caballero, Sandoval-Castro, Hoste and Chan-Perez, Vargas-Magaña 2013), and with the results of the *in vitro* studies on the anthelmintic activity of three heather species against *Trichostrongylus colubriformis*, which suggested that not only tannins, but also other polyphenolic metabolites might be responsible for the biological activity (Moreno-Gonzalo *et al.* 2013).

2.5.2 POLYPHENOL REMOVAL METHODS

Having established that CT are not essential for the AH and antioxidant activities of the OD extract of *L. latisiliquum*, and in order to evaluate the importance of other polyphenols as bioactive metabolites responsible for the AH activity in the extract, different polyphenol removal methods were compared in terms of their efficacy to remove polyphenols and their effect on the biological activity of the resulting fractions. The methods used included treatment of the extract with PVPP (Alonso-Díaz *et al.* 2008), polyamide-SPE extraction (loset *et al.* 2011), gel permeation chromatography using Sephadex LH-20 (Wall *et al.* 1996), and liquid-liquid partition with aqueous NaCl (Wall *et al.* 1996). The results showed that the four methods reduced significantly the presence of total phenols in the resulting fractions, with PVPP and NaCl showing the lowest levels (Table 1). However, none of the polyphenol-free fractions showed a higher AH or antioxidant activity than that of the original OD extract; these results suggested that some of the removed polyphenols from the extract did contribute to its original activity and, at the same time, confirmed the reported importance of polyphenols in the expression of AH activity (Barrau *et al.*, 2005).

Table 1. Anthelmintic activity, antioxidant activity, total phenol and CT content of extracts from oven-dried (OD), lyophilized (LP) and fresh (FR) leaves of *L. latisiliquum* and the fractions resulting from the different polyphenol removal methods.

Extract	Yield (%)	AH activity [§]	AOX activity	Total phenols	CT
		EC ₅₀ (µg/mL) (95%CI)	EC ₅₀ (mg/mL)	(mg EAG/g) [†]	(%EC/g) [‡]
OD	20.25	96.13 (80.71-113.01)	0.10 ± .02a	358 ± 5b	ND
LP	20.18	321.34 (285.54-412.14)*	0.42 ± .10b	277 ± 9a	17.13
FR	0.11	367.85 (198.55-430.10)*	0.28 ± .03b	381 ± 7c	17.30
NaCl fraction	1.73 [¶]	108.91 (69.38-149.41)	2.34 ± .14c	105 ± 3b	NA
Spdx fraction	62.90 [¶]	130.46 (94.36-163.63)	0.18 ± .02a	260 ± 6d	NA
PVPP fraction	38.30 [¶]	228.84 (185.44-311.65)	1.11 ± .09b	93 ± 2a	NA
PA fraction	64.68 [¶]	422.66 (315.81-486.77)*	0.22 ± .02a	194 ± 3c	NA

*Values in the same column are statistically different from those of the oven-dried extract ($P<0.05$)

Different letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$)

[§] The EC₅₀ was calculated using six doses as detailed in the Supplementary Material

[†] milligrams of gallic acid equivalents per gram of extract

[‡] percentage of catechin equivalents per gram of extract

[¶] Yield based on OD extract processed

ND Not detected

NA Not analyzed

2.5.3 HPLC ANALYSES OF *L. LATISILIQUM* CRUDE EXTRACTS AND POLYPHENOL-FREE FRACTIONS

The differences in the HPLC profiles of the three different crude extracts (OD, LP and FR) could be used to explain their differences in terms of AH activity (Figures S1-S4). While the HPLC profiles of the less active LP and FR extracts showed the presence of caffeic and ellagic acids, together with (+)-catechin and epicatechin, the profile of the most active OD extract showed no presence of these CT monomers, but a significant content of gallic and ferulic acids instead (Figure S1, Table S1). These results confirmed that neither CT nor their monomers are related to the AH activity of *L. latisiliquum*. Furthermore, although

caffeic and ellagic acids have been reported with AH activity against *Cooperia* spp. and *Caenorhabditis elegans*, respectively (Mori, Mohamed, Sato, y Yamasaki, 2000; von Sonde Fernex *et al.*, 2015), their presence in the HPLC profiles of the less-active LP and FR extracts suggest that these phenolic metabolites are not active against *H. contortus*. Similarly, although the presence of gallic acid in the OD extract suggests that this polyphenolic metabolite might be associated with the AH activity of *L. latisiliquum* because of its reported activity against *C. elegans* (Mori *et al.*, 2000), the analysis of the HPLC profiles of the polyphenol-free fractions (Figures S1, S5-S8) made it possible to establish that gallic acid is not one of the metabolites responsible for the AH activity of the OD extract of *L. latisiliquum*. This is particularly evident in the case of the NaCl fraction which, despite its low content of gallic acid, maintains its AH activity (Table 1), while the Spdx and PVPP fractions, with a gallic acid content similar to that in the original OD extract, showed a similar or lower AH activity, respectively. Finally, the high content of ferulic acid in the least active PA fraction indicated that this phenolic metabolite is not responsible for the AH activity of the original OD extract.

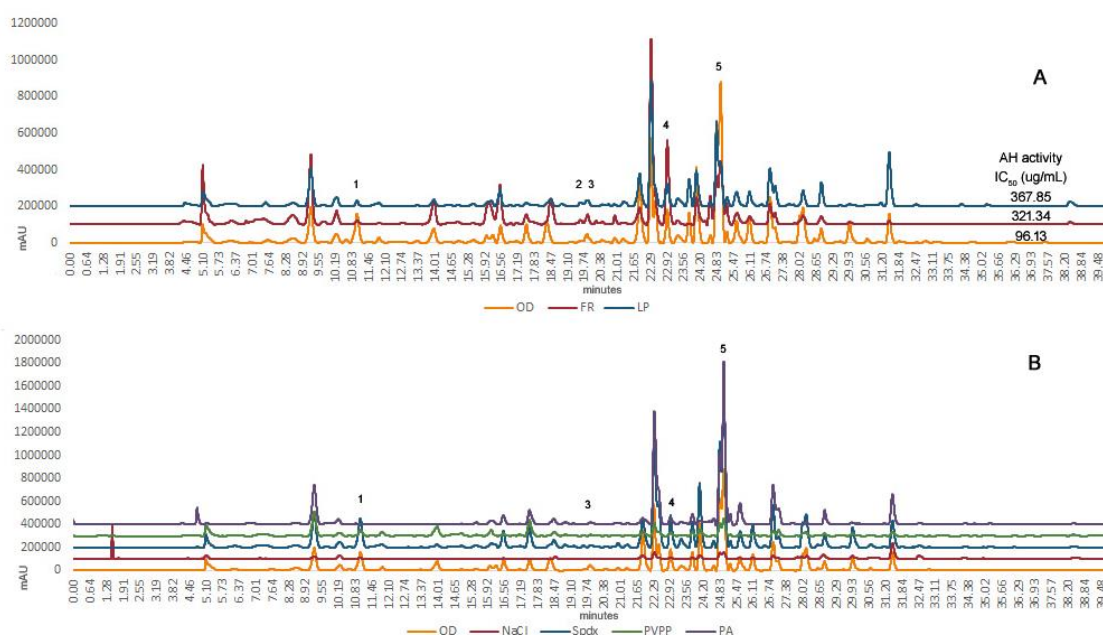


Figure S1. HPLC profiles of A) oven dried (OD), lyophilized (LP) and fresh (FR) leaves extracts of *L. latisiliquum* and B) polyphenol-free fractions obtained using different polyphenol removal methods: polyamide (PA), sephadex LH-20 (Spdx), NaCl and PVPP. Identified phenolics in HPLC profiles: gallic acid (1), epicatechin (2), caffeic acid (3), ellagic acid (4), ferulic acid (5).

Table S1. Percentage of peak area of phenolic metabolites detected in the HPLC chromatographic profiles of crude extracts and polyphenol-free fractions of *L. latisiliquum* leaves.

	<i>Gallic acid</i>	<i>Epicatechin</i>	<i>Caffeic acid</i>	<i>Ellagic acid</i>	<i>Ferulic acid</i>
	% peak area				
Extract					
OD	3.35	ND ^a	0.03	4.85	6.78
LP	1.40	0.22	0.84	2.08	4.85
FR	0.52	0.34	1.16	7.52	2.57
Fraction					
NaCl	0.88	ND ^a	ND ^a	0.72	1.46
Spdx	4.36	ND ^a	ND ^a	3.05	8.74
PVPP	3.43	ND ^a	ND ^a	1.06	3.33
PA	0.05	ND ^a	ND ^a	0.51	34.87

ND^a: Not detected.

2.6 CONCLUSION

The present study showed that neither CT, nor other common plant polyphenolic metabolites such as gallic, caffeic, ellagic and ferulic acids, are related to the AH activity of the OD extract of *L. latisiliquum*. Additionally, the fact that none of the polyphenol-free fractions showed a higher AH or antioxidant activity those of the original OD extract suggests that some of the removed polyphenols present in the original plant extract did contribute to its original activity. The results of this investigation support the reported importance of polyphenols in the expression of the AH activity of the leaf extract of *L. latisiliquum*.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary materials relating to this paper are available online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank José I. Chan-Pérez for providing the infective larvae of *Haemonchus contortus*, as well César A. Can-Cauich and Cesia D. Gutiérrez-Canul for technical assistance. GIHB wishes to thank CONACYT for scholarship No. 255076.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declared that there is no conflict of interest.

2.7 REFERENCES

- Alonso-Díaz M, Torres-Acosta J, Sandoval-Castro C, Hoste H. 2011. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. SEP 27 2011;181:360-364.
- 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 tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*. 5/31;153:313-319.
- 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*. 2005/06/01;131:531-538.
- Hagerman A. 1988. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. *Journal of Chemical Ecology*. FEB 1988;14:453-461.
- Hernández-Orduño G, Torres-Acosta J, Sandoval-Castro C, Aguilar-Caballero A, Reyes-Ramirez R, Hoste H, Calderón-Quintal J. 2008. *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia gaudieri*, *Havardia albicans* and Quebracho tannin extracts on a Mexican strain of *Haemonchus contortus* L3 larvae. *Trop Sub-trop Agroecosyst*.8:191-197.
- Hoste H, Martínez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta J, Sandoval-Castro C. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*. MAY 4 2012;186:18-27.

-
-
- Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Mueller-Harvey I, Sotiraki S, Louvandini H, Thamsborg SM, Terrill TH. 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*. 8/15/;212:5-17.
- Hounzangbe-Adote M, 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*. APR 2005;78:155-160.
- loset K, Nyberg N, Van Diermen D, Malnoe P, Hostettmann K, Shikov A, Jaroszewski J. 2011. Metabolic Profiling of *Rhodiola rosea* Rhizomes by H-1 NMR Spectroscopy. *Phytochemical Analysis*. MAR-APR 2011;22:158-165.
- Jackson F, Barry T, Lascano C, Palmer B. 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. MAY 1996;71:103-110.
- Makkar HP. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual: Springer Science y Business Media.
- Marie-Magdeleine C, Mahieu M, Philibert L, Despois P, Archimede H. 2010. Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. *Small Ruminant Research*. SEP 2010;93:10-18.
- Min B, Pomroy W, Hart S, Sahlou T. 2004. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Ruminant Research*.51:279-283.
- Moreno-Gonzalo J, Manolaraki F, Frutos P, Hervás G, Celaya R, Osoro K, Ortega-Mora LM, Hoste H, Ferre I. 2013. *In vitro* effect of heather extracts on *Trichostrongylus colubriformis* eggs, larvae and adults. *Veterinary Parasitology*. 11/8/;197:586-594.
- Muetzel S, Becker K. 2006. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. *Animal Feed Science and Technology*. JAN 6 2006;125:139-149.
- Mulinacci N, Innocenti M, Bellumori M, Giaccherini C, Martini V, Michelozzi M. 2011. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. *Talanta*. JUL 15 2011;85:167-176.
- Palmer B, Jones R, Wina E, Tangendjaja B. 2000. The effect of sample drying conditions on estimates of condensed tannin and fibre content, dry matter digestibility,

- nitrogen digestibility and PEG binding of *Calliandra calothyrsus*. *Animal Feed Science and Technology*. SEP 30 2000;87:29-40.
- Salminen J. 2003. Effects of sample drying and storage, and choice of extraction solvent and analysis method on the yield of birch leaf hydrolyzable tannins. *Journal of Chemical Ecology*. JUN 2003;29:1289-1305.
- Vargas-Magana J, Torres-Acosta J, Aguilar-Caballero A, Sandoval-Castro C, Hoste H, Chan-Perez J. 2014. Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology*. DEC 15 2014;206:322-327.
- Vargas-Magaña JJ. 2013. Respuesta fisiológica de los ovinos y sus nematodos gastrointestinales a los taninos Mérida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Wall M, Wani M, Brown D, Fullas F, Olwald J, Josephson F, Thornton N, Pezzuto J, Beecher C, Farnsworth N, *et al.* 1996. Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomedicine*. NOV 1996;3:281-285.

CAPÍTULO III

EL USO DE METABOLÓMICA POR $^1\text{H-NMR}$ PARA OPTIMIZAR LA EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE LOS PRODUCTOS ANTIHELMÍNTICOS DE LAS HOJAS DE *LYSILOMA LATISILIQUM**

3. 1 RESUMEN

El presente estudio evaluó el uso de la metabolómica por $^1\text{H-RMN}$ para optimizar la extracción de metabolitos bioactivos a partir del falso tamarindo *Lysiloma latisiliquum*, una planta con poca información fitoquímica, pero reportada con actividad antihelmíntica (AH) contra diferentes estadios de *Haemonchus contortus*, un organismo modelo para nematodos patógenicos. En la primera parte de la investigación, el análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles metabólicos por $^1\text{H-RMN}$ mostró que los extractos con alta actividad AH fueron aquellos obtenidos por disolventes polares o hidrofílicos y que los metabolitos bioactivos son también de alta polaridad. Posteriormente, el análisis discriminante de los mínimos cuadrados parciales (OPLS-DA) permitió la identificación de señales de glicósidos en el perfil metabólico por $^1\text{H-RMN}$ que fueron relacionadas con la actividad AH. Específicamente, quercitrina y arbutina pudieron identificarse como dos de los principales metabolitos relacionados con la actividad AH. El modelo de estudio confirmó a la metabolómica por $^1\text{H-RMN}$ como una técnica de monitoreo que permite detectar e identificar metabolitos bioactivos en plantas.

*Sometido a Phytochemical Analysis como: The use of $^1\text{H-NMR}$ -metabolomics to optimize the extraction and preliminary identification of anthelmintic products from the leaves of *Lysiloma latisiliquum* Autores: Gloria Ivonne Hernández Bolio, Fabiola Escalante Erosa, Karlina García-Sosa, Erika Kutzner, Wolfgang Eisenreich, Juan Felipe de Jesús Torres-Acosta y Luis Manuel Peña-Rodríguez.

The use of ¹H-NMR-metabolomics to optimize the extraction and preliminary identification of anthelmintic products from the leaves of *Lysiloma latisiliquum*

Running head: ¹H-NMR metabolomics for extraction and identification of anthelmintics

Gloria Ivonne-Hernández Bolio,¹ Fabiola Escalante-Erosa,¹ Karlina García-Sosa,¹ Erika Kutzner,² Wolfgang Eisenreich,² Juan Felipe de Jesús Torres-Acosta,³ Luis Manuel Peña-Rodríguez,^{1*}

¹ *Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán. 97200, México*

² *Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München, Lichtenbergstr. 4, D-85747 Garching, Germany.*

³ *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México.*

Abbreviations

AH, anthelmintic; TR, tannin-rich; CT, condensed tannins; VLC, vacuum liquid chromatography; GPC, gel permeation chromatography; TSP, trimethylsilylpropanoic acid; EtOH, ethanol; Hx, *n*-hexane; MeOH, methanol; SE, successive extraction; PCA, principal component analysis; OPLS-DA, orthogonal partial least squares discriminant analysis; PBS, phosphate buffered saline; w/v, weight – volume; v/v, volume – volume; LEIA, larval exsheathment inhibition assay; *J*, coupling constant; IC₅₀, inhibitory concentration of 50%; δ , chemical shift.

Keywords: Anthelmintic activity, arbutin, *Haemonchus contortus*, quercitrin,

**to whom correspondance should be adressed: lmanuel@cicy.mx; tel.: +52-999-9428330; fax: +52-999-9813900*

3.2 ABSTRACT

The present study evaluated the use of $^1\text{H-NMR}$ metabolomics to optimize the extraction of bioactive metabolites from the wild tamarind *Lysiloma latisiliquum*, a plant with no detailed phytochemical information but reported to possess anthelmintic (AH) activity against different stages of *Haemonchus contortus*, a model organism for pathogenic nematodes. In the first part of the investigation, $^1\text{H-NMR}$ -based principle component analysis (PCA) showed that the extracts with high AH activity were those obtained from hydrophylic or polar solvents and that the bioactive metabolites were also of high polarity. The orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) then allowed the identification of $^1\text{H-NMR}$ signals of glycosides in the metabolic profile which were related to high AH activity. More specifically, quercitrin and arbutin could be assigned as two of the main metabolites related to the AH activity. The model study confirmed $^1\text{H-NMR}$ metabolomics as a screening technique to rapidly detect and identify bioactive plant metabolites.

3.3 INTRODUCTION

The choice of solvent in extracting plant materials is one of the most critical steps when searching for novel bioactive secondary metabolites from plants [1]. Extracting the metabolites of interest from a non-soluble matrix, such as plant material, requires taking into account factors such as solvent polarity, ease of removal and reactivity [2]. The polarity of the solvent has a direct impact on the type of metabolites which can be extracted and on the biological activity of the resulting extract; it is normally assumed that the extraction of a given plant material with solvents of different composition, but similar polarity, will produce extracts with similar metabolic profiles and similar levels of biological activity [3, 4]. Consequently, when investigating plant species for their production of biologically active secondary metabolites, it is often necessary to compare different extraction solvents in terms of the yield and composition of the crude extract, together with its level of biological activity, before selecting one as the most suitable for extracting a given class or type of bioactive components [5, 6].

Metabolomics represents an important tool for natural products research, allowing the study of the whole metabolic profile under certain conditions [7]. $^1\text{H-NMR}$ metabolomics, through the statistical analysis of spectra, has been applied successfully in the detection of signals corresponding to secondary metabolites which are related with a phenotypical or biological property [8]. Some of the advantages of using $^1\text{H-NMR}$ metabolomics include its being a non-destructive method with simple processing of spectra [9], together with the possibility of observing signals of different types of secondary metabolites simultaneously. Moreover, the method allows for the elucidation of chemical structures through the interpretation of spectroscopic data or by comparing it with available databases [10]. $^1\text{H-NMR}$ metabolomics has also been used to improve the extraction of bioactive metabolites [11, 12] and to identify $^1\text{H-NMR}$ signals corresponding to metabolites responsible for the activity detected in the extract [13]. In the study of medicinal plants used either by humans or animals, $^1\text{H-NMR}$ metabolomics has been reported to improve the detection of the activity-related metabolites in crude extracts of *Galphimia glauca* [14], *Artemisa afra* [15] and *Rubus occidentalis* [16].

The fodder of *Lysiloma latisiliquum* (L.) Benth (Leguminosae), commonly known as “*tzalam*”, is consumed by goats in the Yucatan Peninsula, either in cut and carry feeding systems or consumed freely by the animals in the tropical forest [17, 18]. Both leaf extracts and fresh leaves of the plant have been shown to possess AH activity *in vitro* and *in vivo*, respectively, when tested on different developmental stages of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* [19-22]. Although tannin-rich (TR) plant extracts, and particularly those rich in condensed tannins (CTs), have been reported to show significant AH activity when tested against *H. contortus* [23, 24], we have recently established that CTs do not contribute to the AH activity of *Lysiloma latisiliquum* [25]. Taking into account that most of the biological evaluations of TR fodders have been carried out using acetone-water extracts due to its high yields of condensed tannins [26], and that the phytochemical information of *L. latisiliquum* has been poorly explored [27], we report herein on the use of $^1\text{H-NMR}$ metabolomics to optimize the extraction and to identify bioactive metabolites present in the leaves of *L. latisiliquum*.

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Extractions were carried out using technical grade solvents (Fermont) distilled in the laboratory. Solvents were eliminated under reduced pressure and a maximum temperature of 40° C using a Büchi RE111 rotary evaporator. VLC purifications were carried out using TLC-grade silica gel GF₂₅₄ (Sigma-Aldrich). TLC analyses were carried out on aluminum-backed plates impregnated with silica gel GF₂₅₄ (E.M. Merck); chromatograms were examined under UV light and visualized by spraying with phosphomolibdic acid reagent, followed by gentle heating. GPC purifications were carried out using a column packed with Sephadex LH-20 (GE healthcare) in 100% ethanol. All experiments were performed at 300 K using the Avance III 500 System (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) with an UltraShield 500 MHz magnet and a SEI 500 S2 probe head (5 mm, inverse ¹H/¹³C with Z-gradient).

3.4.2 PLANT MATERIAL

Fresh leaves of three individuals of *L. latisiliquum* were collected in May 2013 at Comisaría de Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México. A voucher specimen of each individual was deposited at the herbarium of “Unidad de Recursos Naturales, Centro de Investigación Científica de Yucatán” under collection numbers GH-7, GH-8 and GH-9. Three samples were taken from each individual as replicates. The purification of bioactive metabolites was carried out using leaves of *L. latisiliquum* collected in May 2013 in the grounds of Centro de Investigación Científica de Yucatán” (Voucher PSimá 3151, deposited in the same herbarium).

3.4.3 PREPARATION OF PLANT EXTRACTS

Leaves were freeze-dried in a FreeZone freeze dry system (Labconco®) and ground. Portions of ground leaves (3.5 g) from the different samples were extracted twice (24 h each) with 200 mL of the following solvent mixtures: Acetone/H₂O (70:30), MeOH/H₂O (1:1), MeOH, EtOH, and MeOH/CHCl₃ (1:1). Similar portions of ground leaves from the different samples were subjected to a defatting process with hexane followed by successive extractions with dichloromethane (CH₂Cl₂-SE), ethyl acetate (EtOAc-SE) and methanol (MeOH-SE). Evaporation of the extracting solvents produced the corresponding

crude extracts (72 extracts in total). A second batch of leaves (2 kg) was extracted with acetone/H₂O (70:30); the resulting crude extract was used to carry out the purification of bioactive metabolites.

3.4.4 TANNIN REMOVAL

A portion (50 mg) of each extract was suspended in 1600 µL of MeOH and passed through a polyamide column (0.5 g, Macherey-Nagel; conditioned by passing four volumes of MeOH). The column was washed three times with MeOH (800 µL) and the combined eluates were evaporated to dryness using a flow of nitrogen.

3.4.5 CALCULATION OF THE DIELECTRIC CONSTANT (ϵ) AS MEASURE OF SOLVENT POLARITY

The dielectric constant of the different solvent mixtures was calculated using the formula:

$$\epsilon_m = \phi_1 \epsilon_1 + \phi_2 \epsilon_2$$

where ϵ_m , ϵ_1 and ϵ_2 are the dielectric constants of the mixture and solvents 1 and 2, respectively, and ϕ_1 and ϕ_2 are the molar fractions of solvents 1 and 2 in the mixture [28, 29]. Individual solvent ϵ values were obtained from the online database available from [30].

3.4.6 GENERATION OF ¹H-NMR METABOLIC PROFILES AND MULTIVARIATE ANALYSIS

A portion (2 to 4 mg) of each extract was dissolved in MeOH-*d*₄ (600 µL) and 10 µL of TSP (1.2 mg/mL) were added as internal reference, before transferring the samples to individual 5-mm NMR tubes. The measurements were conducted at a magnetic field of 11.75 T. The resonance frequency of ¹H was 500.13 MHz. For all samples, the ¹H-NMR spectra were acquired using the one-dimensional NOESY sequence “noesygppr1d.comp” with presaturation of the residual water signal during the relaxation delay and the mixing time using spoil gradients. The relaxation delay was 4.0 s, and the acquisition time was 3.3 s. Spectra were the result of 64 scans, with data collected into 64 k data points. Each FID was zero-filled to 128 k data points. Prior to Fourier transformation, an exponential window function with a line broadening factor of 0.2 Hz was applied. The resulting spectra were manually phased and baseline corrected using TopSpin 3.2 (Bruker Biospin,

Rheinstetten, Germany) and referenced to 0.1 μM internal trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionic acid sodium salt (TSP) at 0.0 ppm. Additional ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY and HSQC experiments were conducted for the isolated metabolites in order to elucidate its chemical structure. PCA and OPLS-DA analyses were performed using AMIX (Bruker) and SIMCA-P 13.0 software (Umetrics), respectively. NMR spectra were divided into equally sized bins with a width of 0.06 ppm within the region of 10.0 ppm to 0.2 ppm using the advanced bucketing command in AMIX software. Each bin was then integrated, and a data matrix was constructed with each row representing a spectrum and each column representing a variable (i.e., bin). Rows were scaled to the total intensity of the spectrum, and the resulting values were used for PCA. The spectral regions between 4.9–4.8 ppm, 3.40–3.25 ppm, and 1.21–1.14 ppm were excluded in PCA analysis to yield a total of 169 regions. PCA was performed with no scaling of columns using the AMIX software. The bucketing generated from PCA was used to perform the OPLS-DA analysis [25] using the SIMCA 13.0 software (Umetrics, Umeå, Sweden). The data were scaled using *Pareto* scaling, the Hotelling's T2 region shows as an ellipse in the score plots defining the 95% confidence interval of the modelled variation. The quality of model was described by R^2 (percent of variation of the training set explained by the Y-predicted components) and Q^2 (percent of variation of the training set predicted by the model according to cross validation).

3.4.7 LARVAL EXSHEATHMENT INHIBITION ASSAY (LEIA)

The "Paraiso" strain of *H. contortus* used in this assay has been reported as benzimidazol-resistant [31]. For the assay, one thousand ensheathed *H. contortus* L₃ larvae (1-8 weeks old) were incubated with different concentrations of each extract (1200, 600, 300 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or semipurified fractions and pure metabolites (300, 150, 75 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in PBS for 3 h at 20° C. After incubation, the larvae were washed and centrifuged (1000 rpm) three times in phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.2). The larvae were subjected to an artificial exsheathment process by adding Milton® sterilizing fluid (2% sodium hypochlorite and 16.5% sodium chloride) diluted 1:300 in PBS as described by Bahuaud et al. [32]. The kinetics of larval exsheathment in the different experimental treatments was then monitored by microscopic observation (40 \times). Exsheathed larvae were

identified at 0, 20, 40 and 60 min [22]. Four replicates were run for each extract to calculate its IC_{50} value.

3.4.8 BIOASSAY-GUIDED ISOLATION OF ANTHELMINTIC PRODUCTS

Dry-ground leaves (100 g) of *L. latisiliquum* were extracted twice with 2 L of a mixture of acetone/H₂O (70:30); evaporation of the solvent yielded 20.3 g (20.3%) of the corresponding bioactive extract **A1** (IC_{50} = 112.83 μ g/mL). A portion (10.9 g) of the extract **A1** was subjected to GPC to produce 6.3 g (57% yield) of polyphenol-free fraction (**B1**; IC_{50} = 130.46 μ g/mL); a portion (1.3 g) of fraction **B1** was re-suspended in 20 mL of a mixture of H₂O/MeOH (3:2 v/v) and the resulting suspension was partitioned successively between Hx, CH₂Cl₂ and EtOAc (three times each; 2:1, 1:1, 1:1 v/v) to yield the corresponding fractions **C1** (Hx, 84.7 mg, 6.6%; IC_{50} > 300 μ g/mL), **C2** (CH₂Cl₂, 87.1 mg, 6.8%; IC_{50} = 146.69 μ g/mL), **C3** (EtOAc, 535.6 mg, 42%; IC_{50} = 144.82 μ g/mL) and **C4** (aqueous residue, 560 mg, 44%; IC_{50} = 112.35 μ g/mL). Fraction **C3** was purified by VLC (4.5 cm diameter, 5 cm height) using a gradient Hx/EtOAc/MeOH system to produce fractions **D1** to **D9**. The most active fraction **D5** (80 mg; IC_{50} = 49.76 μ g/mL) was subjected to GPC eluting with EtOH to obtain nine fractions (**E1–E9**). Fraction **E5** (17.5 mg; IC_{50} = 80.76 μ g/mL) showed a single component on TLC [R_f 0.63, CHCl₃/MeOH/H₂O (14:7:1)] which was identified as quercitrin (**1**). A precipitate (**F1**, 2.5 mg; IC_{50} = 81.11 μ g/mL) obtained from fraction **E2** (11.5 mg) showed a single component on TLC [R_f 0.55, EtOAc/MeOH/H₂O (100:16.5:7)] which was identified as arbutin (**2**).

3.4.9 STATISTICAL ANALYSIS

The concentration of extract required to inhibit 50% of the larval exsheathment rate (IC_{50}) was calculated using the Polo Plus 1.0 (LeOra software) statistical program. An ANOVA analysis followed by Tukey post-hoc comparison test was carried out in order to assess the differences in AH activity between the different extraction solvents.

3.5 RESULTS AND DISCUSSION

The ¹H-NMR metabolic profiles of extracts obtained by the extraction of the leaves of *L. latisiliquum* with acetone/H₂O (70:30) and MeOH/H₂O (1:1), the two solvent mixtures commonly used to prepare plant extracts when evaluated for its AH activity [26], were

compared with those obtained by extraction with different solvents; these included MeOH and EtOH, two solvents recognized to possess a high solvent strength and to have a good capacity for the extraction of secondary metabolites [33], and MeOH/CHCl₃ (1:1) which is a solvent mixture commonly used in metabolomic studies [9]. Additionally, a comparison of the successive extraction (SE) of the defatted plant material with solvents of increasing polarity (CH₂Cl₂-SE, EtOAc-SE and MeOH-SE) was included. All the NMR profiles showed a complex metabolic profile with abundant signals mainly in the aliphatic and carbinol proton regions (Figures S1 and S2), with only the high polarity extracts showing proton signals in the aromatic region. A PCA analysis indicated a similarity in the ¹H-NMR metabolic profiles of the high polarity extracts, as seen by the clustering of the different replicates of the acetone/H₂O (70:30) ($\epsilon = 38.5$), MeOH/H₂O (1:1) ($\epsilon = 56.4$) and MeOH-SE ($\epsilon = 32.7$) in the PCA score plot (PC1 vs. PC2, 90% variance explained; Figure 1a). These extracts are also clearly discriminated in the PCA score plot from those obtained by using solvents of medium [MeOH ($\epsilon = 32.7$), EtOH ($\epsilon = 24.6$), MeOH/CHCl₃ (1:1) ($\epsilon = 27.2$)] or low-polarity [CH₂Cl₂-SE ($\epsilon = 8.9$), EtOAc-SE ($\epsilon = 6.0$)]. Spectra derived from the medium or low polarity extracts showed a great variation in their metabolic profile because of interfering high-field signals commonly associated with methine and/or methylene protons of lipids [34]. These signals, which can be observed as strong outliers at δ 1.33, 1.57, 1.60, 1.75, 2.05 and 2.11 in the loading plot (Figure 1b) were more abundant in less polar extracts (Figure S1), are the main source of variation between replicates of the same solvent (see score plot, Figure 1a). The influence of these high-field signals in the clustering of the ¹H-NMR metabolic profiles is more evident in the discrimination between the MeOH and MeOH-SE extracts. Although both solvents are of the same polarity ($\epsilon = 32.7$), the former contains both polar and non-polar metabolites and the latter, obtained by the extraction of plant material previously defatted with Hx and previously extracted with low-polarity solvents (CH₂Cl₂-SE, EtOAc-SE), contains a lower amount of non-polar metabolites; this results in a ¹H-NMR metabolic profile which, when free of interfering lipid signals [12], shows sharper signals (Figures S1 and S2).

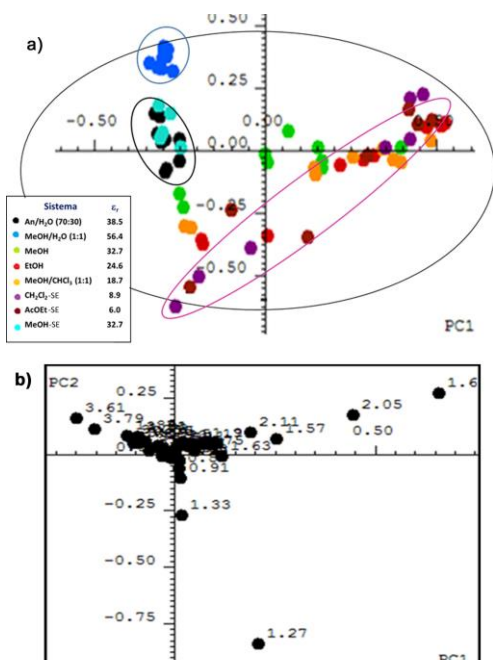


Figure 1. Score plot (a) and loading plot (b) of the PCA analysis (PC1 vs. PC2, 90% explained variance) of ¹H-NMR spectra of the different *L. latisiliquum* extracts (Region δ 0-10). The ellipse represents the Hotelling T2 with 95% confidence in the score plot.

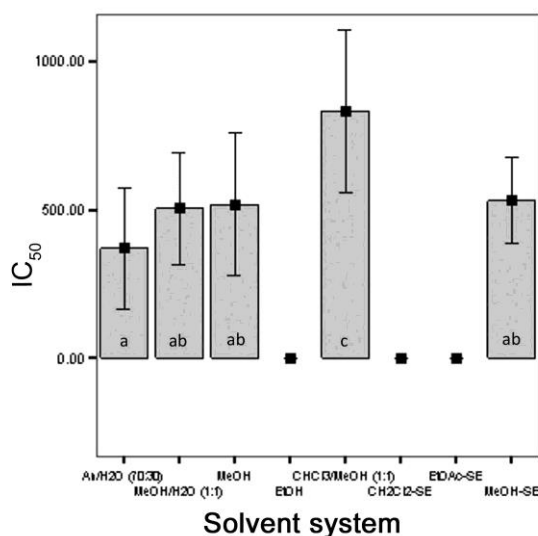


Figure 2. Anthelmintic activity (IC₅₀) of the different *L. latisiliquum* leaf extracts against *H. contortus*. Letters in each type of extract means significant differences ($P < 0.05$).

Testing of all extracts for their AH activity showed the strongest activity for the acetone/H₂O (70:30) extract (Figure 2, Table S1), a result that coincided with earlier *in vitro* reports [35]. Extracts from MeOH/H₂O (1:1), MeOH, and MeOH-ES showed moderate activity with IC₅₀ values ranging from 115 to 900 μ g/mL; these values are similar to those reported for extracts from other plants, when evaluated against *H. contortus* using the same bioassay [36-38]. The lack of AH activity in extracts from medium (EtOH) to low polarity solvents (CH₂Cl₂-SE and EtOAc-SE) further confirmed the finding that the bioactive metabolites of *L. latisiliquum* are of high polarity [25]. The PCA loading plot (Figure 1b) indicated that the tight clustering of the high polarity extracts was predominantly caused by the signals at δ 3.61, 3.79, 3.91, 3.67, 3.73 and 3.25 in their ¹H-NMR metabolic profiles (Figure S2). The chemical shift and coupling patterns of these signals correspond to oxygen-bearing protonated carbons and are characteristic of protons

from sugar moieties in glycosylated metabolites or sugars [39]. To confirm the glycosidic nature of the bioactive metabolites of *L. latisiliquum* leaf extracts, an OPLS-DA analysis was performed using data from the $^1\text{H-NMR}$ metabolic profile of the acetone/ H_2O (70:30), MeOH/ H_2O (1:1) and MeOH-SE extracts, since these extracts showed the highest AH activity and lowest variation in their metabolic profiles (Table S1). The OPLS-DA score plot of *L. latisiliquum* extracts, which correlates the $^1\text{H-NMR}$ metabolic profiles of the extracts with their level of biological activity [40], allowed the identification of two groups, one formed by extracts with high AH activity ($\text{IC}_{50} = 100\text{-}200 \mu\text{g/mL}$) and the other having extracts with moderate activity ($\text{IC}_{50} = 300\text{-}700 \mu\text{g/mL}$) (Figure 3). The variance (R^2) and model predictability (Q^2) for the OPLS-DA analysis were calculated as 0.867 and 0.468, respectively [41]. The contribution plot showed the discriminatory buckets containing $^1\text{H-NMR}$ signals in the metabolic profiles that influenced the groupings behavior (Figure 4a); buckets displaying a high (positive or negative) value have a strong influence on the group building. The calculation of correlation coefficients by an S-plot (Figure 4b), with variables fulfilling the covariance of $|\rho| \geq 0.05$ and the correlation of $|\rho| \geq 0.5$ [42], allowed the identification of the signals at δ 7.33, 6.97, 6.85, 6.67, 4.09, 1.33 and 0.85 (Table 3) as those responsible for the variation of the AH activity in the different *L. latisiliquum* extracts. The signal at δ 1.33 was discarded because it was common to most of the extracts, including those with no activity. The chemical shift and coupling patterns of the signals at δ 7.33, 6.97, 6.85, 6.67 are characteristic of aromatic protons in flavonoid-related skeletons [43], while the signal at δ 4.09 corresponds to the protons of an oxygenated methylene [39] and the signal at δ 0.85 can be assigned to the protons of a methyl group in a pyranose unit [43]. These signals suggested that the bioactive metabolites of *L. latisiliquum* were flavonoid glycosides. This type of metabolites have been reported to be associated with the AH activity of *Onobrichys viciifolia* [23]. Other glycosylated metabolites such as tribulosin, a five-sugar saponin, and β -sitosterol glucoside have also been reported as being responsible for the AH properties of *Tribulus terrestris* [44].

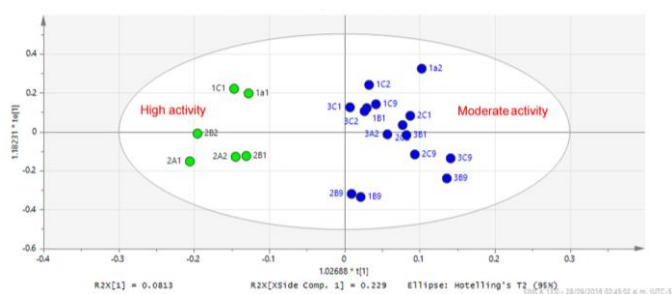


Figure 3. OPLS-DA score plot of high (100-200 $\mu\text{g/mL}$) to moderately active (300-700 $\mu\text{g/mL}$) extracts of *L. latisiliquum*). The ellipse represents the Hotelling T2 with 95% confidence in the score plot.

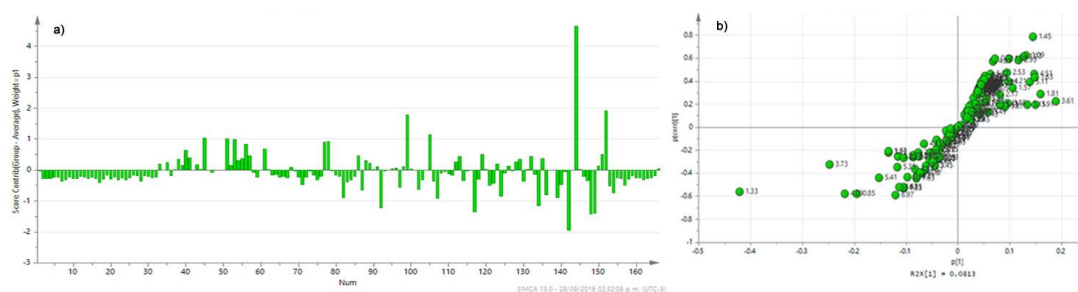


Figure 4. Contribution plot (a) and S-plot (b) of the OPLS-DA analysis showing the discriminant $^1\text{H-NMR}$ signals found in the model.

In order to confirm the identification of the metabolites responsible for the AH activity of *L. latisiliquum*, the leaf extract of the plant was subjected to a bioassay-guided purification. Initial fractionation of the bioactive (IC_{50} 130.46 $\mu\text{g/mL}$) polyphenol free fraction of the acetone/ H_2O (70:30) extract using a liquid-liquid partition procedure with Hx, CH_2Cl_2 , and EtOAc yielded the corresponding low (Hx), medium-low (CH_2Cl_2), medium-high (EtOAc), and high (residual aqueous phase) polarity fractions. The presence of AH activity in the medium-low (IC_{50} 146.69 $\mu\text{g/mL}$), medium-high (IC_{50} 144.82 $\mu\text{g/mL}$), and high polarity (IC_{50} 112.35 $\mu\text{g/mL}$) fractions indicated that there are both lipophilic and hydrophilic bioactive metabolites in the leaf extract of *L. latisiliquum*. The chromatographic purification of the medium-high polarity fraction yielded two phenolic metabolites identified as quercitrin (quercetin 3-O- α -L-rhamnopyranoside) and arbutin (4-hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside) (Figure 5), by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature [45, 46] (Tables S2, S3) and, in the case of quercitrin, by comparing its

chromatographic behavior with a commercial sample. Quercitrin has been isolated from different plant species including *Loranthus tanakae* (Loranthaceae) [45], *Kalanchoe pinnata* (Crasulaceae) [47], *Dendrophthoe falcata* (Loranthaceae) [48], *Litchi chinensis* (Sapindaceae) [49], and *Euphorbia hirta* (Euphorbiaceae) [49], as well as from *Pterogyne nitens* and *Mucuna pruriens*, two species of the Fabaceae family [50, 51]. The reported biological activities of quercitrin include antioxidant and antiinflammatory [52], antidiarrhoeic [53], and leishmanicidal [51]. Similarly, arbutin is a phenolic metabolite found in several species of Ericaceae, Lamiaceae, Saxifragaceae, Rosaceae and Caprifoliaceae families [54]. Plants containing arbutin have traditionally been used to treat uro-genital infections [55]; however, the pure metabolite has been reported to have activity as a tyrosinase inhibitor and as antioxidant [56]. Arbutin has also been reported to be isolated from *O. viciifolia* (Fabaceae), a forage plant recognized by its anthelmintic properties [57]. Our identification of arbutin as one of the metabolites with anthelmintic activity (IC_{50} 81.11 $\mu\text{g/mL}$) present in the leaf extract of *L. latisiliquum* does not coincide with a previous report about the pure metabolite not being active when tested in the same bioassay, against a polyphenol susceptible isolate of *H. contortus* [58]. Even though this is the first report of quercitrin as a bioactive metabolite with AH activity (IC_{50} 80.76 $\mu\text{g/mL}$), its corresponding aglycone, quercetin, has been reported to have a stronger AH activity (21.0 $\mu\text{g/mL}$) *in vitro* when tested against *H. contortus* [58]. Results from *in vivo* experiments in cows have demonstrated that the sugar moiety in the flavonoid skeleton is an important structural feature for the bioavailability of quercetin in the rumen of cattle [59].

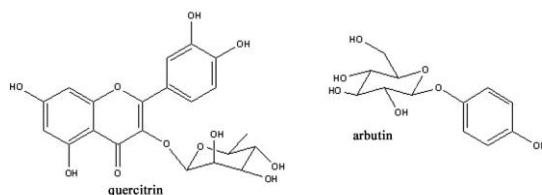


Figure 5. Phenolic metabolites isolated from the leaf extract of *L. latisiliquum*.

The signals corresponding to H-2' (δ 7.34, d, $J=2$ Hz) and H-6' (δ 7.33, dd, $J=8.5, 2$ Hz) in quercitrin, together with those corresponding to H-2/H-6 (δ 6.97, d, $J=9.1$ Hz) and H-3/H-5 (δ 6.70, d, $J=9.1$ Hz) in arbutin, coincide with those indicated by the OPLS-DA model as related with the AH activity of *L. latisiliquum* (Table 2). The results obtained with the

bioassay-guided fractionation validated the prediction model and confirm the potential of $^1\text{H-NMR}$ metabolomics for the extraction and identification of bioactive metabolites from plants and other organisms.

3.6 CONCLUDING REMARKS

The $^1\text{H-NMR}$ metabolomic analysis of *L. latisiliquum* extracts confirmed that the bioactive metabolites are best extracted with polar solvents. The OPLS-DA analysis facilitated the detection of activity-related signals which could be assigned to bioactive products of glycosidic nature. The identification of quercitrin and arbutin as two of the metabolites related to the AH activity of *L. latisiliquum* using the bioassay-guided fractionation, confirm the potential and importance of $^1\text{H-NMR}$ metabolomics for the detection and identification of bioactive metabolites from plants without previous phytochemical information. Further purification and elucidation of other active products from *L. latisiliquum* is currently underway.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information is available.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by CONACYT-México (Project CB-2013-01221608). The authors wish to thank José I. Chan-Pérez for providing the infective larvae of *Haemonchus contortus* and Radamés Alvarez-Zapata for technical assistance with the statistical analysis of metabolomics data. GIHB wishes to thank CONACYT for scholarship No. 255076 and the “Becas Mixtas” and “Mobility” Programs of CONACYT and CICY, respectively, for their support in carrying a research stay at TUM.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare that there is no conflict of interest.

3.7 REFERENCES

- [1] Mushtaq, M., Choi, Y., Verpoorte, R., Wilson, E., *Phytochemical Analysis* 2014, 25, 291-306.
- [2] Bucar, F., Wube, A., Schmid, M., *Natural Product Reports* 2013, 30, 525-545.
- [3] Katritzky, A., Fara, D., Yang, H., Tamm, K., *et al.*, *Chemical Reviews* 2004, 104, 175-198.
- [4] Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., *et al.*, *Veterinary Parasitology* 2015, 212, 5-17.
- [5] Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., *et al.*, *Journal of Food Engineering* 2013, 117, 426-436.
- [6] Jones, W. P., Kinghorn, A. D., in: Sarker, S. D., Latif, Z., Gray, A. I. (Eds.), *Natural Products Isolation*, Humana Press, Totowa, NJ 2005, pp. 323-351.
- [7] Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., Kell, D. B., *Trends in Biotechnology* 2004, 22, 245-252.
- [8] Robinette, S. L., Brüsweiler, R., Schroeder, F. C., Edison, A. S., *Accounts of Chemical Research* 2012, 45, 288-297.
- [9] Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., *Nat Protoc* 2010, 5, 536-549.
- [10] Verpoorte, R., Choi, Y., Kim, H., *Flavour and Fragrance Journal* 2010, 25, 128-131.
- [11] Martin, A., Pawlus, A., Jewett, E., Wyse, D., *et al.*, *Rsc Advances* 2014, 4, 26325-26334.
- [12] Kaiser, K., Barding, G., Larive, C., *Magnetic Resonance in Chemistry* 2009, 47, S147-S156.
- [13] Bailey, N., Wang, Y., Sampson, J., Davis, W., *et al.*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004, 35, 117-126.
- [14] Sharma, A., Cardoso-Taketa, A., Choi, Y., Verpoorte, R., Villarreal, M., *Journal of Ethnopharmacology* 2012, 141, 964-974.
- [15] Liu, N. Q., Cao, M., Frédéricich, M., Choi, Y. H., *et al.*, *Journal of Ethnopharmacology* 2010, 128, 230-235.
- [16] Paudel, L., Wyzgoski, F. J., Giusti, M. M., Johnson, J. L., *et al.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014, 62, 1989-1998.
- [17] Flores, J., Bautista, F., *Revista Mexicana De Biodiversidad* 2012, 83, 503-518.
- [18] González-Pech, P. G., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A., Tun-Garrido, J., *Small Ruminant Research* 2015, 133, 128-134.
- [19] Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Vargas-Magaña, J. J., Canul-Ku, H. L., Miranda-Soberanis, R., *et al.*, *Veterinary Parasitology* 2010, 172, 283-290.
- [20] Martínez-Ortiz-de-Montellano, C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J. F. J., *et al.*, *Experimental Parasitology* 2013, 133, 281-286.
- [21] Brunet, S., Jackson, F., Hoste, H., *International Journal for Parasitology* 2008, 38, 783-790.
- [22] Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., Hoste, H., *Veterinary Parasitology* 2008, 153, 313-319.
- [23] Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., *Parasitology* 2005, 131, 531-538.
- [24] Min, B., Pomroy, W., Hart, S., Sahl, T., *Small Ruminant Research* 2004, 51, 279-283.
- [25] Hernández-Bolio, G. I., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F., Castañeda-Ramírez, G. S., *et al.*, *Natural Product Research* Submitted.
- [26] Makkar, H. P., *Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual*, Springer Science yamp; Business Media 2003.

- [27] García, D. E., Medina, M. G., *Zootecnia Tropical* 2006, 24, 233-250.
- [28] Jouyban, A., Soltanpour, S., Chan, H., *International Journal of Pharmaceutics* 2004, 269, 353-360.
- [29] Prakongpan, S., Nagai, T., *Chemical y Pharmaceutical Bulletin* 1984, 32, 340-343.
- [30] Stenutz, R., 2015. <http://www.stenutz.eu/chem/solv23.php> (Last time accessed April 3, 2017).
- [31] Ortiz-Ocampo, G. I., *Posgrado Institucional en Ciencias Agropecuarias y Manejo de Recursos Naturales Tropicales*, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México 2014, p. 62.
- [32] Bahuaud, D., De Montellano, C. M.-O., Chauveau, S., Prevot, F., *et al.*, *Parasitology* 2006, 132, 545-554.
- [33] Snyder, L., *Journal of Chromatographic Science* 1978, 16, 223-234.
- [34] Knothe, G., 2006. ¹H-NMR spectroscopy of fatty acids and their derivatives. <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=40270>. (Last time accessed April 3, 2017).
- [35] Castañeda-Ramírez, G. S., Evaluación in vitro de *Annona squamosa*, *A. muricata* y *A. reticulata* contra *Haemonchus contortus*. PhD thesis. Posgrado Institucional en Ciencias Agropecuarias y Manejo de Recursos Naturales Tropicales, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México 2014, p. 57.
- [36] Vargas-Magaña, J. J., *Respuesta fisiológica de los ovinos y sus nematodos gastrointestinales a los taninos*. Posgrado Institucional en Ciencias Agropecuarias y Manejo de Recursos Tropicales, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México 2013, p. 136.
- [37] Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., *et al.*, *Veterinary Parasitology* 2013, 197, 586-594.
- [38] Castañeda-Ramírez, G. S., Evaluación in vitro de *Annona squamosa*, *A. muricata* y *A. reticulata* contra *Haemonchus contortus*. PhD thesis. Posgrado Institucional en Ciencias Agropecuarias y Manejo de Recursos Naturales Tropicales, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México 2014, p. 57.
- [39] Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., Bryce, D. L., *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley yamp; Sons 2014.
- [40] Sharma, A., Cardoso-Taketa, A., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Villarreal, M. L., *Journal of Ethnopharmacology* 2012, 141, 964-974.
- [41] Eriksson, L., Byrne, T., Johansson, E., Trygg, J., Vikström, C., *Multi-and megavariable data analysis basic principles and applications*, Umetrics Academy 2013.
- [42] Wei, F., Furihata, K., Miyakawa, T., Tanokura, M., *Food Chemistry* 2014, 152, 363-369.
- [43] Lommen, A., Godejohann, M., Venema, D., Hollman, P., Spraul, M., *Analytical Chemistry* 2000, 72, 1793-1797.
- [44] Deepak, M., Dipankar, G., Prashanth, D., Asha, M. K., *et al.*, *Phytomedicine* 2002, 9, 753-756.
- [45] Kim, Y.-K., Kim, Y. S., Choi, S. U., Ryu, S. Y., *Archives of Pharmacal Research* 2004, 27, 44-47.
- [46] Ahmed, A. S., Nakamura, N., Meselhy, M. R., Makhboul, M. A., *et al.*, *Phytochemistry* 2000, 53, 149-154.
- [47] Muzitano, M. F., Cruz, E. A., de Almeida, A. P., Da Silva, S. A. G., *et al.*, *Planta Med* 2006, 72, 81-83.
- [48] Hasan, M. S., Ahmed, M. I., Mondal, S., Uddin, S. J., *et al.*, *Opem* 2006, 6, 355-360.

- [49] Chen, Y., Lin, J., Liu, S., Lu, P., Yang, D., *Journal of Food Science* 2011, 76, C724-C728.
- [50] Regasini, L., de Oliveira, C., Velloso, J., Oliveira, O., et al., *African Journal of Biotechnology* 2008, 7, 4609-4613.
- [51] Ekanem, A., Obiekezie, A., Kloas, W., Knopf, K., *Parasitology Research* 2004, 92, 361-366.
- [52] Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., et al., *European journal of immunology* 2005, 35, 584-592.
- [53] Galvez, J., Crespo, M. E., Jimenez, J., Suarez, A., Zarzuelo, A., *Journal of pharmacy and pharmacology* 1993, 45, 157-159.
- [54] Morąg, M., Nowak, G., Michalak, A., *Postępy Fitoterapii* 2012.
- [55] Carmen, P. O. P., Vlase, L., Tamas, M., *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2009, 37, 129.
- [56] Takara, K., Otsuka, K., Wada, K., Iwasaki, H., Yamashita, M., *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2007, 71, 183-191.
- [57] Regos, I., Urbanella, A., Treutter, D., *Journal of agricultural and food chemistry* 2009, 57, 5843-5852.
- [58] Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A. R., Mueller-Harvey, I., et al., *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 2015, 5, 127-134.
- [59] Berger, L. M., Wein, S., Blank, R., Metges, C. C., Wolffram, S., *Journal of dairy science* 2012, 95, 5047-5055.

Table 1. IC₅₀ values of the *L. latisiliquum* leaves extracts used in the OPLS-DA analysis.

Extract	Sample	IC ₅₀ (µg/mL)
An/H₂O (70:30)	1a1	188.14
	1b1	307.56
	1c1	174.62
	2a1	130.37
	2b1	208.02
	2c1	434.86
	3b1	384.39
	3c1	497.67
	MeOH/H₂O	1a2
1c2		625.72
2a2		114.56
2b2		265.46
2c2		540.08
3a2		397.69
3c2		584.73
MeOH-SE	1b9	663.21
	1c9	422.96
	2b9	614.39
	2c9	375.19
	3b9	490.56
	3c9	553.99

Table 2. Correlation between $^1\text{H-NMR}$ signals and AH activity highlighted by OPLS-DA model.

Bin (ppm)	ρ	$\rho(\text{corr})$
7.33	-0.103958	-0.531799
6.97	-0.120244	-0.590944
6.85	-0.103765	-0.522924
6.67	-0.112411	-0.520881
4.09	-0.218226	-0.579896
1.33	-0.420277	-0.563818
0.85	-0.194727	-0.577322

3.8 SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Dielectric constants (ϵ_r) of the different extracting solvents and IC_{50} values (mean) of the corresponding leaf extracts of *L. latisiliquum*.

Extract	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)							
	An/H ₂ O 70:30	MeOH/H ₂ O 1:1	MeOH	EtOH	MeOH/CHCl ₃ 1:1	CH ₂ Cl ₂ -SE	AcOEt-SE	MeOH-SE
ϵ_r	38.5	56.4	32.7	24.6	27.24	8.9	6.0	32.7
Individual								
1	223.44	611.09	505.67	>1200	472.56	>1200	>1200	543.08
2	257.75	306.63	218.97	>1200	698.24	>1200	>1200	403.54
3	626.64	594.00	828.66	>1200	1114.11	>1200	>1200	646.92

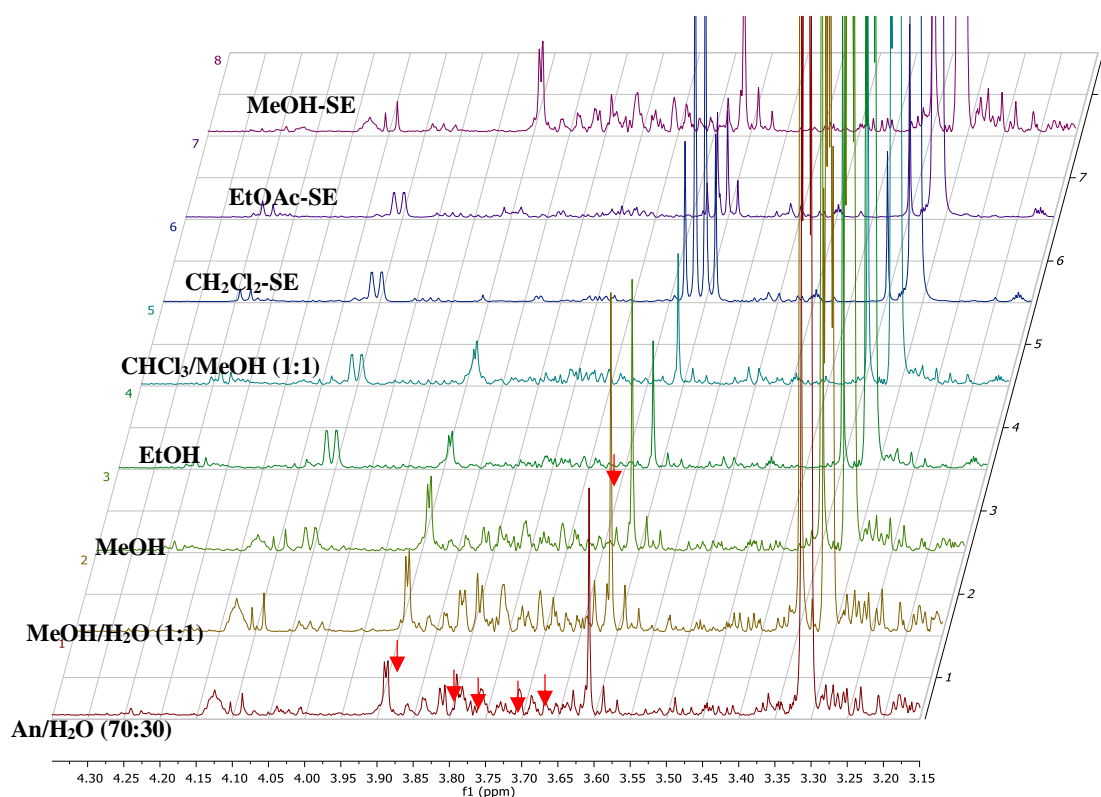


Figure S1. $^1\text{H-NMR}$ Signals which influence the grouping of the high polarity extracts An/H₂O (70:30), MeOH:H₂O (1:1), and MeOH-SE: δ 3.61, 3.79, 3.91, 3.67, 3.73 and 3.25 (red arrows) in representative $^1\text{H-NMR}$ metabolic profiles of *L. latisiliquum* extracts.

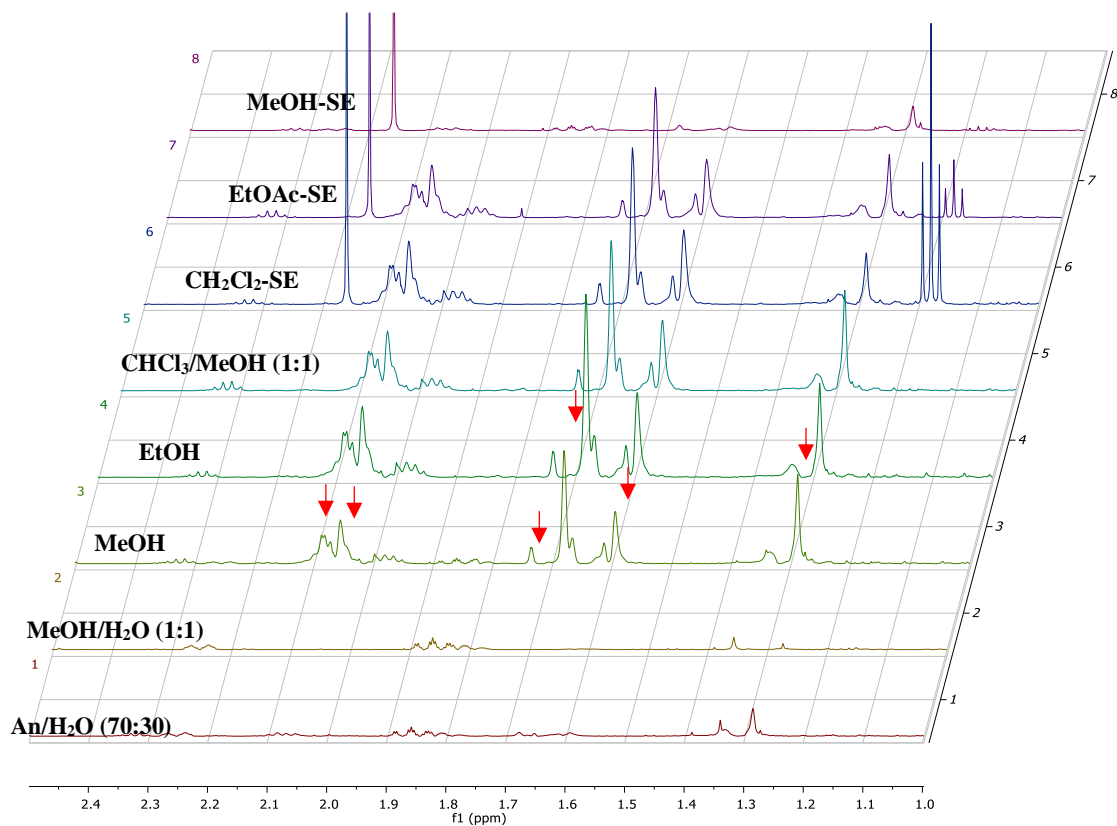


Figure S2. ¹H-NMR Signals which influence the grouping of low polarity extracts MeOH, EtOH, CHCl₃/MeOH (1:1), CH₂Cl₂-SE, EtOAc-SE: δ 1.30, 1.57, 1.60, 1.75, 2.05 and 2.11 (red arrows), in representative ¹H-NMR metabolic profiles of *L. latisiliquum* extracts.

Table S2. Experimental ^1H , ^{13}C -NMR, COSY and HSQC data of metabolite **E5** and those reported for quercitrin (quercetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside) (Kim et al., 2004).

Position	^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD)		COSY	^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD), HSQC	
	Quercitrin	E5	E5	Quercitrin	E5
2				149.9	149.8
3				136.2	136.2
4				179.6	179.6
5				163.2	163.2
6	6.13, d, $J = 2.5$ Hz	6.20, d, $J = 2.1$ Hz		100.2	99.6
7				167.2	166.0
8	6.29, d, $J = 2.5$ Hz	6.38, d, $J = 2.1$ Hz		95.3	94.7
1'				123.1	123.1
2'	7.28, s	7.34, d $J = 2.1$ Hz		116.9	116.6
3'				146.4	147.2
4'				159.2	159.2
5'	6.86, d, $J = 7.9$ Hz	6.92, d, $J = 8.3$ Hz	H-6'	116.4	116.3
6'	7.25, d, $J = 7.9$ Hz	7.31, d, $J = 8.3$ Hz	H-5'	122.8	122.8
H-1''	5.29 d, $J = 1.2$ Hz	5.35, d, $J = 1.6$ Hz	H-2''	103.5	103.5
H-2''	4.17 m	4.22, dd, $J = 3.1, 1.7$ Hz	H-1'', H-3''	71.9	71.6
H-3''	3.70, d, $J = 6.7$ Hz	3.75, dd, $J = 9.5, 3.2$ Hz	H-2'', H-4''	72.2	71.9
H-4''	3.32, d, $J = 9.6$ Hz	3.33, m,	H-3''	73.4	73.0
H-5''	3.35, m	3.41, dd $J = 9.5, 6.2$ Hz	H-6''	72.0	71.8
H-6''	0.86, d, $J = 6.1$ Hz	0.94 d, $J = 6.2$ Hz	H-5''	17.7	17.3

Table S3. Experimental ^1H , ^{13}C -NMR, HSQC and J -resolved data of metabolite **F1** and those reported for arbutin (4-hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside) (Ahmed et al., 2000).

Position	^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD)	J -resolved	^{13}C -NMR (125 MHz, CD_3OD), HSQC	
	F1	F1	Arbutin	F1
1			153.7	152.4
H-2,6	6.97, d, $J = 9.3$ Hz		119.3	117.8
H-3,5	6.70, d, $J = 9.3$ Hz		116.5	115.2
4			152.3	151.0
H-1'	4.74, d, $J = 7.36$ Hz		103.5	102.1
H-2'	3.47, m	t, $J = 8.4$ Hz	74.9	73.6
H-3'	3.40, m	d, $J = 8.6$ Hz	77.9	76.6
H-4'	3.44, m	d, $J = 8.5$ Hz	71.3	70.0
H-5'	3.42, m	t, $J = 8.0$ Hz	77.9	76.5
H-6a'	3.70, dd $J = 12, 3.8$ Hz		62.5	61.0
H-6b'	3.88, dd, $J = 12, 1.6$ Hz		62.5	61.0

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Entre las plantas forrajeras tropicales con propiedades antihelmínticas, una de las especies más estudiadas es *L. latisiliquum*. El follaje de esta planta fue inicialmente investigado debido a que es un componente importante de la dieta de ovinos y caprinos en la península de Yucatán (Flores y Bautista, 2012; González-Pech *et al.*, 2015). Los primeros estudios *in vitro* a través de los bioensayos LMIA y LEIA permitieron confirmar el potencial AH de este material contra larvas de *H. contortus* (Alonso, 2008). Estudios posteriores robustecieron la evidencia de la actividad AH de *L. latisiliquum*, reportando que la ingestión del follaje conduce a un bajo establecimiento larval en el tracto intestinal de cabras (Brunet *et al.*, 2008) así como a una reducción en el tamaño de individuos adultos y baja fecundidad en las hembras (Martínez Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2010). En todos los trabajos anteriores se sugería que los TC tenían un rol determinante en la actividad AH de la planta, ya que en otras especies forrajeras con propiedades antihelmínticas presentan una fuerte correlación entre su contenido de TC y la actividad AH (Alonso-Díaz *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios posteriores utilizando extractos de la planta en los bioensayos EHA y LEIA, permitieron sugerir que los TC no están relacionados con la actividad AH de esta especie contra *H. contortus* (Vargas-Magaña, 2013).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman de manera clara que los TC no están relacionados con la actividad AH *in vitro* de *L. latisiliquum*. Actualmente han sido reportadas varias especies de plantas cuya actividad AH en la inhibición del desenvaine de *H. contortus* no está relacionada con los TC. Como ejemplo, *Annona* spp., *Coffea arabica* y *Carya illinoensis* han demostrado actividad inhibitoria aun después de un tratamiento con PVPP, indicando que existen otros metabolitos secundarios con actividad AH (Castañeda-Ramírez, 2014; Vargas-Magaña, 2013).

En el presente estudio, la eliminación de los metabolitos TC mediante el proceso de secado condujo a la obtención de un extracto de mayor actividad con respecto a los preparados comúnmente con hojas frescas, lo que coincide con resultados previos en los que se encontró que *Onobrychis viciifolia* (sainfoin) exhibió una mayor actividad AH en el

ensayo LEIA cuando se utilizó extracto de heno de sainfoin comparado con el extracto de hojas frescas (Ojeda-Robertos *et al.*, 2010).

Es posible que la ausencia de actividad de los TC se deba a las características estructurales de este grupo de metabolitos secundarios (Figura 9). Se ha observado que los monómeros de prodelfinidinas (PD) así como los derivados galloilados muestran mayor actividad AH. Además, el número de hidroxilos está relacionado con mayor actividad inhibitoria en el ensayo LEIA (Brunet *et al.*, 2008; Brunet y Hoste, 2006). Asimismo, una mayor proporción de PD con respecto a procianidinas (PC), así como altos pesos moleculares, han sido relacionados con mayor actividad AH (Quijada *et al.*, 2015). Por todo lo anterior, es posible que la baja actividad inhibitoria de *L. latisiliquum* se deba a que los TC están constituidos por una mayor proporción de PC con relación a PD, o un número reducido de oxhidrilos. Alternativamente, los TC de esta planta pudieran ser de bajo peso molecular. Adicionalmente, los TC de *L. latisiliquum* parecen ejercer un efecto de dilución con respecto a los metabolitos bioactivos. Tal vez esto explique porqué al eliminar a los primeros se obtiene una mayor actividad inhibitoria para el extracto libre de TC (Hernández-Bolio *et al.*, 2017).

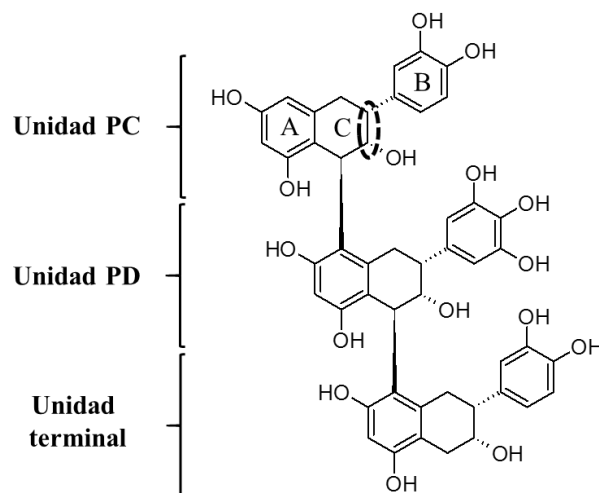


Figura 9. Características estructurales de los taninos condensados: a) tamaño, b) tipo de unidades que lo constituyen (PC o PD) y c) estereoisomería del anillo C (*cis* o *trans*)

Además de los TC, otros polifenoles como los taninos hidrolizables y flavonoides han demostrado tener actividad AH (Engström *et al.*, 2016; Klongsiriwet *et al.*, 2015; Brunet *et al.*, 2007), por lo que se investigaron otros métodos de eliminación de polifenoles con el

objetivo de descartar a estos metabolitos fenólicos y tratar de elucidar el tipo de metabolitos secundarios responsables de la actividad de *L. latisiliquum*.

El método de eliminación de polifenoles por extracción en fase sólida con poliamida C6, así como el tratamiento del extracto con PVPP, mostraron diferencias en cuanto al nivel de actividad AH exhibida por el extracto original de hojas secas, mientras que el tratamiento por partición con NaCl y por exclusión en gel (Sephadex LH-20) no presentaron diferencias significativas. Las diferencias en cuanto al nivel de actividad de estas fracciones no pudieron ser explicadas por fenoles comunes de plantas. Es interesante que a pesar de que algunos de estos metabolitos han sido activos para otros ensayos, e.g. inhibición de la eclosión de huevos y motilidad larval (Engström *et al.*, 2016; von Son-de Fernex *et al.*, 2015), no hayan mostrado actividad en el ensayo LEIA. Esto sugiere un mecanismo de acción diferente para el ensayo en estudio, en el cual se ha observado que moléculas de tipo flavonol han demostrado la mayor actividad (Klongsiriwet *et al.*, 2015), mientras que metabolitos con una reducida cantidad de grupos oxhidrilo exhiben una menor actividad (Brunet y Hoste, 2006).

La afinidad de cada uno de los métodos por ciertos grupos de metabolitos fenólicos reveló las posibles causas de las diferencias en cuanto a actividad AH. Mientras que la partición con NaCl y el tratamiento con Sephadex LH-20 han sido reportados como métodos que permiten eliminar específicamente TC y taninos hidrolizables (TH) (Strumeyer y Malin, 1975; Wall *et al.*, 1996), se ha demostrado que el PVPP se une no sólo a taninos sino también a flavan-3-oles, ácido gálico y flavonoles (Verza *et al.*, 2008), teniendo una mayor afinidad por agliconas como la quercetina, en comparación con su correspondiente glucósido (Laborde *et al.*, 2006). Por otro lado, el procesamiento de extractos con columnas de poliamida, además de eliminar TH como el ácido tánico, es capaz de retener cierta cantidad de otros flavonoides como catequina y fenoles simples (2-3 grupos OH) (Collins *et al.*, 1998), lo que pudo ocasionar una baja actividad en esta fracción.

Por lo anterior, se puede sugerir que los polifenoles involucrados en la actividad AH de *L. latisiliquum* son de bajo peso molecular, con respecto a los taninos. Además, es posible recomendar el tratamiento con Sephadex LH-20 como un método que permite eliminar polifenoles de alto peso molecular, obteniéndose un mayor rendimiento de extracto, haciéndolo ideal para realizar un estudio fitoquímico sin la interferencia de estos

productos. Por otro lado, el tratamiento con poliamida es el método que ofrece mayor rapidez de procesamiento con un alto rendimiento, característica deseable para estudios con un gran número de muestras, como lo es la metabolómica.

Al descartar a los TC como responsables de la actividad AH de *L. latisiliquum* surgió una nueva interrogante relacionada con la identidad de los metabolitos bioactivos, ya que, a pesar de que en el Capítulo 1 se plantea que probablemente otro tipo de fenoles son los que poseen la actividad, hay muchos grupos de metabolitos que poseen este grupo funcional. Con base en esto, la selección del disolvente de extracción se utilizó como una herramienta que permitió seleccionar los componentes que serían extraídos (Gray *et al.*, 2012), y, mediante su evaluación biológica, conocer aquel o aquellos sistemas que favorecen la extracción de metabolitos bioactivos, escoger la mejor estrategia de purificación de los mismos, así como proveer de un perfil reproducible e independiente de las variaciones de la matriz vegetal (Smith, 2003). A pesar de que un extracto crudo es muy complejo en su composición, un análisis de RMN puede revelar la presencia de compuestos aromáticos, fenoles, azúcares, terpenoides, esteroides, así como ácidos grasos (Gray *et al.*, 2012). El estudio metabolómico de *L. latisiliquum* permitió simplificar las tareas descritas anteriormente, y permitió caracterizar preliminarmente el tipo de metabolitos relacionados con la actividad AH.

De acuerdo con los resultados obtenidos con el análisis PCA es posible afirmar que los metabolitos activos son de alta polaridad. Sin embargo, no son extraídos por un disolvente en específico, sino que pueden ser extraídos por varios sistemas de alta polaridad en un amplio rango ($\epsilon = 32.7 - 56.7$). Esto confirmó que el protocolo de extracción tiene un efecto significativo en la actividad AH como había sido sugerido previamente (Castañeda-Ramírez, 2014). Este autor reportó que un extracto de An/H₂O (70:30) tenía mayor efecto AH sobre el desenvaine *larval* que un extracto metanólico. Sin embargo, la identidad de los metabolitos que ocasionan esta diferencia se desconocía. El análisis PCA permitió también descartar como metabolitos activos aquellos componentes de baja polaridad como ácidos grasos, alcaloides y terpenoides, algunos de los cuales han sido reportados con actividad AH en otros ensayos contra *H. contortus*; e.g. el eugenol y las sesquiterpen-lactonas detectadas utilizando el ensayo de inhibición de la eclosión de huevos (Foster *et al.*, 2011; Pessoa *et al.*, 2002), o el alcaloide de aporfina (S)-dicentrina, que inhibe el desarrollo larval (Ayers *et al.*, 2007).

El análisis OPLS-DA de los extractos bioactivos de mayor polaridad permitió detectar las señales de $^1\text{H-RMN}$ que ocasionaban las diferencias entre los distintos niveles de actividad AH. Los extractos de mayor actividad presentaron valores de IC_{50} similares a los reportados para plantas consideradas como activas contra *H. contortus*, entre las que se pueden citar *Erica umbellata* (179.4 $\mu\text{g/mL}$), *Calluna vulgaris* (188.6 $\mu\text{g/mL}$), *Annona squamosa* (154 $\mu\text{g/mL}$), *L. racemosa* (143.3 $\mu\text{g/mL}$) y *R. mangle* (325.9 $\mu\text{g/mL}$) (Castañeda-Ramírez, 2014; Moreno-Gonzalo *et al.*, 2013a; Vargas-Magaña, 2013). Es importante aclarar que el bioensayo elegido tiene una gran repercusión para la construcción del modelo OPLS-DA. En este caso, los amplios límites de confianza que presenta el ensayo LEIA producían un modelo con una baja capacidad predictiva, por lo que posteriormente se construyó un modelo basado en niveles de actividad (OPLS-DA). Lo anterior confirmó que la elección del ensayo biológico es de suma importancia en un estudio metabólico para mejorar la precisión del modelo, sobre todo si se busca predecir una actividad biológica en función del perfil metabólico (Bailey *et al.*, 2004).

Una de las ventajas de conocer las señales de $^1\text{H-RMN}$ que están relacionadas con la actividad de los extractos de hoja de *L. latisiliquum* es permitir de una manera rápida y confiable asegurar la calidad, en términos de actividad AH, de extractos o formulaciones de este forraje, mediante la predicción de la actividad AH a través del perfil por $^1\text{H-RMN}$, sin necesidad de llevar a cabo ensayos de actividad biológica (Bailey *et al.*, 2004).

Identificar los metabolitos activos en extractos de plantas es un paso esencial que sustenta la evidencia de la actividad AH de las especies vegetales (Athanasiadou *et al.*, 2007) y dado que en el presente trabajo se descartaron los TC como responsables de la actividad AH de *L. latisiliquum*, era necesario identificar los metabolitos secundarios que están involucrados en la misma. Utilizando el gráfico S-plot del análisis OPLS-DA se detectaron un total de siete señales que influenciaron la discriminación de los extractos de mayor actividad. De acuerdo al desplazamiento químico y patrones de acoplamiento de las señales detectadas se sugirió que pertenecen a protones aromáticos en esqueletos de tipo flavonoide (Lommen *et al.*, 2000). Adicionalmente, la detección de las señales a δ 4.09 y δ 0.85 permitió sugerir que los protones correspondientes pertenecen a una unidad de piranosa (Lommen *et al.*, 2000). Estos resultados permiten explicar porqué el extracto An/H₂O (70:30) presentó la mayor actividad en comparación de los demás utilizados en el presente proyecto. Se ha reportado que, mientras el metanol extrae con mayor eficiencia

los polifenoles de baja masa molecular, la extracción con mezclas de acetona-agua favorecen la extracción de flavonoles con mayor masa molecular (Dai y Mumper, 2010). Es por esta razón que los sistemas de baja polaridad como EtOH, Hx, CH₂Cl₂ y AcOEt no fueron capaces de extraer los metabolitos activos y, por tanto, no presentaron actividad AH.

Para complementar la caracterización de los metabolitos bioactivos se llevó a cabo un estudio biodirigido del extracto de An/H₂O (70:30) de hojas de *L. latisiliquum*. En este tipo de estudios, se espera que, al realizar el fraccionamiento del extracto activo, la actividad biológica vaya incrementando conforme se obtienen fracciones enriquecidas con el componente activo. Sin embargo, esto no lleva siempre a resultados conclusivos (Heinrich *et al.*, 2012). Durante el estudio biodirigido de *L. latisiliquum*, no se observaron incrementos muy marcados en la actividad AH. Las particiones y fracciones resultantes de los fraccionamientos cromatográficos demostraron en varios casos poseer una actividad similar a la del extracto crudo. Desde el punto de vista fitoquímico esto puede representar un problema, ya que la complejidad de este tipo de extractos dificulta la ubicación de metabolitos biológicamente activos. Sin embargo, esta situación representa también una oportunidad interesante de estudio en cuanto al combate contra la resistencia antihelmíntica ya que es común que los parásitos, o cualquier organismo patógeno, desarrollen rápidamente resistencia contra metabolitos puros, por lo que el uso de material que tiene una combinación de diversos compuestos con actividad antiparasitaria puede ayudar a disminuir la probabilidad de generar resistencia contra alguno de los xenobióticos en particular (Ginsburg y Deharo, 2011).

Entre las ventajas de usar extractos como “cocteles medicinales” se encuentra la capacidad de asegurar un mecanismo de acción multifactorial (Wink, 2003), así como prolongar la farmacocinética, estabilidad y biodisponibilidad de los componentes activos (Spelman *et al.*, 2006; Spinella, 2002). Un ejemplo de esto, lo constituyen las polimetoxiflavonas casticina y artemitina, las cuales son inactivas contra *Plasmodium* spp. por sí solas, sin embargo, han demostrado potenciar selectivamente la actividad de artemisinina contra *P. falciparum*. Por lo cual, el extracto crudo de la planta puede ofrecer una ventaja terapéutica sobre la administración del sesquiterpeno puro (Elford *et al.*, 1987).

En el caso de extractos vegetales como el de *L. latisiliquum*, una estrategia podría ser la producción reproducible de extractos, los cuales contengan una variedad de componentes activos en sus proporciones originales. Otras maneras de emplear el follaje de esta especie incluye su uso como nutracéutico (Hoste *et al.*, 2015), ya sea fresco, ensilado, henificado o peletizado (Hoste *et al.*, 2016). Sin embargo, es necesario identificar los metabolitos relacionados con la actividad biológica para garantizar la calidad de los extractos o el material vegetal al ser administrados.

Los metabolitos quercitrina y arbutina, identificados mediante el estudio biodirigido de *L. latisiliquum*, presentaron una actividad considerada como moderada en los bioensayos LEIA si se comparan con otros metabolitos puros evaluados recientemente (Klongsiriwet *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha reportado que metabolitos fenólicos como el flavonoide quercetina interactúan con glicoproteínas-P, incrementando significativamente la biodisponibilidad de antihelmínticos comerciales y retrasando la aparición de resistencia por parte de los parásitos (Lespine *et al.*, 2012).

Es importante destacar que sólo existen reportes del IC₅₀ de otros dos metabolitos relacionados con el desenvaine larval de *H. contortus*, los flavonoides quercetina y luteolina (Klongsiriwet *et al.*, 2015), aislados a partir de *Salix* spp. y que han exhibido una importante actividad AH para inhibir el desenvaine de *H. contortus*. Por lo tanto, los metabolitos aislados en el presente estudio constituyen las primeras moléculas con actividad AH identificadas a partir de una especie forrajera tropical.

Aunque se ha demostrado la actividad AH de quercitrina y arbutina *in vitro*, es importante llevar a cabo estudios *in vivo* para confirmar su actividad y evaluar su biodisponibilidad, así como su biotransformación en el líquido ruminal de los animales (*e.g.* pruebas de digestibilidad) (Sandoval-Castro *et al.*, 2012). Estos experimentos permitirían la estimación de dosis, modo de administración o consumo de follaje de *L. latisiliquum*.

La información obtenida en el presente estudio complementa de manera importante el estudio de *L. latisiliquum* como una especie de la selva baja caducifolia que debe ser considerada como un recurso importante para la producción de pequeños rumiantes, además de que posee gran producción de semilla y alta capacidad de establecimiento de plántulas (Quiroz-Carranza y Orellana, 2010) así como resistencia a la sequía (Tamayo-

Chim *et al.*, 2012), lo cual constituye una gran ventaja para su exploración como un recurso con potencial nutracéutico.

4.2 CONCLUSIONES

El presente trabajo demostró que los taninos condensados y otros fenoles comunes de *L. latisiliquum* no contribuyen a la actividad de inhibición del desenvaine larval de *H. contortus*.

La eliminación de taninos condensados por secado de hojas de *L. latisiliquum* permitió la obtención de un extracto con mayor actividad antihelmíntica en comparación a los tradicionalmente preparados con hojas frescas.

El análisis metabolómico por ¹H-RMN de *L. latisiliquum* permitió la identificación del mejor sistema de extracción de productos antihelmínticos y la predicción de sistemas que pueden exhibir un nivel similar de actividad antihelmíntica.

El análisis de PCA indicó que los productos bioactivos son altamente polares y contienen una porción glicosilada, mientras que el análisis OPLS-DA facilitó la identificación preliminar de los productos antihelmínticos a través de la detección de señales relacionadas con la actividad.

El análisis biodirigido del extracto activo de *L. latisiliquum* llevó a la purificación e identificación de dos productos con actividad antihelmíntica moderada como quercitrina y arbutina.

Las señales en la región aromática del espectro de ¹H-RMN de los metabolitos purificados coincidieron con las indicados por el análisis OPLS-DA como relacionadas con la actividad, confirmando que la metabolómica puede utilizarse como una herramienta útil en la detección e identificación de metabolitos bioactivos de plantas sin estudio fitoquímico previo.

4.3 PERSPECTIVAS

En estudios sucesivos se propone utilizar las señales indicadas por el análisis OPLS-DA como una guía para la purificación de metabolitos bioactivos, llevando a cabo espectros de ^1H -RMN en cada etapa del fraccionamiento, en sustitución de los bioensayos. De esta manera se agilizaría el proceso de aislamiento cuando los bioensayos son muy laboriosos o prolongados.

De acuerdo a las señales indicadas por análisis OPLS-DA, existen otros productos activos, por lo que se propone continuar con la purificación e identificación de metabolitos secundarios, así como la evaluación de su actividad antihelmíntica.

En cuanto a los productos purificados, quercitrina y arbutina, se sugiere la evaluación en otros modelos de actividad antihelmíntica para conocer sus posibles efectos en diferentes estadios de *H. contortus*, así como probar mezclas para investigar un posible efecto de sinergismo entre ellos.

Determinar la biodisponibilidad y efecto antihelmíntico *in vivo* de los metabolitos identificados mediante la administración oral de hojas, extracto de hojas secas o *pellets* y productos puros para explorar su potencial uso fitoterápico o nutracéutico.

REFERENCIAS

- Ademola, I. O., Fagbemi, B. O., y Idowu, S. O. (2007). Anthelmintic activity of *Spigelia anthelmia* extract against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*, 101, 63–69.
- Aguilar-Caballero, A. J. Torres-Acosta, J.F.J., Cámara-Sarmiento, R. (2009). Importancia del parasitismo gastrointestinal en ovinos y situación. In B. A. González GR (Ed.), *Avances en el control de la parasitosis gastrointestinal de ovinos en el trópico*. (pp. 1–12).
- Ahmed, M., Laing, M. D., y Nsahlai, I. V. (2013). *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep. *Journal of Helminthology*, 87, 174–9.
- Aissa, A., Manolaraki, F., Ben Salem, H., Hoste, H., y Kraiem, K. (2016). *In vitro* assessment of the anthelmintic activity of *Hedysarum carnosum* Desf. at different phenological stages and from six locations in Tunisia. *Parasitology*, 143, 778–786.
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., y 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.
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., y Hoste, H. (2010). Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: A friendly foe? *Small Ruminant Research*, 89, 164–173.
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., y Hoste, H. (2011). Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 181, 360–364.
- Arellano Rodríguez, J. A. (2003). *Nomenclatura, Forma de Vida, Uso, Manejo Y Distribución de Las Especies Vegetales de la Península de Yucatan*. *Etnoflora Yucatanense Fascículo 20*. UADY. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=UWS8YdWWvKYC>
- Athanasiadou, S., Githiori, J., y Kyriazakis, I. (2007). Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal*, 1, 1392–1400.
- Ayers, S., Zink, D. L., Mohn, K., Powell, J. S., Brown, C. M., Murphy, T., Brand, R., Pretorius, S., Stevenson, D., Thompson, D., Singh, S. B. (2007). Anthelmintic activity of aporphine alkaloids from *Cissampelos capensis*. *Planta Medica*, 73, 296–297.
- Ayers, S., Zink, D. L., Mohn, K., Powell, J. S., Brown, C. M., Murphy, T., Brand, R., Pretorius, S., Stevenson, D., Thompson, D., Singh, S. B. (2008). Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity *in vitro*. *Phytochemistry*, 69, 541–545.
- Bahaud, D., De Montellano, C. M.-O., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., y Hoste, H. (2006). Effects of four tanniferous plant extracts on the *in*

- in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology*, 132, 545–554.
- Bailey, N. J. C., Wang, Y., Sampson, J., Davis, W., Whitcombe, I., Hylands, P. J., Croft, S.L., Holmes, E. (2004). Prediction of anti-plasmodial activity of *Artemisia annua* extracts: Application of ^1H NMR spectroscopy and chemometrics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 117–126.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., y 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.
- Bautista, F., Díaz-Garrido, S., Castillo-González, M., y Zinck, J. A. (2005). Spatial heterogeneity of the soil cover in the Yucatan Karst: Comparison of Mayan, WRB, and Numerical Classifications. *Eurasian Soil Science C/C of Pochvovedenie*, 38, S81.
- Behnke, J. M., Buttle, D. J., Stepek, G., Lowe, A., y Duce, I. R. (2008). Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Parasites y Vectors*, 1, 29.
- Bizimenyera, E. S., Githiori, J. B., Eloff, J. N., y Swan, G. E. (2006). *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, 142, 336–343.
- Brunet, S., Aufrere, J., El Babili, F., Fouraste, I., y Hoste, H. (2007). The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology*, 134, 1253–1262.
- Brunet, S., y Hoste, H. (2006). Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7481–7487.
- Brunet, S., Jackson, F., y Hoste, H. (2008). Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *International Journal for Parasitology*, 38, 783–790.
- Brunet, S., Montellano, C. M. O. de, Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., Capetillo-Leal, C., y Hoste, H. (2008). Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, 157, 81–88.
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., y Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 218–228.
- Burke, J. M., Terrill, T. H., Kallu, R. R., Miller, J. E., y Mosjidis, J. (2007). Use of copper oxide wire particles to control gastrointestinal nematodes in goats. *Journal of Animal Science*, 85, 2753–2761.
- Buttle, D. J., Behnke, J. M., Bartley, Y., Elsheikha, H. M., Bartley, D. J., Garnett, M. C., Donnan, A.A., Jackson, F., Lowe, A., Duce, I. R. (2011). Oral dosing with papaya

- latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasites y Vectors*, 4, 36.
- Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Morais, S. M., Santos, L. F. L., Rocha, M. F. G., y Bevilaqua, C. M. L. (2005). Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 7, 97–106.
- Carvalho, C. O., Chagas, A. C. S., Cotinguiba, F., Furlan, M., Brito, L. G., Chaves, F. C. M., Stephan M.P., Bizzo, H.R., Amarante, A. F. T. (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*, 183, 260–268.
- Castañeda-Ramírez, G. S. (2014). Evaluación *in vitro* de *Annona squamosa*, *A. muricata* y *A. reticulata* contra *Haemonchus contortus*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Universidad Autónoma de Yucatán.
- Castaño Zubieta, R. (2005). Estudio de la variación genética entre cepas de nematodos parásitos trichostrongílidos de los rumiantes, resistentes y susceptibles a la ivermectina mediante el empleo de marcadores moleculares. Universidad de Buenos Aires.
- Chan-Pérez, J. I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Castañeda-Ramírez, G. S., Vilarem, G., y Mathieu, C. (2016). *In vitro* susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary Parasitology*, 217, 53–60.
- Chartier, C., Etter, E., Hoste, H., Pors, I., Koch, C., y Dellac, B. (2000). Efficacy of copper oxide needles for the control of nematode parasites in dairy goats. *Veterinary Research Communications*, 24, 389–399.
- Colegate, S. M., y Molyneux, R. J. (2007). *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*. CRC press.
- Colgrave, M. L., Kotze, A. C., Huang, Y. H., O'Grady, J., Simonsen, S. M., y Craik, D. J. (2008). Cyclotides: Natural, circular plant peptides that possess significant activity against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Biochemistry*, 47, 5581–5589.
- Collins, R. A., Ng, T. B., Fong, W. P., Wan, C. C., y Yeung, H. W. (1998). Removal of polyphenolic compounds from aqueous plant extracts using polyamide minicolumns. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 45, 791–796.
- Coop, R. L., y Kyriazakis, I. (1999). Nutrition-parasite interaction. *Veterinary Parasitology*, 84, 187–204.
- Dai, J., y Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352.
- de Montellano, C. M. O., Vargas-Magaña, J. J., Aguilar-Caballero, A. J., Sandoval-Castro, C. A., Cob-Galera, L., May-Martínez, M., Miranda-Soberanis, R., Hoste, H., Cámara-Sarmiento, R., Torres-Acosta, J. F. J. (2007). Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles for the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats. *Veterinary Parasitology*, 146, 66–76.

- DeRosa, A. A., Chirgwin, S. R., Fletcher, J., Williams, J. C., y Klei, T. R. (2005). Exsheathment of *Ostertagia ostertagi* infective larvae following exposure to bovine rumen contents derived from low and high roughage diets. *Veterinary Parasitology*, 129, 77–81.
- Duno, R., Can, L., y Ancona-Ayora, R. E. (2010). *Lysiloma latisiliquum* - Flora de la Península de Yucatán. Retrieved from http://www.cicy.mx/sitios/flora_digital/ficha_virtual.php?especie=1532
- Elford, B. C., Roberts, M. F., Phillipson, J. D., y Wilson, R. J. M. (1987). Potentiation of the antimalarial activity of qinghaosu by methoxylated flavones. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 434–436.
- Engström, M. T., Karonen, M., Ahern, J. R., Baert, N., Payré, B., Hoste, H., y Salminen, J. P. (2016). Chemical structures of plant hydrolyzable tannins reveal their *in vitro* activity against egg hatching and motility of *Haemonchus contortus* nematodes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 840–851.
- Eriksson, L., Byrne, T., Johansson, E., Trygg, J., y Vikström, C. (2013). *Multi-and megavariate data analysis basic principles and applications*. Umetrics Academy.
- Eysker, M., Bakker, N., Kooyman, F. N. J., y Ploeger, H. W. (2005). The possibilities and limitations of evasive grazing as a control measure for parasitic gastroenteritis in small ruminants in temperate climates. *Veterinary Parasitology*, 129, 95–104.
- Fernández, A. S., Fiel, C. A., y Steffan, P. E. (1999). Study on the inductive factors of hypobiosis of *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Veterinary Parasitology*, 81, 295–307.
- Flores, J. S., y Bautista, F. (2012). Knowledge of the Yucatec Maya in seasonal tropical forest management: The forage plants. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83, 503–518.
- Foster, J. G., Cassida, K. A., y Turner, K. E. (2011). *In vitro* analysis of the anthelmintic activity of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) sesquiterpene lactones against a predominantly *Haemonchus contortus* egg population. *Veterinary Parasitology*, 180, 298–306.
- Gale, S. W., y Pennington, T. D. (2013). *Lysiloma* (Leguminosae : Mimosoideae) in Mesoamerica, 59, 453–467.
- Galicia-Aguilar, H. H., Rodríguez-González, L. A., Capetillo-Leal, C. M., Cámara-Sarmiento, R., Aguilar-Caballero, A. J., Sandoval-Castro, C. A., y Torres-Acosta, J. F. J. (2012). Effects of *Havardia albicans* supplementation on feed consumption and dry matter digestibility of sheep and the biology of *Haemonchus contortus*. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 178–184.
- García, D. E., y Medina, M. G. (2006). Valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. *Zootecnia tropical*, 24, 233–250.
- García de Miguel, J. (2000). Etnobotánica maya: origen y evolución de los huertos familiares de la Península de Yucatán, México, 1–247.
- Ghisalberti, E. L. (2002). Secondary metabolites with antinematodal activity. *Studies in*

Natural Products Chemistry, 26, 425–506.

- Ginsburg, H., y Deharo, E. (2011). A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments – an introduction. *Malaria Journal*, 10, S1.
- Githiori, J. B., Athanasiadou, S., y 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-Pech, P. G., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro, C. A., y Tun-Garrido, J. (2015). Feeding behavior of sheep and goats in a deciduous tropical forest during the dry season: The same menu consumed differently. *Small Ruminant Research*, 133, 128–134.
- Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., y Kell, D. B. (2004). Metabolomics by numbers: Acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology*, 22, 245–252.
- Gray, A. I., Igoli, J. O., y Edrada-Ebel, R. (2012). Natural products isolation in modern drug discovery programs. *Natural Products Isolation*, 515–534.
- Harder, A., y von Samson-Himmelstjerna, G. (2001). Activity of the cyclic depsipeptide emodepside (BAY 44-4400) against larval and adult stages of nematodes in rodents and the influence on worm survival. *Parasitology Research*, 87, 924–8.
- Harder, A., y Von Samson-Himmelstjerna, G. (2002). Cyclooctadepsipeptides - A new class of anthelmintically active compounds. *Parasitology Research*, 88, 481–488.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., y Williamson, E. M. (2012). Methods in natural. In *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*. Elsevier Health Sciences.
- Hernández-Bolio, G. I., García-Sosa, K., Escalante-Erosa, F., Castañeda-Ramírez, G. S., Sauri-Duch, E., Torres-Acosta, J. F. de J., y Peña-Rodríguez, L. M. (2017). Effects of polyphenol removal methods on the *in vitro* exsheathment inhibitory activity of *Lysiloma latisiliquum* extracts against *Haemonchus contortus* larvae. *Natural Product Research*, 6419, 1–6.
- Hernández-Orduño, G., Acosta, J. F. J. T., Castro, C. A. S., Caballero, A. J. A., Ramirez, R. R. R., Hoste, H., y Quintana, J. A. C. (2008). *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia gaureri*, *Havardia albicans* and Quebracho tannin extracts on a mexican strain of *Haemonchus contortus* L₃ larvae. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8, 191–197.
- Hernández-Villegas, M. M., Borges-Argáez, R., Rodríguez-Vivas, R. I., Torres-Acosta, J. F. J., Méndez-González, M., y Cáceres-Farfán, M. (2012). *In vivo* anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. *Veterinary Parasitology*, 189, 284–290.
- Hertzberg, H., Huwyler, U., Kohler, L., Rehbein, S., y Wanner, M. (2002). Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology*, 125, 65.
- Holden-Dye, L., y Walker, R. J. (2005). Anthelmintic drugs and nematicides: studies in

Caenorhabditis elegans.

- Hördegen, P., Cabaret, J., Hertzberg, H., Langhans, W., y Maurer, V. (2006). *In vitro* screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemonchus contortus* with a modified methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 85–89.
- Hoste, H. (2005). Alternative methods for the sustainable control of gastrointestinal nematodes in small ruminants, 431–436.
- Hoste, H., Brunet, S., Paolini, V., Bahuaud, D., Chauveau, S., Fouraste, I., y Lefrileux, Y. (2009). Compared *in vitro* anthelmintic effects of eight tannin-rich plants browsed by goats in the southern part of France. *Option Méditerranéennes*, 431–436.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., y Hoskin, S. O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 22, 253–261.
- Hoste, H., Manolaraki, F., Brunet, S., López-Arroyo, C., Martínez-Ortiz de Montellano, C., Sotiraki, S., y Torres Acosta, F. (2011). The anthelmintic properties of tannin-rich legume forages: from knowledge to exploitation in farm conditions. *Options Méditerranéennes. Séries A. Mediterranean Seminars*, 99, 295–304.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C. A. (2012). Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*, 186, 18–27.
- Hoste, H., y Torres-Acosta, J. F. J. (2011). Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology*, 180, 144–154.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Quijada, J., Chan-Perez, I., Dakheel, M. M., Kommuru, D. S., Mueller-Harvey, I., Terrill, T. H. (2016). Chapter Seven - Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. In R. B. G. and G. V. S.-H. B. T.-A. in *Parasitology (Ed.)*, *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends* (Vol. Volume 93, pp. 239–351). Academic Press.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T. H. (2015). Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, 212, 5–17.
- Hussain, A., Khan, M. N., Iqbal, Z., Sajid, M. S., y Khan, M. K. (2011). Anthelmintic activity of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology*, 179, 92–99.
- Isoet, K. N., Nyberg, N. T., Van Diermen, D., Malnoe, P., Hostettmann, K., Shikov, A. N., y Jaroszewski, J. W. (2011). Metabolic profiling of *Rhodiola rosea* rhizomes by 1H-NMR spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, 22, 158–165.
- Iqbal, Z., Lateef, M., Akhtar, M. S., Ghayur, M. N., y Gilani, A. H. (2006). *In vivo*

- anthelmintic activity of ginger against gastrointestinal nematodes of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 285–287.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M. N., y Afaq, M. (2006). Anthelmintic resistance: The state of play revisited. *Life Sciences*, 79, 2413–2431.
- Jackson, F., y Miller, J. (2006). Alternative approaches to control-*Quo vadit?* *Veterinary Parasitology*, 139, 371–384.
- Jackson, F., Varady, M., y Bartley, D. J. (2012). Managing anthelmintic resistance in goats-Can we learn lessons from sheep? *Small Ruminant Research*, 103, 3–9.
- Jaimez-Rodríguez, P. R. (2016). *Conducta ingestiva de cabritos centinelas en la selva baja caducifolia y su relación con la infección con nematodos gastrointestinales*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Jones, O. A. H., y Cheung, V. L. (2007). An introduction to metabolomics and its potential application in veterinary science. *Comparative Medicine*, 57, 436–442.
- Kamaraj, C., Rahuman, A. A., Elango, G., Bagavan, A., y Zahir, A. A. (2011). Anthelmintic activity of botanical extracts against sheep gastrointestinal nematodes, *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*, 109, 37–45.
- Kaminsky, R., Bapst, B., Stein, P. A., Strehlau, G. A., Allan, B. A., Hosking, B. C., ... Sager, H. (2011). Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitology Research*, 109, 19–23.
- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S. S., Wenger, A., Wieland-berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, F., Skripsky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., Ma, P. (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, 452, 176–180.
- Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature Protocols*, 5, 536–549.
- Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A. R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E. M., y Hoste, H. (2015). Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5, 127–134.
- Köhler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 31, 336–345.
- Laborde, B., Moine-Ledoux, V., Richard, T., Saucier, C., Dubourdieu, D., y Monti, J.-P. (2006). PVPP – Polyphenol Complexes: A Molecular Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4383–4389.
- Lange, K. C., Olcott, D. D., Miller, J. E., Mosjidis, J. A., Terrill, T. H., Burke, J. M., y Kearney, M. T. (2006). Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Veterinary Parasitology*, 141, 273–278.
- Lespine, A., Ménez, C., Bourguinat, C., y Prichard, R. K. (2012). P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for

- reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 58–75.
- Liu, N. Q., Cao, M., Frédérich, M., Choi, Y. H., Verpoorte, R., y van der Kooy, F. (2010). Metabolomic investigation of the ethnopharmacological use of *Artemisia afra* with NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 230–235.
- Lommen, A., Godejohann, M., Venema, D. P., Hollman, P. C. H., y Spraul, M. (2000). Application of directly coupled HPLC - NMR - MS to the identification and confirmation of quercetin glycosides and phloretin glycosides in apple peel, 72, 4431–4435.
- Lynn, R. C., Eberhard, M. L., Bowman, D. D., Georgi, J. R., y Georgi, M. E. (2003). *Georgis' parasitology for veterinarians*. St. Louis, Miss.: Saunders.
- Macedo, I. T. F., Bevilaqua, C. M. L., de Oliveira, L. M. B., Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Morais, S. M., Machado, L. K. A., y Ribeiro, W. L. C. (2012). *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Veterinary Parasitology*, 190, 504–509.
- Martínez-Ortíz-de-Montellano, C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., y 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.
- Martínez-Ortíz-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.
- Mekkonen, S. M. (2007). *Helminth Parasites of Sheep and Goats in Eastern Ethiopia*. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Merck Sharp y Dohme Corp. (2016). Merck Veterinary Manual - Gastrointestinal Parasites of Sheep and Goats. Retrieved from http://www.merckvetmanual.com/mvm/digestive_system/gastrointestinal_parasites_of_ruminants/gastrointestinal_parasites_of_sheep_and_goats.html
- Miller, J. E., y Horohov, D. W. (2006). Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Journal of Animal Science*, 84: E124-E132
- Min, B. R., Pomroy, W. E., Hart, S. P., y Sahlou, T. (2004). The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Ruminant Research*, 51, 279–283.
- Molan, A. L., Alexander, R. A., Brookes, I. M., y McNabb, W. C. (2000). Effects of an extract from sulla (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes *in vitro*. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 60, 21–25.
- Monteiro, M. V. B., Bevilaqua, C. M. L., Morais, S. M., Machado, L. K. A., Camurça-

-
-
- Vasconcelos, A. L. F., Campello, C. C., Ribeiro, W.L.C., Mesquita, M. de A. (2011). Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 182, 259–263.
- Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., Celaya, R., Osoro, K., ... Ferre, I. (2013a). *In vitro* effect of heather (Ericaceae) extracts on different development stages of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 197, 235–243.
- Moreno-Gonzalo, J., Manolaraki, F., Frutos, P., Hervás, G., Celaya, R., Osoro, K., Ortega-Mora, L.M., Hoste, H., Ferre, I. (2013b). *In vitro* effect of heather extracts on *Trichostrongylus colubriformis* eggs, larvae and adults. *Veterinary Parasitology*, 197, 586–594.
- Moreno, F. C., Gordon, I. J., Knox, M. R., Summer, P. M., Skerrat, L. F., Benvenuti, M. A., y Saumell, C. A. (2012). Anthelmintic efficacy of five tropical native Australian plants against *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in experimentally infected goats (*Capra hircus*). *Veterinary Parasitology*, 187, 237–243.
- Mori, T., Mohamed, A. S. A., Sato, M., y Yamasaki, T. (2000). Ellagitannin toxicity in the free-living soil-inhabiting nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Pesticide Science*, 25, 405–409.
- Morris, C. A., Green, R. S., Cullen, N. G., y Hickey, S. M. (2003). Genetic and phenotypic relationships among faecal egg count, anti-nematode antibody level and live weight in Angus cattle. *Animal Science*, 76, 167–174.
- Mukai, D., Matsuda, N., Yoshioka, Y., Sato, M., y Yamasaki, T. (2008). Potential anthelmintics: Polyphenols from the tea plant *Camellia sinensis* L. are lethally toxic to *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Natural Medicines*, 62, 155–159.
- Ojeda-Robertos, N., Manolaraki, F., Theodoridou, K., Aufrere, J., Halbwirth, H., Stich, K., Regos, I., Treutter, D., Mueller-Harvey, I., Hoste, H. (2010). The anthelmintic effect of sainfoin (silage, hay, fresh) and the role of flavonoid glycosides. In *61st Annual Meeting, European Association of Animal Production, Heraklion, Crete, Greece* (pp. 23–27).
- Oliveira, L. M. B. de, Bevilaqua, C. M. L., Macedo, I. T. F., Morais, S. M. de, Monteiro, M. V. B., Campello, C. C., Ribeiro, W.L.C., Batista, E. K. F. (2011). Effect of six tropical tanniferous plant extracts on larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 20, 155–160.
- Olufunke, M. D. (2012). Developments in Phytochemistry. *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*, 10–22.
- Paolini, V., Bergeaud, J. P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, P., y Hoste, H. (2003). Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 113, 253–261.
- Papadopoulos, E. (2008). Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Research*, 76, 99–103.
- Pennington, T. D., y Sarukhán, J. (2005). *Árboles tropicales de México: manual para la*

identificación de las principales especies. UNAM.

- Pessoa, L. M., Morais, S. M., Bevilaqua, C. M. L., y Luciano, J. H. S. (2002). Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 109, 59–63.
- Price, P. W. (1980). Evolutionary biology of parasites. *Monographs in Population Biology*, 15, 1–237.
- Prichard, R. K., Hall, C. A., Kelly, J. D., Martin, I. C. A., y Donald, A. D. (1980). The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*, 56, 239–250.
- Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H. M., Ramsay, A., Mueller-harvey, I., y Hoste, H. (2015). Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 6346–6354.
- Quiroz-Carranza, J., y Orellana, R. (2010). Uso y manejo de leña combustible en viviendas de seis localidades de Yucatán , México. *Madera Y Bosques*, 16, 47–67.
- Robinette, S. L., Brüscheweiler, R., Schroeder, F. C., y Edison, A. S. (2012). NMR in metabolomics and natural products research: two sides of the same coin. *Accounts of Chemical Research*, 45, 288–297.
- Rochfort, S., Parker, A. J., y Dunshea, F. R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69, 299–322.
- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., de León, A. A. P., Villela, H. S., de Jesús Torres-Acosta, J. F., Sánchez, H. F., Salas-D.R., Cruz, R.R., Saldierna, F., Carrasco, D. G. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8, 61–74.
- Sandoval-Castro, C. A., Torres-Acosta, J. F. J., Hoste, H., Salem, A. Z. M., y Chan-Pérez, J. I. (2012). Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 192–201.
- Sanyal, P. K., Sarkar, A. K., Patel, N. K., Mandal, S. C., y Pal, S. (2008). Formulation of a strategy for the application of *Duddingtonia flagrans* to control caprine parasitic gastroenteritis. *Journal of Helminthology*, 82, 169–174.
- Sharma, A., Cardoso-Taketa, A., Choi, Y. H., Verpoorte, R., y Villarreal, M. L. (2012). A comparison on the metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* four years later. *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 964–974.
- Shulaw, W. P., Lewandowsky, R., McCutcheon, J., y Foster, J. G. (2012). Fact Sheet: Strategies for coping with parasite larvae on pastures in the springtime in Ohio. *The Ohio State University Extension*. Retrieved from <http://ohioline.osu.edu/factsheet/VME-28>
- Smith, R. (2003). Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1000, 3–27.
- Smith, W. D., y Zarlenga, D. S. (2006). Developments and hurdles in generating vaccines

- for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology*, 139, 347–359.
- Soulsby, E. J. L. (1982). *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. London: Bailliere Tindall.
- Spelman, K., Duke, J. A., y Bogenschutz-Godwin, M. J. (2006). The synergy principle at work with plants, pathogens, insects, herbivores, and humans. In P. B. Kaufman, L. J. Cseke, S. Warber, J. A. Duke, y H. L. Brielmann (Eds.), *Natural products from plants*. CRC press Boca Raton FL.
- Spinella, M. (2002). The importance of pharmacological synergy in psychoactive herbal medicines. (Herbal synergy review). *Alternative Medicine Review*, 7, 130–138.
- Steppek, G., Curtis, R. H. C., Kerry, B. R., Shewry, P. R., Clark, S. J., Lowe, A. E., Duce I.R., Buttle, D.J., Behnke, J. M. (2007). Nematicidal effects of cysteine proteinases against sedentary plant parasitic nematodes. *Parasitology*, 134, 1831–1838.
- Stewart, D., McDougall, G. J., Sungurtas, J., Verrall, S., Graham, J., y Martinussen, I. (2007). Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: Advances toward fruit nutritional enhancement. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 645–651.
- Strumeyer, D. H., y Malin, M. J. (1975). Condensed tannins in grain sorghum: isolation, fractionation, and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23, 909–914.
- Swan, G. E. (1999). The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. *Journal of the South African Veterinary Association*, 70, 61–70.
- Tamayo-Chim, M., Reyes-García, C., y Orellana, R. (2012). A combination of forage species with different responses to drought can increase year-round productivity in seasonally dry silvopastoral systems. *Agroforestry Systems*, 84, 287–297.
- Tariq, K. A., y Tantry, M. A. (2012). Preliminary studies on plants with anthelmintic properties in Kashmir—The North-West temperate Himalayan region of India. *Chinese Medicine*, 3, 106–112.
- Torres-Acosta, J. F. J., y Aguilar-Caballero, A. J. (2005). Control, prevención y erradicación de la nematodiasis gastrointestinal en rumiantes. In V. I. Rodríguez y G. L. Cob (Eds.), *Enfermedades de importancia económica en mamíferos domésticos* (pp. 161–176). McGraw Hill.
- Torres-Acosta, J. F. J., y Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 77, 159–173.
- Torres-Acosta, J. F. J., Jacobs, D. E., Aguilar-Caballero, A., Sandoval-Castro, C., May-Martinez, M., y Cob-Galera, L. A. (2004). The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. *Veterinary Parasitology*, 124, 217–238.

- Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A. J., Cámara-Sarmiento, R., y Alonso-Díaz, M. A. (2012). Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. *Small Ruminant Research*, 103, 28–40.
- Uniprot Consortium. (2016). Uniprot Taxonomy - *Haemonchus contortus* (Barber pole worm). Retrieved from <http://www.uniprot.org/taxonomy/6289>
- USDA-GRIN. (2016). USDA, GRIN, *Lysiloma latisiliquum*. Retrieved from <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/accessiondetail.aspx?1127584>
- Várady, M., Papadopoulos, E., Dolinská, M., y Königová, A. (2011). Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: sheep versus goats. *Helminthologia*, 48, 137–144.
- Vargas-Magaña, J. J. (2013). Respuesta fisiológica de los ovinos y sus nematodos gastrointestinales a los taninos. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Vatta, A. F., Waller, P. J., Githiori, J. B., y Medley, G. F. (2009). The potential to control *Haemonchus contortus* in indigenous South African goats with copper oxide wire particles. *Veterinary Parasitology*, 162, 306–313.
- Verza, S. G., Pavei, C., y Ortega, G. G. (2008). Study of the specificity of cross-povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19, 1627–1633.
- von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M. Á., Mendoza-de Gives, P., Valles-de la Mora, B., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., y Castillo Gallegos, E. (2015). Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Veterinary Parasitology*, 214, 89–95.
- Wall, M. E., Wani, M. C., Brown, D. M., Fullas, F., Olwald, J. B., Josephson, F. F., Thornton, N.M., Pezzuto, J.M., Beecher, C.W.W., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Kinghorn, A. D. (1996). Effect of tannins on screening of plant extracts for enzyme inhibitory activity and techniques for their removal. *Phytomedicine*, 3, 281–285.
- Waller, P. J. (2006). From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. *Veterinary Parasitology*, 139, 1–14.
- Waller, P. J., y Thamsborg, S. M. (2004). Nematode control in “green” ruminant production systems. *Trends in Parasitology*, 20, 493–497.
- Wang, Y., Tang, H., Nicholson, J. K., Hylands, P. J., Sampson, J., Whitcombe, I., Stewart, C.G., Caiger, S., Oru, I., Holmes, E. (2004). Metabolomic strategy for the classification and quality control of phytomedicine: A case study of chamomile flower (*Matricaria recutita* L.). *Planta Medica*, 70, 250–255.
- Ward, J. L., Baker, J. M., y Beale, M. H. (2007). Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *FEBS Journal*, 274, 1126–1131.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular

phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3–19.

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

Zajac, A. M. (2006). Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 22, 529–541.

Zhu, L., Dai, J. L., Yang, L., y Qiu, J. (2013). *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Veterinary Parasitology*, 195, 112–117.