

**“ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA *in vitro* DE
EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Diospyros
anisandra* Y *Petiveria alliacea* CONTRA
CYATHOSTOMINOS (Nematoda: Cyathostominae)”**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

Médico Veterinario Zootecnista

Gabriela Janett Flota Burgos

Directores:

Dr. José Alberto Rosado Aguilar

Dr. Roger Iván Rodríguez Vivas



Mérida, Yuc., México, Septiembre de 2017.



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS NATURALES TROPICALES**

**ALUMNA: MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
GABRIELA JANETT FLOTA BURGOS**

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**DR. FELIPE TORRES ACOSTA
CCBA-UADY**

**DR. EDUARDO GUTIÉRREZ BLANCO
CCBA-UADY**

**DR. ANTONIO ORTEGA PACHECO
CCBA-UADY**

**DRA. KARLA Y. ACOSTA VIANA
CIR-HIDEYO NOGUCHI**

**DRA. EUGENIA DEL S. GUZMÁN MARÍN
CIR-HIDEYO NOGUCHI**

MÉRIDA, YUCATÁN, OCTUBRE DEL 2017

DECLARACIÓN

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

MVZ Gabriela Janett Flota Burgos

DEDICATORIA

A mi Dios, todopoderoso.

A mis padres: Mirna Burgos Escalante y Gabriel Flota Méndez.

A mi segundo padre: Marco Amaya Burgos.

A mis hermanos: Odett y Moisés Flota Burgos.

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios, por darme la determinación y fortaleza para cumplir con esta meta: *“Mira que te mando que te esfuerces y seas valiente; no temas ni desmayes, porque Jehová, tu Dios, estará contigo en donde quiera que vayas” Josué 1:9.*

A mi madre, por ser mi ejemplo más grande y mi mayor motivación en la vida. Gracias por cada sacrificio realizado para sacarnos adelante, por cada lucha vivida para darnos lo mejor. Te amo demasiado mamá, las palabras no bastan para expresarlo.

A mi segundo padre, Marco, por amarnos infinitamente y unir a esta familia. Gracias por sus consejos llenos de sabiduría y su apoyo en los momentos difíciles.

A Odett y Moisés, mis hermanos, porque esto sea un ejemplo para que crean en el cumplimiento de sus metas y sueños, y las alcancen con esfuerzo y dedicación.

A la Universidad Autónoma de Yucatán, por todo el apoyo y facilidades brindadas durante mi formación académica. A todo el personal de la Unidad de Diagnóstico de la FMVZ, en especial, al Departamento de Parasitología.

A mis asesores. Al Dr. Alberto Rosado Aguilar por sus enseñanzas y facilidades para la realización del proyecto. Al Dr. Iván Rodríguez por todo el apoyo brindado, la confianza y la motivación para seguir adelante a pesar de las adversidades: *“para ser una persona extraordinaria, hay que hacer cosas extraordinarias”.*

A mi comité tutorial: Dr. Felipe Torres Acosta, Dr. Eduardo Gutiérrez Blanco y Dr. Antonio Ortega Pacheco, por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A mis amigos, por estar presentes incondicionalmente en cada etapa de este proyecto: Gladys Noh, Omar Castillo, Cintya Keb, Maritza Campos, Ivet Velázquez, William Novelo, José Ortiz, Monserrat Cob, Iris Trinidad e Israel Chan. A Karen Arjona, por estar en los momentos más difíciles y estresantes de estos dos años.

A Karla Azcorra, por su guía, consejo, paciencia y dedicación. Gracias por estar conmigo a cada momento. Te quiero muchísimo, mi amada mentora.

A las personas que Dios se encargó de poner en mi camino, en el momento correcto: Pablo Azcorra, Eunice García, Gerardo Jiménez, Salatiel Pech, Joshua O'horán. Gracias por su invaluable de amistad.

A todas las personas que participaron, directa o indirectamente, en la realización de este trabajo, especialmente a los alumnos de servicio social.

La realización y término de este trabajo no hubiese sido posible sin su apoyo y ayuda incondicional.

Gracias a todos.

RESUMEN

Los extractos metanólicos de estructuras vegetales son una alternativa prometedora a los tratamientos antihelmínticos farmacéuticos tradicionales. Se realizó una evaluación *in vitro* de cómo los extractos metanólicos de la corteza y hojas de *Diospyros anisandra* y el tallo y hojas de *Petiveria alliacea*, colectados durante la época de lluvias y secas, afectaron el desarrollo larval y la eclosión de huevos de Cyathostominos. Siete concentraciones (600, 300, 150, 75, 37.5, 18.7 and 9.3 µg/mL) fueron evaluadas utilizando la prueba de eclosión de huevos. Se aplicó un ANOVA para identificar las diferencias entre las concentraciones evaluadas y los controles. Las concentraciones letales al 50% (CL₅₀) y los intervalos de confianza al 95% fueron calculados con un análisis probit. A partir de la concentración de 37.5 µg/mL, los extractos del tallo de *D. anisandra* de ambas épocas mostraron ≥95% de inhibición de la eclosión de huevos (IEH), mientras que los extractos de las hojas de *D. anisandra* tuvieron >90% de IEH a partir de 75 µg/mL. Para *P. alliacea*, los extractos de hojas y tallo de cada época de colecta presentaron >97% de IEH a partir de la concentración a partir de 300 µg/mL, aunque se observó una eficacia similar en concentraciones menores con los tallos (75 µg/mL) y hojas (150 µg/mL) colectados en época de lluvias. Los valores de las CL₅₀ fueron más bajos para los extractos de la corteza (10.2 µg/mL) y hojas (18.4 µg/mL) de *D. anisandra* colectados en época de lluvias, seguido del extracto del tallo (28.2 µg/mL) de *P. alliacea* de lluvias. En los extractos de *D. anisandra*, la IEH se debió, en gran parte, a su actividad ovicida (≥96% a partir de 37.5 µg/mL), mientras que en los extractos de *P. alliacea* se debió a un fallo en la eclosión de larvas L₁ (≥ 90% a partir de 75 µg / ml). En general, los extractos de la corteza de *D. anisandra* de la época de lluvias tuvieron un fuerte efecto antihelmíntico *in vitro* contra Cyathostominos al inhibir el desarrollo larval, y los extractos del tallo de *P. alliacea* de la época de lluvias tuvieron un fuerte efecto al prevenir la eclosión de huevos. Ambas son posibles alternativas de control para estos nemados.

Palabras clave: Actividad antihelmíntica, Cyathostominos, *Diospyros anisandra*, extractos, *Petiveria alliacea*.

SUMMARY

Methanol extracts of plant structures are promising alternatives to traditional pharmaceutical anthelmintic treatments. An *in vitro* evaluation was done of how methanol extracts of *Diospyros anisandra* bark and leaves, and *Petiveria alliacea* stems and leaves, collected during the rainy and dry seasons, affected cyathostomin larval development and egg hatching. Seven concentrations (600, 300, 150, 75, 37.5, 18.7 and 9.3 µg/mL) were tested using the egg hatch assay. An ANOVA was applied to identify differences between the concentrations and the controls. Fifty percent lethal concentration (LC₅₀) and the 95% confidence interval were calculated with a probit analysis. At and above 37.5 µg/mL, the *D. anisandra* bark extracts from both seasons exhibited ≥95% egg hatch inhibition (EHI), while the *D. anisandra* leaf extracts had >90% EHI at and above 75 µg/mL. For *P. alliacea*, the extracts from leaves and stems from either season exhibited >97% EHI at and above 300 µg/mL, although similar efficacy was also observed at lower concentrations with the rainy season stems (75 µg/mL) and leaves (150 µg/mL). Values for LC₅₀ were lowest for the rainy season *D. anisandra* bark (10.2 µg/mL) and leaf extracts (18.4 µg/mL), followed by the rainy season *P. alliacea* stems extract (28.2 µg/mL). In the *D. anisandra* extracts, EHI was largely due to its ovicidal activity (≥96% beginning at 37.5 µg/mL), whereas in the *P. alliacea* extracts it was due to L₁ larval hatch failure (≥90% beginning at 75 µg/mL). Overall, the rainy season *D. anisandra* bark extracts had a strong *in vitro* anthelmintic effect against cyathostomins by inhibiting larval development, and the rainy season *P. alliacea* stem extracts had a strong effect by preventing egg hatching. Both are possible control alternatives for these nematodes.

Key words: Anthelmintic activity, cyathostomins, *Diospyros anisandra*, *Petiveria alliacea*, extracts.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Importancia de las parasitosis gastrointestinales causadas por nematodos en equinos.....	3
2.2 Principales nematodos gastrointestinales (NGI) en equinos.....	3
2.3 Cyathostominos.....	4
2.3.1 Características morfológicas y fisiológicas.....	4
2.3.2 Ciclo biológico.....	5
2.3.3 Patogenia y signos clínicos.....	6
2.3.4 Prevalencia de Cyathostominos a nivel mundial.....	7
2.4 Antihelmínticos utilizados en el control de Cyathostominos.....	7
2.5 Resistencia antihelmíntica.....	8
2.6 Alternativas de control: uso de extractos de plantas con actividad antihelmíntica.....	9
2.7 Actividad biológica de <i>Diospyros anisandra</i>	12
2.8 Actividad biológica de <i>Petiveria alliacea</i>	13
2.9 Variación en la concentración de compuestos activos de acuerdo a la época de colecta.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. REFERENCIAS.....	19
6. ARTÍCULO PARA LA REVISTA VETERINARY PARASITOLOGY.....	29
Acuse de envío.....	29
Abstract.....	31
1. Introduction.....	33

2. Materials y methods.....	35
2.1 Study area.....	35
2.2 Vegetal extracts.....	36
2.3 Cyathostomin egg production.....	36
2.4 Evaluation of vegetal extracts.....	37
2.5 Statistical analysis.....	38
3. Results.....	39
4. Discussion.....	40
5. Conclusion.....	45
6. Acknowledgements.....	46
7. References.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Cápsula bucal de <i>Cyathostomum alveatum</i> : a) vista dorsoventral y b) vista lateral.....	5
Figura 2. Ciclo biológico de los Cyathostominos.....	6
Figura 3. <i>D. anisandra</i> : a) hojas y ramas; b) flores y c) frutos.....	12
Figura 4. Plantas de <i>P. alliacea</i> , se observan las características de las hojas y las flores.....	14
Figuras del artículo.	
Figura 1. Efecto ovicida en los huevos de Cyathostominos. a) control negativo, b) tratados con el extracto de <i>D. anisandra</i> y c) tratados con tiabendazol (control positivo).....	59
Figura 2. Efecto en los huevos de Cyathostominos tratados con el extracto de <i>P. alliacea</i> : se observa la formación de las larvas L ₁ que no pudieron eclosionar del huevo.....	59

ÍNDICE DE CUADROS.

PÁGINA

Cuadros del artículo.

Cuadro 1. Promedios y desviación estándar (\pm) del porcentaje de inhibición de la eclosión, porcentaje de actividad ovicida y porcentaje de larvas que fallaron la eclosión obtenidos con <i>D. anisandra</i>	55
Cuadro 2. Promedios y desviación estándar (\pm) del porcentaje de inhibición de la eclosión, porcentaje de actividad ovicida y porcentaje de larvas que fallaron la eclosión obtenidos con <i>P. alliacea</i>	56
Cuadro 3. Concentraciones letales al 50% ($\mu\text{g/ml}$) e intervalos de confianza al 95% obtenidos con los extractos de <i>D. anisandra</i>	57
Cuadro 4. Concentraciones letales al 50% ($\mu\text{g/ml}$) e intervalos de confianza al 95% obtenidos con los extractos de <i>P. alliacea</i>	58

1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos gastrointestinales (NGI) son un impedimento importante en la cría de caballos en todo el mundo (Urquhart *et al.*, 2006). Millones de dólares son invertidos cada año para el control de estos parásitos debido a que provocan una variedad de cuadros clínicos en los caballos que incluyen anemia, diarrea, pérdida de peso, síndromes de mala absorción, síndrome abdominal agudo (cólico), enteritis, peritonitis fatal y la muerte del animal (Bliss, 2007; Bowman, 2009).

Los Cyathostominos, llamados “pequeños estróngilos” son los nematodos más abundantes en equinos de todo el mundo (Kaplan y Vidyashankar, 2012). A nivel mundial, se reportan prevalencias de hasta 100% en equinos (Pereira y Vianna, 2006; Hinney *et al.*, 2011). En México las prevalencias reportadas van desde 6.4% hasta 91.8% (Valdez *et al.*, 2006; Rosado-Aguilar *et al.*, 2014).

En el caso de Cyathostominos, la resistencia a bencimidazoles y pirimidinas ha sido ampliamente reportada (Kuzmina y Kharchenko, 2008; Traversa *et al.*, 2009; Canever *et al.*, 2013). De igual forma, se cuenta con reportes de resistencia a la ivermectina por parte de los mismos (Näreaho *et al.*, 2011; Canever *et al.*, 2013; Rosado-Aguilar *et al.*, 2014).

La necesidad de encontrar alternativas para el control de los nematodos que puedan reducir el uso de antihelmínticos y el desarrollo de resistencia es reconocida internacionalmente (Moreno *et al.*, 2010). Entre dichas alternativas se encuentra el uso de extractos de plantas con propiedades antihelmínticas, las cuales han sido probadas contra nematodos de ovinos, caprinos y bovinos, principalmente (Hernández-Villegas *et al.*, 2011; Rosado-Aguilar *et al.*, 2016). En Australia, Payne *et al.* (2013) evaluaron de manera *in vitro* 37 extractos acuosos de plantas nativas contra Cyathostominos a una concentración de 1400µg/mL y encontraron 100% de inhibición de la eclosión al usar *Acacia baileyana*, *A. melanoxylon*, *A. podalyriifolia*, *Eucalyptus gomphocephala*, *Alectryon oleifolius*, *Santalum spicatum* y *Duboisia hopwoodii*. Peachey *et al.* (2015), evaluaron extractos metanólicos de cinco plantas de Etiopía y cuatro del Reino Unido sobre Cyathostominos, obteniendo porcentajes de inhibición de la eclosión mayores al

90% con los extractos de *Allium sativum*, *Acacia nilotica* y *Cucumis prophetarum* a una concentración de 1900 µg/mL. El estado de Yucatán cuenta con gran diversidad de plantas nativas, entre las cuales se ha demostrado *in vitro* que los extractos metanólicos de *Petiveria alliacea* y *Diospyros anisandra* poseen alta eficacia (>90%) en la inhibición de la eclosión de diferentes nematodos como *Ancylostoma* spp, *Haemonchus* spp y *Trichostrongylus* spp (Arjona-Cambranes *et al.*, 2016; Rosado-Aguilar *et al.*, 2016). Este antecedente deja abierta la posibilidad de que los extractos anteriormente mencionados presenten alta actividad antihelmíntica en contra de otros nematodos de diferentes especies pertenecientes al orden Strongylida. Debido a esto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos metanólicos de *Diospyros anisandra* y *Petiveria alliacea* sobre la eclosión huevos de Cyathostominos (Nematoda: Cyathostominae).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia de las parasitosis gastrointestinales causadas por nematodos en equinos.

Los NGI son impedimento importante en la cría de caballos en todo el mundo (Urquhart *et al.*, 2006). En general, millones de dólares se gastan cada año para el control de los parásitos internos de los caballos; sin embargo, éstos siguen siendo uno de los problemas más importantes que afectan la salud y el bienestar de los caballos (Bliss, 2007).

Según Colahan *et al.* (1998) y Prada (2002), los equinos son animales que potencialmente pueden ser atacados o infectados por un gran número de NGI. Independientemente de la forma en la que son criados, rara vez o nunca, se escapan de la exposición a parásitos en algún momento de su vida. No es inusual para un caballo aparentemente sano albergar más de medio millón de NGI (Bliss, 2007).

2.2 Principales nematodos gastrointestinales en equinos.

Los NGI que actualmente tienen importancia clínica en equinos pueden agruparse en grandes estróngilos, dentro de los cuales se encuentran las especies de *Strongylus vulgaris*, *S. edentatus* y *S. equinus*; en pequeños estróngilos, llamados Cyathostominos; *Oxyuris equi* del grupo de los Oxyúridos; y los ascáridos, siendo el principal *Parascaris equorum* (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Prada, 2002; Bowman, 2009). Entre estos nematodos, los de mayor prevalencia reportada son los Cyathostominos, considerados actualmente como los endoparásitos más comunes y de mayor patogenicidad en caballos, con prevalencias reportadas hasta del 100% (Pereira y Vianna, 2006; Prada y Romero, 2009; Hinney *et al.*, 2011; AAEP, 2013).

2.3 Cyathostominos.

2.3.1 Características morfológicas y fisiológicas.

Estos nematodos pertenecen al orden Strongylida, familia Cyathostominae (Bowman, 2009; Kornás *et al.*, 2009). La subfamilia Cyathostominae consiste de una compleja tribu que incluye más de 50 especies, agrupadas en 14 géneros. (Matthews *et al.*, 2004). Sin embargo, la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP, por sus siglas en inglés) recomienda el nombre del uso común Cyathostominos para estos nematodos y cyathostominosis para la enfermedad que causan (Kassai *et al.*, 1988). También son conocidos como pequeños estróngilos, en relación a su tamaño comparado con *S. vulgaris*, *S. edentatus* y *S. equinus*.

Los Cyathostominos son parásitos del intestino grueso de caballos, cebras y burros, entre otros équidos. Son altamente prevalentes y se encuentran en los pastos, los cuales tienen una carga parasitaria mixta de pequeños y grandes estróngilos. Todas las especies de la tribu Cyathostominea parasitan el ciego y colón del caballo, es común encontrar hasta de 15 a 20 especies infectando a un individuo al mismo tiempo (Matthews *et al.*, 2004). De 75 a 100% de los huevos expulsados en las heces de los caballos naturalmente infectados pertenecen a pequeños estróngilos, ya que estos superan en gran medida a los grandes estróngilos, tanto en número de especies, como de individuos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Bowman, 2009).

El tamaño de estos nematodos oscila entre 5 y 18 mm, dependiendo del género, poseen una cápsula bucal corta y cilíndrica o anular. Carecen de dientes en el interior de la cápsula, poseen coronas radiales externa e interna y la gotera esofágica es corta cuando es apreciable, no alcanzando el borde anterior de la cápsula bucal (Lichtenfels *et al.*, 2008) (Figura 1). La bolsa caudal de los machos está bien conformada y la costilla dorsal es doble y ramificada. La vulva en las hembras se abre cerca del ano, en la extremidad caudal (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Urquhart *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007).

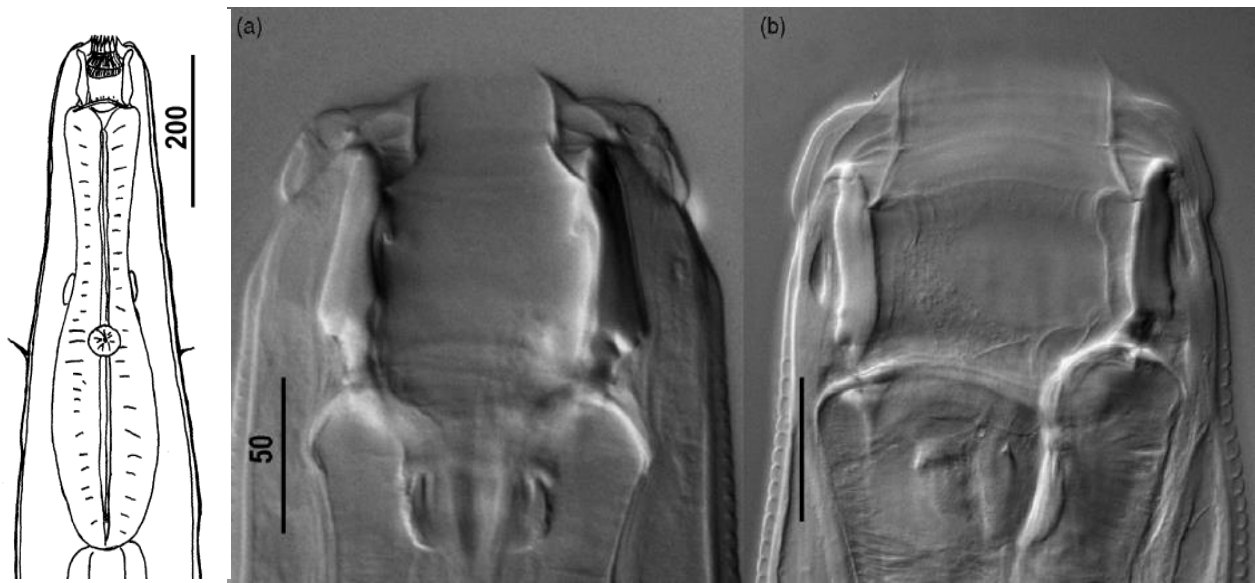


Fig 1. Cápsula bucal de *Cyathostomum alveatum*: a) vista dorsoventral y b) vista lateral (Lichtenfels *et al.*, 2008).

2.3.2 Ciclo biológico.

El ciclo biológico de los Cyathostominos es directo (Figura 2). Los huevos de pequeños estróngilos aparecen en las heces a partir de las seis semanas de infección, el desarrollo de las larvas infectivas y su supervivencia dependen fundamentalmente de la humedad y la temperatura. Bajo condiciones adecuadas, los huevos embrionan hasta larva L₁, las cuales pueden morir rápidamente si las heces o la materia que las contenga se deseca, mientras que el segundo estadio es más resistente y si bien paraliza su desarrollo cuando las heces se desecan, lo reanudan tan pronto aparecen las condiciones de humedad (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Las larvas infectivas (L₃) son aún más resistentes. La parasitosis se adquiere mediante la ingestión de larvas infectivas que contaminan las pasturas. Las larvas ingeridas se localizan en el intestino grueso, penetran la mucosa y desarrollan a pre-adultos para luego emerger a la luz intestinal. También es probable que permanezcan en hipobiosis en la mucosa por algunas semanas o meses. Este fenómeno ocurre principalmente en otoño. La mucosa presenta gran cantidad de pequeños nódulos que albergan el parásito en su interior. En la primavera puede ocurrir que los parásitos emerjan al exterior produciendo importantes lesiones en la pared intestinal, lo que conduce a una importante

diarrea con adelgazamiento y deshidratación (Taylor *et al.*, 2007). Este fenómeno tiene amplias repercusiones en el curso de la infección, tanto en las consecuencias epidemiológicas como en la presentación de las manifestaciones clínicas y susceptibilidad a los antihelmínticos. El periodo de prepatencia es de 6 a 12 semanas (Anderson, 2000; Taylor *et al.*, 2007; Bowman, 2009).

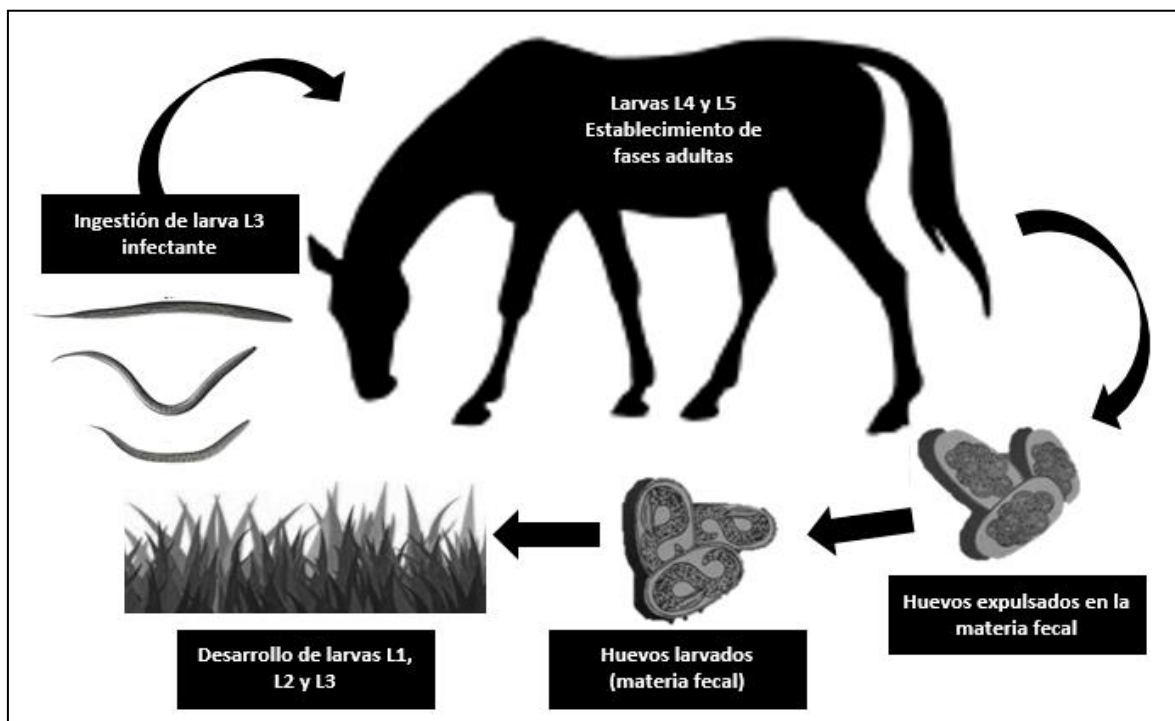


Fig. 2. Ciclo biológico de los Cyathostominae.

2.3.3 Patogenia y signos clínicos.

Una vez establecidos en intestino grueso, los Cyathostominae pueden llegar a formar poblaciones numéricamente importantes, los adultos tienen mecanismos patógenos directamente relacionados con sus hábitos alimentarios. Todos los estróngilos poseen cápsulas bucales que permiten atrapar la mucosa intestinal, digerirla, romper los capilares e ingerir sangre. En infecciones naturales se ha demostrado una disminución en la motilidad ileoceólica y una menor respuesta a la ingestión de alimento, suponiéndose que podría ocasionar una propulsión más lenta de la ingesta, que determinaría a su vez la pérdida de apetito, la malabsorción y la disminución de la ganancia de peso. La disminución de la

absorción de agua por la mucosa lesionada se traduciría en un incremento del contenido acuoso de las heces, que induciría a la diarrea y a la incompleta formación de las heces. La emergencia de las larvas desde la mucosa a la luz intestinal puede ser un importante factor patógeno en las infecciones y causar cólicos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999; Urquhart *et al.*, 2006; Bowman, 2009).

2.3.4 Prevalencia de Cyathostominos a nivel mundial.

Se considera que los Cyathostominos son los nematodos gastrointestinales con mayor prevalencia y abundancia en equinos de todo el mundo (Kaplan y Vidyashankar, 2012). A nivel mundial, se han reportado prevalencias desde 6.4% hasta un 100%. Sobresalen los reportes hechos en Brasil, Alemania, Colombia y Argentina, donde se reportaron prevalencias de 100%, 98.4%, 86.2% y 80%, respectivamente (Fusé *et al.*, 1999; Pereira y Vianna, 2006; Prada y Romero, 2009; Hinney *et al.*, 2011).

En México son escasos los estudios de frecuencia de NGI en equinos. Valdez *et al.* (2006) reportaron una prevalencia del 6.4% en la costa este y Muñoz (1997) reportó una prevalencia de 51% de Strongylida (orden) en equinos de Yucatán, sin llegar a hacer la diferenciación entre grandes y pequeños estróngilos. En un estudio realizado por Rosado-Aguilar *et al.* (2014) se observó una prevalencia de 91.8% de Cyathostominos en equinos de Yucatán.

2.4 Antihelmínticos utilizados en el control de Cyathostominos.

Los programas del control de NGI tradicionales implican la rotación de antihelmínticos a intervalos regulares, sin un diagnóstico previo, generalizando el tratamiento a toda la población. Sin embargo, este enfoque se basa en conceptos y estrategias desarrolladas hace más de 40 años, cuando *S. vulgaris* era el NGI más importante en los equinos y actualmente, es el NGI menos frecuente. Cabe destacar que los Cyathostominos no fueron considerados patógenos importantes en ese momento, y la atención se centró en *S. vulgaris*; esta situación ha cambiado y se reconocen como parásitos importantes de los equinos, por lo que

las estrategias diseñadas para el control de *S. vulgaris* no son apropiadas o muy eficaces para su control (Nielsen, 2012; AAEP, 2013).

Tres clases de antihelmínticos han sido utilizados para el control de infecciones por Cyathostominos: bencimidazoles, tetrahidropirimidinas y lactonas macrocíclicas (Lyons *et al.*, 2011; von Samson-Himmelstjerna, 2012).

Bowman (2009) menciona que los Cyathostominos adultos son susceptibles al febantel (6 mg/kg PV), febendazol (30-60mg/kg PV), oxibendazol (10mg/kg PV), pamoato de pirantel (12.5mg/kg PV) e ivermectina (0.2mg/kg PV). En cuanto a los estadios larvarios, está demostrado que algunos bencimidazoles, a dosis varias veces superiores a las habitualmente utilizadas en adultos, son eficaces como: tiabendazol (400 mg/kg PV), fenbendazol (30mg/kg PV) y oxfendazol (50mg/kg PV). Sin embargo, debido al uso frecuente e irracional se ha generado resistencia a estos fármacos (Kaplan, 2004).

2.5 Resistencia antihelmíntica.

Se define como resistencia antihelmíntica el estado heredable de no susceptibilidad o susceptibilidad disminuida al efecto de una concentración determinada de un antihelmíntico, que en condiciones normales causa inhibición del crecimiento o la muerte del parásito (Prada, 2002). Desafortunadamente, este problema ha involucrado a la mayoría de las familias de antihelmínticos disponibles en el mundo, lo que representa una amenaza a la viabilidad de la industria pecuaria y el control de estos parásitos (McKellar y Jackson, 2004; Coles *et al.*, 2006).

El desarrollo de la resistencia antihelmíntica depende de varios factores, entre ellos se encuentran: la frecuencia y tiempo de aplicación del tratamiento antihelmíntico, eficacia del tratamiento, población de NGI en refugio, supervivencia de la siguiente generación de NGI y la biología de los mismos (Sangster, 1999). En este último punto, se hace énfasis en que la duración del ciclo biológico y el modo de herencia de la resistencia en NGI pueden tener cierta influencia en la tasa de desarrollo de la resistencia antihelmíntica. Bajo este contexto, se espera

que los Cyathostominos desarrollen resistencia antihelmíntica más rápidamente que otros NGI, como los grandes estróngilos, ya que su ciclo biológico dura en promedio 6 semanas mientras que en grandes estróngilos puede extenderse hasta 40 semanas, dependiendo de la especie (Sangster, 1999; AAEP, 2013).

En el caso de Cyathostominos, la resistencia a bencimidazoles y pirimidinas ha sido ampliamente reportada (Bjørn *et al.*, 1991; Varady *et al.*, 2000; Kaplan *et al.*, 2004; Kuzmina y Kharchenko, 2008; Traversa *et al.*, 2009; Canever *et al.*, 2013). Para las lactonas macrocíclicas, ya se cuenta con diversos reportes de resistencia (Molento *et al.*, 2008; Milillo *et al.*, 2009; Traversa *et al.*, 2009; Näreaho *et al.*, 2011; Canever *et al.*, 2013). En México, se ha reportado un fallo en la eficacia del tratamiento con ivermectina y la existencia de indicios de resistencia a la misma por parte de Cyathostominos, observándose en aquellos ranchos que utilizaban frecuentemente IVM (>4 veces/año) (Rosado-Aguilar *et al.*, 2014).

2.6 Alternativas de control: uso de extractos de plantas con actividad antihelmíntica.

La necesidad de encontrar alternativas para el control de los nematodos que puedan reducir el uso de antihelmínticos y el desarrollo de resistencia es reconocida internacionalmente (Moreno *et al.*, 2010). Se menciona que diversas plantas contienen componentes químicos naturales que, de algún modo, pueden inhibir a los parásitos y beneficiar así al huésped (Messent *et al.*, 2012).

Se han probado extractos de plantas con propiedades antihelmínticas principalmente en nematodos de ovinos y caprinos. Hoste *et al.* (2015) mencionan que el resultado de diversas investigaciones en pequeños rumiantes, han demostrado una reducción significativa del conteo de huevos en heces, esto al utilizar determinados pastos con diferentes leguminosas. Esto último ha sido la base para la exploración y búsqueda de plantas que contienen metabolitos secundarios con propiedades fitoterapéuticas y/o nutracéuticas contra NGI de pequeños rumiantes. Hernández-Villegas *et al.* (2011) evaluaron el extracto de las hojas de *Phytolacca icosandra*, la cual pertenece a la misma familia que *Petiveria*

alliacea, con diferentes polaridades contra huevos de *Haemonchus contortus* utilizado como solventes etanol, n-hexano y diclorometano. En la prueba de inhibición de la eclosión, se observó un porcentaje de inhibición de la eclosión (PIE) superior al 90% con los extractos disueltos con etanol y diclorometano a concentraciones de 900 µg/mL o mayores. El extracto disuelto con n-hexano no mostró inhibición de la eclosión en ninguna concentración evaluada.

En el caso de nematodos de equinos, solo existen dos reportes sobre el uso de plantas con propiedades antihelmínticas contra Cyathostominae. Payne *et al.* (2013) evaluaron *in vitro* extractos crudos (acuosos) de 37 plantas nativas de Australia a una concentración de 1400µg/mL obteniendo 100% de inhibición del desarrollo larval con 7 plantas: *Acacia baileyana*, *A. melanoxylon*, *A. podalyriifolia*, *Eucalyptus gomphocephala*, *Alectryon oleifolius*, *Santalum spicatum* y *Duboisia hopwoodii*. A excepción de *A. melanoxylon* y *D. hopwoodii*, en las demás plantas se le atribuyó el efecto antihelmíntico a la presencia de taninos. La actividad antihelmíntica de las plantas evaluadas se midió como el número de larvas L₃ que lograron eclosionar tras el tiempo de exposición (48 horas a 27°C). Sin embargo, y a pesar de utilizar el término inhibición del desarrollo larval, no se hace mención acerca del efecto obtenido sobre los huevos no eclosionados; esto es, si se quedaron en fase de mórula o si las larvas L₁ se desarrollaron y no eclosionaron como ocurre con otros nematodos, por ejemplo *H. contortus*. Posteriormente, las 7 plantas mencionadas anteriormente fueron evaluadas nuevamente a concentraciones de 1400µg, 700µg, 300µg y 150µg por mL, para obtener las concentraciones letales al 50% (CL₅₀). Se observó un rango de CL₅₀ de 30.9 a 196 µg/ml. *D. hopwoodii* y *A. oleifolius* fueron las plantas con las menores CL₅₀ con 30.9 µg/mL y 47.2 µg/mL, respectivamente. En 2015, Peachey *et al.* evaluaron extractos crudos (metanólicos) de cinco plantas de Etiopía y cuatro del Reino Unido a concentraciones de 1900 µg/mL mediante la técnica de inhibición de la eclosión, observando PIE de 100%, 96.4% y 93.4% para *Allium sativum*, *Acacia nilotica* y *Cucumis prophetarum*, respectivamente. Es dicho estudio no se menciona el efecto antihelmíntico sobre los huevos no eclosionados. Las CL₅₀ obtenidas fueron las siguientes: 200 µg/mL y 1100 µg/mL para *Acacia nilotic*,

Cucumis prophetarum y *Rumex abyssinicus*, respectivamente (plantas provenientes de Etiopía). En el caso de las plantas del Reino Unido, se observaron CL50 de 900 µg/mL, 1000 µg/mL, 2000 µg/mL y 2300 µg/mL para *Zingiber officinale*, *Allium sativum* y *Chenopodium álbum*, respectivamente.

Los principales efectos antihelmínticos reportados con el uso de extractos de plantas son el efecto ovicida y larvas L₁ que fallan la eclosión (Vargas-Magaña *et al.*, 2014; Chan-Pérez *et al.*, 2016). Se conoce como efecto ovicida a la inhibición del desarrollo larval, es decir, los huevos expuestos a los extractos se quedaban en la fase de mórula y las larvas L₁ no llegan a desarrollarse. Esto puede deberse al tamaño pequeño de los metabolitos secundarios presentes en el extracto, lo que les permite entrar al huevo y ocasionar dicho efecto ovicida (Souza *et al.*, 2008). Este mecanismo de acción es característico de los bencimidazoles (Robinson *et al.*, 2004). Vargas-Magaña *et al.* (2014) describió por primera vez la formación de larvas L₁ de *H. contortus* sin la eclosión de las mismas ni la ruptura de los huevos utilizando extractos acetona/agua (70:30). Este concepto ha sido definido como “larvas que fallan la eclosión”. Vargas-Magaña *et al.*, (2014) explica los posibles mecanismos por los cuales los metabolitos secundarios de las plantas logran inhibir la eclosión de los huevos larvados, dentro de los se encuentran:

- 1) “Evitando cambios en la permeabilidad de los huevos tratados. Los metabolitos secundarios podrían unirse a componentes de la membrana del huevo y envolverlo, evitando el cambio de permeabilidad requerido para la eclosión” (Perry, 2000).
- 2) “Inhibición de las enzimas de eclosión. Molan *et al.* (2010) sugieren que los compuestos secundarios pueden unirse a las enzimas encargadas de la eclosión, lo que puede bloquear la acción de las mismas en la degradación de la membrana del huevo. De igual forma, Rogers y Brooks (1977) mencionan que la inactivación de dichas enzimas puede resultar en la reducción de la velocidad de eclosión o incluso detener totalmente este proceso”.

3) “Competencia con los receptos de factores de eclosión presentes en la membrana de los huevos tratados. Se proponen mecanismos de señalización para que el proceso de eclosión pueda ser llevado a cabo, esto es, la implicación de una interacción receptor-ligando entre las lipoproteínas presentes en la membrana del huevo, así como la presencia de enzimas como mediadores de esta interacción. Es posible que los metabolitos secundarios se unan competitivamente a factores de la eclosión del huevo y ocasionar un retraso o inhibición en el proceso” (Doncaster y Shepherd, 1967; Perry, 2000).

2.7 Actividad biológica de *Diospyros anisandra*.

Diospyros anisandra S.F. Blake es un árbol o arbusto perteneciente a la familia Ebenaceae, cuyo nombre común es *K'aakalche'* o *Kakal'che* en lengua maya. A nivel nacional, se encuentra distribuida en toda la Península de Yucatán. Puede medir hasta 7 metros de altura, de ramas dimórficas, hojas y flores (de 4-5 pétalos, color blanco crema o amarillo pálido) dispuestas en racimos cortos, con frutos redondos (1 cm de diámetro aproximadamente). Se reporta su uso como madera para la elaboración de instrumentos, es una planta melífera y su fruto es comestible (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003).



Fig. 3. *Diospyros anisandra*: a) hojas y ramas; b) flores y c) frutos. ([http://chalk.richmond.edu/flora-kaxil-kiuic/d/diospyros anisandra.html](http://chalk.richmond.edu/flora-kaxil-kiuic/d/diospyros_anisandra.html)).

Las propiedades biológicas de las plantas del género *Diospyros* L. han sido atribuidas a la presencia de una serie de triterpenos pentacíclicos (1,4)

naftoquinonas, cumarinas y flavonoides (Adeniyi *et al.*, 2000; Ganapaty *et al.*, 2004). Borges-Argáez *et al.* (2007) encontraron estructuras similares a agujas con coloración naranja al evaluar la partición hexánica del extracto metanólico de la corteza proveniente de *D. anisandra* contra diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Al realizar un análisis y comparar sus datos espectrales con los reportados en la literatura dichas estructuras fueron identificadas como plumbagina. Uc-Cachón *et al.* (2012) identificó 14 compuestos con actividad biológica reportada en la partición hexánica del extracto metanólico de la corteza de *D. anisandra*, los cuales incluían siete naftoquinonas, cuatro triterpenos y tres sesquiterpenos. Los compuestos con mayor reporte de actividad biológica en *D. anisandra* son las naftoquinonas, destacando la plumbagina. Ésta última se encuentra en las hojas, corteza y raíces de *D. anisandra* y se le atribuyen propiedades antiespasmódicas, antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias (antiprotozoarias) y anticancerígenas. También se ha reportado la actividad ixodocida de la hoja y corteza de *D. anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus microplus*, con mortalidades obtenidas de 84.91% y 79.24%, respectivamente (Rosado-Aguilar *et al.*, 2008).

Arjona-Cambranes *et al.* (2016) evaluaron extractos de corteza y hoja *D. anisandra* colectados en época de lluvias y secas contra huevos de *Ancylostoma* spp, encontrando PIE superiores al 95% a partir de la concentración de 2400 µg/ml para los extractos colectados tanto en época de lluvias como secas. Las menores CL₅₀ se obtuvieron con los extractos colectados en época de lluvias: 500 µg/ml y 700 µg/mL para corteza y hoja, respectivamente. Se observó que el principal efecto obtenido con los extractos de *D. anisandra* fue la inhibición de la embrionación de los huevos de *Ancylostoma* spp.

2.8 Actividad biológica de *Petiveria alliacea*.

Petiveria alliacea es una planta perteneciente a la familia Phytolaccaceae, conocida comúnmente como zorrillo silvestre o payche, es considerada maleza o una planta plaga. Se reconoce como una hierba hasta de 1m de altura con olor penetrante a zorrillo. Las hojas tienen pequeños brotes verde oscuro, sus flores

son blancas y se encuentran a lo largo de las ramas terminales. Los frutos son de color verdoso a pardo oscuro. Se encuentra distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).



Fig. 4. Imágenes de *P. alliacea*. Se observan las características de las hojas y las flores (<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/phytolaccaceae/petiveria-alliacea/fichas/pagina1.htm>).

En la medicina tradicional, esta planta es utilizada para el tratamiento de reumatismo, sinusitis, gripa, dolor de muelas, entre otros usos. También se reporta que posee actividad biológica como diurético, antiespasmódico, anti-inflamatorio, antipirético, antibacteriano e insecticida vegetal (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Varios compuestos biológicamente activos han logrado ser aislados de *P. alliacea*, entre ellos se encuentran esteroides, terpenoides, saponinas, polifenoles, taninos, flavonoides, cumarinas y alcaloides (De Sousa *et al.*, 1990; Benavides *et al.*, 2001; Araujo-Luz *et al.*, 2016). Rosado-Aguilar *et al.* (2010) y Arceo-Medina *et al.* (2017) identificaron y comprobaron la actividad acaricida contra larvas y adultas de *R. microplus* de dos compuestos sulfurados (Dibencildisulfuro y Dibenciltrisulfuro) que se encuentran en el tallo y la hoja de *P. alliacea*. También se ha reconocido un aceite esencial, denominado petiverina y al cual se le confiere gran parte de la actividad biológica de la planta. Este último compuesto se encuentra en

concentraciones superiores en el tallo a comparación de la hoja (Sariego-Frómata *et al.*, 2013).

Arjona-Cambranes *et al.* (2016) observaron PIE superiores a 98% utilizando extractos metanólicos de *P. alliacea* a concentraciones de 600 µg/mL contra huevos de *Ancylostoma* spp, independientemente de la estructura de origen y época de colecta del extracto. Se observó que las larvas L₁ se formaron dentro de los huevos, pero éstas no eclosionaron. El extracto metanólico de *P. alliacea* también ha sido probado contra *Haemochus* spp y *Trichostrongylus* spp en bovinos, obteniéndose un 100% de inhibición de la eclosión a concentraciones de 3600 µg/mL (Rosado-Aguilar *et al.*, 2016).

2.9 Variación en la concentración de compuestos activos de acuerdo a la época de colecta.

Sharapin *et al.* (2000) menciona que existen diversos factores intrínsecos y extrínsecos que pueden provocar que la cantidad y naturaleza de los constituyentes químicos presentes en las plantas varíen de manera considerable. Los factores intrínsecos son aquellos que tienen que ver con la planta en sí, por ejemplo, la ontogenia y fenología. Dentro de los factores extrínsecos se encuentra altitud y latitud, temperatura, humedad y radiación, entre otros.

Se ha demostrado que las condiciones ambientales y la variabilidad estacional pueden influir en el incremento o reducción de la síntesis de compuestos secundarios y, por tanto, su concentración, además de potenciar o disminuir su actividad biológica (Chaves *et al.*, 2001). Gazim *et al.* (2010) estudiaron la variación estacional de la concentración y la composición química del aceite esencial de las hojas frescas de *Tetradenia riparia* y observaron que las máximas concentraciones se encontraron en invierno y las mínimas en primavera, de igual manera, al analizar los principales contenidos en el aceite esencial encontraron una alta variabilidad química entre las diferentes estaciones. Chaves *et al.* (2001) encontraron que la concentración de fenoles varía en el extracto de *Cistus iandanifer* en relación con la época y está influenciada por factores como la

radiación y estrés hídrico, observando que existía mayor concentración de fenoles durante la primavera.

Arceo-Medina *et al.* (2017) observó mayor actividad ixodícida con el extracto metanólico de tallo de *P. alliacea* colectado en época de secas sobre larvas de *R. microplus*. Este efecto fue atribuido a los factores climáticos presentes en las épocas de colecta de las plantas. La baja disponibilidad de agua juega un papel importante en la concentración de metabolitos secundarios en las plantas, al ejercer estrés biótico sobre ellas, las plantas producirán una mayor o menor concentración de metabolitos para su protección, lo cual puede dar origen a la variación en la actividad acaricida (Chaves *et al.*, 2001). Santacoloma *et al.* (2010) mencionan que la falta de agua contribuye a que las plantas cierren sus estomas y restrinjan el proceso de fotosíntesis, en tales condiciones carbohidratos no estructurales tienden a ser acumulados y pueden explicar el aumento de síntesis de sustancias de defensa pertenecientes al metabolismo secundario.

Sin embargo, en el caso de la actividad antihelmíntica, estudios realizados por Arjona-Cambranes *et al.* (2016) y Rosado-Aguilar *et al.* (2016), encontraron mayor actividad antihelmíntica contra *Ancylostoma* spp. y NGI de bovinos (*Haemonchus* spp y *Trichostrongylus* spp) utilizando extractos de *D. anisandra* y *P. alliacea* colectados en época de lluvias. Esto podría deberse a que las composiciones y concentraciones de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antihelmíntica son diferentes a los responsables de la actividad ixodícida.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

- Evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos metanólicos de *Diospyros anisandra* y *Petiveria alliacea* sobre huevos de Cyathostominos.

3.2. Objetivos específicos.

- Evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos metanólicos de la hoja y corteza de *Diospyros anisandra*, colectados en época de lluvias y secas, sobre el desarrollo larval y eclosión de huevos de Cyathostominos.
- Evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos metanólicos de la hoja y tallo de *Petiveria alliacea*, colectados en época de lluvias y secas, sobre el desarrollo larval y eclosión de huevos de Cyathostominos.

4. HIPÓTESIS.

- Los extractos metanólicos de *Diospyros anisandra* y *Petiveria alliacea* tienen actividad antihelmíntica *in vitro* sobre el desarrollo larval y la eclosión de huevos de Cyathostominos.

5. REFERENCIAS.

Adeniyi, B., Robert, M., Chai, H., Fong, H. 2000. *In vitro* cytotoxicity activity of diosquinone, a naphthoquinone epoxide. *Phytother. Res.* 17: 282-284.

American Association of Equine Practitioners. 2013. Parasite Control Guidelines. Disponible en: <http://www.aaep.org/images/files/ParasiteControlGuidelinesFinal.pdf>.

Anderson, R.C. 2000. Nematode parasites of vertebrates. Their Development and Transmission. 2nd Edition. Ed. CABI Publishing, Ontario, Canada.

Arceo-Medina, G.N., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Méndez-González M., Borges-Argaez, R., Cáceres-Farfán, M., Tamayo-Díaz, M.L. 2017. Effect of season and sampling location on acaricidal activity of *Petiveria alliacea* on larvae of *Rhipicephalus microplus* resistant to acaricides. *Vet. Med. Allied Sci.* 1(1): 1-7.

Araujo-Luz, D., Miranda-Pinheiro, A., Lopes-Silva, M., Chagas-Monteiro, M., Prediger, R.D., Ferraez-Maia, C.S., Fontes-Júnior, E.A. 2016. Ethnobotany, phytochemistry and neuropharmacological effects of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae): A review. *J. Ethnopharmacol.* 185(5): 182-201.

Arjona-Cambranes, K.A., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Ortega-Pacheco, A., Flota-Burgos, G.J. 2016. Actividad antihelmíntica in vitro de extractos vegetales contra huevos de *Ancylostoma* spp. de perros. IV Seminario Internacional y V Nacional de Investigadores en salud y producción animal. 11-13 de Octubre. Tunja, Colombia.

Arellano-Rodríguez, J.A., Flores-Guido, J.S., Tun-Garrido, J., Cruz-Bojórquez, M.M. 2003. Etnoflora Yucatanense: nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán (Fascículo 20). Universidad Autónoma de Yucatán.

Bahuad, D., Martínez-Ortiz de Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H. 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology*. 132 (4): 545-554.

Benavides, P.J.C., Young, M.C.M., Giesbrecht, A.M., 2001. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. *Phytochemistry* 57: 743-747.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Universidad Nacional Autónoma de Yucatán. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7970>

Bliss, D.H. 2007. The control of Gastro-Intestinal nematode parasites in horses with emphasis on reducing environment contamination: A new control strategy for an old problem. *Equine Parasitology section*. Mid America Agricultural Research.

Bjørn, H., Sommer, C., Schougard, H., Henriksen, S.A., Nansen, P. 1991. Resistance to benzimidazole anthelmintics in small strongyles (Cyathostominae) of horses in Denmark. *Acta. Vet. Scand.* 32, 253-260.

Borges-Argáez, R., Canché-Chay, C.I., Peña-Rodríguez, L.M., Said-Fernández, S., Molina-Salinas, G.M. 2007. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia*. 78: 370-372.

Bowman, D.D. 2009. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 9th Edition. Ed. Saunders-Elsevier. Philadelphia.

Canever, R.J., Braga, P.R.C., Boeckh, A., Grycajuck, M., Bier, D., Molento, M.B., 2013. Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Vet. Parasitol.* 194, 35-39.

Chan-Pérez, J.I., Torres-Acosta, J.F.J, Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Castañeda-Ramírez, G.S., Vilarem, G., Mathieu, C., 2014. In vitro susceptibility of

ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone: water extracts of two tannin rich plants. *Vet. Parasitol.* 217:53-60.

Chaves, N., Sosa T., Escudero J.C., 2001. Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. *J. Chem. Ecol.* 27: 623-631.

Colahan, P., Mayhew, G., Merrit, M., Moore, N. 1998. *Medicina y cirugía equina*. 4ª Edición. Ed. Intermedica. Buenos Aires, Argentina.

Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 136: 167-185.

Cordero del Campillo, M., Rojo, F.A., Martínez, A.R., Sánchez, M.C., Hernández, S., Navarrete, I., Diez, P., Quiroz, H., Carvalho, M. *Parasitología Veterinaria*. 1ª edición. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España.

De Sousa, J., Demuner, A., Pinheiro, J., Breit Maier, E., Cassels, B., 1990. dibenzyltrisulphide and trans-N-methyl-4-methoxyproline from *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry* 29: 3653-3655.

Doncaster, C.C., Shepherd, A.M. 1967. The behaviour of second-stage *Heterodera rostochiensis* larvae leading to their emergence from the eggs. *Nematologica* 13: 476-478.

Fusé, L. A., Saumell, C.A., Rodríguez, H.O., Passucci, J. 1999. Epidemiología y control de endoparásitos en potrancas criollas. *Revista de Medicina Veterinaria*. 83(4): 154-158.

Ganapaty, S., Steve, P.T., Fotso, S., Laatsch, H. 2004. Antitermitic quinones from *Diospyros sylvatica*. *Phytochemistry*. 65: 1265-1271.

Gazim, Z.G., Amorim, A.C.L., Hovell, A.M.C, Moraes, R.C., Ansilieiro, N., Alves, F.G, Garcia C.D. 2010. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic

and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. *Molecules* 15: 5509-5524.

Hernández-Villegas, M.M., Borges-Argaez, R., Rodriguez-Vivas, R.I., Torres-Acosta, J.F., Mendez-Gonzalez, M., Caceres-Farfan, M. 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 179: 100-106.

Hinney, B., Wirtherle, N.C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K.H., Clausen, P.H. 2011. Prevalence of helminths in horses in the state of Branderburg, Germany. *Parasitol Res.* 108: 1083-1091.

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvadini, H., Thamsborg, S.M., Terril, T.H. 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Vet. Parasitol.* 212: 5-17.

Kaplan, R. M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* 20:477-481.

Kaplan, R.M., Klei, T.R., Lyons, E.T., Lester, G., Courtney, C.H., French, D.D., Tolliver, S.C., Vidyashankar, A.N., Zhao, Y., 2004. Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 225, 903-910.

Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: globalworming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186: 70-78.

Kassai, T., Cordero del Campillo, M., Euzeby, J., Gaafar, S., Hiepe, Th., Himonas, C.A., 1988. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOPAD). *Vet. Parasitol.* 29: 299-326.

Kornás, S., Skalska, M., Nowosad, B., Gawor, J., Kharchenko, V., Cabaret, J. 2009. Occurrence of *Strongylus* (Strongylidae) in horses from small farms on the basis of necropsy. *Pol. J. Vet. Sci.* 12: 225-30.

Kuzmina, T.A., Kharchenko, V.O., 2008. Anthelmintic resistance in cyathostomins of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on strongylid community structure. *Vet. Parasitol.* 154: 277-288.

Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V., Dvojnos, G.M. 2008. Illustrated identification keys to strongylid parasites (strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Vet. Parasitol.* 156: 4-161.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Kuzmina, T.A., Collins, S.S., 2011. Further evaluation in field tests of the activity of three anthelmintics (fenbendazole, oxbendazole, and pyrantel pamoate) against the ascarid *Parascaris equorum* in horse foals on eight farms in Central Kentucky (2009–2010). *Parasitol. Res.* 109, 1193-1197.

Matthews, J.B. 2014. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *Int. J. Parasitol.* 4(3): 310-315.

McKellar, Q.A., Jackson, F. 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol.* 20: 456-461.

Messent, P.R.; Salas, A. y Vilaseca, L. 2012. Parasitosis intestinales del perro y el uso de hierbas en la dieta. *Advance Research Reports*. Disponible en: https://www.affinity-petcare.com/veterinary/sites/default/files/parasitosis_intestinales_perro_y_uso_hierbas.pdf

Milillo, P., Boeckh, A., Cobb, R., Otranto, D., Lia, R.P., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Bartolini, R., Traversa, D., 2009. Faecal cyathostomin egg count distribution and efficacy of anthelmintics against cyathostomins in Italy: a matter of geography? *Parasit. Vectors* 2 (Suppl. 2), S4.

Molan, A.L., Faraj, A.M. 2010. The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: trichostrongylidae). *Fol. Parasitol.* 57: 62-68.

Molento, M.B., Antunes, J., Novak-Bentes, R., Coles, G.C. 2008. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet. Rec.* 162 (12):384-385.

Morales, B.A.A, Bello, H., Vallejo, M., Villoria, D. 2012. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en caballos pura sangre de carrera (*Equus caballus*) durante el periodo de cuarentena 2011 en el Hipódromo La Rinconada, Caracas, Venezuela. *Neotrop. Helminthol.* 6(1): 115 - 119.

Moreno, F.C., Gordon, I.J., Wright, A.D., Benvenuti, M.A., Saumell, C.A. 2010. Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 42 (3):155-163.

Muñoz, J.E. 1997. Identificación y descripción de parásitos gastrointestinales de equinos en el estado de Yucatán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México.

Näreaho, A., Vainio, K., Oksanen, A., 2011. Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. *Vet. Parasitol.* 182, 372-377.

Nielsen, N. K. 2012. Sustainable equine parasite control: Perspectives and research needs. *Vet. Parasitol.* 185: 32-44.

Payne, S.E., Kotze, A.C., Durmic, Z., Vercoe, P.E. 2013. Australian plants show anthelmintic activity toward equine cyathostomins *in vitro*. *Vet. Parasitol.* 196:153-160.

Peachey, L.E., Pinchbeck, G.L., Matthews, J.B., Burden, F.A., Mulugeta, G., Scantlebury, C.E., Hodgkinson, J.E. 2015. An evidence-based approach to the evaluation of ethnoveterinary medicines against strongyle nematodes of equids. *Vet. Parasitol.* 210: 40-52.

Pereira, J.R., Vianna, S.S. 2006. Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 140: 289-295.

Perry, R.N., 2002. Hatching. In: Donald, L. (Ed.), The Biology of Nematodes. Taylor and Francis. London and New York. pp. 147–169.

Prada, G.A. 2002. Determinación de resistencia antihelmíntica de nematodos gastrointestinales del equino frente a lactonas macrocíclicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Prada, G.A., Romero C.S. 2009. Determinación de géneros de endoparásitos que afectan a los equinos de las sabanas del Casanare. Revista de Medicina Veterinaria. 18: 71- 79. Tomado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012293542009000200007&script=sci_art_text.

Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I., 2004. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. J. Mol. Graph. Model. 23: 257-284.

Rogers, W.P., Brooks, F. 1977. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. Int. J. Parasitol. 7: 61-65.

Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Borgez-Argaez, R., García-Vázquez, Z., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., Dorantes-Euán, A. 2008. Actividad ixodocida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilis) microplus* (Acari: ixodidae). Trop. Subtrop. Agroecosyt. 8(3): 297-301.

Rosado, A.J.A., Aguilar, C.A.J., Rodríguez, V.R.I., Borges, A.R., García, V.Z., Méndez, G.M. 2010b. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). Vet. Parasitol. 168: 299-303.

Rosado-Aguilar, J.A., Flota-Burgos, G.J., Rojas-Becerril, R., Trinidad-Martínez, I. 2014. Frequency and ivermectin resistance of gastrointestinal nematodes in equine farms from Mexico. 13th International Congress of Parasitology. 10-15 August. Mexico.

Rosado-Aguilar J.A., Arjona-Cambranes K., Flota-Burgos G.J., Rodríguez-Vivas R.I., 2016. Actividad antihelmíntica de extractos metanólicos contra huevos del orden Strongylida de bovinos. IV Seminario Internacional y V Nacional de Investigadores en Salud y Producción animal SENISPA. 11, 12 y 13 Octubre. Tunja, Colombia.

Sangster, N.C. 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? Vet. Parasitol. 85: 189-204.

Santacoloma V.L., Granados, E., 2010. Evaluación del contenido de metabolitos secundarios en dos especies de plantas forrajeras encontradas en dos pisos térmicos de Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental 1:31-35.

Sariego-Frómeta, S., Marin-Morán, J. E., Ochoa-Pachecho, A., Viera-Tamayo, Y. 2013. *Petiveria alliacea* L.: distintas condiciones experimentales en la elaboración de extractos con actividad antimicrobiana. Revista QuímicaViva. 3(12): 274-287.

Sharapin, N., Machado, R.L., Souza, C.E., Rocha, A.E., Valverde, M.E., Lopes, A.J., 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. CYTED. Bogotá Colombia. Pp 27-39

Souza, M., Belvi, C., Morais, S.M., Costa, C., Silva, A., Braz-filho, R. 2008. Anthelmintic acetogenin from *Annona Squamosa* L. Seed. Anais. Acad. Brasil. Ciên. 80: 271-277.

Taylor, M.A., Coop, R.L, Wall, R.L. 2007. Veterinary Parasitology. 3th Edition. Ed. Blackwell, USA.

Traversa, D., Castagna, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Meloni, S., Bartolini, R., Geurden, T., Pearce, M.C., Woringer, E., Besognet, B., Milillo, P., D'Espois, M., 2012. Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. Vet. Parasitol. 188, 294-300.

Uc-Cachón, A.H., Borges-Argáez, R., Said-Fernández, S., Vargas-Villareal, J., González-Salazar, F., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., Molina-Salinas,

G.M. 2014. Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent activity against pan-resistant first-line drugs *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 27: 114-120.

Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. 2006. *Veterinary Parasitology*. 2nd edition, Ed. Blackwell Science, Scotland.

Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Chan-Pérez, J.I. 2014. Anthelmintic activity of acetone–water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Vet. Parasitol.* 206: 322-327.

Valdez, M.P., Hernández, M., Galindo, L., Alonso, M.A. 2006. Gastrointestinal parasite burden, body condition and hematological values in equines in the humid tropical areas of Mexico. *Fifth International Colloquium on Working Equines*, Addis Ababa, Ethiopia. 45(2): 603-607.

Varady, M., Konigova, A., Corba, J., 2000. Benzimidazole resistance in equine cyathostomes in Slovakia. *Vet. Parasitol.* 94, 67–74.

von Samson-Himmelstjerna, G. 2012. Anthelmintic resistance in equine parasites – detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet. Parasitol.* 185:2-8. Doi: 10.1016/j.vetpar.2011.10.010.

Parasitology

Manuscript Draft

Manuscript Number: Vetpar-D-17-11573

Title: Anthelmintic activity of methanol extracts of *Diospyros anisandra* and *Petiveria alliacea* on cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) larval development and egg hatching

Article Type: Research paper

Keywords: Anthelmintic activity, cyathostomins, *Diospyros anisandra*, *Petiveria alliacea*, extracts, horses.

Corresponding Author: Dr. Jose Alberto Rosado-Aguilar, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Yucatan

First Author: Gabriela J Flota-Burgos, MVZ

Order of Authors: Gabriela J Flota-Burgos, MVZ; Jose Alberto Rosado-Aguilar, PhD; Roger I Rodríguez-Vivas, PhD; Karen A Arjona-Cambranes, MVZ

Abstract: Methanol extracts of plant structures are promising alternatives to traditional pharmaceutical anthelmintic treatments. An in vitro evaluation was done of how methanol extracts of *Diospyros anisandra* bark and leaves, and *Petiveria alliacea* stems and leaves, collected during the rainy and dry seasons, effected cyathostomin larval development and egg hatching. Seven concentrations (600, 300, 150, 75, 37.5, 18.7 and 9.3 µg/ml) were tested using the egg hatch assay. An ANOVA was applied to identify differences between the concentrations and the controls. Fifty percent lethal concentration (LC50) and the 95% confidence interval were calculated with a probit analysis. At and above 37.5 µg/ml, the *D. anisandra* bark extracts from both seasons exhibited ≥95% egg hatch inhibition (EHI), while the *D. anisandra* leaf extracts had >90% EHI at and above 75 µg/ml. For *P. alliacea*, the extracts from leaves and stems from either season exhibited >97% EHI at and above 300 µg/ml, although similar efficacy was also observed at lower concentrations with the rainy season stems (75 µg/ml) and leaves (150 µg/ml). Values for LC50 were lowest for the rainy season *D. anisandra* bark (10.2 µg/ml) and leaf extracts (18.4 µg/ml), followed by the rainy season *P. alliacea* stems extract (28.2 µg/ml). In the *D. anisandra* extracts, EHI was largely due to its ovicidal activity (≥96% beginning at 37.5 µg/ml), whereas in the *P. alliacea* extracts it was due to L1 larval hatch failure (≥90% beginning at 75 µg/ml). Overall, the rainy season *D. anisandra* bark extracts had a strong in vitro anthelmintic effect against cyathostomins by inhibiting larval development, and the rainy season *P. alliacea* stem extracts had a strong effect by preventing egg hatching. Both are possible control alternatives for these nematodes.

De: VETPAR <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Fecha: 15 de agosto de 2017, 05:53:24 GMT-5
Para: alberto.rosadoaguilar@gmail.com, ja.rosado@correo.uady.mx
Asunto: Vetpar-D-17-11573 Revision Requested
Responder a: VETPAR <vetpar@elsevier.com>

Ms. No. Vetpar-D-17-11573

Anthelmintic activity of methanol extracts of *Diospyros anisandra* and *Petiveria alliacea* on cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) larval development and egg hatching
Veterinary Parasitology

Dear Dr. Rosado-Aguilar,

I can now inform you that the Editorial Board has evaluated your manuscript. The Editor has advised that the manuscript will be reconsidered for publication after moderate revision.

The comments listed below should be taken into account when revising the manuscript. Along with your revision, you will need to supply a response letter ('Revision Note'), which is a thorough, detailed response to the referees' comments, specifically noting each comment made by the referees and/or Editor, and describing all changes. Should you disagree with any comment(s), please explain why.

Please submit your revision online by logging onto the Elsevier Editorial System for Veterinary Parasitology using the following combination:

<https://ees.elsevier.com/vetpar/>

Your username is: alberto.rosadoaguilar@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/VETPAR/automail_query.asp.

You will find your submission record under the menu item, 'Submissions Needing Revision'.

We are introducing the VIRTUAL MICROSCOPE, an exciting new feature that enables authors to add detailed microscopic images to their papers and enables users to view the images at their highest resolution. For more information about this feature, please see:

<http://www.elsevier.com/about/content-innovation/virtual-microscope>

In case your article contains microscopic images, you are invited to use this Virtual Microscope feature for your paper. For use of the Virtual Microscope or any related questions, please contact virtualmicroscope@elsevier.com. In your email, please include [Ms.Ref.No Vetpar-D-17-11573](#)

We are looking forward to receiving the revised submission.

With kind regards,

Martin K. Nielsen, DVM, PhD, DipACVM
Co-Editor in Chief
Veterinary Parasitology

1 **ARTÍCULO ENVIADO A LA REVISTA VETERINARY PARASITOLOGY**

2 **Anthelmintic activity of methanol extracts of *Diospyros anisandra* and**
3 ***Petiveria alliacea* on cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) larval**
4 **development and egg hatching.**

5 G.J. Flota-Burgos^a, J.A. Rosado-Aguilar^{a*}, R.I. Rodríguez-Vivas^a, K.A. Arjona-
6 Cambranes^a.

7 a: Departamento de Salud Animal y Salud Pública, Facultad de Medicina
8 Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5 carretera
9 Mérida-Xmatkuil, CP 97100 Mérida, Yucatán, México.

10

11

12

13

14

15

16

17 ***Corresponding author:** FMVZ-UADY, Km 15.5 carretera Mérida- Xmatkuil,
18 Mérida, Yucatán, México. Tel.: +52 9999 42 32 00; fax: +52 9999 42 32 05. *E-mail*
19 *address:* alberto.rosadoaguilar@gmail.com (J.A. Rosado-Aguilar)

20 **Abstract**

21 Methanol extracts of plant structures are promising alternatives to traditional
22 pharmaceutical anthelmintic treatments. An *in vitro* evaluation was done of how
23 methanol extracts of *Diospyros anisandra* bark and leaves, and *Petiveria alliacea*
24 stems and leaves, collected during the rainy and dry seasons, effected
25 cyathostomin larval development and egg hatching. Seven concentrations (600,
26 300, 150, 75, 37.5, 18.7 and 9.3 µg/ml) were tested using the egg hatch assay. An
27 ANOVA was applied to identify differences between the concentrations and the
28 controls. Fifty percent lethal concentration (LC₅₀) and the 95% confidence interval
29 were calculated with a probit analysis. At and above 37.5 µg/ml, the *D. anisandra*
30 bark extracts from both seasons exhibited ≥95% egg hatch inhibition (EHI), while
31 the *D. anisandra* leaf extracts had >90% EHI at and above 75 µg/ml. For *P.*
32 *alliacea*, the extracts from leaves and stems from either season exhibited >97%
33 EHI at and above 300 µg/ml, although similar efficacy was also observed at lower
34 concentrations with the rainy season stems (75 µg/ml) and leaves (150 µg/ml).
35 Values for LC₅₀ were lowest for the rainy season *D. anisandra* bark (10.2 µg/ml)
36 and leaf extracts (18.4 µg/ml), followed by the rainy season *P. alliacea* stems
37 extract (28.2 µg/ml). In the *D. anisandra* extracts, EHI was largely due to its
38 ovicidal activity (≥96% beginning at 37.5 µg/ml), whereas in the *P. alliacea* extracts
39 it was due to L₁ larval hatch failure (≥90% beginning at 75 µg/ml). Overall, the rainy
40 season *D. anisandra* bark extracts had a strong in vitro anthelmintic effect against
41 cyathostomins by inhibiting larval development, and the rainy season *P. alliacea*

42 stem extracts had a strong effect by preventing egg hatching. Both are possible
43 control alternatives for these nematodes.

44 **Key words:** Anthelmintic activity, cyathostomins, *Diospyros anisandra*, extracts,
45 horses, *Petiveria alliacea*.

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60 **1. Introduction**

61 Cyathostomins are the most abundant nematodes found in horse species
62 worldwide (Corning, 2009; Kaplan and Vidyashankar, 2012; Matthews, 2014). As
63 such, they constitute one of the most important challenges in horse breeding to
64 animal health, yield and well-being (Urquhart et al., 2006). Prevalences as high as
65 100% have been reported around the world (Pereira and Vianna, 2006; Hinney et
66 al., 2011; Morariu et al., 2016); in Mexico it ranges from 6.4 to 91.8% (Valdez et al.,
67 2006; Rosado-Aguilar et al., 2014).

68 Traditional cyathostomin control programs principally use three families of
69 anthelmintic drugs: benzimidazoles, pyrimidines and macrocyclic lactones.
70 However, frequent use of these drugs has selected for cyathostomins resistant to
71 benzimidazoles and pyrimidines (Kuzmina and Kharchenko, 2008; Traversa et al.,
72 2009; Canever et al., 2013). Reports from around the world have also
73 documented the existence of ivermectin-resistant cyathostomins (Molento et al.,
74 2008; Milillo et al., 2009; Traversa et al., 2009; Näreaho et al., 2011; Rosado-
75 Aguilar et al., 2014). There is a clear need to develop nematode control
76 alternatives that can reduce use of anthelmintic drugs and the consequent
77 creation of resistant nematode strains (Moreno et al., 2010).

78 Plant extracts are a promising alternative since some have proven *in vitro*
79 anthelmintic activity mainly against nematodes in sheep and cattle (Hernández-
80 Villegas et al., 2011). Very few studies have been done on the anthelmintic
81 activity of plant extracts against nematodes in horses. In an *in vitro* study on

82 aqueous extracts from 37 native Australian plants, 100% egg hatch inhibition
83 (EHI) in cyathostomins was observed with *Acacia baileyana*, *A. melanoxylon*,
84 *A. podalyriifolia*, *Eucalyptus gomphocephala*, *Alectryon oleifolius*, *Santalum*
85 *spicatum* and *Duboisia hopwoodii* (Payne et al., 2013). In a study of methanol
86 extracts from five plants from Ethiopia and four from the United Kingdom,
87 cyathostomin EHI was greater than 90% with *Allium sativum*, *Acacia nilotica* and
88 *Cucumis prophetarum* (Peachey et al., 2015). Methanol extracts of *D. anisandra*
89 and *P. alliacea* from Yucatan, Mexico, have been shown to exert highly
90 efficient (>90%) *in vitro* inhibition of larval development in *Ancylostoma* spp.
91 and *Haemonchus* spp. (Arjona-Cambranes et al., 2016; Rosado-Aguilar et al.,
92 2016), nematodes belonging to the same order as the cyathostomins. These plants
93 are endemic to Yucatan, and, similar *in vitro* activity could be determined on
94 cyathostomins. Therefore the aim of this study was to evaluate the *in vitro*
95 anthelmintic activity of methanol extracts of *D. anisandra* and *P. alliacea* on
96 cyathostomin larval development and egg hatching.

97 **2. Materials and methods**

98 **2.1. Study área**

99 The study was done at the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny,
100 Universidad Autónoma de Yucatán (19°30', 21°35' N; 87°30', 90°24' W), in the
101 municipality of Merida, in the state of Yucatan, Mexico. The region is characterized
102 as having a warm sub-humid climate (Aw) with distinct rainy (June-October) and
103 dry (November-May) seasons. Average temperature ranges from 24 to 28 °C,

104 relative humidity is between 65 and 95%, and annual rainfall ranges from 400 to
105 1400 mm (INEGI, 2012).

106 **2.2. Vegetal extracts**

107 Extracts were made from rather than of the bark and leaves of *D. anisandra*, and
108 the stem and leaves of *P. alliacea*. Collection of plant material was done during the
109 rainy and dry seasons. After collection it was dried in an oven at 40 °C for two to
110 three days, and then ground in an electric grinder to reduce particle size to 5 mm
111 (Rosado-Aguilar et al., 2010a). Two 24-h extractions were done of the dried plant
112 material using 30 ml methanol (MeOH) for every 25 g material. After each 24-h
113 period, the methanol was separated from the material by straining through filter
114 paper placed in a glass funnel. The methanol solvent from each extraction was
115 placed in a glass flask, and the solvent eliminated by evaporation at reduced
116 pressure in a rotary evaporator (Rotovapor®, Büchi). The resulting concentrated
117 crude extract was decanted into glass vials and these placed in an extraction hood
118 for 24 h to remove any residual solvent. These were stored at 4 °C until analysis
119 (Rosado-Aguilar et al., 2008).

120 **2.3. Cyathostomin egg production**

121 Feces from a naturally-infected horse were collected and the McMaster technique
122 was used to quantify the number of eggs per gram of feces (hpg) (Rodríguez-Vivas
123 and Cob-Galera, 2005). The feces were macerated in purified water at a ratio of 50
124 g feces to 100 ml water. The resulting mixture was filtered through gauze, the
125 filtrate placed in 15 ml plastic tubes and centrifuged at 1000 g for 5 minutes. After

126 discarding the supernatant in each tube, a saturated sugar solution (1.280 density)
127 was added to the sediment. This mixture was homogenized with a vortex and
128 again centrifuged. The superficial portion (the eggs) in each tube was recovered
129 using an inoculation loop and placed in a 15 ml tube containing phosphate buffer
130 solution (PBS). The eggs were washed three times to remove the sugar solution
131 and resuspended in PBS. Egg concentration in the PBS/egg mixture was
132 estimated (eggs/ml) and the mixture diluted to a 200 eggs/ml concentration (Chan-
133 Pérez et al., 2016). Cultures were also done to produce L3 larvae for
134 morphological identification (Cordero del Campillo et al., 1999; Zajac and Conboy,
135 2012).

136 **2.4. Evaluation of vegetal extracts**

137 ***Egg Hatch Assay.*** This test was done following World Association for the
138 Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines (Coles et al., 1992;
139 Coles et al., 2006). Three replicates were done for each of seven concentrations:
140 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.7 and 9.3 µg. Phosphate buffer solution (PBS) was
141 used as negative control and 0.1 µg/ml thiabendazole as positive control. Extracts
142 were diluted with PBS at concentrations mentioned above. Using 48-well plates, 1
143 ml egg solution (approx. 200 eggs) and 1 ml diluted extract were deposited in each
144 well (i.e. 2 ml total content per well). Plates were incubated at 28 °C for 48 h, after
145 which two drops of Lugol's solution were added to each well to halt developmental
146 activity. The bioassay criterion was a >80% hatching rate in the negative control.
147 The contents of each well were placed in a McMaster chamber and examined with
148 a microscope (10x) to count the morulated eggs (ovicidal activity), eggs containing

149 a larva (larvae failing eclosion) and L1 larvae (Vargas-Magaña et al., 2014).
150 Hatching rate and egg hatch inhibition were calculated with the following formula
151 (Peachey et al., 2015):

$$152 \quad \% \text{ hatch} = (L1 / L1 + \text{eggs}) \times 100.$$

$$153 \quad \% \text{ egg hatch inhibition} = 100 - \% \text{ hatch}.$$

154 Ovicidal activity and larvae failing eclosion. Extract effect on larval
155 development (ovicidal activity; OA) was measured based on the number of eggs
156 that did not form larvae. Larvae failing eclosion (LFE) was quantified as the
157 percentage of eggs that formed larvae but did not hatch. Calculation of these rates
158 was done with these formulas (Vargas-Magaña et al., 2014):

$$159 \quad \% \text{ OA} = (\text{morulated eggs} / \text{morulated eggs} + \text{eggs containing a larva} + \text{L1 larvae}) \times$$
$$160 \quad 100.$$

$$161 \quad \% \text{ LFE} = (\text{eggs containing a larva} / \text{morulated eggs} + \text{eggs containing a larva} + \text{L1}$$
$$162 \quad \text{larvae}) \times 100.$$

163 **2.5. Statistical analysis**

164 An ANOVA (generalized linear models) was applied to the results to identify
165 significant differences between the controls and the evaluated extract
166 concentrations; this was done with the Statgraphics 5.1 program (Statgraphics,
167 2001). Fifty-percent lethal concentrations (LC₅₀) and their 95% confidence intervals
168 were calculated with a probit analysis of the concentrations (LeOra Software,
169 2004).

170 3. Results

171 At 75 µg/ml concentration or above, all the evaluated *D. anisandra* extracts
172 exhibited EHI values greater than 90% (Table 1). However, the bark extracts had
173 higher EHI values (≥97.0% beginning at 37.5 µg/ml, regardless of collection
174 season) than the leaf extracts (≥90.0% beginning at 75 µg/ml). All the
175 evaluated *D. anisandra* treatments differed ($p < 0.05$) from the negative controls.
176 The bark extract EHI values (≥97%) did not differ ($p > 0.05$) from thiabendazole at all
177 concentrations from 37.5 to 600 µg/ml. Likewise, leaf extract EHI (≥96%) did not
178 differ ($p > 0.05$) from thiabendazole at all concentrations from 150 to 600 µg/ml,
179 regardless of season. The overall highest anthelmintic activity in terms of EHI was
180 observed with the 37.5 µg/ml concentration of the bark extract, with no significant
181 increase at higher concentrations. Activity did not vary in the leaf extracts
182 beginning at 75 µg/ml. Both *P. alliacea* stem and leaf extracts exhibited 99% EHI at
183 600 µg/ml (Table 2). The highest activity (97% EHI beginning at 75 µg/ml) was
184 produced with the rainy season stem extract, although the rainy season leaf extract
185 produced the same inhibition beginning at 150 µg/ml. *P. alliacea* dry season leaf
186 extract differed ($p < 0.05$) from the negative control at all concentrations. Maximum
187 EHI was observed at 75 µg/ml with rainy season stems and at 300 µg/ml for dry
188 season stems. Maximum EHI for the leaf extracts was observed at 150 µg/ml and
189 300 µg/ml for the rainy and dry season, respectively. At and above these
190 concentrations, activity (EHI) did not differ ($p > 0.05$) from the positive control nor did
191 it vary at higher concentrations.

192 The lowest ($p < 0.05$) LC_{50} values for the *D. anisandra* extracts were observed with
193 the rainy season bark extract (10.29 $\mu\text{g/ml}$) and leaf extract (18.48 $\mu\text{g/ml}$)
194 (Table 3). In contrast, the dry season *D. anisandra* bark and leaf extracts had
195 LC_{50} values at least twice as high. For *P. alliacea*, rainy season stems had a lower
196 LC_{50} (28.27 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$) than the dry season stems, and there was no difference
197 ($p > 0.05$) between the rainy and dry season leaf extracts.

198 Ovicidal activity (i.e. inhibition of larval development) was the main effect of
199 the *D. anisandra* extracts on the eggs (Figure 1), since all these extracts exhibited
200 OA $> 90\%$ beginning at 150 $\mu\text{g/ml}$. Indeed, the bark extracts had 100% OA at 600
201 $\mu\text{g/ml}$. Moreover, unhatched L_1 larvae were present (LFE 2.3-13.6%) with all the
202 *D. anisandra* extracts beginning at 9.3 $\mu\text{g/ml}$. Both the *P. alliacea* stem and leaf
203 extracts caused larvae failing eclosion, although this differed between rainy and dry
204 season extracts at 150 $\mu\text{g/ml}$ (Table 2). The rainy season extracts had LFE values
205 $> 92\%$ at 150 $\mu\text{g/ml}$, while the dry season extracts had values $< 81\%$. At this
206 concentration, the *P. alliacea* extracts produced low OA (3.4-11.2%).

207 **4. Discussion**

208 In terms of EHI and LC_{50} values, the rainy season extracts from both plants had the
209 highest anthelmintic activity. This could be due to seasonal variations in the levels
210 of plant secondary metabolites that may exercise anthelmintic activity against
211 cyanthostomin eggs. Various studies have shown that seasonal and spatial
212 variation can influence secondary metabolite concentrations and consequent
213 biological activity (Modak, 2011).

214 The present results contrast with those of Arceo-Medina et al. (2017), who reported
215 higher ixodicide activity against *Rhipicephalus microplus* using methanol extracts
216 from *P. alliacea* stems collected in the dry season. The difference in efficacy of this
217 extract by collection season might be due to the use of different parasites, other
218 metabolites are responsible for the activity and/or that these metabolites exert
219 activity at different concentrations This coincides with previous studies in which *D.*
220 *anisandra* and *P. alliacea* extracts from raw material collected in the rainy season
221 exhibited the highest anthelmintic activity against *Ancylostoma* spp. and
222 *Haemonchus* spp., as observed in the present study with cyathostomin eggs
223 (Arjona-Cambranes et al., 2016; Rosado-Aguilar et al., 2016).

224

225 Few studies have addressed the anthelmintic activity of plant extracts against
226 nematodes in horses. Both Payne et al. (2013) and Peachey et al. (2015)
227 evaluated the effects of vegetal extracts against cyathostomins. Payne et al. (2013)
228 reported 100% EHI when using 1400 µg/ml of aqueous extracts of seven plants:
229 *Acacia baileyana*, *A. melanoxylon*, *A. podalyriifolia*, *Eucalyptus gomphocephala*,
230 *Alectryon oleifolius*, *Santalum spicatum* and *Duboisia hopwoodii*. Using 10,000
231 µg/ml of methanol extracts, Peachey et al. (2015) reported 100% EHI with
232 *Allium sativum*, 96.4% with *Acacia nilotica* and 93.4% with *Cucumis*
233 *prophetarum*. Similar EHI levels were observed in the present study, but the
234 effective concentrations were notably lower (150-600 µg/ml). Beginning at 150
235 µg/ml, all the *D. anisandra* extracts, regardless of plant structure or collection

236 season, exhibited high (>90%) EHI. All the *P. alliacea* extracts also had EHI >99%,
237 but at 600 µg/ml.

238 Except for the dry season leaf extract, the *D. anisandra* extracts, at and above 75
239 µg/ml, exhibited EHI values similar to that of the positive control (0.1 µg/ml
240 thiabendazole). For *P. alliacea*, rainy season stem extract concentrations at and
241 above 75 µg/ml had EHI values similar to that of thiabendazole, while the dry
242 season stem extract attained this level at and above 150 µg/ml. This level of
243 activity was not reached in the dry and rainy season leaf extracts until 300 µg/ml.
244 The concentrations at which the *D. anisandra* and *P. alliacea* extracts exhibited
245 activity similar to that of thiabendazole were many times greater than the 0.1 µg/ml
246 required for the pharmaceutical. However, cyathostomins have documented
247 resistance to benzimidazoles including thiabendazole (Cernea et al., 2003;
248 Canever et al., 2013).

249 Plant extracts are a prolific source of ecological bioactive compounds and are
250 promising potential sources for new, effective and safe anti-helminth
251 treatments. Many natural compounds have modes of actions that differ from
252 those of current pharmaceutical treatments and may therefore be effective
253 against resistant nematodes (Hammond et al., 1997; Waller et al., 2001). In fact,
254 studies done using laboratory animals have shown that methanol plant extracts
255 have low toxicity in mammals (Freitas et al., 2011; Madhumitha et al., 2012;
256 Rosado-Aguilar et al., 2017). This is one reason why the *D. anisandra* and *P.*
257 *alliacea* extracts studied here are a potential alternative for nematode control in

258 horses; they have efficacies similar to those of current pharmaceutical
259 treatments, which are compromised by parasite resistance.

260 The LC₅₀ values observed for the *D. anisandra* and *P. alliacea* extracts showed
261 higher effectiveness against cyathostomin than the extracts reported by Payne et
262 al. (2013), e.g., the extracts from *D. hopwoodii* needed three times higher of LC₅₀
263 (30.9 µg/ml) compared to the rainy season *D. anisandra* bark extract (10.29 µg/ml).
264 The LC₅₀ values reported by Peachey et al. (2015) are even higher: 2,000 µg/ml
265 for *Allium sativum*; 1,100 µg /ml for *Cucumis prophetarum*; and 200 µg/ml for
266 *Acacia nilotica*.

267 Neither Payne et al. (2013) nor Peachey et al. (2015) reported ovicidal activity by
268 extracts against cyathostomin eggs, rather, they reported EHI as anthelmintic
269 activity. In the *D. anisandra* extracts tested here, the main effect against
270 cyathostomin eggs was inhibition of larval development; that is, eggs exposed to
271 the extracts remained in the morula or L₁ larvae stages, never fully developing.
272 This may be due to the small size of the secondary metabolites in the extracts,
273 which would allow them to enter the egg and affect the developing organism
274 (Souza et al., 2008). Anthelmintic activity of this kind is typical of the
275 benzimidazole drug family (Robinson et al., 2004). Moreover the anthelmintic
276 activity from *P. alliacea* extracts was manifested largely as failure of L₁ larvae to
277 hatch. This coincides with a study of acetone/water (70:30) extracts of *Acacia*
278 *pennatula* and *Onobrychis viicifolia* in which the extracts prevented formed *H.*
279 *contortus* L₁ larvae from hatching and/or the eggs from rupturing (Vargas-Magaña
280 et al. 2014); a phenomenon defined as “larvae failing eclosion”. Some of the

281 possible mechanisms by which plant secondary metabolites may inhibit larval
282 hatching are prevention of the changes in the egg shell permeability (Perry, 2000);
283 inhibition of the enzymes needed for hatching (Rogers and Brooks, 1977; Molan et
284 al., 2010); and/or competition with hatching factors receptors on the egg shell
285 (Doncaster and Shepherd, 1967; Perry, 2000; Vargas-Magaña et al., 2014).

286 The biological properties of plants in the *Diospyros* L. genus have been attributed
287 to a series of pentacyclic triterpenes, naphthoquinones, coumarins and flavonoids
288 (Adeniyi et al., 2000; Ganapaty et al., 2004). For example, in a comparison to
289 previous studies, Borges-Argáez et al. (2007) observed orange-colored, needle-
290 like structures identified as plumbagin in the spectral data of the hexane portion of
291 a methanol extract of *D. anisandra* bark challenged against different
292 *Mycobacterium tuberculosis* strains. In another study, fourteen bioactive
293 compounds were identified in the hexane portions of a methanol extract of *D.*
294 *anisandra* bark, including seven naphthoquinones, four triterpenes and three
295 sesquiterpenes (Uc-Cachón et al., 2012). The most bioactive compounds in *D.*
296 *anisandra* are the naphthoquinones, particularly plumbagin. Found in this species'
297 leaves, bark and roots, this compound has been attributed anti-spasmodic,
298 antibacterial, antifungal, antiprotozoan and anti-cancer properties (Nematollahi et
299 al., 2012; Uc Cachón et al., 2014).

300 Various bioactive compounds have been isolated from *P. alliacea*, including
301 steroids, terpenoids, saponins, polyphenols, tannins, flavonoids, coumarins and
302 alkaloids (De Sousa et al., 1990; Benavidez et al., 2001; Araujo-Luz et al.,
303 2016). Two sulfured compounds (dibenzyl disulfide and dibenzyl trisulfide) from

304 the stem and leaves of *P. alliacea* are also reported to have ixodicide activity
305 against *R. microplus* (Rosado-Aguilar et al., 2010b; Arceo-Medina et al., 2016).
306 Much of the biological activity of *P. alliacea* is due to the essential oil petiverine
307 (Sariego-Frómeta et al., 2013). This occurs in higher concentrations in the stem
308 than in the leaves, which may explain the better EHI and LC₅₀ values of the stem
309 extracts compared to the leaf extracts in the present results.

310 Extracts from endemic plants are a viable alternative for nematode control in
311 horses. They could partially or completely replace current pharmaceutical
312 treatments and thus overcome the challenge of increasing resistance to
313 anthelmintic drugs. However, only limited research has been done with this
314 approach. *In vitro* studies are needed to identify the specific secondary metabolites
315 that provide these plants their anthelmintic activity, as well as to quantify how this
316 activity is affected by plant structure and collection season, among other factors. *In*
317 *vivo* studies will help to understand these metabolites pharmacodynamic and
318 pharmacokinetic inside animals, determine proper doses and corroborate
319 extract efficacy in field settings.

320 **5. Conclusion**

321 The methanol extract of *D. anisandra* bark collected in the rainy season exhibited
322 high anthelmintic activity in the form of ovicidal activity, while extract from *P.*
323 *alliacea* stem collected in the rainy season caused larvae failing eclosion on
324 cyathostomin eggs under *in vitro* conditions. These extracts are a potential
325 alternative means of nematode control.

326 **6. Acknowledgements**

327 The research reported here was financed by the CONACYT (grant No. CB-
328 2012-01-178216). We are very grateful to CONACYT for supporting Gabriela Flota-
329 Burgos in her second year of the MSc. degree at CCBA-UADY.

330 **7. References**

331 Adeniyi, B., Robert, M., Chai, H., Fong, H. 2000. *In vitro* cytotoxicity activity of
332 diosquinone, a naphthoquinone epoxide. *Phytother. Res.* 17: 282-284.

333 Araujo-Luz, D., Miranda-Pinheiro, A., Lopes-Silva, M., Chagas-Monteiro, M.,
334 Prediger, R.D., Ferraez-Maia, C.S., Fontes-Júnior, E.A. 2016. Ethnobotany,
335 phytochemistry and neuropharmacological effects of *Petiveria alliacea* L.
336 (Phytolaccaceae): A review. *J. Ethnopharmacol.* 185(5): 182-201.

337 Arceo-Medina, G.N., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez.
338 2016. Synergistic action of fatty acids, sulphides and stilbene against
339 acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus* ticks. *Vet. Parasitol.* 228: 121–125.

340 Arceo-Medina, G.N., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Méndez-
341 González M., Borges-Argaez, R., Cáceres-Farfán, M., Tamayo-Díaz, M.L. 2017.
342 Effect of season and sampling location on acaricidal activity of *Petiveria alliacea* on
343 larvae of *Rhipicephalus microplus* resistant to acaricides. *Vet. Med. Allied Sci.*
344 1(1):1-7.

345 Arjona-Cambranes, K.A., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Ortega-
346 Pacheco, A., Flota-Burgos, G.J. 2016. Actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos
347 vegetales contra huevos de *Ancylostoma* spp. de perros. IV Seminario

348 Internacional y V Nacional de Investigadores en salud y producción animal. 11-13
349 de Octubre. Tunja, Colombia.

350 Borges-Argáez, R., Canche-Chay, C.I., Peña-Rodríguez, LM., Said-Fernández, S.,
351 Molina-Salinas, GM., 2007. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoter*
352 78: 370–372.

353 Canever, R.J., Braga, P.R.C., Boeckh, A., Grycajuck, M., Bier, D., Molento, M.B.,
354 2013. Lack of *Cyathostomin* sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in
355 Brazil. *Vet. Parasitol.* 194: 35-39.

356 Cernea, M., Cozma, V., Cernea, C., Gall, I.A., 2003. The strongilidosis in horses
357 from Mures district: epidemiology and diagnosis. *Bulletin USAMV Cluj Napoca.* 60:
358 196-201.

359 Chan-Pérez, J.I., Torres-Acosta, J.F.J, Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H.,
360 Castañeda-Ramírez, G.S., Vilarem, G., Mathieu, C., 2014. *In vitro* susceptibility of
361 ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards
362 acetone: water extracts of two tannin rich plants. *Vet. Parasitol.* 217:53-60.

363 Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geert, S., Klei, T.R., Taylor, M.A.,
364 Waller, P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary
365 Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in
366 nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44: 35-44.

367 Cordero del Campillo, M., Rojo, F.A., Martínez, A.R., Sánchez, M.C., Hernández,
368 S., Navarrete, I., Diez, P., Quiroz, H., Carvalho, M. 1999. *Parasitología Veterinaria.*
369 1ª edición. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España.

370 Corning, S. 2009. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance
371 and therapy. *Parasit. Vectors.* Suppl 2:S1. doi: 10.1186/1756-3305-2-S2-S1.

372 De Sousa, J., Demuner, A., Pinheiro, J., Breit Maier, E., Cassels, B., 1990.
373 332 dibenzyltrisulphide and trans-N-methyl-4-methoxyproline from *Petiveria*
374 *alliacea*. Phytochemistry 29: 3653-3655.

375 Doncaster, C.C., Shepherd, A.M. 1967. The behaviour of second-stage
376 *Heterodera rostochiensis* larvae leading to their emergence from the eggs.
377 Nematologica 13: 476-478.

378 Freitas, P.C.M, Pucci, L.L., Vieira, M.S., Lino, R.S. Jr, Oliveira, M.A., Cunha, L.C.,
379 Paula, J.R., Valadares, M.C. 2011. Diuretic activity and acute oral toxicity of
380 *Palicourea coriacea* (Cham.) K Schum J. Ethnopharmacol. 134: 501-503.

381 Ganapaty, S., Steve, P.T., Fotso, S., Laatsch, H. 2004. Antitermitic quinones
382 from *Diospyros sylvatica*. Phytochemistry. 65: 1265-1271.

383 Hammond, J.A., Fielding, D., Bishop, S.C. 1997. Prospects for plant anthelmintics
384 in tropical veterinary medicine. Vet. Res. Commun. 21(3): 213-228.

385 Hernández-Villegas, M.M., Borges-Argaez, R., Rodriguez-Vivas, R.I., Torres-
386 Acosta, J.F., Mendez-Gonzalez, M., Caceres-Farfan, M. 2011. Ovicidal and
387 larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against
388 *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol.179: 100-106.

389 Hinney, B., Wirtherle, N.C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K.H., Clausen, P.H.
390 2011. Prevalence of helminths in horses in the state of Brandeburg, Germany.
391 Parasitol. Res. 108: 1083-1091.

392 INEGI. 2009. Tipos de climas en Yucatán. Disponible en:
393 <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/yuc/clim.cfm?c=444&e=3>
394 1

395 Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global
396 worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186: 70-78.

397 Kuzmina, T.A., Kharchenko, V.O., 2008. Anthelmintic resistance in cyathostomins
398 of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on
399 strongylid community structure. *Vet. Parasitol.* 154: 277-288.

400 LeOra software, 2003. In: Robertson, J.L., Preisler, H.K., Russel, R.M. (Eds.), *A*
401 *User's Guide to Probit or Logit Analysis.* , pp. 7–11, Berkeley, USA.

402 Madhumitha, G., Rajakumar, G., Roopan, S.M., Rahuman, A.A., Priya, K.M., Saral,
403 A.J.M., Khan, F.R.N., Khanna, V.G., Velayutham, K., Jayaseelan, C., Kamaraj, C.,
404 Elango, G. 2012. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel
405 aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding
406 parasites. *Parasitol. Res.* 111: 2189-2199.

407 Matthews, J.B. 2014. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *Int. J.*
408 *Parasitol.* 4(3): 310-315.

409 Milillo, P., Boeckh, A., Cobb, R., Otranto, D., Lia, R.P., Perrucci, S., di Regalbono,
410 A.F., Beraldo, P., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Bartolini, R.,
411 Traversa, D., 2009. Faecal cyathostomin egg count distribution and efficacy of
412 anthelmintics against cyathostomins in Italy: a matter of geography? *Parasit.*
413 *Vectors* 2 (Suppl. 2), S4.

414 Modak, B., Torres, R., Urzúa, A., 2011. Seasonal variation of the flavonoids
415 pinocembrin and 3-o-methylgalangin, in the surface component mixture (resinous
416 exudates and waxy coating) of *Heliotropium Stenophyllum*. *J. Chil. Chem. Soc.* 56:
417 532-534.

418 Molan, A.L., Faraj, A.M. 2010. The effects of condensed tannins extracted from
419 different plant species on egg hatching and larval development of
420 *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: trichostrongylidae). *Fol. Parasitol.* 57: 62-
421 68.

422 Molento, M.B., Antunes, J., Bentes, R.N., Coles, G.C., 2008. Anthelmintic
423 resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet. Rec.* 162: 384-385.

424 Morariu, S., Mederle, N., Badea, C., Dărăbuș, G., Ferrari, N., Genchi, C. 2016. The
425 prevalence, abundance and distribution of cyathostomins (small strongyles) in
426 horses from Western Romania. *Vet. Parasitol.* 223: 205-209.

427 Moreno, F.C., Gordon, I.J., Wright, A.D., Benvenuti, M.A., Saumell, C.A. 2010.
428 Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de
429 nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 42(3): 155-163.

430 Näreaho, A., Vainio, K., Oksanen, A., 2011. Impaired efficacy of ivermectin
431 against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle
432 infections in trotter foals in Finland. *Vet. Parasitol.* 182: 372-377.

433 Nematollahi, A., Aminimoghadamfarouj, N., Wiart, C., 2012. Reviews on 1,4-
434 naphthoquinones from *Diospyros* L. *J Asian. Nat. Prod. Res.* 14(1):80-88.

435 Payne, S.E., Kotze, A.C., Durmic, Z., Vercoe, P.E. 2013. Australian plants
436 show anthelmintic activity toward equine cyathostomins *in vitro*. *Vet. Parasitol.*
437 196:153-160.

438 Peachey, L.E., Pinchbeck, G.L., Matthews, J.B., Burden, F.A., Mulugeta, G.,
439 Scantlebury, C.E., Hodgkinson, J.E. 2015. An evidence-based approach to
440 the evaluation of ethnoveterinary medicines against strongyle nematodes of
441 equids. *Vet. Parasitol.* 210: 40-52.

442 Pereira, J.R., Vianna, S.S. 2006. Gastrointestinal parasitic worms in equines
443 in the Paraíba Valley, State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 140: 289-295.

444 Perry, R.N., 2002. Hatching. In: Donald, L. (Ed.), *The Biology of Nematodes*.
445 Taylor and Francis. London and New York. pp. 147–169.

446 Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I., 2004. A
447 possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an
448 inter-domain movement. *J. Mol. Graph. Model.* 23: 257-284.

449 Rogers, W.P., Brooks, F. 1977. The mechanism of hatching of eggs of
450 *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 7: 61-65.

451 Rodríguez-Vivas, R.I., Cob-Galera, L.A. 2005. Técnicas diagnósticas en
452 parasitología veterinaria. 2ª edición. Universidad Autónoma de Yucatán. pp. 32-59.

453 Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Borgez-
454 Argaez, R., García-Vázquez, Z., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M.,
455 Dorantes-Euán, A. 2008. Actividad ixodicida de extractos crudos de *Diospyros*
456 *anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilis) microplus* (Acari: ixodidae).
457 *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 8(3): 297-301.

458 Rosado-Aguilar J.A., Aguilar-Caballero A., Rodríguez-Vivas R.I., Borges-
459 Argaez R., García-Vázquez Z., Méndez-González M. 2010a. Screening of the
460 acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus*
461 *(Boophilus) microplus* (acari: ixodidae) by larval immersion test. *Trop. Subtrop.*
462 *Agroecosyst.* 12(1): 417-422.

463 Rosado, A.J.A., Aguilar, C.A.J., Rodríguez, V.R.I., Borges, A.R., García, V.Z.,
464 Méndez, G.M. 2010b. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea*

465 (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
466 (Acari: ixodidae). *Vet. Parasitol.* 168: 299-303.

467 Rosado-Aguilar, J.A., Flota-Burgos, G.J., Rojas-Becerril, R., Trinidad-Martínez, I.
468 2014. Frequency and ivermectin resistance of gastrointestinal nematodes in equine
469 farms from Mexico. 13th International Congress of Parasitology. 10-15 August.
470 Mexico.

471 Rosado-Aguilar, J.A., Arjona-Cambranes, K., Flota-Burgos, G.J., Rodríguez-Vivas,
472 R.I., 2016. Actividad antihelmíntica de extractos metanólicos contra huevos
473 del orden Strongylida de bovinos. IV Seminario Internacional y V Nacional de
474 Investigadores en Salud y Producción animal SENISPA. 11, 12 Y 13 Octubre.
475 Tunja, Colombia.

476 Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Borgez-Argaez, R., Arjona-
477 Cambranes, K. 2017. Acaricidal activity of *Havardia albicans* and *Caesalpinia*
478 *gaumeri* methanolic leaf extracts on *Rhipicephalus microplus* and its toxicity to
479 laboratory animals. *Experimental and Applied Acarology.* 71: 345-354.

480 Sario-Frómata, S., Marin-Morán, J. E., Ochoa-Pachecho, A., Viera-Tamayo, Y.
481 2013. *Petiveria alliacea* L.: distintas condiciones experimentales en la elaboración
482 de extractos con actividad antimicrobiana. *Rev. Química Viva.* 3(12): 274-287.

483 Souza, M., Belvi, C., Morais, S.M., Costa, C., Silva, A., Braz-filho, R. 2008.
484 Anthelmintic acetogenin from *Annona Squamosa* L. Seed. *Anais. Acad. Brasil.*
485 *Ciên.* 80: 271-277.

486 Traversa, D., Castagna, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Meloni, S., Bartolini,
487 R., Geurden, T., Pearce, M.C., Woringer, E., Besognet, B., Milillo, P., D'Espois, M.,

488 2012. Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. Vet.
489 Parasitol. 188:294-300.

490 Uc-Cachón, A.H., Molina-Salinas, G.M., Said-Fernández, S., Méndez-
491 González, M., Cáceres-Farfán, M., Borgez-Argáez, R. 2012. A new dimeric
492 naphthoquinone from *Diospyros anisandra*. Nat. Prod. Res. 27(13): 1174-1178.

493 Uc-Cachón, A.H., Borgez-Argáez, R., Said-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J.,
494 González-Salazar, F., Méndez-González, M., Cáceres-Farfán, M., Molina-Salinas,
495 G.M., 2014. Naphthoquinones isolated from *Diospyros anisandra* exhibit potent
496 activity against pan-resistant first-line drugs Mycobacterium tuberculosis strains.
497 Pulmon. Pharmacol. & Therap. 27: 114-120.

498 Urquhart, G.M., Armour, J., Duncan, J.L., Dunn, A.M., Jennings, F.W. 2006.
499 Veterinary Parasitology. 2nd edition, Ed. Blackwell Science, Scotland.

500 Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-
501 Castro, C.A., Hoste, H., Chan-Pérez, J.I. 2014. Anthelmintic activity of acetone-
502 water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between
503 tannins and other plant secondary compounds. Vet. Parasitol. 206: 322-327.

504 Valdez, M.P., Hernández, M., Galindo, L., Alonso, M.A. 2006. Gastrointestinal
505 parasite burden, body condition and hematological values in equines in the humid
506 tropical areas of Mexico. Fifth International Colloquium on Working Equines, Addis
507 Ababa, Ethiopia. 45(2): 603-607.

508 Waller, P.J., Bernes, G., Thamsborg, S.M., Sukura, A., Richter, S.H., Ingebrigtsen,
509 K., Höglund, J. 2001. Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic
510 countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. Acta
511 Vet. Scand. 42(1): 31-44.

512 Zajac, A. M., Conboy, G. A. 2012. Veterinary Clinical Parasitology. 7th
513 Edition. Ed. Blackwell, United States.

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535 **Table 1.** Egg hatch inhibition, ovicidal activity and larvae failing eclosion rates
 536 (average % \pm standard deviation) for methanol extracts from *D. anisandra* bark and
 537 leaves collected in the rainy and dry seasons

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Bark		Leaves	
	Rainy	Dry	Rainy	Dry
Control				
<i>Non-hatched%</i>	4.9 (0.9) ^a	6.9 (3.7) ^a	4.7 (0.5) ^a	4.1 (2.0) ^a
Thiabendazole (0.1)				
<i>EHI %</i>	98.3 (0.3) ^{*b}	96.9 (1.4) ^{*b}	97.5 (2.2) ^{*b}	97.5 (2.2) ^{*b}
600				
<i>EHI %</i>	100.0 (0.0)^{*b}	100.0 (0.0)^{*b}	99.6 (0.6)^{*b}	99.5 (0.4)^{*b}
<i>OA %</i>	100.0 (0.0)	100.0 (0.0)	99.6 (0.6)	99.4 (0.2)
<i>LFE %</i>	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.2 (0.3)
300				
<i>EHI %</i>	99.9 (0.2)^{*b}	99.8 (0.2)^{*b}	99.2 (1.3)^{*b}	98.6 (1.2)^{*b}
<i>OA %</i>	99.9 (0.2)	99.8 (0.2)	99.2 (1.3)	98.4 (1.0)
<i>LFE %</i>	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.2 (0.3)
150				
<i>EHI %</i>	99.1 (1.6)^{*b}	99.4 (0.6)^{*b}	99.3 (1.3)^{*b}	96.7 (1.8)^{*b}
<i>OA %</i>	98.8 (1.5)	98.0 (0.8)	99.3 (1.3)	92.6 (5.1)
<i>LFE %</i>	0.3 (0.4)	1.3 (0.3)	0.0 (0.0)	4.0 (3.6)
75				
<i>EHI %</i>	99.0 (0.8)^{*b}	99.3 (0.2)^{*b}	93.7 (3.8)^{*b}	90.6 (3.7) ^{*c}
<i>OA %</i>	97.5 (1.6)	99.0 (0.1)	84.4 (2.9)	76.2 (7.5)
<i>LFE %</i>	1.5 (0.8)	0.2 (0.2)	9.3 (0.9)	14.4 (11.1)
37.5				
<i>EHI %</i>	97.9 (2.0)^{*b}	97.0 (1.2)^{*b}	66.6 (3.6)^{*c}	57.4 (2.2)^{*d}
<i>OA %</i>	96.5 (2.2)	88.3 (9.2)	55.1 (5.1)	45.4 (2.7)
<i>LFE %</i>	1.4 (1.7)	8.7 (8.1)	11.5 (1.5)	12.1 (0.6)
18.2				
<i>EHI %</i>	81.8 (11.8)^{*c}	86.3 (3.1)^{*c}	55.5 (6.8)^{*d}	24.2 (5.5)^{*e}
<i>OA %</i>	78.1 (10.3)	72.4 (4.1)	43.7 (5.2)	20.5 (6.8)
<i>LFE %</i>	3.7 (1.9)	13.9 (2.0)	11.8 (1.8)	3.7 (2.6)
9.3				
<i>EHI %</i>	31.9 (8.6)^{*d}	38.7 (4.3)^{*d}	28.4 (9.9)^{*e}	13.3 (1.5)^{*f}
<i>OA %</i>	28.0 (7.9)	25.1 (4.2)	16.6 (7.7)	11.0 (0.7)
<i>LFE %</i>	3.9 (0.7)	13.6 (0.7)	11.9 (2.6)	2.3 (1.7)

538 *EHI %: Egg hatch inhibition.*

539 *OA %: Ovicidal activity.*

540 *LFE %: Larvae failing eclosion.*

541 ** Significant difference compared to negative control.*

542 *Different letter superscripts in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).*

543 **Table 2.** Egg hatch inhibition, ovicidal activity and larvae failing eclosion rates
 544 (average % ± standard deviation) for methanol extracts from *P. alliacea* stems and
 545 leaves collected in the rainy and dry seasons.

Concentration (µg/ml)	Stems		Leaves	
	Rainy	Dry	Rainy	Dry
Control				
Non-hatched %	3.1 (0.8) ^a	4.0 (3.4) ^a	8.1 (6.4) ^a	6.8 (1.1) ^a
Thiabendazole (0.1)				
EHI %	99.7 (0.6) ^{*b}	100.0 (0.0) ^{*b}	98.9 (1.1) ^{*b}	100.0 (0.0) ^{*b}
600				
EHI %	99.4 (0.6)^{*b}	99.5 (0.5)^{*b}	99.9 (0.2)^{*b}	99.6 (0.7)^{*b}
OA %	4.1 (1.1)	4.3 (0.5)	4.7 (0.9)	5.0 (2.5)
LFE %	95.3 (0.5)	95.3 (0.8)	95.1 (0.7)	94.6 (2.3)
300				
EHI %	99.3 (0.1)^{*b}	99.6 (0.6)^{*b}	99.7 (0.6)^{*b}	97.6 (1.1)^{*b}
OA %	7.2 (1.1)	6.6 (1.4)	5.7 (0.8)	11.2 (3.5)
LFE %	92.2 (1.0)	93.0 (1.0)	94.0 (0.7)	86.4 (2.6)
150				
EHI %	99.2 (0.8)^{*b}	77.4 (8.8)^{*c}	98.9 (1.1)^{*b}	84.3 (1.2)^{*c}
OA %	7.0 (1.1)	6.2 (1.0)	4.8 (1.5)	3.4 (0.6)
LFE %	92.2 (1.3)	71.2 (7.9)	94.1 (1.1)	80.9 (1.4)
75				
EHI %	97.7 (0.5)^{*b}	57.7 (4.2)^{*d}	8.4 (3.0)^c	79.8 (1.7)^{*d}
OA %	7.0 (0.6)	8.5 (0.8)	8.4 (0.0)	5.7 (0.4)
LFE %	90.7 (0.6)	49.3 (3.7)	0.0 (0.0)	74.1 (1.8)
37.5				
EHI %	64.1 (4.5)^{*c}	25.6 (8.4)^{*e}	7.9 (0.5) ^d	61.1 (4.1) ^{*e}
OA %	5.3 (2.6)	7.0 (3.3)	7.9 (0.5)	3.8 (1.3)
LFE %	58.8 (2.0)	18.6 (5.2)	0.0 (0.0)	57.3 (4.4)
18.7				
EHI %	30.5 (0.7) ^{*d}	9.3 (3.1) ^f	7.3 (2.9) ^e	37.7 (1.6) ^{*f}
OA %	4.3 (2.5)	6.5 (2.1)	7.3 (0.0)	7.7 (1.6)
LFE %	26.2 (1.9)	2.8 (3.6)	0.0 (0.0)	30.0 (3.0)
9.3				
EHI %	3.7 (0.8) ^e	6.6 (1.2) ^g	6.4 (2.9) ^f	18.1 (0.5) ^{*g}
OA %	3.7 (0.8)	5.4 (1.9)	6.4 (2.9)	5.2 (1.5)
LFE %	0.0 (0.0)	1.2 (0.7)	0.0 (0.0)	12.9 (2.0)

546 EHI %: Egg hatch inhibition.

547 OA %: Ovicidal activity.

548 LFE %: Larvae failing eclosion

549 * Significant difference compared to negative control.

550 Different letter superscripts in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

551

552 **Table 3.** LC50 and 95% confidence intervals for methanol extracts of *D. anisandra*
 553 bark and leaves.

Structure	Season	LC 50 (µg/ml)	95% IC
	Rainy	10.29 ^a	9.12-11.39
	Dry	32.85 ^{bd}	27.97-38.04
	Rainy	18.48 ^c	15.75-21.25
	Dry	28.14 ^{bd}	24.17-34.69

554 *LC₅₀: 50% lethal concentration.*

555 *95% CI: 95% confidence intervals.*

556 *Different letter superscripts in the same column indicate significant difference (p<0.05).*

557

558 **Table 4.** LC₅₀ and 95% confidence intervals for methanol extracts of *P. alliacea*

Structure	Season	LC 50 (µg/ml)	95% IC
	Rainy	28.27 ^a	26.01-30.49
	Dry	74.11 ^b	63.51-84.74
	Rainy	38.22 ^{ca}	29.45-48.29
	Dry	31.31 ^a	26.66-36.19

559 stems and leaves.

560 *LC₅₀: 50% lethal concentration.*

561 *95% CI: 95% confidence intervals.*

562 *Different letter superscripts in the same column indicate significant difference (p<0.05).*

563

564

565

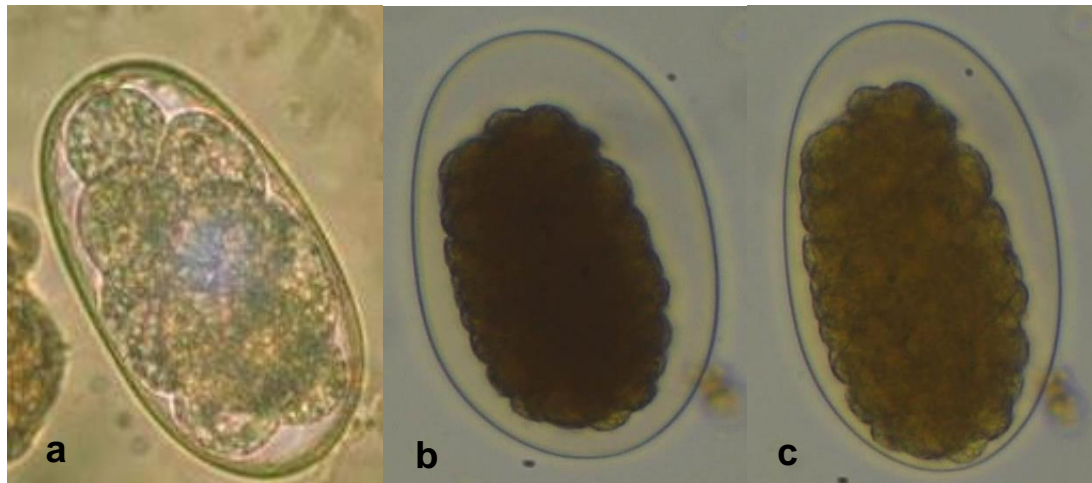
566

567

568

569

570



571 **Figure 1.** Ovicidal activity in cyathostomin eggs. a) negative control; b) treated with
572 methanol extract of *D. anisandra*; and c) treated with thiabendazole (positive
573 control).

574

575

576

577

578

579

580

581



582 **Figure 2.** Larvae failing eclosion in cyathostomin eggs treated with methanol
583 extract of *P. alliacea*. L1 larvae clearly formed but unable to hatch.