



**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y  
MANEJO DE RECURSOS  
NATURALES TROPICALES

**Potencial antihelmíntico *in vitro* de extractos  
acetona-agua obtenidos de la cáscara y del follaje  
de tres cultivares de *Theobroma cacao* sobre  
huevos de *Haemonchus contortus***

**Tesis**

**Presentada como requisito para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Agropecuarias.**

**Por**

**Médico Veterinario Zootecnista  
Alvaro De La Cruz Cortazar.**

**Asesores**

**Dr. Carlos Alfredo Sandoval Castro.  
M. C. José Israel Chan Pérez.**

Mérida, Yucatán, México, febrero de 2015



**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
AGROPECUARIAS Y  
MANEJO DE RECURSOS  
NATURALES TROPICALES

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

**ALUMNO: MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
ALVARO DE LA CRUZ CORTAZAR**

**SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO**

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

\_\_\_\_\_

**DR. LUIS SARMIENTO FRANCO  
CCBA-UADY**

\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

**DR. ROGER IVÁN RODRÍGUEZ VIVAS  
CCBA-UADY**

\_\_\_\_\_

**DR. JOSÉ CARLOS CERVERA HERRERA  
CCBA-UADY**

\_\_\_\_\_

**MÉRIDA, YUCATÁN, ENERO DEL 2015**

KM 15.5 carretera Mérida - Xmatkuil Apdo. Postal 4-116 Itzimmá Mérida, Yucatán.  
Tel. (999) 9 42-32-00 Fax 9 42 -32-05

## **DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD**

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.

---

Médico Veterinario Zootecnista  
Alvaro de la Cruz Cortazar

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero a Dios, fuente infinita de todo conocimiento, por brindarme fortaleza e iluminar mi entendimiento para realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado con la beca para la realización de mis estudios, sin su apoyo no habría sido posible.

Al Campus Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA) de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) por darme la oportunidad de pertenecer al posgrado institucional.

A mis asesores al Doctor Carlos Alfredo Sandoval Castro y al Maestro en Ciencias José Israel Chan Pérez; por su valiosa guía y siempre útil colaboración en el desarrollo de las actividades propias de esta investigación.

A mis tutores Doctor Juan Felipe de Jesús Torres Acosta y Doctor Luis Sarmiento Franco por guiarme por el camino correcto de la ciencia y por tener disposición para evaluar mis avances con paciencia y con orientaciones siempre centradas.

A los compañeros del laboratorio de parasitología por su agradable compañía durante el tiempo que duró la actividad de este trabajo.

A las químicas del laboratorio de Nutrición Animal, por su amabilidad y profesionalismo en las actividades que se llevaron a cabo en su área.

A mis camaradas de la orden del Haemonchus, por siempre tener algo que aportar.

A mis más cercanos amigos durante este posgrado; M.V.Z Diana Sáez Peniche y M.V.Z. Jerónimo Sepúlveda Vázquez.

## **DEDICATORIAS**

A mi familia; mi madre Sra. Olivia Cortazar Romero, por ser inspiración y mi más grande motivación, a mi padre Sr. Adolfo de la Cruz de la Cruz, gran amigo y un hombre sabio y comprensivo con quien siempre he podido contar en toda circunstancia. A mi hermano; Aldo Marvin de la Cruz Cortazar, mejor hermano no se puede pedir. Quienes siempre estuvieron animando y soportando con paciencia; dándome la fuerza de voluntad para llevar a cabo este trabajo y alcanzar este objetivo de vida.

A mis abuelos Sra. Josefa Romero García y Sr. Ovidio Cortazar Bautista † por tenerme presente en sus oraciones. A mis abuelos paternos, allá donde estén, este esfuerzo va dedicado con cariño por la fe que depositaron en mí.

A mis amigos de muchos años que se tomaron su tiempo para dedicarme unas palabras de aliento y demostraron su valiosa amistad en los momentos en los que más los necesité.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Ciencias Agropecuarias y Manejo de Recursos Naturales Tropicales. Por compartir el diario vivir de esta aventura.

A todos, muchas gracias por su cariño, amistad y por permitir no sentirme tan lejos de casa.

## Resumen

El presente estudio evaluó el efecto antihelmíntico (AH) *in vitro* de extractos acetona-agua (70:30 v/v) de la cáscara de los frutos y las hojas de tres cultivares de *Theobroma cacao*: Azteca (CAZT y HAZT), Calabacillo (CCAL y HCAL) y Ceylán (CCEY y HCEY) sobre la eclosión de huevos de dos aislados de *Haemonchus contortus* de diferentes regiones de México (CENID-PAVET-INIFAP y FMVZ-UADY) mediante el ensayo de inhibición de la eclosión de huevos (EIEH). Adicionalmente, para explorar el potencial nutricional de estos cultivares se realizó su análisis químico proximal. Los huevos de *H. contortus* se obtuvieron de caprinos donadores infectados artificialmente y fueron incubados en buffer fosfato salino (Phosphate buffered saline, PBS) a diferentes concentraciones del extracto (0, 600, 1200, 2400 y 3600 µg/ml PBS). Se empleó un modelo lineal generalizado en el análisis de los datos colectado. El papel de los taninos en el efecto AH de los extractos fue evaluado usando polivinilpolipirrolidona (PVPP). Los extractos de CCEY y CCAL bloquearon la eclosión en ambos aislados a 1200 µg/ml PBS. El extracto de CAZT alcanzó a inhibir la eclosión a 3600 µg/ml PBS en el aislado CENID-PAVET-INIFAP. Los seis extractos bloquearon la eclosión del aislado FMVZ a 3600 µg/ml PBS. El papel de los taninos en el efecto AH observado sólo se comprobó para el extracto de HCEY en ambos aislados. Tanto las cáscaras como las hojas de *T. cacao* evaluadas tienen potencial nutricional para pequeños rumiantes. Se concluye que los subproductos evaluados representan una opción nutraceutica para la alimentación de pequeños rumiantes y que dichas fuentes son diferentes en cuanto a la acción AH mostrada sobre huevos de *H. contortus*.

**Palabras clave:** Extractos acetónicos, cultivares de *Theobroma cacao*, eclosión de huevos, *H. contortus*

## Summary

The present study evaluated the *in vitro* anthelmintic (AH) effect of acetone-water extracts (70:30 v/v) of the shell of fruit and leaves of three cultivars of *Theobroma cacao*: Azteca (CAZT and HAZT) Calabacillo (CCAL and HCAL) and Ceylan (CCEY and HCEY) on egg hatch of two *Haemonchus contortus* isolates from different regions of Mexico (CENID-PAVET-INIFAP and FMVZ-UADY) by means of the egg hatching inhibition assay (EHIA). In addition, to explore the nutritional potential of these cultivars a chemical proximal analysis was performed. The nematode eggs were obtained from donors goats artificially infected and were incubated in phosphate buffered saline (PBS) to different extract concentrations (0, 600, 1200, 2400 and 3600 µg/ml PBS). A generalized linear model was used in the analysis of data collected. The role of tannins in the AH effect of the extracts was evaluated using polyvinylpolypyrrolidona (PVPP). The CCEY and CCAL extracts blocked the hatching in both, CENID-PAVET-INIFAP and FMVZ isolates, at 1200 µg/ml PBS. The CAZT extract achieved hatching inhibition at 3600µg/ml PBS for the CENID-PAVET-INIFAP isolate. The six extracts blocked the hatching of FMVZ isolate at 3600 µg/ml PBS. The role of tannins in the observed AH effect was confirmed for HCEY extract in both isolates, CENID-PAVET-INIFAP and FMVZ. Shell of fruits and leaves of *T. cacao* evaluated have nutritional potencial for small ruminants. In conclusion the *T. cacao* by products evaluated represent a nutraceutical option for small ruminants feeding, but these resources have differences in their AH action against *H. contortus* eggs.

**Key Words:** acetonic extracts, *Theobroma cacao* varieties, egg hatching, *H. contortus*.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
2.1 Panorama de la resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales.....	11
2.2 <i>Haemonchus contortus</i> .....	12
2.3 Antihelmínticos no convencionales y plantas con potencial nutracéutico como control alternativo de helmintos.....	13
2.4 Metabolitos secundarios de las plantas (MSP).....	15
2.4.1 Taninos como AH.....	15
2.5 Ensayos <i>in vitro</i> para la evaluación de plantas con potencial antihelmíntico.....	17
2.5.1 Ensayo de inhibición de la eclosión de huevos (EIEH).....	18
2.6 El cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ) y su uso potencial.....	19
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
5. REFERENCIAS.....	23
6. ARTÍCULO Efecto antihelmíntico <i>in vitro</i> de extractos acetona-agua de tres cultivares de <i>Theobroma cacao</i> sobre la eclosión de <i>Haemonchus contortus</i> .....	32



## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
En la revisión de literatura	
Cuadro 1. Plantas forrajeras evaluadas <i>in vitro</i> con potencial uso antihelmíntico.....	16
En el artículo	
Cuadro 1. Resultados del análisis bromatológico de las hojas y cáscaras de los cultivares de <i>T. cacao</i> estudiadas (% base seca) incluyendo porcentaje de fenoles totales (FT), fenoles no taninos (F no T), taninos totales (TT) y taninos condensados (TC).....	41
Cuadro 2. Efecto <i>in vitro</i> de las dosis de los extractos de <i>Theobroma cacao</i> sobre el porcentaje de eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> aislamiento CENID-PAVET INIFAP.....	42
Cuadro 3. Efecto <i>in vitro</i> de las dosis de los extractos de <i>Theobroma cacao</i> sobre el porcentaje de eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> aislamiento FMVZ.....	42
Cuadro 4. Porcentaje de eclosión de huevos de <i>H. contortus</i> (CENID-PAVET-INIFAP) expuestos a extractos de hoja y cáscara de <i>T. cacao</i> con y sin PVPP.....	43
Cuadro 5. Porcentaje de eclosión de huevos de <i>H. contortus</i> (FMVZ) expuestos a extractos de hoja y cáscara de <i>T. cacao</i> con y sin PVPP.....	43
Cuadro 6. Concentración eficaz 50 (CE <sub>50</sub> ) e intervalos de confianza al 95% obtenidos de los diferentes extractos evaluados de <i>T. cacao</i> sobre la eclosión de huevos de dos aislamientos de <i>H. contortus</i> .....	44

## 1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de plantas con compuestos bioactivos que puedan ser empleados como antihelmínticos no convencionales o nutraceuticos ha recibido una considerable atención en los últimos años, debido al creciente desarrollo en todo el mundo de la resistencia a los antihelmínticos (AH) químicos en las poblaciones de nematodos gastrointestinales (NGI). Sin embargo, la evidencia científica para validar el uso de las plantas sigue siendo limitada (Hoste *et al.*, 2008; Sandoval-Castro *et al.*, 2012). El término nutraceutico resulta de una contracción entre nutrición y farmacéutico y se refiere a alguna sustancia que proporciona beneficios a la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades (Andlauer y Furst, 2002).

Entre los compuestos bioactivos más estudiados se encuentran los taninos condensados (TC) los cuales han probado ser eficaces como sustancias antihelmínticas (Aguilar-Caballero *et al.*, 2011), pero también podrían actuar indirectamente al aumentar la resiliencia del huésped (Provenza y Villalba, 2010). En Yucatán, se han identificado plantas ricas en taninos que han exhibido un efecto AH sobre las fases adultas y larvarias de *H. contortus* (Brunet *et al.*, 2008; Martínez-Ortiz-De-Montellano *et al.*, 2010) y se ha comprobado la susceptibilidad a extractos ricos en taninos en diferentes aislamientos de *H. contortus*. Sin embargo, se ha observado que algunos aislamientos que han estado en contacto con plantas ricas en taninos (PRT) son menos susceptibles a los extractos de estas plantas, mientras que aislamientos obtenidos de animales en pastoreo sin exposición previa a las PRT son más susceptibles a los efectos de estos compuestos (Calderón-Quintal *et al.*, 2010; Vargas-Magaña *et al.*, 2013). Por lo que se ha propuesto la hipótesis que taninos provenientes de forrajes o fuentes que no forman parte de la dieta normal de los pequeños rumiantes pueden tener una mayor actividad antihelmíntica. En este contexto Nieves-Guerrero (2010) realizó una evaluación *in vitro* de diferentes extractos provenientes de fuentes de taninos no convencionales como *Theobroma cacao*, *Coffea arabica* y tres

especies de mangle (*Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Languncularia racemosa*) para el control de *H. contortus* en ovinos y observó un efecto AH sobre la motilidad de las larvas infectantes de este nematodo. Así, *Theobroma cacao* puede representar una opción viable, desde el punto de vista del aprovechamiento de los recursos naturales tropicales, debido a la disponibilidad de subproductos provenientes de la explotación de este cultivo. Se estima que cerca del 60% de la cosecha corresponde a materiales de desecho como la cáscara. Por otra parte; la actividad de poda periódica de los árboles genera gran cantidad de follaje que no es aprovechado. Así, la necesidad de hacer un uso sustentable de los recursos naturales hace pertinente el estudio de estos como una alternativa en la alimentación de los pequeños rumiantes. La cáscara y el follaje de cacao ofrecen posibilidades para su aprovechamiento, tanto por sus propiedades nutritivas como su posible aporte como fuente de AH no convencionales, es decir cómo nutraceutico.

Por estas razones el objetivo del presente trabajo de investigación fue estudiar el potencial efecto antihelmíntico de extractos acetona-agua (70:30 v/v) de los subproductos de *T. cacao* (cáscara y follaje) provenientes del estado de Tabasco; como fuente no convencional rica en taninos contra los huevos de *H. contortus* y explorar sus propiedades nutricionales para enriquecer los datos ya existentes.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Panorama de la resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales**

Las gastroenteritis parasitarias en ovejas y cabras en pastoreo constituyen uno de los problemas de primera magnitud por ser los más frecuentes e importantes de los pequeños rumiantes; por lo que su estudio y tratamiento son siempre temas de alto interés (Alemán *et al.*, 2011).

El uso intensivo y la administración inadecuada de los antihelmínticos, en épocas y grupos de rumiantes no apropiados, han contribuido al desarrollo de resistencia

a estas sustancias, lo que constituye un obstáculo importante para su control (Cordero *et al.*, 1999; Nari, 2001; Márquez, 2003). La resistencia antihelmíntica es la capacidad de una población de nematodos para sobrevivir a dosis de antihelmíntico que serían letales para las poblaciones sensibles (Prichard *et al.*, 1980). En los NGI de los pequeños rumiantes, la resistencia AH se ha descrito para todas las familias de fármacos disponibles en la actualidad (Torres-Acosta y Hoste, 2008; Cuéllar-Ordaz, 2009). Es común encontrar rebaños de ovinos con nematodos resistentes a múltiples drogas antihelmínticas en Centroamérica, en los Estados Unidos de América, partes de México y Costa Rica. La evidencia sugiere que la resistencia antihelmíntica es un fenómeno creciente en el continente americano (Torres-Acosta *et al.*, 2012).

El rápido desarrollo de la resistencia a los antihelmínticos, asociado con el alto costo de la disposición de fármacos antihelmínticos, limita el éxito de estos productos en el control de los NGI. Esto incrementa el interés en el estudio de bioactivos de las plantas como fuente alternativa al uso de los antihelmínticos (Alemán *et al.*, 2011).

## **2.2 *Haemonchus contortus***

De los nematodos gastrointestinales que afectan a los pequeños rumiantes, *Haemonchus contortus* es considerado como uno de los de mayor importancia debido a su patogenicidad (Arroyo-Balán *et al.*, 2008). Se localiza en el abomaso de los ovinos y caprinos. Son nematodos hematófagos y tienen color rojo debido a la sangre ingerida. Los machos miden 19-22mm y las hembras 25-34mm (Cordero-del-Campillo *et al.*, 1999).

El ciclo biológico de *H. contortus* es directo. Las hembras son prolíficas. Los huevos son eliminados al ambiente junto con las heces. Las larvas L<sub>1</sub> eclosionan de los huevos que se encuentran en el pasto y se pueden desarrollar a larva infectante (L<sub>3</sub>) en un periodo de hasta 5 días, pero el periodo de desarrollo puede retrasarse si las condiciones ambientales son desfavorables. Las larvas

infectantes abandonan las heces y suben a los pastos para ser consumidas por los animales. Esta migración ocurre durante los períodos donde la radiación solar es débil. Después de la ingestión y en el rumen, las larvas pierden la vaina que las protegen. En el abomaso, estas larvas penetran en la mucosa donde se alimentan hasta la próxima muda. En la mucosa sufren una transformación a larva 4. Justo antes de la muda final desarrollan una lanceta que les permite perforar la mucosa gástrica para obtener sangre de los vasos de la mucosa. Como adultos se mueven libremente sobre la superficie de la mucosa del abomaso. El período prepatente es de 2 a 3 semanas (Cordero-del-Campillo *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2007).

### **2.3 Antihelmínticos no convencionales y plantas con potencial nutracéutico como control alternativo de helmintos**

Los antihelmínticos no convencionales (AHNC) son todas aquellas alternativas a los medicamentos desarrollados por la industria farmacéutica. Los AHNC tienen propiedades AH y su acción es eficaz parcialmente; ya sea dirigiéndose a una especie de parásito o por la modulación de la actividad biológica de los NGI en lugar de eliminarlos. Ejemplos de estos AHNC son las agujas de óxido de cobre; las cuales han demostrado acción contra *H. contortus* en ovinos (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

Dentro de los AHNC también se incluyen a los antihelmínticos naturales provenientes de las plantas. Estos AH naturales están caracterizados por su bajo costo y disponibilidad. La aparición de la RA ha incrementado el interés en este tipo de AH naturales. Un gran número de ensayos *in vitro* e *in vivo* han validado la acción antihelmíntica de diversas plantas medicinales mediante la identificación de compuestos bioquímicos responsables de los efectos antiparasitarios (Stepek *et al.*, 2004; Githiori *et al.*, 2006).

Las propiedades benéficas de estas alternativas no convencionales sobre la salud de los animales por lo general se asocia al contenido de uno o más metabolitos secundarios (Hoste *et al.*, 2006). Sin embargo aún quedan varias cuestiones por

ser resueltas como el origen de la variabilidad de los resultados entre los diferentes estudios que se han llevado a cabo, el modo de acción contra los NGI, la caracterización de compuestos activos y las condiciones óptimas de acción (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

Recientemente se ha acuñado el término Control Integrado de Parásitos (CIP), particularmente cuando existe resistencia antihelmíntica (RA). El CIP es una estrategia que busca integrar diversos métodos de control de NGI. Dicha integración considera las condiciones ambientales, de manejo y del animal para obtener el mejor resultado posible. A la fecha existen diversas alternativas para el control de los NGI (Galina y Cuéllar, 2009). Dentro de los principales organismos antagónicos de los nematodos en la naturaleza se han identificado ácaros, bacterias, virus, insectos, hongos y plantas productoras de metabolitos con actividad nematocida (Athanasiadou y Kyriazakis, 2004; Mendoza-de Gives, 2009). Los resultados recientes, en experimentos *in vivo* e *in vitro*, sugieren que las plantas forrajeras que contienen metabolitos secundarios, en este caso taninos, podrían utilizarse como nutracéuticos o antihelmínticos ya que sus propiedades antihelmínticas y su valor nutritivo directo son una opción prometedora para su uso en el control integrado de las nematodosis gastrointestinales en los sistemas de producción agrícola (Alemán *et al.*, 2011).

Así, los nutracéuticos son una opción que se puede utilizar a largo plazo tratando de combinar su valor nutritivo y sanitario con el fin de prevenir brotes clínicos de las infecciones por nematodos, para limitar los procesos biológicos de los NGI y para reducir la dependencia a los AH químicos para el control de estas enfermedades parasitarias (Hoste *et al.*, 2008).

Estudios recientes han comparado la acción AH *in vitro* de extractos de plantas contra aislados de *H. contortus* de diferentes regiones de México; Yucatán (UADY), Morelos (CENID-INIFAP) y estado de México (UNAM) empleando el ensayo de inhibición de la motilidad larval (LMIA, por sus siglas en inglés), demostrando que los aislados de Yucatán fueron menos susceptibles al extracto comparado con los aislados CENID y UNAM (Calderón-Quintal *et al.*, 2010). En el

cuadro 1 se enlistan algunas de las plantas cuyos extractos han sido evaluados para el control de NGI.

## **2.4 Metabolitos secundarios de las plantas (MSP)**

Las plantas producen una gran diversidad de compuestos orgánicos que no participan directamente en sus procesos metabólicos primarios, a estos compuestos se les conoce como metabolitos secundarios (MSP) (García, 2004; Lincoln y Zeiger, 2006). Este es un factor que limita el uso de árboles y arbustos forrajeros en muchas especies (Torres-Acosta *et al.*, 2008). Se ha encontrado evidencia del efecto antihelmíntico que poseen las sustancias bioactivas provenientes de las plantas (alcaloides, terpenoides, saponinas y taninos, entre otros), lo cual es importante ahora que los NGI han generado resistencia a las drogas antihelmínticas comerciales más comunes en los sistemas de producción de rumiantes (Torres-Acosta *et al.*, 2008). Dentro de los MSP con propiedades antihelmínticas, destacan los taninos que forman parte integral del sistema de defensa contra los herbívoros y otros patógenos de las plantas como bacterias, hongos, insectos y virus (Jean-Blain, 1998).

### **2.4.1 Taninos como AH**

Por sus características los taninos se dividen en dos grandes grupos. Los taninos hidrolizables (TH) y los taninos condensados (TC) (Makkar, 2006; Hoste *et al.*, 2006). Estos últimos son clasificados en cuatro grupos, los más comunes son las procianidinas y las prodelfinidinas (Hoste *et al.*, 2006).

Los TH son potencialmente tóxicos para el hígado y riñones, pudiendo ocasionar la muerte de los animales (Waghorn y McNabb, 2003). Se dice que son responsables de la mayoría de los efectos nocivos debido a que pueden ser absorbidos y circular por el flujo sanguíneo (Jean-Blain, 1998; Reed, 1995).

Cuadro 1. Plantas y subproductos agroindustriales evaluados *in vitro* con potencial uso antihelmíntico contra *H. contortus*.

Planta	Bioensayo	Concentraciones evaluadas	Dosis efectiva	Autor
- <i>L. leucocephala</i>	LDVA	10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, y 90 µg/ml	60, 70, 80, y 90 µg/ml	Ademola <i>et al.</i> , 2005
- <i>Melia azedarach</i>	EIA y LDVA	50, 25, 12.5, 6.2 y 3.12 mg mL <sup>-1</sup>	EIA 0.36 mg/ mL <sup>-1</sup> y LDVA 9.18 mg/mL <sup>-1</sup>	Maciel <i>et al.</i> , 2006
- <i>Acacia pennatula</i> , <i>Piscidia piscipula</i> , <i>L. leucocephala</i> y <i>L. latisiliquum</i>	LMI y LAEA	LMI 150, 300, 600, 1200 µg/ml PBS y LAEA 1200 µg/ml PBS	600, 1200 µg/ml PBS	Alonso-Díaz <i>et al.</i> , 2008
- <i>Acacia gaumeri</i> , <i>Havardia albicans</i> y QUEBRACHO	LMI	0, 600, 1200, 1800 y 2400 µg/ml PBS	600, 1200, 1800, 2400 µg/ml PBS	Hernández-Orduño <i>et al.</i> , 2008
- <i>Coffea arabica</i> , <i>Theobroma cacao</i> , <i>Rhizophora mangle</i> , <i>Avicennia germinans</i> , <i>L. racemosa</i>	LMI	0, 300, 600 y 1200 µg/ml PBS	1200 µg/ml PBS	Nieves-Guerrero <i>et al.</i> , 2010
- <i>Parkia biglobosa</i>	EIA	0.3, 0.7, 1.2, 2.0 ml/5 ml de agua destilada	1.2 and 2.0 ml	Soetan <i>et al.</i> , 2011
- <i>L. latisiliquum</i> , <i>L. racemosa</i> , <i>R. mangle</i> , <i>A. germinans</i> , <i>T. cacao</i> y <i>C. arabica</i>	EIA	0,600,1200, 2400 y 3600 µg/ml PBS	600, 1200, 2400 y 3600 µg/ml PBS	Vargas-Magaña <i>et al.</i> , 2013.

TC taninos condensados. EIA (Ensayo de Inhibición de la Eclosión). LMI (Inhibición de la Migración Larvaria). LDVA (Ensayo de viabilidad del desarrollo larval). LAEA (ensayo de desovine larval artificial)



Por otro lado; los animales que consumen plantas con elevados niveles de TC generalmente tienen una menor utilización de nutrientes, debido principalmente a una reducción en la digestión de la proteína lo que puede ocasionar una disminución del consumo de alimento debido a la reducción de la digestibilidad y un funcionamiento inadecuado del rumen (Dawson *et al.*, 1999). La actividad biológica de los TC depende de dos factores principales: la concentración y la estructura de los mismos (Hoste *et al.*, 2006). Sin embargo, también se han encontrado efectos benéficos en el uso de los TC. Por ejemplo, estos compuestos son conocidos por su efecto anti-timpánico que es de gran utilidad cuando los animales se exponen a dietas con elevados niveles de proteína soluble, ayudando a disminuir la producción de gas al reducir la fermentación ruminal. También se ha encontrado que al consumir TC en cantidades moderadas sus efectos son generalmente positivos y no reducen el consumo voluntario (Torres-Acosta *et al.*, 2008). Adicionalmente, varios estudios han reportado que los taninos pueden mejorar la resiliencia y resistencia de los pequeños rumiantes contra los NGL (Paolini y Hoste, 2006). Esto ha sido demostrado utilizando pasturas con taninos, heno de plantas taniníferas y forraje de árboles o plantas leñosas de diferentes latitudes (Hoste *et al.*, 2006).

En Yucatán se ha observado que el extracto acetónico de follaje de diversos árboles taniníferos nativos tiene efecto antihelmíntico *in vitro* contra *Haemonchus contortus*.

## **2.5 Ensayos *in vitro* para la evaluación de plantas con potencial antihelmíntico**

Los ensayos *in vitro* son un medio apropiado para evaluar especies de plantas debido a que son rápidos de realizar y económicos, comparados a los experimentos *in vivo* (Mendoza, 2010). Existe una variedad de ensayos que pueden ser empleados, dependiendo de la fase parasitaria que requiera ser evaluada. Los ensayos más empleados en la evaluación del potencial AH de

diversas plantas son: ensayo de inhibición en la eclosión de huevos, ensayo de inhibición del desarrollo larval, ensayo de inhibición en la alimentación larval, ensayo de inhibición de la migración larval, ensayo de inhibición en el desenvaine larval y ensayo de inhibición en la motilidad de adultos (Hoste *et al.*, 2008). Muchos estudios *in vitro* con plantas tropicales se han enfocado sobre *H. contortus* con diferentes concentraciones de extractos (variando desde  $\mu\text{g/ml}$  a  $\text{mg/ml}$ ) (Athanasidou *et al.*, 2007). Sin embargo, una de las principales desventajas de los ensayos *in vitro* es la dificultad para interpretar los resultados debido a las grandes diferencias que se producen entre las condiciones *in vitro* e *in vivo* (Hoste *et al.*, 2008).

### **2.5.1 Ensayo de inhibición de la eclosión de huevos (EIEH)**

Este método se funda en el hecho de que los bencimidazoles impiden la embriogénesis y eclosión de los huevos. Consiste en la colección de huevos de NGI de animales infectados naturalmente o con infección inducida; una vez recuperados de las heces, se exponen al fármaco y se incuban por 48 horas a 28 °C. Para luego determinar el porcentaje de huevos que logran eclosionar y calcular la dosis efectiva media ( $\text{DE}_{50}$ ) a través del análisis PROBIT (Coles *et al.*, 1992).

Como muchos métodos, este es usado para evaluar la actividad nematocida tanto de drogas como de extractos de plantas. Basándose en la hipótesis que una actividad nematocida observada *in vitro* podría indicar una potencial actividad *in vivo* (Kamaraj *et al.*, 2011).

Vargas-Magaña *et al.* (2013) compararon tres ensayos *in vitro*: ensayo de inhibición del desenvaine larval (LEIA), ensayo de inhibición de eclosión de huevos (EHA) y ensayo de inhibición de la motilidad de larvas (LMIA); para evaluar la susceptibilidad de *H. contortus* contra extractos ricos en taninos tanto de plantas como de subproductos agroindustriales. Encontrando diferencias en la susceptibilidad en el aislado de *H. contortus* entre los bioensayos. Explicando que dicha diferencia puede deberse a que EHA y LMIA son metodologías diseñadas para evaluar la resistencia AH de NGI y concluye que LEIA tiene una alta

sensibilidad y EHA tiene sensibilidad media; sin embargo, ambas podrían ser usadas para evaluar el efecto AH de subproductos agroindustriales.

## **2.6 El cacao (*Theobroma cacao*) y su uso potencial**

El género *Theobroma* pertenece a la orden *Malvales* y a la familia *Esterculiaceae* (López-Andrade *et al.*, 1996).

El árbol del cacao se originó probablemente en la selva del Amazonas y; desde ahí, se extendió a Mesoamérica. Mide aproximadamente seis metros de altura y tiene hojas lustrosas de hasta treinta centímetros de longitud. Durante el año se abren unas seis mil flores, pero sólo unas treinta llegan a formar semillas. Llamadas también "habas del cacao", las semillas se encuentran adentro de una mazorca o piña rojiza de unos 28 centímetros de longitud. En el cultivo del cacao son importantes las condiciones ambientales, como la temperatura, la lluvia, el viento y las horas de sol. En principio, el árbol tiene que desarrollarse bajo la sombra. No soporta las bajas temperaturas (<21°C). Por otro lado, las temperaturas muy altas pueden dañar el árbol; por eso debe estar en la sombra. La temperatura más adecuada para la floración es de 25°C. (SIAP, 2012).

El fruto es una baya conocida como mazorca y se forma de la unión de los cinco carpelos. La forma varía de globosa a fusiforme (López-Andrade *et al.*, 1996).

En México la planta productiva se reconoce instaurada alrededor de los años 30, a partir de la introducción de materiales genéticos conocidos como Forasteros y Trinitarios, los cuales sufrieron recombinaciones con el material genético domesticado existente en las regiones de nuestro país desde la época prehispánica (cacao Criollo), a este sistema genético se le denominó Complejo Genético Trinitario (Ramírez-Díaz, 1997).

Actualmente, existe una gran diversidad genética en las poblaciones de cacao cultivadas en el mundo; sin embargo, estas pueden clasificarse en tres grandes grupos: Criollos, Forasteros y Trinitarios. El cacao Criollo se les denomina a todas las variedades de cacao que crecen espontáneamente en el sureste de México y

Centroamérica; considerados los primeros en ser domesticados en las regiones cálida – húmedas, se caracteriza por sus frutos angostos y alargados, con la punta muy pronunciada.

El cacao Forastero es comúnmente representado por el genotipo denominado Calabacillo se consideran de domesticación relativamente reciente, al parecer se comenzaron a producir en Brasil a partir del año 1740.

La tercera variedad es el cacao Trinitario y se origina de la mezcla de cacaos Forasteros y Criollos (López-Andrade *et al.*, 2000).

México ocupa el 11º lugar en la producción de cacao en grano contribuyendo con el 1.2% de la producción mundial (SIAP, 2006). Según datos preliminares en septiembre de 2012, los principales estados productores de cacao en México son Chiapas (9,037 ton), Tabasco (17,237 ton) y Guerrero (210 ton) (SIAP, 2012).

Por otra parte la cosecha del cacao inicia en el mes de septiembre y termina en diciembre, el segundo periodo inicia en marzo y termina en el mes de mayo (Córdova-Ávalos *et al.*, 2001).

Dentro de las actividades de la explotación de esta planta, reviste importancia la poda periódica y el “deshije” de los arboles; el cual consiste en eliminar los brotes del tallo y de las ramas; incluyendo ramas secas, enfermas y las entrecruzadas (Ramírez-Díaz, 1997; Córdova-Ávalos *et al.*, 2001).

Las semillas del cacao contienen cerca de 300 compuestos volátiles, incluyendo ésteres, hidrocarboclonas, monocarbonilos, piroles entre otros. También contiene cerca de 18% de proteína (8% digestible); grasas (manteca de cacao); aminas y alcaloides incluyendo teobromina (0.5 a 2.7%), cafeína (0.25 a 1.43%), tiramina, dopamina, salsolinol, trigonelina, ácido nicotínico y aminoácidos libres; taninos, fosfolípidos, etc. La manteca de cacao contiene predominantemente triglicéridos de ácidos grasos, consistentes de ácidos oleico (37.3%), esteárico (34.4%), y palmítico (26.2%). Más de un 73% de los glicéridos están presentes como formas monoinsaturadas. En adición a los alcaloides (principalmente teobromina), taninos y otros constituyentes (Kalvatchev *et al.*, 1998).

Los principales subproductos de la explotación del cacao son la cáscara y el mucílago, mismos que representan cerca de 60% del peso total de la producción. El uso del cacao como planta con potencial nutracéutico fue evidenciado por Nieves-Guerrero (2010) al realizar el análisis bromatológico de la semilla y la cáscara de *T. cacao*. El análisis bromatológico de la semilla fue el siguiente: MS (64.95%), PC (15.37%), cenizas (3.61%), extracto etéreo (42.19%), fibra detergente neutra (20.62%), fibra detergente ácida (11.52%), lignina (8.37%); mientras que en la cáscara se encontraron MS (23.57%), PC (6.39%), cenizas (11.56%), extracto etéreo (5.61%), fibra detergente neutra (62.95%), fibra detergente ácida (52.35%) y lignina (26.98%). La determinación de compuestos fenólicos totales (FT) y taninos condensados (TC) en los extractos acetónicos fue de 8.13% (FT) y 12.49% (TC) para la cáscara de cacao mientras que para la semilla de cacao se encontraron valores de 20.45% (FT) y 58.91% (TC).

Otros autores reportaron la composición fitoquímica de la cáscara de cacao procesadas a partir de extractos metanólicos; donde se demostró la presencia de saponinas, taninos, alcaloides, flavonoides y esteroides insaturados. Determinaron y cuantificaron el contenido de teobromina en la cáscara el cual fue de 1900 mg/kg misma que no es nociva para la alimentación de los animales (Crescente *et al.*, 1999).

### **3. HIPÓTESIS**

Los extractos acetónicos obtenidos de la cáscara y follaje de tres variedades de *Theobroma cacao* afectan de manera diferente la eclosión de los huevos de *Haemonchus contortus* de los aislados CENID-PAVET-INIFAP y FMVZ, en condiciones *in vitro*; debido a que son una fuente de taninos a la cual este NGI no se encuentra en contacto de manera frecuente y a que los aislados seleccionados muestran diferente sensibilidad a los extractos de PRT.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos acetona-agua (70:30 v/v) de la cáscara y follaje de tres variedades de cacao (*Theobroma cacao*) así como el potencial nutricional de estos sustratos.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar el efecto antihelmíntico de los extractos de la cáscara y follaje de *T. cacao* sobre el proceso de eclosión de los huevos de *H. contortus* de los aislados CENID-PAVET-INIFAP y FMVZ.
- Determinar el papel de los taninos presentes en los extractos obtenidos de la cáscara y follaje de *T. cacao* empleando un bloqueador de taninos (polivinilpolipirrolidona-PVPP).
- Determinar la composición bromatológica de la cáscara y follaje de *T. cacao*.

## 5. REFERENCIAS

Ademola, I.O., Akanbi, A.I., Idowu, S.O. 2005. Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharmaceutical Biology*. 43: 599-604.

Aguilar-Caballero, A. J., Cámara-Sarmiento, R., Torres-Acosta, J. F., Sandoval-Castro C. 2011. El control de los nematodos gastrointestinales en caprinos: ¿dónde estamos? *Bioagrocencias*. 4: 10-16.

Aguilar-Caballero, A.J., Torres-Acosta, J.F.J., Cámara-Sarmiento, R. 2009. Importancia del parasitismo gastrointestinal en ovinos y situación actual de la resistencia antihelmíntica en México. *Memorias del VII Seminario Internacional de Producción de Ovinos en el Trópico, las parasitosis y su control*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Alemán Y., Sánchez L.M., Pérez T., Rodríguez Y., Olivares J.L., Rodríguez J.G. 2011. Actividad larvicida de extractos de *Rhizophora mangle* L. contra estongilidos gastrointestinales de ovinos. *Revista Salud Animal*. 33: 111-115.

Alonso-Diaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., 2008 In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniferous plants. *Veterinary Parasitology*. 153: 313-319.

Andlauer, W., Furst, P., 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and Outlook. *Food Research International*. 35: 171-1716.

Arroyo-Balán, F.L., Mendoza-Gives, P., López-Arellano, M.E., Liébalo-Hernández, E., Vázquez-Prats, V., Miranda-Miranda, E., Ortiz de Montelano-Nolasco, A.M.

2008. Evaluación de un método combinado de control de la hemoncosis ovina en condiciones controladas. *Técnica Pecuaria México*. 46: 217-223.

Athanasiadou, S., Kyriazakis, I. 2004. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*. 63, 631-639.

Athanasiadou, S., Githiori, J., Kyriazakis, I., 2007. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal* 1, 1392–1400.

Calderón-Quintal, J.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C. A., Alonso, M. A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A. 2010. Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible? *Archivos de Medicina Veterinaria*. 42: 165-171.

Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 44: 35-44.

Cordero- Del Campillo, M., Rojo-Márquez, F.A., Martínez-Fernández, A.R., Sánchez-Acedo, M.C., Hernández-Rodríguez, S., Navarrete-López-Cozar, I., Diez-Baños, P., Quiroz-Romero, H., Carvalho-Varela, M. 1999. *Parasitología Veterinaria*. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. España.

Córdova-Ávalos, V., Sánchez-Hernández, M., Estrella-Chulím, N.G., Macías-Layane, A., Sandoval-Castro, E., Martínez-Saldaña, T., Ortíz-García, C.F. 2001 Factores que afectan la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el ejido



Francisco I. Madero del Plan Chontalpa Tabasco, México. Universidad y Ciencia. 17:34. 93-100.

Crescente, O., Acosta, M., Guevara, M., Estaba, A. 1999 Aprovechamiento de los desechos del cacao (*Theobroma cacao* L.). Saber. 11: 28-30.

Cuéllar-Ordaz, J. A. 2009. Evaluación de la resistencia a los desparasitantes. Memorias del VII Seminario Internacional de Producción de Ovinos en el Trópico, las parasitosis y su control. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Dawson, J.M., Buttery, P.J., Jenkins, D., Wood, C.D., Gill, M. 1999. Effects of dietary Quebracho tannin on nutrient utilization and tissue metabolism in sheep and rats. Journal Science Food Agriculture. 79: 1423-1430.

Domínguez, S.X.A., 1979. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa, S.A. México, D.F. 47-54

Galina-Hidalgo, M. A., Cuéllar-Ordaz, A. 2009. Alternativas de control de nematodos gastrointestinales en ovinos. Memorias del VII Seminario Internacional de Producción de Ovinos en el Trópico, las parasitosis y su control. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Githiori, J.B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., 2006. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. Veterinary Parasitology. 139: 308–320.

Hernandez- Orduño, G., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval- Castro, C., Aguilar-Caballero, A.J., Reyes- Ramirez, R.R., Hoste, H., Calderón-Quintal, J.A. 2008. In vitro anthelmintic effect of *Acacia gaumeri*, *Havardia albicans* and Quebracho tannin extracts on a Mexican strain of *Haemonchus contortus* L3 larvae. Tropical and subtropical Agroecosystems. 8: 191-197

Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S., Hoskin, S. O. 2006. The effects of tannin rich plants on parasitic nematode in ruminants. *Trends Parasitology*. 22: 253-261.

Hoste, H., Torres-Acosta, J. F. J., Alonso-Diaz, M. Á., Brunet, S., Sandoval-Castro, C., Adote, S. H. 2008. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Tropical Biomedicine*. 25: 56-72.

Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolarakia, F., Bruneta, S., Ojeda-Roberto, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C.A. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*. 185: 18-27.

Jean-Blain, C. 1998. Aspectes nutritionnels et toxicologiques des tannins. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 149: 911-920.

Kalvatchev, Z., Garzaro, D., Guerra-Cedezo, F. 1998. *Theobroma Cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición. *Agroalimentaria*. 6: 23-25.

Kamaraj, C., Rahuman, A. 2011 Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. 91: 400-404.

de Lock, U.O., 1994. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales, second ed. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú, pp. 147–161.

López-Andrade, P.A., Delgado-Nuñez, V.H., Azpeita-Morales, A., 1996. El cacao *Theobroma cacao* L. en Tabasco. INIFAP PRODUCE. Libro técnico N. 1, División Agrícola.

López-Andrade, P.A., Delgado-Nuñez, V.H., Azpeita-Morales, A., Castañeda-Ceja, R. 2000 Tecnología para la producción de cacao en Tabasco. INIFAP PRODUCE. Gobierno del estado de Tabasco.

Maciel, M.V., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Costa, C.T.C., Castro, C.M.C. 2006. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 140: 98-104

Makkar, H.P.S. 2006. Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites. BSAS Publication 34. The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. Edited by C.A. Sandoval-Castro, F.D.DeB.D. Hovell, J.F.J. Torres-Acosta and A. Ayala-Burgos. Nottingham University Press. 235-249.

Márquez L. D. 2003. Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Revista Corpoica*. 4: 55-71.

Martínez-Ortíz-de-Montellano C., Vargas-Magaña J.J., H.L. Canul-Kuc H. L., Miranda-Soberanis R., Capetillo-Leal C., Sandoval-Castro C. A., Hoste H., Torres-Acosta J. F. J. 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 172: 283–290.

Mendoza-de Gives, P. 2009. Control Biológico: una alternativa para el control de nematodos gastrointestinales. Memorias del VII Seminario Internacional de

Producción de Ovinos en el Trópico, las parasitosis y su control. Universidad Juárez autónoma de Tabasco.

Moreno, F. C., Gordon, I. J., Wright, A.D., Benvenuti, M.A., Saumell, C.A. 2010. *In vitro* anthelmintic effect of plant extracts against infective larvae of ruminants gastrointestinal nematode parasites. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 42: 155-163.

Nari, A. 2001. Diagnóstico y control de resistencia antihelmíntica en pequeños rumiantes. Platica magistral. En: Memorias II Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camelidos Sudamericanos. XI Congreso Nacional de Produccion Ovina.

Nieves-Guerrero, A.E. 2010. Evaluacion *in vitro* de fuentes de taninos (cacao y café) y forrajes (tres géneros de mangle) en el control de *Haemonchus contortus* en ovinos. Tesis de grado; licenciatura. UADY. Mérida, Yucatán, México.

Oliveira, L.M.B., Bevilaqua, C.M.L., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Barros, R. S., Rodriguez, A.C.M., Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Morais, S.M., Lima Y.C., Vieira, L.S., Navarro A.M.C., 2008. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*. 159: 55-59.

Paolini, V., Hoste H. 2006. Effects of tannins in goats infected with gastrointestinal nematodes. BSAS Publication 34. The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. Edited by C.A. Sandoval-Castro, F.D.DeB.D. Hovell, J.F.J. Torres-Acosta and A. Ayala-Burgos. Nottingham University Press. 209-220.

Prichard, R. K., Hall, C. A., Kelly, J. D., Martin, I. C. A., Donald, A. D. 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. Australian Veterinary Journal. 56: 239-250.

Ramírez-Díaz, F., 1997 Sistema Agroindustrial Cacao en México y su comportamiento en el Mercado. Universidad Autonoma de Chapingo. Colección: Estructura y dinámica de los sistemas agroindustriales.

Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. Journal of Animal Science. 73: 1516-1528.

Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., Salem, A.Z.M., Chan-Pérez, J.I. 2012. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock. Animal Feed Science and Technology. 176: 192– 201.

Soetan, K.O., Lasisi, O.T., Agboluaje, A.K. 2011. Comparative assessment of *in-vitro* anthelmintic effects of the aqueous extracts of the seeds and leaves of the African locust bean (*Parkia biglobosa*) on bovine nematode eggs. Journal of Cell and Animal Biology. 5: 109-112.

Steppek, G., Behnke, J.M., Buttle, D.J., Duce, I.R., 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? Trends Parasitology. 20: 322–327.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. 2007. Veterinay Parasitology. Third Edition. Blackwell Publishing. U. S. A. 158-159.

Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H. 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. Small Ruminant Research. 77: 159–173.

Torres-Acosta, J.F.J., Alonso-Díaz, M.Á., Hoste, H., Sandoval-Castro C.A., Aguilar-Caballero, A.J. 2008. Efectos negativos y positivos del consumo de forrajes ricos en taninos en la producción de caprinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 9: 83-90

Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuéllar-Ordaz, J.A. 2012. Anthelmintic resistance in Sheep farms: Update of the situation in the American Continent. *Veterinary Parasitology*. 189: 89–96.

Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Capetillo-Leal, C.M. 2013. Comparison of three *in vitro* assays to assess the sensitivity of *Haemonchus contortus* to tannin rich extracts. Tesis de grado: Doctorado. Respuesta fisiológica de los ovinos y sus nematodos gastrointestinales a los taninos. UADY. Mérida, Yucatán, México.

Villalba, J. J., Provenza, F. D., Hall, J. O., Lisonbee L. D. 2010. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. *Journal Of Animal Science*. 88: 2189-2198.

Von Samson-Himmelstjerna, G., von Witzendorff, C., Sievers, G., Schnieder, T., 2002. Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after benzimidazole treatment. *Veterinary Parasitology*. 108: 227-235

Waghorn, G.C., McNabb, W.C. 2003. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 383-392.

[http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/cacao/ce\\_panorama.pdf](http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/cacao/ce_panorama.pdf)

(consultado el 02 de noviembre de 2012)

[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=183](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=183) (consultado el 19 de noviembre de 2012)

[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=110&Itemid=75](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=110&Itemid=75) (consultado el 19 de noviembre de 2012)

<http://www.leorasoftware.com/> Leora software 2002; (consultado el 15 de abril de 2013)

## 6. ARTICULO

### **Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos acetona-agua de tres cultivares de *Theobroma cacao* sobre la eclosión de *Haemonchus contortus*.**

A. De la Cruz-Cortazar\*, C.A. Sandoval-Castro<sup>1</sup>, J.I. Chan-Pérez<sup>1</sup>, J.F.J. Torres Acosta<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>*Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5, Carretera Mérida-Xmatkuil, A.P., 4-116 Itzimná, C.P. 97315, Mérida, Yucatán, México.*

Manuscrito en preparación para enviar a la revista "Veterinary Parasitology"



## RESUMEN

El presente estudio evaluó el efecto antihelmíntico (AH) *in vitro* de extractos acetona-agua (70:30 v/v) de la cáscara de los frutos y las hojas de tres cultivares de *Theobroma cacao*: Azteca (CAZT y HAZT), Calabacillo (CCAL y HCAL) y Ceylán (CCEY y HCEY) sobre la eclosión de huevos de dos aislados de *Haemonchus contortus* de diferentes regiones de México (CENID-PAVET-INIFAP y FMVZ-UADY) mediante el ensayo de inhibición de la eclosión de huevos (EIEH). Adicionalmente, para explorar el potencial nutricional de estos cultivares se realizó su análisis químico proximal. Los huevos del nematodo se obtuvieron de caprinos donadores infectados artificialmente y fueron incubados en buffer fosfato salino (Phosphate buffered saline, PBS por sus siglas en inglés) a diferentes concentraciones del extracto (0, 600, 1200, 2400 y 3600 µg/ml PBS). Se empleó modelo lineal generalizado el análisis de los datos colectados. La concentración eficaz 50 (CE<sub>50</sub>) fue determinada. El papel de los taninos en el efecto AH de los extractos fue evaluado usando polivinilpolipirrolidona (PVPP). Los extractos bloquearon la eclosión en ambos aislados a 1200 µg/ml PBS. El papel de los taninos en el efecto AH observado sólo se comprobó para el extracto de HCEY en ambos aislados. Se concluye que los subproductos evaluados representan una opción nutracéutica para la alimentación de pequeños rumiantes y que dichas fuentes son diferentes en cuanto a la acción AH mostrada sobre huevos de *H. contortus*.

**Palabras clave:** Extractos acetónicos, variedades de *Theobroma cacao*, eclosión de huevos, *H. contortus*.

## 1. Introducción

A raíz de la resistencia antihelmíntica (RA) se han explorado alternativas para el control de los NGI. El uso de plantas o partes de estas como frutos, hojas y tallos como AH no convencionales ha demostrado ser una alternativa debido a su eficacia sobre las diferentes etapas del ciclo biológico de estos parásitos. Una diferencia entre estos nuevos AH y las drogas comerciales es que su efecto es solamente parcial (Torres-Acosta *et al.*, 2008). Dentro de estas plantas y como fuente no convencional de alimento se encuentra el cacao (*Theobroma cacao*). Conteniendo cerca de 300 componentes volátiles además de alcaloides como la teobromina y taninos (Garzaro *et al.*, 1998). El uso del cacao como planta con potencial nutracéutico fue evidenciado por Nieves-Guerrero (2010) al realizar el análisis bromatológico de la semilla y la cáscara de *T. cacao*. Encontró la siguiente composición química: 23.57% MS, 6.39% PC, 11.56% cenizas, 5.61% extracto etéreo, 62.95% fibra detergente neutra, 52.35% fibra detergente ácida y 26.98% lignina lo que indica que estos materiales eran viables para el consumo de los rumiantes. El contenido de compuestos fenólicos totales (FT) y taninos condensados (TC) en los extractos acetónicos fue de 8.13% FT y 12.49% TC respectivamente, para la cáscara de cacao.

Dado que las hojas y cáscara de cacao no forman parte de la dieta normal de los pequeños rumiantes, se presenta la hipótesis que los metabolitos secundarios en los extractos acetona-agua (70:30 v/v) tendrán una elevada actividad AH. La presente investigación tuvo como objetivo comparar el efecto AH *in vitro* de extractos acetónicos obtenidos de la cáscara y de la hoja de tres cultivares de *Theobroma cacao*: cacao Azteca (Criollo); cacao Ceylán blanco (Forastero) y cacao Calabacillo (Trinitario), sobre el proceso de eclosión en huevos de *Haemonchus contortus* provenientes de dos regiones de México (CENID-PAVET-INIFAP y FMVZ-UADY) así como explorar las propiedades nutricionales de los cultivares evaluados.

## **2. Materiales y métodos.**

### **2.1 Área de colección de muestras vegetales**

Las cáscaras y las hojas de tres variedades de *T. cacao*: Trinitario (Azteca), Forastero (Calabacillo) y Criollo (Ceylán) fueron recolectadas en julio de 2013 en una plantación en el municipio del Centro, Tabasco (17°59'21"N 92°55'41"O). Las muestras fueron mantenidas en congelación, hasta su posterior procesamiento, en el Laboratorio de Nutrición Animal, del Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, de la Universidad Autónoma de Yucatán.

### **2.2 Determinación de la composición bromatológica del cacao**

Los materiales antes mencionados fueron procesados para determinar su composición química: proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) y cenizas (AOAC, 1980), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), lignina (Ankom<sup>200</sup> Fiber analyzer). Además se determinaron fenoles totales (FT) (Folin-Coicalteu) y taninos condensados (TC) (vainillina) (Makkar, 2003). Estos análisis sirvieron para describir su potencial como alimento para rumiantes.

### **2.3 Preparación de extractos de los materiales colectados**

Se usaron 500 g en base fresca de cada materia recolectada (cáscara y hojas de cacao) y se mezclaron con acetona: agua (70/30 v/v) conteniendo ácido ascórbico (3g L<sup>-1</sup>). La mezcla fue puesta en baño de ultrasonido durante 20 min (Branson model 5510). Posteriormente, la mezcla fue filtrada empleando papel filtro comercial (número 50). La mezcla fue lavada dos veces con diclorometano (relación 1:1) para remover pigmentos y lípidos. La acetona se removió del

extracto por medio de un rotoevaporador asistido por vacío (<60 °C; Buchi modelo B-480). La fracción acuosa obtenida fue liofilizada con un equipo UL Standard 61010<sup>a</sup>, labconco ® y almacenada en frascos de vidrio sellados a 4 °C hasta su uso. Se obtuvieron seis extractos: cáscara Ceylán (CCEY), cáscara Azteca (CAZT), cáscara Calabacillo (CCAL), hoja Ceylán (HCEY), hoja Azteca (HAZT) y hoja Calabacillo (HCAL).

#### **2.4 Infección de animales donadores**

Se emplearon dos aislados de *H. contortus*; uno proveniente de ovinos en pastoreo de la región centro de México (CENID-PAVET-INIFAP) y otro proveniente de caprinos en pastoreo de vegetación nativa de la región sureste de México (FMVZ-UADY); ambos aislados susceptibles a bencimidazoles. Para la obtención de huevos frescos de *H. contortus* se realizaron infecciones artificiales en dos caprinos donadores, uno por cada aislado empleado. Los caprinos donadores fueron previamente desparasitados, empleando dos antihelmínticos de amplio espectro (bencimidazol 20 mg kg<sup>-1</sup> y levamisol 12 mg kg<sup>-1</sup>). Diez días después de la desparasitación, los animales fueron infectados con 4000 larvas infectantes de cada uno de los aislamientos. Estos animales fueron mantenidos dentro de jaulas individuales elevadas, para evitar infecciones con otros NGI. Al día 28 postinfección, se colectaron muestras de heces para ser procesadas empleando la técnica de McMaster con el fin de corroborar la patencia de la infección y determinar la carga parasitaria (huevos por gramo de heces). Los animales fueron alimentados con de 3 kg de pasto de corte (*Pennisetum purpureum*) y 300 g alimento balanceado en forma diaria, además de agua *ad libitum*.

## 2.5 Ensayo de inhibición en la eclosión de huevos (EIEH)

Se evaluó el efecto antihelmíntico de los seis extractos acetona-agua (70:30) de las cáscaras y de las hojas de *T. cacao* sobre la eclosión de los huevos mediante el EIEH (Hoste *et al.*, 2006). En un tubo de 50 ml fue pesado 0.160 g de cada extracto y diluido en 16 ml de PBS, para obtener una solución madre a 10,000 µg/ml de buffer (Phosphate buffered saline o PBS por sus siglas en Inglés). Se emplearon placas de 24 pozos para incubar los huevos de *H. contortus* con los extractos de cada planta. Para cada extracto se evaluaron las concentraciones de 300 µg, 600 µg, 1200 µg, 2400 µg, 3600 µg y 4800 µg de extracto por ml de PBS. Se empleó PBS sin extracto como control negativo. En cada pozo se colocaron las soluciones a diversas concentraciones empleando la solución madre y PBS en distintas proporciones. Posteriormente 1ml de la suspensión con huevos (200 huevos/ml) fue adicionada en cada uno de los pozos (volumen final de 2 ml). Las placas con los huevos fueron incubadas durante 48 horas a 28 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó dos gotas de una solución de Lugol en cada uno de los pozos, esto con el propósito de detener el proceso de eclosión, matar a las larvas y teñirlas.

El contenido de cada pozo fue recuperado para realizar el conteo de los huevos y larvas empleando una cámara de McMaster, para facilitar el conteo al microscopio empleando un aumento 10x. Los resultados fueron ubicados en tres categorías: huevos, huevos larvados y larvas. Se realizaron 6 réplicas por cada una de las concentraciones evaluadas. Se determinó el porcentaje de eclosión en cada uno de los pozos empleando la fórmula:

$$\%Eclosión = (\text{número de huevos} / \text{Total de huevos} + \text{larvas}) \times 100$$

Para determinar la influencia de los taninos sobre el proceso de eclosión de los huevos, los extractos fueron incubados con un secuestrante de taninos (polivinilpolipirrolidone, PVPP) empleando una concentración de 0.05 g de PVPP por cada ml de solución de extracto. Las soluciones de extracto + PVPP fueron

incubadas durante 2 horas a 24 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos con el extracto fueron centrifugados a 3500 rpm por 5 min. El sobrenadante (libre de taninos) fue recuperado y empleado para realizar una segunda serie de placas como se describió anteriormente evaluando las concentraciones de 3600µg sin PVPP, 3600µg con PVPP y PBS como control negativo. Se realizaron 6 réplicas de cada concentración y se determinó en porcentaje de eclosión.

## **2.6 Análisis de datos**

La dosis-efecto de los extractos sobre el proceso de eclosión fue estimada mediante Modelos Lineales Generalizados (MLG) determinando diferencias significativas entre el control negativo (PBS) y las diferentes concentraciones evaluadas. Los datos obtenidos de la prueba de PVPP fueron analizados con un MLG para determinar las diferencias entre los resultados del control negativo (PBS) y los de 3600 µg/ml PBS o los de 3600 µg/ml PBS + PVPP. Mediante el programa estadístico Statgraphics 5.1 (Statgraphics, 2001).

Adicionalmente se determinaron las concentraciones eficaces al 50% ( $CE_{50}$ ) y sus intervalos de confianza al 95% mediante un análisis PROBIT empleando el programa PoloPlus (LeOra software, 2003).

La composición química de las diferentes variedades de cacao no fue comparada estadísticamente ya que únicamente se analizó 1 muestra por variedad. Se presentan los resultados únicamente con fines descriptivos y para contribuir al conocimiento de su valor nutricional ya que existe información limitada sobre estas plantas.

### 3. Resultados

#### 3.1 Análisis bromatológico

Las hojas de cacao presentaron mayor cantidad de PC, siendo estos mismos ligeramente más altos en EE. En contraste la cáscara de cacao presentó la menor cantidad de PC y EE (Cuadro 1). El análisis del contenido de fenoles muestra que en general las hojas de los cultivares evaluados presentan un mayor contenido de FT comparado con las cáscaras. Sin embargo, el contenido de TC fue más variable al encontrarse en las hojas el menor (HAZT: 7.01%) y el mayor valor (HCAL: 37.61%).

#### 3.2 Resultados del ensayo de inhibición en la eclosión de huevos (EIEH)

Los resultados del control negativo (PBS) muestran rangos de eclosión de *H. contortus* de 88.88% hasta 96.93% para el aislamiento CENID-PAVET-INIFAP y de 83.79% hasta 97.50% para el aislamiento FMVZ.

En la evaluación de los extractos contra el aislamiento del centro del país CENID-PAVET-INIFAP se encuentra que el extracto CCEY (cáscara de Ceylán) muestra una acción AH sobre la eclosión arriba del 50% (49.46% de eclosión) en la concentración de 1200 µg/ml de PBS.

Los extractos más eficaces a concentración de 3600 µg/ml de PBS contra el aislado CENID-PAVET-INIFAP fueron: HAZT (3.63%), CCEY (13.57%) y HCAL (29.46%); los menos eficaces fueron CCAL (53.70%), HCEY (49.64%) y CCAL (45.23%) (Cuadro 2).

La acción AH contra la eclosión del aislamiento local FMVZ se hace evidente en los extractos CCEY y CCAL (Cáscara Calabacillo) en la concentración de 1200 µg/ml de PBS.

Los extractos más eficaces a concentración de 3600 µg/ml de PBS contra el aislado FMVZ fueron HAZT (5.53%), CAZT (8.04%), CCAL (9.42%), CCEY

(12.29%) y HCAL (21.52%). El menos eficaz para este aislado fue HCEY (41.57%) (Cuadro 3).

### **3.3 Resultados de la prueba de PVPP**

La segunda serie de ensayos de inhibición de la eclosión de huevos, con y sin la adición de PVPP, se realizó para confirmar el papel de los polifenoles en la actividad AH, observada en los extractos a la concentración de 3600 µg/ml de PBS. Los controles negativos (PBS), para el aislado CENID-PAVET-INIFAP, mostraron un rango de 90.64% hasta 97.86% de eclosión; mientras que para el aislado FMVZ el rango de eclosión fue desde 70.72% hasta 96.52%.

El uso de PVPP muestra que los compuestos polifenólicos de los extractos, tanto de cáscara como de hoja de *T. cacao*, no tienen una acción AH sobre la eclosión de huevos de *H. contortus*, en la mayoría de los extractos, y que esta acción AH, incluso se ve mejorada cuando se bloquean los compuestos polifenólicos en ambos aislamientos; por lo tanto, en el aislamiento CENID-PAVET-INIFAP y FMVZ en el extracto HCEY, se puede decir que los compuestos polifenólicos si jugaron un papel en la acción AH encontrada (Cuadro 4 y 5). Mostrando que los taninos no son los responsables de la actividad AH, en la totalidad de los extractos evaluados.

### **3.4 Concentración eficaz 50 (CE<sub>50</sub>)**

En el cuadro 6, se muestra la interacción de la CE<sub>50</sub> en ambos aislados estudiados (CENID-PAVET-INIFAP y FMVZ). Se indican los extractos con diferencia significativa entre ambos aislados: CAZT y CCAL.

Los extractos más eficaces en contra de CENID-PAVET-INIFAP son CCEY (CE<sub>50</sub> = 1304.99 µg) y HAZT (CE<sub>50</sub> = 1618.89 µg). Contra el aislado FMVZ, los extractos más eficaces fueron CCAL (CE<sub>50</sub> = 1223.66 µg), CAZT (CE<sub>50</sub> = 1533.53 µg) y CCEY (CE<sub>50</sub> = 1544.39 µg).



Cuadro 1. Resultados del análisis bromatológico de las hojas y cáscaras de los cultivares de *T. cacao* estudiados (% base seca) incluyendo porcentaje de fenoles totales (FT), fenoles no taninos (F no T), taninos totales (TT) y taninos condensados (TC)

Material de <i>T. cacao</i>	FC	FDN	FDA	C	PC	EE	Lignina	(FT) *	(F no T)*	(TT)*	(TC)**
CCEY	36.13	63.38	49.59	9.43	5.33	0.62	22.00	1.38	0.64	0.74	14.50
CAZT	32.50	65.34	48.40	10.42	5.39	0.41	20.14	1.79	0.77	1.02	10.49
CCAL	32.64	64.47	49.45	10.35	4.62	0.48	22.32	1.61	0.59	1.02	14.71
HCEY	34.68	64.43	45.08	9.35	10.81	1.02	18.99	2.89	1.07	1.82	13.98
HAZT	35.75	66.91	47.29	9.66	10.38	1.20	18.33	3.34	1.01	2.33	7.01
HCAL	30.14	60.67	42.05	12.50	9.41	2.14	19.19	3.24	1.40	1.84	37.61

MS: materia seca, FC: fibra cruda, FDN: fibra detergente neutra, FDA: fibra detergente acida, C: cenizas, PC: proteína cruda, EE: extracto etéreo. CCEY: cáscara Ceylán, CAZT: cáscara Azteca, CCAL: cáscara Calabacillo, HCEY: hoja Ceylán, HAZT: hoja Azteca y HCAL: hoja Calabacillo.

\* F equivalente a ácido Tánico

\*\* Vainillina= equivalente a catequina

Cuadro 2: Efecto *in vitro* de las dosis de los extractos de *Theobroma cacao* sobre el porcentaje de eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* aislamiento CENID-PAVET-INIFAP.

Extracto	Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ de PBS: Phosphate Buffered Saline)						EE
	PBS	300	600	1200	2400	3600	
HAZT	96.64	94.08	94.45	73.75*	<b>16.08*</b>	<b>3.63*</b>	3.19
HCEY	95.55	93.17	90.79	70.30*	59.68*	<b>49.64*</b>	2.31
HCAL	94.88	93.66	91.81	79.35*	60.85*	<b>29.46*</b>	3.70
CAZT	88.88	93.39	92.29	80.95	65.04*	53.70*	3.01
CCEY	96.93	96.62	87.92	<b>49.46*</b>	<b>34.14*</b>	<b>13.57*</b>	8.09
CCAL	96.36	96.10	86.31	76.27*	54.59*	<b>45.23*</b>	3.61

HAZT (hoja de cacao Azteca), HCEY (hoja de cacao Ceylán), HCAL (hoja de cacao Calabacillo), CAZT (cáscara de cacao Azteca), CCEY (cáscara de cacao Ceylán), CCAL (cáscara de cacao Calabacillo) y EE (error estándar de la media). (\*) Indica la diferencia estadística significativa entre la dosis con respecto al control (PBS).

Cuadro 3: Efecto *in vitro* de las dosis de los extractos de *Theobroma cacao* sobre el porcentaje de eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* del aislado FMVZ

Extracto	Dosis ( $\mu\text{g/ml}$ de PBS: Phosphate Buffered Saline)						EE
	PBS	300	600	1200	2400	3600	
HAZT	83.79	85.12	82.30	69.22*	<b>48.12*</b>	<b>5.53*</b>	2.28
HCEY	97.50	96.36	94.27	81.05*	58.84*	<b>41.57*</b>	1.67
HCAL	87.40	91.16	94.42	70.81*	61.61*	<b>21.52*</b>	5.66
CAZT	97.30	94.86	87.94	60.85*	<b>31.05*</b>	<b>8.04*</b>	3.74
CCEY	94.07	96.15	86.16	<b>49.36*</b>	<b>38.51*</b>	<b>12.29*</b>	4.72
CCAL	92.33	92.91	72.49*	<b>43.10*</b>	<b>24.49*</b>	<b>9.42*</b>	3.85

HAZT (hoja de cacao Azteca), HCEY (hoja de cacao Ceylán), HCAL (hoja de cacao Calabacillo), CAZT (cáscara de cacao Azteca), CCEY (cáscara de cacao Ceylán), CCAL (cáscara de cacao Calabacillo) y EE (error estándar de la media). (\*) Indica la diferencia estadística significativa entre la dosis con respecto al control (PBS).

Cuadro 4: Porcentaje de eclosión de huevos de *H. contortus* (CENID-PAVET-INIFAP) expuestos a extractos de hoja y cáscara de *T. cacao* con y sin PVPP

Extracto	PBS	3600	PVPP	EE
HAZT	97.86	0.36*	0*	0.32
HCEY	91.76	3.36*	31.20*	1.53
HCAL	95.90	5.95*	3.97*	1.21
CAZT	93.03	0.66*	0*	0.77
CCEY	95.86	3.77*	4.65*	2.13
CCAL	90.64	8.16*	0*	1.12

HAZT (hoja de cacao Azteca), HCEY (hoja de cacao Ceylán), HCAL (hoja de cacao Calabacillo), CAZT (cáscara de cacao Azteca), CCEY (cáscara de cacao Ceylán), CCAL (cáscara de cacao Calabacillo) y EE (error estándar de la media). (\*) En la misma fila Indica diferencia significativa en comparación con su control. EE (error estándar de la media)

Cuadro 5: Porcentaje de eclosión de huevos de *H. contortus* (FMVZ) expuestos a extractos de hoja y cáscara de *T. cacao* con y sin PVPP

Extracto	PBS	3600	PVPP	EE
HAZT	74.83	3.85*	10.12*	2.19
HCEY	96.52	3.35*	29.71*	2.04
HCAL	74.79	0.41*	2.21*	0.95
CAZT	72.57	16.49*	7.17*	2.00
CCEY	71.84	5.39*	0.5*	1.34
CCAL	70.72	8.60*	0.09*	0.69

HAZT (hoja de cacao Azteca), HCEY (hoja de cacao Ceylán), HCAL (hoja de cacao Calabacillo), CAZT (cáscara de cacao Azteca), CCEY (cáscara de cacao Ceylán), CCAL (cáscara de cacao Calabacillo) y EE (error estándar de la media). (\*) En la misma fila Indica diferencia significativa en comparación con su control. EE (error estándar de la media)

Cuadro 6. Concentración eficaz 50 (CE<sub>50</sub>) e intervalos de confianza al 95%, obtenidos de los diferentes extractos evaluados de *T. cacao*, sobre la eclosión de huevos de dos aislamientos de *H. contortus*.

Extracto	Aislamiento	
	CENID-PAVET-INIFAP	FMVZ
HAZT	1618.89 <sup>a</sup> (1470.72 a 1767.24)	2282.89 <sup>a</sup> (1435.84 a 2579.49)
HCEY	3316.65 <sup>a</sup> (2845.56 a 3988.72)	3070.70 <sup>a</sup> (2826.11 a 3378.02)
HCAL	2558.73 <sup>a</sup> (2239.23 a 2877.60)	2801.32 <sup>a</sup> (2571.17 a 3100.34)
CAZT	4174.37 <sup>a</sup> (3529.71 a 5374.81) †	1533.53 <sup>b</sup> (1296.77 a 1749.42)
CCEY	1304.99 <sup>a</sup> (989.82 a 1655.18)	1544.39 <sup>a</sup> (1252.36 a 1858.95)
CCAL	3378.45 <sup>a</sup> (2782.37 a 4315.61)	1223.66 <sup>b</sup> (983.51 a 1460.37)

HAZT (hoja de cacao Azteca), HCEY (hoja de cacao Ceylán), HCAL (hoja de cacao Calabacillo), CAZT (cáscara de cacao Azteca), CCEY (cáscara de cacao Ceylán), CCAL (cáscara de cacao Calabacillo)

†Intervalo de confianza al 95%. Diferentes literales indica diferencias significativas entre columnas (P > 0.05)

#### 4 Discusión

El presente trabajo comparó el efecto AH *in vitro* de los extractos acetona-agua (70:30 v/v) de cáscara y hoja de tres cultivares de *T. cacao*: Azteca, Calabacillo y Ceylán; sobre la eclosión de los huevos de *H. contortus* de dos aislamientos resistentes a los antihelmínticos comerciales y de diferentes regiones de México (CENID-PAVET-INIFAP y FMVZ) mediante el Ensayo de Inhibición de la Eclosión

de los Huevos (EIEH); así como explorar el potencial nutricional de los cultivares de cacao estudiados.

### **Composición química**

Valores similares del análisis bromatológico de las cáscaras de los tres cultivares evaluados han sido reportados por Nieves-Guerrero *et al.* (2010). Valores para otros componentes de la cáscara fueron reportados por Crescente *et al.* (1999); quienes al realizar un análisis químico a la cáscara de cacao en Venezuela encontraron los siguientes: 8.69% proteínas, 1.40% grasa, 60.14% materia orgánica y 5.51% minerales que revelan el potencial de la cáscara de cacao en la elaboración de dietas para animales y como fertilizante orgánico de numerosos cultivos. Pouomogne *et al.* (1997) reportaron los siguientes valores para la cáscara de cacao: 17% humedad, 10.8% proteína cruda, 2.4% grasa cruda y 13.9% cenizas. Sin embargo, no se encontraron reportes de valores para el follaje de cacao por lo que los resultados aquí reportados contribuyen a la valoración de su potencial como nutracéutico.

### **Efecto antihelmíntico**

La técnica utilizada (EIEH) presenta una sensibilidad media para determinar el efecto AH de extractos acetónicos sobre NGI en comparación con la técnica de inhibición del desenvaine que es altamente sensible (Vargas-Magaña *et al.*, 2013). Sin embargo fue seleccionada debido a que las muestras estudiadas corresponden a fuentes no convencionales de AH, por lo tanto, independientemente de la sensibilidad de la prueba, se esperaría un efecto AH como efecto de que los aislados provienen de animales que no estuvieron en contacto previo con dicha fuente.

Los resultados de la evaluación *in vitro* confirmaron la diferencia en el efecto AH entre los extractos acetona-agua (70:30 v/v) de las hojas y la cáscara entre los cultivares de *T. cacao* evaluados sobre la eclosión de los huevos de *H. contortus*. Vargas-Magaña *et al.* (2013) evaluaron la eclosión de *H. contortus* del aislamiento CENID-INIFAP expuesto a extractos acetona-agua obtenidos de diferentes follajes ricos en taninos (*Lysiloma latisiliquum*, *Laguncularia racemosa*, *Rizophora mangle* y *Acicennia germinans*) y subproductos agroindustriales (semilla y cáscara de *T. cacao* y *Coffea arabica*) en concentraciones similares a las evaluadas en esta investigación; y descubrieron que los extractos de *R. mangle* y de la cascara de *T. cacao* bloquearon la eclosión a iguales o superiores a 1200 µg/ml de PBS. Los datos mostrados en esta evaluación confirman una inhibición de la eclosión similar para un extracto de cáscara (CCEY, 49.46% de eclosión a 1200 µg/ml de PBS), contra el mismo aislado de *H. contortus*. Los extractos restantes presentaron efecto AH sobre la eclosión a la máxima concentración evaluada contra el mismo aislado a excepción de CAZT el cual permitió 53.70% de eclosión. Lo que pone en evidencia diferencias entre los cultivares de *T. cacao* estudiados.

Por otra parte la acción AH fue muy distinta contra el aislado FMVZ en el cual, además del extracto CCEY, se sumó el extracto CCAL; 49.36% y 43.10% de eclosión respectivamente en la concentración 1200 µg/ml de PBS además de dos extractos que mostraron inhibición de la eclosión por encima del 50% a 2400 µg/ml de PBS.

La diferencia entre el efecto de las dosis puede deberse a que la naturaleza de los compuestos presentes no siempre es conocida. Es sabido que para plantas de la misma especie, el contenido de metabolitos secundarios de las plantas (MSP) es altamente variable en calidad y cantidad, debido a la genética y/o los efectos del ambiente (Makkar *et al.*, 2006). Algunos ejemplos de los efectos genéticos son la localización diferenciada de los PSM en los diferentes tejidos, diferencias entre cultivares y la edad fenológica. Ejemplos de los efectos del ambiente son las condiciones del suelo, el agua y la luz, condiciones ambientales adversas y aumento de la depredación por la herbivoría (Hoste *et al.*, 2008)

Otra fuente de variación se refiere al modo de preparación de los extractos en la composición de las drogas de las plantas (extracción, decocción, infusión, etc.) (Lahlou, 2004), la cual es minimizada al elaborar los extractos con un mismo procedimiento y en un corto plazo de tiempo. No obstante, la inconsistencia en la actividad AH entre los extractos de las diferentes variedades de cacao, puede sugerir que existe variabilidad de las estructuras químicas de los taninos condensados y otros compuestos contenidos en los extractos evaluados tal como se ha detectado al evaluar diversas variedades de mangle (Molan *et al.*, 2003; Hoste *et al.*, 2006).

Aun cuando la literatura dice que, a mayor cantidad de TC se espera un mayor efecto AH (Paolini y Hoste, 2006; Nieves-Guerrero *et al.*, 2010), y que en esta evaluación la muestra HCAL mostró la mayor cantidad de TC (37.61%). Los niveles más altos en la inhibición de la eclosión de los huevos de *H. contortus*, fueron observados en los extractos que no tuvieron elevada concentración de TC.

### **Papel de los TC en la actividad AH**

Las plantas ricas en taninos han sido evaluadas por su efecto sobre los NGI de los rumiantes (Hoste *et al.*, 2006). Se ha reportado que los taninos pueden mejorar la resiliencia y la resistencia de los ovinos y caprinos infectados con NGI (Paolini y Hoste, 2006).

La prueba EIEH con y sin PVPP demostró que los compuestos polifenólicos no siempre son los responsables de la acción AH, en los extractos evaluados. Esto debido a que la acción AH observada solo puede ser atribuida a este tipo de MSP, en unos de los extractos (HZAI) para ambos aislamientos.

La actividad antihelmíntica de los extractos de plantas se puede deber a los metabolitos secundarios, que pueden extraer de la materia cruda de las mismas (Domínguez, 1979). Otra explicación es que en las plantas pueden contener, además de taninos, diversas compuestos secundarios, algunos de los cuales podrían ser extraídos conjuntamente con los compuestos fenólicos y que también pueden tener un efecto AH (Barrau *et al.*, 2005).

## Conclusión

La evidencia recabada en esta investigación confirma la existencia de diferencias en la acción AH de los extractos de *T. cacao*, de los cultivares evaluados, sobre la eclosión de *H. contortus*. Además, que estos cultivares representan una opción viable para la alimentación de pequeños rumiantes, lo que permite proponer el uso de cultivares específicos, como elementos nutracéuticos en la dieta de ovinos y caprinos. Sin embargo, se espera ampliar la investigación hacia los metabolitos secundarios implicados en la acción AH encontrada.

## 5. Referencias

- Alonso-Díaz, M. Á., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A., 2008. Efectos negativos y positivos del consumo de forrajes ricos en taninos en la producción de caprinos. *Trop. and Subtrop. Agroecosystems*. 9, 83-90.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H. 2008. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathmen of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet. Parasitol.* 153, 313-319.
- AOAC. 1980 Official Methods of Analysis, Association of Official Agricultural Chemist, 13 ed. Washington, D.C.
- Arrazate, C. H. A., Fuentes, J. M. V., Rojas, E. C., Méndez, R. A. G., López, A. M., Medina, J. F. A. 2011. *Diagnóstico del cacao en México*: Universidad Autónoma Chapingo.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H. 2005 Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop.*) on the *in vitro* larval migration of



*Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. Parasitology. 131, 531-538.

Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet. Parasitol. 44, 35-44

Crescente, O., Acosta, M., Guevara, M., Estaba, A. 1999 Aprovechamiento de los desechos del cacao (*Theobroma cacao* L.). Saber, 11, 28-30

Dominguez, S.X.A., 1979. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. S.A. México, D.F. 281

Garzaro, D., Cedezzo, F. G., & Kalvatchev, Z. 1998. *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. Agroalimentaria, 23.

Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S., Hoskin, S. O. 2006. The effects of tannin rich plants on parasitic nematode in ruminants. Trends Parasitol. 22, 253-261.

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F., Alonso-Diaz, M.A., Brunet, S., Sandoval-Castro, C., Houzangbe-adote, S., 2008. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. Trop. Biomed. 25, 56-72.

Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., et al. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. Vet. Parasitol. 186, 18-27.

- Lahlou, M. 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.* 18, 435-448.
- Makkar, H.P.S., 2003. Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage. A Laboratory Manual Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency (FAO/ IAEA), Vienna, Austria, 49–53.
- Makkar, H.P.S. 2006. Chemical and biological assays for quantification of major plant secondary metabolites in: Sandoval-Castro, C.A., DeB Hovell, F.D., Torres-Acosta, J.F.J and Ayala-Burgos, (Eds.), *Herbivores, assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds*. Nottingham University Press, Nottingham, 235-249.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S. 2003, Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichstrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* 33, 1691- 1698.
- Nieves-Guerrero, A.E. 2010. Evaluacion *in vitro* de fuentes de taninos (cacao y café) y forrajes (tres géneros de mangle) en el control de *Haemonchus contortus* en ovinos. Tesis de grado; licenciatura. UADY. Mérida, Yucatán, México.
- Paolini, V., Hoste H. 2006. Effects of tannins in goats infected with gastrointestinal nematodes. BSAS Publication 34. The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. Edited by C.A. Sandoval-Castro, F.D.DeB.D. Hovell, J.F.J. Torres-Acosta and A. Ayala-Burgos. Nottingham University Press. 209-220.

- Pouomogne, V., Takam, G., Pouemegne, J-B., 1997. A preliminary evaluation of cacao husks in practical diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 156, 211-219.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 69, 299-322.
- Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H. 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Res.* 77, 159–173.
- Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H.2, Capetillo-Leal, C.M. 2013. Comparison of three *in vitro* assays to assess the sensitivity of *Haemonchus contortus* to tannin rich extracts. Tesis de grado: Doctorado. Respuesta fisiológica de los ovinos y sus nematodos gastrointestinales a los taninos. UADY. Mérida, Yucatán, México.
- Von Samson-Himmelstjerna, G., von Witzendorff, C., Sievers, G., Schnieder, T. 2002. Comparative use of faecal egg count reduction test, egg hatch assay and beta tubulin codon 200 genotyping in small strongyles (cyathostominae) before and after bencimidazole Treatment. *Vet. Parasitol.* 108, 227-235.