






Eclosion inhibition of *Haemonchus contortus* eggs with two extracts of *Caesalpinia coriaria* fruits

Inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* con dos extractos de frutos de *Caesalpinia coriaria*

Olmedo-Juárez, A.²  De Jesús-Martínez, X.¹, Rojas-Hernández, S.¹ 
Villa-Mancera A.³  Romero-Rosales, T.¹  Olivares-Pérez, J.^{1*} 

¹Universidad Autónoma de Guerrero, Programa de Posgrado Maestría en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local, Carretera Iguala-Tuxpan, Guerrero, México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación, Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad, Carretera Federal Cuernavaca- Cuautla N° 8534/Col. Progreso C.P. 625550, Jiutepec, Morelos, México / A.P. 206- CIVA. ³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Olmedo-Juárez, A., De Jesús-Martínez, X., Rojas-Hernández, S., Villa-Mancera A., Romero-Rosales, T., Olivares-Pérez, J. (2022). Eclosion inhibition of *Haemonchus contortus* eggs with two extracts of *Caesalpinia coriaria* fruits. *Revista Bio Ciencias* 9, e1121. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.09.e1121>



ABSTRACT

Haemonchus contortus is a gastrointestinal parasite of small ruminants. The objective of the study was to evaluate the effect of the acetonic and ethanolic extracts of the *Caesalpinia coriaria* fruits legume on the egg eclosion inhibition (EEI) of *H. contortus* in small ruminants. For this effect, it was evaluated at different concentrations of the extracts (acetonic: 20.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.2 and 0.6 mg / mL), (ethanolic: 6.15, 3.12, 1.56 and 0.78 mg / mL), and methanol 4 % v/v in distilled water as negative control and ivermectin 0.5 % as positive control, were used. The inhibitory effect data were analyzed with a completely randomized design by analysis of variance using the general linear model and the Tukey test ($p < 0.05$); the lethal concentrations (LC_{50} and LC_{90}) were estimated by the Probit analysis of the statistical analysis systems (SAS) program. The inhibitory

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: December 13th 2020.

Accepted/Aceptado: January 05th 2022.

Available on line/Publicado: January 26th 2022.

RESUMEN

Haemonchus contortus es un parásito gastrointestinal de los pequeños rumiantes. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del extracto acetónico y etanólico de frutos de la leguminosa *Caesalpinia coriaria* sobre la inhibición de la eclosión de huevos (EEI) de *H. contortus* en pequeños rumiantes. Por éste efecto se evaluó a diferentes concentraciones de los extractos (acetónico: 20.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.2 y 0.6 mg / mL), (etanólico: 6.15, 3.12, 1.56 y 0.78 mg / mL), y metanol al 4 % v/v en agua destilada fue utilizada como control negativo e ivermectina 0.5 % como control positivo. Los datos del efecto inhibitorio se analizaron con un diseño completamente al azar mediante análisis de varianza utilizando el modelo lineal general y la prueba de Tukey ($p < 0.05$); las concentraciones letales (LC_{50} y LC_{90}) se estimaron mediante el análisis Probit del programa de sistemas de análisis estadístico (SAS). Los efectos inhibitorios de los extractos dependieron de la concentración, donde la actividad inhibitoria fue comparativamente similar al control positivo a las dosis de 1.2 mg/mL para el extracto acetónico (AE) y 0.78 mg/mL para el extracto etanólico (EE), ($p < 0.0001$). Las LC_{50} fueron

*Corresponding Author:

Olivares Perez Jaime. Universidad Autónoma de Guerrero, Programa de Posgrado Maestría en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local, Carretera Iguala-Tuxpan, Guerrero. E-mail: olivaares@hotmail.com

effects of the extracts depended on the concentration, where the inhibitory activity was comparatively similar to the positive control doses of 1.2 mg/mL for the acetonic extract (AE) and 0.78 mg/mL for the ethanolic extract (EE), ($p < 0.0001$). The LC_{50} were AE = 0.23 mg/mL and EE = 0.014 mg/mL; LC_{90} AE = 1.04 mg/mL and EE = 0.14 mg/mL. The results indicate that the EEI of the extracts elaborated with the *C. coriaria* fruits in acetonic and ethanolic solvent have inhibitory activity against *H. contortus* eggs eclosion, nevertheless, requires further investigations as antiparasitic for oral use in animals.

KEY WORDS

Caesalpinia coriaria, *Haemonchus contortus*, parasite, eggs.

Introduction

Parasitism is one of the main problems that affect small ruminants, and in this group, gastrointestinal nematodes (GIN) are the most important cause of mortality in sheep and goats in the tropics of Mexico (Delgado, A. *et al.*, 2016; Zapata *et al.*, 2016; Canul-Ku *et al.*, 2012). *H. contortus* is a gastroenteric nematode that parasitizes the abomasum of ruminants (sheep, goats and cattle) and is epidemiologically the most important with 70% prevalence in tropical regions (Olivares *et al.*, 2012; Ehsan *et al.*, 2020). This parasite is the most pathogenic (Baltrusis *et al.*, 2020), it feed on blood, injury the abomasal epithelium and clinically causes epithelium inflammation, emaciation, anemia and hypoproteinemia with losses of up to 500 mL of blood/day, submandibular edema, drooping of the productive parameters (production of wool, milk and meat), and in many cases death of infected animals (Eshan *et al.*, 2020). The frequent use of anthelmintic for the parasites control has been one of the causes that has led to the resistance development of these microorganisms (Laca-Megyési *et al.*, 2020). The parasites are a problem from a biological and economic point of view, especially when the inadequate use of chemical dewormers is abused, this has promoted the development of the anthelmintic resistance (Muñiz-Lagunes *et al.*, 2015). Kaplan & Vidyashankar (2012) reported resistance of *H. contortus* to ivermectin, moxidectin, levamisole and albendazole in 76 %, 24 %, 98 % and 54 % of the studied goat and sheep herds; to

AE = 0.23 mg/mL y EE = 0.014 mg/mL; LC_{90} AE = 1.04 mg/mL y EE = 0.14 mg/mL. Los resultados indican que la EEI de los extractos elaborados con los frutos de *C. coriaria* en disolvente acetónico y etanólico tienen actividad inhibitoria contra huevos de *H. contortus*, sin embargo, requiere de mayores investigaciones como antiparasitario para su uso vía oral en animal.

PALABRAS CLAVE

Caesalpinia coriaria, *Haemonchus contortus*, parásito, huevos.

Introducción

El parasitismo es uno de los principales problemas que afectan a los pequeños rumiantes, y en este grupo, los nematodos gastrointestinales (GIN) son la causa más importante de mortalidad en ovejas y cabras en el trópico de México (Delgado, A. *et al.*, 2016; Zapata *et al.*, 2016; Canul-Ku *et al.*, 2012). *H. contortus* es un nematodo gastroentérico que parasita el abomaso de los rumiantes (ovinos, caprinos y bovinos) y es epidemiológicamente el más importante con una prevalencia del 70 % en las regiones tropicales (Olivares *et al.*, 2012; Ehsan *et al.*, 2020). Éste parásito es el más patógeno (Baltrusis *et al.*, 2020), se alimenta de sangre, lesiona el epitelio abomasal y clínicamente provoca inflamación del epitelio, emaciación, anemia e hipoproteinemia con pérdidas de hasta 500 mL de sangre/día, edema submandibular, caída de los parámetros productivos (producción de lana, leche y carne), y en muchos casos muerte de animales infectados (Eshan *et al.*, 2020). El uso frecuente de antihelmínticos para el control de parásitos ha sido una de las causas que ha propiciado el desarrollo de resistencias de éstos microorganismos (Laca-Megyési *et al.*, 2020). Los parásitos son un problema desde el punto de vista biológico y económico, especialmente cuando se abusa del uso inadecuado de desparasitantes químicos, esto ha promovido el desarrollo de la resistencia a los antihelmínticos (Muñiz-Lagunes *et al.*, 2015). Kaplan & Vidyashankar (2012) reportaron resistencia de *H. contortus* a ivermectina, moxidectina, levamizol y albendazol en 76 %, 24 %, 98 % y 54 % de los rebaños de cabras y ovejas estudiados; a tetrahidropirimidinas y lactonas macrocíclicas (Baltrusis *et al.*, 2020).

El impacto del parasitismo por GIN ha motivado el desarrollo de investigaciones en medicina alternativa, como el uso de

tetrahydropyrimidines and macrocyclic lactones (Baltrusis et al., 2020).

The impact of parasitism by GIN has motivated the development of investigation in alternative medicine, such as the use of biological agents (fungi and hematophagous mites) (Pérez-Pérez et al., 2014; Von de - Fernex et al., 2015; Olmedo et al., 2014; García-Ortiz et al., 2015) and medicinal plants or extracts of tree leaves with nematicidal properties of use in ruminants (León-Castro et al., 2015; Olivares et al., 2012; Carvalho et al., 2012). Manuel-Pablo et al. (2020) reported that the supply of a diet with 4.5 % tannins from the *C. coriaria* fruits in goats; they had a daily consumption of 45 g of the secondary compounds without negative effects on health, weight gain and feed conversion of the animals. The arboreal legume *C. coriaria* Jacq. Willd, is commonly known as "Cascalote", is widespread in the Tierra Caliente region of Guerrero and contains a high variety of secondary metabolites such as tannins, gallic acid, and flavonoids (Sánchez-Carranza et al., 2017), gallotannins (methyl gallate) and their derivatives were also identified (De Jesús-Martínez et al., 2018). The objective of the study was to evaluate the acetonetic and ethanolic extracts from *C. coriaria* fruits against *H. contortus* eggs.

Material and Methods

Vegetative material corresponded to *C. coriaria* dried fruit (5000 g) were collected in march in the Tierra Caliente region of Guerrero, Mexico, located at 18° 20' 30" NL and 100 39' 18" WL, which were brought to total dryness through of a forced-air heater at 40 °C. Subsequently they were subjected to a milling with a Mini Wiley Mill, to obtain a particle size of 1 mm.

Preparation of acetonetic and ethanolic extracts

Each acetone and ethanol extracts were elaborated separately preparing a solution of 300 g of dried fruits of *C. coriaria* suspended in 2000 mL of the solvents, during 72 h, at room temperature, to extract polar secondary compounds and intermediate polarity. Then the liquid solutions of the extracts were filtered with different filters separately in the following order, first gauze, then cotton and finally filter paper, the residual solvents were removed by distillation under reduced pressure with the help of a rotary evaporator (Buchi R-114) at 60 °C, and finally, they were dried by Lyophilization processes (Labconco FreeZone -105 °C) to obtain the semi-solid extracts. The

agentes biológicos (hongos y ácaros hematófagos) (Pérez-Pérez et al., 2014; Von de - Fernex et al., 2015; Olmedo et al., 2014; García-Ortiz et al., 2015) y plantas medicinales o extractos de hojas de árboles con propiedades nematicidas de uso en rumiantes (León-Castro et al., 2015; Olivares et al., 2012; Carvalho et al., 2012). Manuel-Pablo et al. (2020) informaron que el suministro de una dieta con 4.5 % de taninos de los frutos de *C. coriaria* en cabras; tuvieron un consumo diario de 45 g de los compuestos secundarios sin efectos negativos sobre la salud, el aumento de peso y la conversión alimenticia de los animales. La leguminosa arbórea *C. coriaria* Jacq. Willd, comúnmente conocido como "Cascalote", está muy extendido en la región de Tierra Caliente de Guerrero y contiene una gran variedad de metabolitos secundarios como taninos, ácido gálico y flavonoides (Sánchez-Carranza et al., 2017), también, fueron identificados los galotaninos (galato de metilo) y sus derivados (De Jesús-Martínez et al., 2018). El objetivo del estudio fue evaluar los extractos acetónicos y etanólicos de frutos de *C. coriaria* contra huevos de *H. contortus*.

Material y métodos

El material vegetal correspondió a frutos secos de *C. coriaria* (5000 g), fueron recolectados en marzo en la región de Tierra Caliente de Guerrero, México, ubicada a 18° 20' 30" NL y 100 39' 18" WL, los cuales fueron llevados a sequedad total a través de un calentador de aire forzado a 40 °C. Posteriormente se sometieron a una molienda con un Molino Mini Wiley, para obtener un tamaño de partícula de 1 mm.

Preparación de extractos acetónico y etanólico

Cada uno de los extractos de acetona y etanol, fueron elaborados por separado preparando una solución de 300 g de frutos secos de *C. coriaria* suspendidos en 2000 mL de los solventes, durante 72 h, a temperatura ambiente, con el fin de extraer compuestos secundarios polares y de polaridad intermedia. Luego se filtraron las soluciones líquidas de los extractos con diferentes filtros por separado en el siguiente orden, primero gasa, luego algodón y finalmente papel filtro, los disolventes residuales se eliminaron por destilación a presión reducida con la ayuda de un rotavapor (Buchi R-114) a 60° C, y finalmente se secaron mediante procesos de Liofilización (Labconco FreeZone -105 °C) para obtener los extractos semisólidos. Los extractos secos sin disolvente (36 g) se almacenaron a -40 °C hasta su uso en los bioensayos *in vitro*.

solvent-free dry extracts (36 g) were stored at -40 °C until their use in the *in vitro* bioassays.

Biological material

Obtaining *Haemonchus contortus* eggs

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

Eggs eclosion inhibition (% EEI)

Eight 96-well microtiter plates were used. The treatments were acetonic and ethanolic extracts at different concentrations (20, 10, 5, 2.5, 1.2 and 0.6 mg / mL) and (6.15, 3.12, 1.56 and 0.78 mg / mL), 4 % methanol as a negative control and ivermectin injectable solution (5 mg / mL; Ivomec® Pour ON Boehringer Ingelheim laboratory) as a positive control. Fifty μL of an aqueous suspension containing 100 ± 150 *H. contortus* eggs were placed in each well. Subsequently, aliquots of 50 μL of the extracts and controls were added, having a final volume of 100 μL per well. The plates were incubated by 48 hours at a temperature of 28 °C, with 100 % humidity (at an incubator Ecoshel model CI-80). The egg eclosion process was stopped by adding 10 μL of 5 % lugol solution. Finally, a total count of eggs or larvae of each well was performed and the EEI percentage was determined by the following formula: % EEI = [(number of eggs) / (number of larvae + number of eggs)] * 100.

Statistical analysis

The data were analyzed under a completely randomized design, with the following statistical model: $Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$; where: Y_{ij} = eclosion inhibition; μ = general mean; T_i = effect of the extracts and controls ξ_{ij} = the random error of the treatment. The difference between means was compared with the Tukey test ($p < 0.05$). In addition, minimum (LC₅₀) and maximum (LC₉₀) lethal concentrations were determined using the PROBIT procedure of the SAS statistical package (SAS 2002).

Material biológico

Obtención de huevos de *Haemonchus contortus*

Se utilizaron huevos de *H. contortus* obtenidos de las heces de un ovino infectado experimentalmente con larvas infecciosas (L₃) del parásito (cepa INIFAP, 350 L₃/kg de BW del animal). Los huevos se concentraron a través del paso en diferentes tamices (200, 100, 75 y 37 μm de diámetro) y por gradientes de densidad en solución de sacarosa al 40 %.

Inhibición de la eclosión de huevos (% EEI)

Fueron utilizadas ocho placas de microtitulación de 96 pocillos. Los tratamientos fueron extractos acetónico y etanólico a diferentes concentraciones (20, 10, 5, 2.5, 1.2 y 0.6 mg/mL) y (6.15, 3.12, 1.56 y 0.78 mg / mL), metanol al 4 % como control negativo e ivermectina solución inyectable (5 mg / mL; Ivomec® Pour ON laboratorio Boehringer Ingelheim) como control positivo. Fueron colocados 50 μL de una suspensión acuosa que contenía 100 ± 150 huevos de *H. contortus* en cada pocillo. Posteriormente se agregaron alícuotas de 50 μL de los extractos y controles, teniendo un volumen final de 100 μL por pocillo. Las placas se incubaron por 48 horas a una temperatura de 28 °C, con 100 % de humedad (en una incubadora Ecoshel modelo CI-80). El proceso de eclosión de huevos se detuvo agregando 10 μL de solución de lugol al 5 %. Finalmente, se realizó un recuento total de huevos o larvas de cada pocillo y se determinó el porcentaje de EEI mediante la siguiente fórmula: % EEI = [(número de huevos) / (número de larvas + número de huevos)] * 100.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados bajo un diseño completamente al azar, con el siguiente modelo estadístico: $Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$; donde: Y_{ij} = inhibición de la eclosión; μ = media general; T_i = efecto de los extractos y controles; ξ_{ij} = el error aleatorio del tratamiento. La diferencia entre medias se comparó con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Además, se determinaron las concentraciones letales mínima (LC₅₀) y máxima (LC₉₀) utilizando el procedimiento PROBIT del paquete estadístico SAS (SAS 2002).

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en el estudio evidenciaron que los extractos de los frutos de esta

Results and Discussion

The results obtained in the study showed evidence that the extracts of the fruits of this arboreal legume have inhibitory effects on the eclosion of *H. contortus* eggs. In the percentages of EEI, the effects were close to 100 % at the concentration doses of 2.5 and 3.12 mg L of the acetonic (Figure 1) and ethanolic (Figure 2) extracts respectively, this means that both extracts used effectively inhibited the eclosion of eggs to the interrupt their development. Figure 3 shows the images with the readings of the eggs after their incubation with the different treatments, the images 3A, 3B and 3C showed the high eclosion of eggs to L_1 larvae that were observed when they were incubated with the negative controls (methanol at 4 % and H_2O). The 3D, 3E and 3F images showed the remaining eggs that were inhibited by exposure to the *C. coriaria* fruit extracts. Poné *et al.* (2011) reported that the active compounds in the extracts penetrate the envelope (cuticle) of the egg and prevent its development and/or paralyze the larvae of the first embryonic stage. Delgado-Núñez *et al.* (2020) reported an interruption of embryonic development and a 30 % reduction in the cell mass and shell of the egg. In addition, some eggs showed irregular edges and deformations that produced a wrinkled surface appearance.

Ademola *et al.* (2011), Zebre *et al.* (2017) when using an acetonic solvent observed that tannins extracted from

leguminosa arbórea tienen efectos inhibidores sobre la eclosión de huevos de *H. contortus*. En los porcentajes de EEI, los efectos fueron cercanos al 100 % a las dosis de concentración de 2.5 y 3.12 mg/mL de los extractos acetónico (Figura 1) y etanólico (Figura 2) respectivamente, esto significa que los extractos utilizados inhibieron efectivamente la eclosión de los huevos al interrumpir su desarrollo. En la Figura 3 se muestran las imágenes con las lecturas de los huevos después de su incubación con los diferentes tratamientos, las imágenes 3A, 3B y 3C mostraron la alta eclosión de huevos a larvas L_1 que se observaron cuando se incubaron con los controles negativos (metanol al 4 % y H_2O). Las imágenes 3D, 3E y 3F mostraron los huevos remanentes que fueron inhibidos por la exposición a los extractos de frutos de *C. coriaria*. Poné *et al.* (2011) informaron que los compuestos activos en los extractos penetran la envoltura (cutícula) del huevo e impiden su desarrollo y/o paralizan las larvas de la primera etapa embrionaria. Delgado-Núñez *et al.* (2020) informaron de una interrupción del desarrollo embrionario y una reducción del 30 % en la masa celular y la cáscara del huevo. Además, algunos huevos mostraron bordes irregulares y deformaciones que produjeron una apariencia de superficie arrugada.

Ademola *et al.* (2011), Zebre *et al.* (2017) al utilizar un solvente acetónico observaron que los taninos extraídos de *Cassia alata* y *Acacia raddiana*, respectivamente, fueron responsables de la inhibición de la eclosión de huevos y la inducción de mortalidad

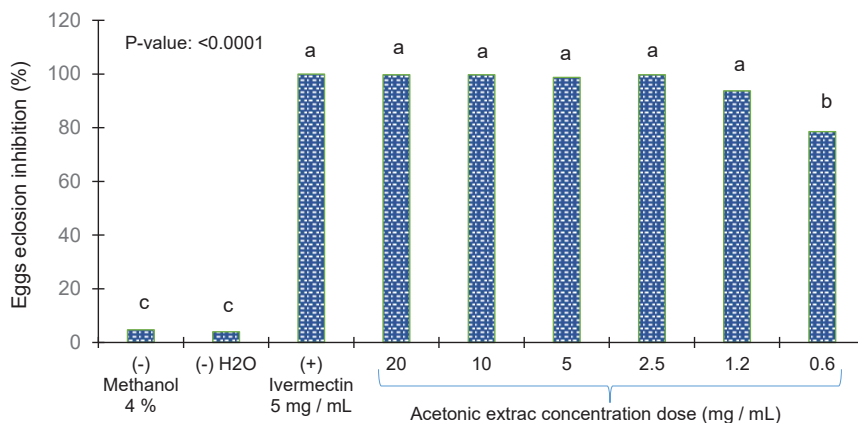


Figure 1. Eggs eclosion inhibition of *H. contortus* exposed to acetonic extract elaborated with *C. coriaria* fruits (abc different literals eclosion inhibition differed between treatments)

Figura 1. Inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* expuestos al extracto acetónico elaborado con frutos de *C. coriaria* (abcdiferentes literales, la inhibición de la eclosión difirió entre tratamientos)

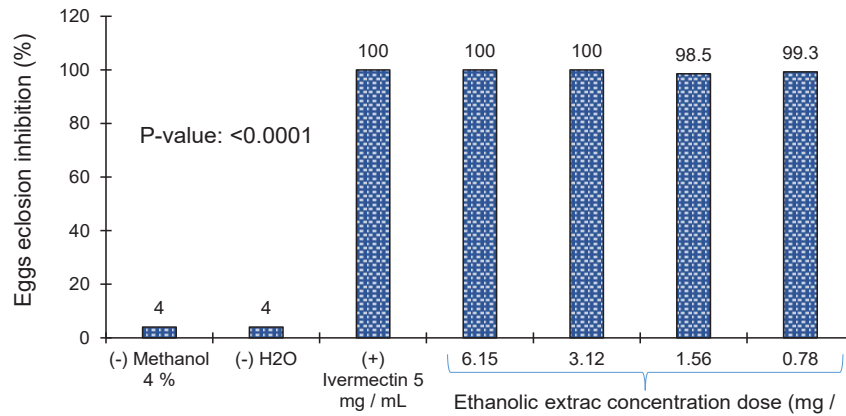


Figure 2. Eggs eclosion inhibition of *H. contortus* exposed to ethanolic extract elaborated with *C. coriaria* fruits (^{abc} different literals eclosion inhibition differed between treatments).

Figura 2. Inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* expuestos al extracto etanólico elaborado con frutos de *C. coriaria* (^{abc} diferentes literales, la inhibición de la eclosión difirió entre tratamientos).

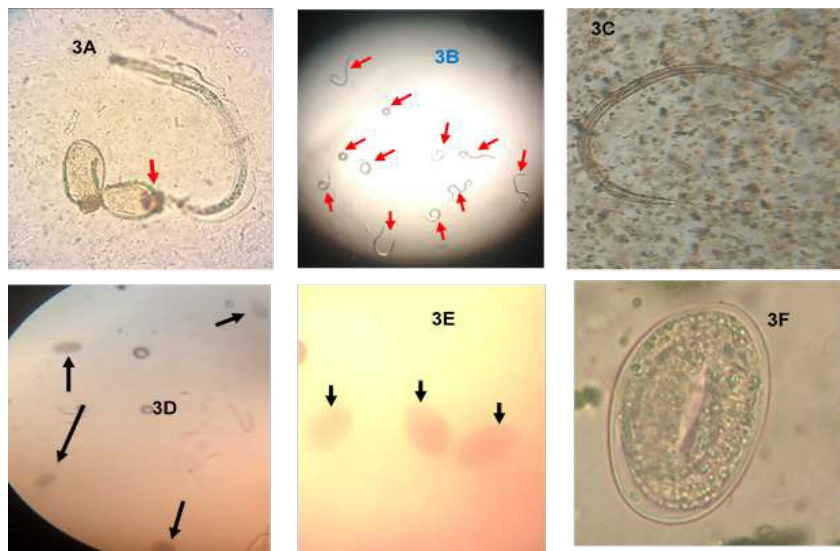


Figure 3. Microscopic images that represented the readings of the *H. contortus* eggs: (A, B and C) showed the high eggs eclosion to L1 larvae in the negative controls, (D, E and F) showed the remaining eggs inhibited by exposure to *C. coriaria* fruits extracts.

Figura 3. Imágenes microscópicas que representaron las lecturas de los huevos de *H. contortus*: (A, B y C) mostraron la alta eclosión de huevos a larvas L1 en los controles negativos, (D, E y F) mostraron los huevos remanentes inhibidos por exposición a extractos de frutos de *C. coriaria*.

Cassia alata and *Acacia raddiana*, respectively, were responsible of eggs eclosion inhibition and adult stage *H. contortus* mortality inducing, but damages in the enveloped of the eggs was not they described. Similar results were obtained by Carvalho *et al.* (2012), Akkari *et al.* (2014), Cabardo & Portugaliza (2017) when they used ethanol solvent observed that tannins extracted polarly from several plants rich in condensed tannins, showed in studies *in vitro* activity to inhibit the eclosion of eggs, infective stage larvae (L_3) and caused paralysis and / or death in adult parasites. These antecedents indicated that the use of acetic and ethanolic solvents extracted secondary polar compounds that showed activity against *H. contortus* eggs. Veloz-García *et al.* (2004) reported as main phenolic compounds to gallic and tannic acids in the cascalote pods, in another study De Jesús-Martínez *et al.* (2018) reported to the gallotannins (methyl gallate) and their derivatives as primordial secondary compounds, for this reason, the effects observed against the parasite eggs in this study, could be attributed to the action of these compounds.

The lethal concentrations (LC_{50} and LC_{90}) of the extracts used are shown in Figure 4A and 4B. In the acetic extract, an LC_{50} of 0.23 mg/mL and LC_{90} of 1.04 mg/mL are observed, and for the ethanolic extract an LC_{50} of 0.014

de *H. contortus* en estado adulto, pero no se describieron daños en la envoltura de los huevos. Carvalho *et al.* (2012), Akkari *et al.* (2014), Cabardo & Portugaliza (2017) Obtuvieron resultados similares cuando utilizaron etanol como solvente, observaron que los taninos extraídos polarmente de varias plantas ricas en taninos condensados, mostraron en estudios *in vitro* actividad para inhibir la eclosión de huevos, larvas en estadio infectivo (L_3) y provocaron parálisis y/o muerte en parásitos adultos. Estos antecedentes indicaron que el uso de solventes acetónicos y etanólicos extrajo compuestos polares secundarios que mostraron actividad contra huevos de *H. contortus*. Veloz-García *et al.* (2004) reportaron como principales compuestos fenólicos a los ácidos gálico y tánico en las vainas de cascalote, en otro estudio De Jesús-Martínez *et al.* (2018) reportaron a los galotaninos (galato de metilo) y sus derivados como compuestos secundarios primordiales, por esta razón, los efectos observados contra los huevos del parásito en este estudio, podrían atribuirse a la acción de éstos compuestos.

Las concentraciones letales (LC_{50} y LC_{90}) de los extractos utilizados se muestran en la Figura 4A y 4B. En el extracto acetónico se observaron LC_{50} de 0.23 mg/mL y LC_{90} de 1.04 mg/mL, y para el extracto etanólico se observó una LC_{50} de 0.014 mg/mL y LC_{90} de 0.14 mg/mL. Los resultados mostraron un efecto dependiente de la concentración en los diferentes extractos, sin embargo, comparativamente

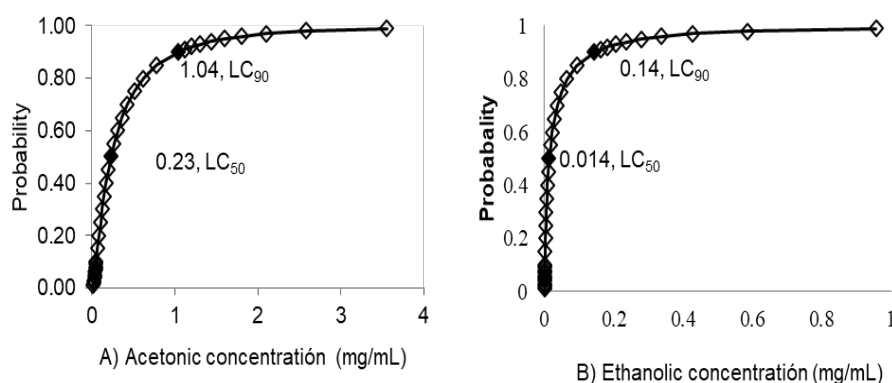


Figure 4. Lethal concentrations of the acetonic (A) and ethanolic (B) extract elaborated with *C. coriaria* fruits on the egg eclosion inhibition of *H. contortus*.

Figura 4. Concentraciones letales del extracto acetónico (A) y etanólico (B) elaborado con frutos de *C. coriaria* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus*.

mg/mL and CL_{90} of 0.14 mg/mL, are observed. The results showed a concentration-dependent effect in the different extracts, however, comparatively between the two extracts it can be seen that the lethal concentrations of the ethanolic extract were lower compared to acetic extract, which may indicate that the polar compounds extracted of the *C. coriaria* fruits with the ethanolic solvent, turned out to be more lethal against the eggs of the parasite. Al - Rawahi *et al.* (2013) reported that the solubility of polyphenols is affected by the type of solvents used and their polarity, resulting in extracts with different properties despite being elaborated from the same plant. Dai & Mumper (2010), Al-Farsi *et al.* (2007) observed that 100% acetone extracted flavonoid and phenolic compounds of low polarity. Ringuet & Viña (2013) mentioned that ethanol is a solvent of excellent solubility to extract polar compounds. The same phenomenon was observed by Castillo-Mitre *et al.* (2017) who reported the different effect of extracts elaborated with *Acacia cochliacantha* leaves using different solvents, against eggs of *H. contortus* and attributed it to polar and non-polar compounds present in the different fractions. Sánchez-Carranza *et al.* (2017) reported that fruits and leaves of *C. coriaria* are a rich source in condensed tannins, such as gallic acid, ethyl gallate and tannic acid, as a basis of hydrolyzable tannins, so the biological activity reported in this study could be related to these metabolites. In addition, the concentration doses used in the study were less than 9% (90 g/kg dry matter) of tannins to cause mortality in the animal (Nawab *et al.*, 2020). Frutos *et al.* (2004) fed finishing lambs daily with diets added with 20.8 g/kg of dry matter, and they did not observe toxic effects or decrease in the production of the animals. Manuel-Pablo *et al.* (2020) provided daily 45 g of secondary compounds in the fruits of *C. coriaria* without negative effects on health, weight gain and feed conversion of the goats. Pérez, V. *et al.* (2011) reported symptoms such as methemoglobinemia, kidney failure, anorexia, depression and diarrhea in ruminants when they consumed tannins in the diet to higher quantities at 4400 mg/kg of body weight.

Conclusions

It is concluded that the extract elaborated with *C. coriaria* fruits in acetic and ethanol solvents

entre los dos extractos, se puede observar que las concentraciones letales del extracto etanólico fueron menores en comparación con el extracto acético, lo que indicó que los compuestos polares extraídos de los frutos de *C. coriaria* con el solvente etanólico resultaron ser más letales contra los huevos del parásito. Al-Rawahi *et al.* (2013) reportaron que la solubilidad de los polifenoles se ve afectada por el tipo de solventes utilizados y su polaridad, resultando en extractos con diferentes propiedades a pesar de estar elaborados a partir de la misma planta. Dai & Mumper (2010), Al-Farsi *et al.* (2007) observaron que la acetona al 100% extraía compuestos flavonoides y fenólicos de baja polaridad. Ringuet & Viña (2013) mencionaron que el etanol es un solvente de excelente solubilidad para extraer compuestos polares. El mismo fenómeno fue observado por Castillo-Mitre *et al.* (2017) quienes reportaron diferente efecto de extractos elaborados con hojas de *Acacia cochliacantha* utilizando diferentes solventes, contra huevos de *H. contortus* y lo atribuyeron a compuestos polares y no polares presentes en las diferentes fracciones. Sánchez-Carranza *et al.* (2017) reportaron que frutos y hojas de *C. coriaria* son una fuente rica en taninos condensados, como ácido gálico, galato de etilo y ácido tánico, como base de taninos hidrolizables, por lo que la actividad biológica reportada en este estudio podría estar relacionada con estos metabolitos. Además, las dosis de concentración empleadas en el estudio, fueron inferiores al 9 % (90 g/kg de materia seca) de taninos para causar mortalidad en el animal (Nawab *et al.*, 2020). Frutos *et al.* (2004) alimentaron diariamente corderos de engorde con dietas adicionadas con 20.8 g/kg de materia seca, y no observaron efectos tóxicos ni disminución en la producción de los animales. Manuel-Pablo *et al.* (2020) proporcionaron diariamente 45 g de compuestos secundarios en los frutos de *C. coriaria* sin efectos negativos sobre la salud, el aumento de peso y la conversión alimenticia de las cabras. Pérez, V. *et al.* (2011) reportaron síntomas como metahemoglobinemia, insuficiencia renal, anorexia, depresión y diarrea en rumiantes cuando consumieron taninos en la dieta en cantidades mayores a 4400 mg/kg de peso corporal.

Conclusiones

Se concluye que el extracto elaborado con frutos de *C. coriaria* en solventes acéticos y etanólicos inhibe la

eclosion inhibits *H. contortus* eggs, so it could be an option in the treatment of nematodes in small ruminants, however, it requires more research as antiparasitic for direct and reliable use in animals. The effect on the eggs eclosion inhibition of the parasite was different between the extracts and was attributed to the solvent used because it was the same arboreal fruit. The findings in this study require additional investigations for the identification of the compounds responsible for the EEI, by means of studies of identification of bioactive compounds by high-performance liquid chromatography (HPLC).

eclosión de huevos de *H. contortus*, por lo que podría ser una opción en el tratamiento de nematodos en pequeños rumiantes, sin embargo, requiere más investigación como antiparasitario para uso directo y confiable en animales. El efecto sobre la inhibición de la eclosión de huevos del parásito fue diferente entre los extractos y se atribuyó al solvente utilizado, por tratarse del mismo fruto arbóreo. Los hallazgos de este estudio requieren investigaciones adicionales para la identificación de los compuestos responsables de la EEI, mediante estudios de identificación de compuestos bioactivos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Conflicts of Interest

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

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses con respecto a la publicación de este artículo.

Acknowledgements

Part of this work was supported by INIFAP (project SIGI: 8215734475). This research forms part of the Master's thesis of MVZ Xochitl de Jesús Martínez under the direction of Dr Jaime Olivares-Pérez and Dr Agustín Olmedo-Juárez.

Agradecimientos

Parte de este trabajo fue apoyado por INIFAP (proyecto SIGI: 8215734475). Esta investigación forma parte de la tesis de maestría de MVZ Xochitl de Jesús Martínez bajo la dirección del Dr. Jaime Olivares-Pérez y el Dr. Agustín Olmedo-Juárez.

References

- Ademola, I. O., & Eloff, J. N. (2011). Ovicidal and larvicidal activity of *Cassia alata* leaf acetone extract and fractions on *Haemonchus contortus*: *In vitro* studies. *Pharmaceutical Biology*, 49(5), 539–544. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.526948>
- Akkari, H., Rtibi, K., B'chir, F., Rekik, M., Darghouth, M.A., & Gharbi, M. (2014). *In vitro* evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Research Communications*, 38, 249–255. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9609-y>
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Al-Abid, M., Al-Shoaily, K., Al-Amry, M., & Al-Rawahy, F. (2007). Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. *Food and Chemistry*, 104(3), 943-947. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.051>
- AlRawahi, A. S., Rahman, M. S., Guizani, N., & Essa, M. M. (2013). Chemical composition, water sorption isotherm, and phenolic contents in fresh and dried pomegranate peels. *Journal of Drying Technology*, 31(3), 257–263. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.710695>
- Baltrušis, P., Komáromyová, M., Várady, M., Samson-Himmelstjerna, G., & Johan Höglund, J. (2020). Assessment of the F200Y mutation frequency in the β tubulin gene of *Haemonchus contortus* following the exposure to a discriminating concentration of thiabendazole in the egg hatch test. *Experimental Parasitology*, 217, 107957. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107957>
- Cabardo, D. E., & Portugaliza, H. P. (2017). Anthelmintic activity of *Moringa oleifera* seed aqueous and ethanolic extracts against *Haemonchus contortus* eggs and third stage larvae. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 5(1), 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.02.001>

- Canul-Ku, H. L., Rodríguez-Vivas, R. I., Torres-Acosta, J. F. J., Aguilar- Caballero, A. J., Pérez-Cogollo, L. C., & Ojeda-Chi, M. M. (2012). Prevalence of cattle herds with ivermectin resistant nematodes in the hot sub-humid tropics of Mexico. *Veterinary Parasitology*, 183(3-4), 292–298. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.029>
- Carvalho, C. O., Chagas, A. C. S., Cotinguiba, F., Furlanc, M., Brito, L. G., Chaves, F. C. M., Stephan, M. P., Bizzo, H. R., & Amarante, A. F. T. (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*, 183(3-4), 260– 268. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.051>
- Castillo-Mitre, G. F., Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Cortázar-González, M., Mendoza-de Gives, P., Hernández-Beteta, E. E., Reyes-Guerrero, D. E., López- Arellano, M. E., Vázquez-Armijo, J. F., Ramírez-Vargas, G., & Zamilpa, A. (2017). Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 204, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.010>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- De Jesús-Martínez, X., Olmedo-Juárez, A., Olivares-Pérez, J., Zamilpa, A., Mendoza-De Gives, P., López-Arellano, M. E., Rojas-Hernández, S., Villa-Mancera, A., Camacho-Díaz, L. M., & Cipriano-Salazar, M. (2018). In Vitro Anthelmintic Activity of Methanolic Extract from *Caesalpinia coriaria* J. Willd Fruits against *Haemonchus contortus* Eggs and Infective Larvae. *BioMed Research International*, 2018, 7375693. <https://doi.org/10.1155/2018/7375693>
- Delgado, A., Núñez, O., Aguilera, V. L., Palacios, D., Salas, R. J., Berbert, G., González, M., & Fernández, N. (2016). Acción ovicida in vitro del extracto hidro-alcoholico crudo de la semilla de *Pouteria sapota* (mamey colorado) contra huevos de *Haemonchus contortus*. Primer reporte. *Revista de Producción Animal*, 28(2-3), 51-54. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-79202016000200007
- Delgado-Núñez, E. J., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Olmedo-Juárez, A., Cardoso-Taketa, A., Sánchez-Mendoza, E., Tapia-Maruri, D., Salinas-Sánchez, D. O., & Mendoza-de Gives, P. (2020) Isorhamnetin: A Nematocidal Flavonoid from *Prosopis laevigata* Leaves Against *Haemonchus contortus* Eggs and Larvae. *Biomolecules*, 10(5), 773. <https://doi.org/10.3390/biom10050773>
- Ehsan, M., Hu, R. S., Liang, Q. L., Hou, J. L., Song, X., Yan, R., Zhu, X. Q., & Li, X. (2020). Advances in the Development of Anti-*Haemonchus contortus* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Vaccines*, 8(3), 1-18. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines8030555>
- Frutos, P., Raso, M., Hervás, G., Mantecón, A. R., Pérez, V., & Giráldez, F. J. (2004). Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs?. *Animal Research*, 53(2), 127-136. <https://doi.org/10.1051/animres:2004001>
- García-Ortiz, N., Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., López-Arellano, M. E., Bautista-Garfias, C. R., & González-Garduño, R. (2015). *In vitro* predatory activity of *Lasioseius penicilliger* (Arachnida: Mesostigmata) against three nematode species: *Teladorsagia circumcincta*, *Meloidogyne* sp. and *Caenorhabditis elegans*. *Veterinaria México*, 2(1), 1-8. <http://dx.doi.org/10.21753/vmoa.2.1.340>
- Kaplan, M. R., & Vidyashankar, N. A. (2012). An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186(1-2), 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048>
- Laca-Megyési, Š., Königová, A., Babják, M., Molnár, L., Rajský, M., Szestáková, E., Major, P., Soroka, J., Urda-Dolinská, M., Komáromyová, M., & Várady, M. (2020). Wild ruminants as a potential risk factor for transmission of drug resistance in the abomasal nematode *Haemonchus contortus*. *European Journal of Wildlife Research*, 66, 9. <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1351-x>
- León-Castro, Y., Olivares-Pérez, J., Rojas-Hernández, S., Villa-Mancera, A., Valencia-Almazán, M. T., Hernández-Castro, E., Córdova-Izquierdo A., & Jiménez-Guillén R. (2015). Chemical composition of three tree fodders and effect in control *Haemonchus contortus* and change of body weight in kids. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(5), 193-201. <https://www.redalyc.org/pdf/3586/358638159007.pdf>
- Manuel-Pablo, A., Elghandour, M. M. Y., Olivares-Pérez, J., Rojas-Hernández, S., Cipriano-Salazar, M., Cruz-Lagunas, B., & Camacho-Díaz, L. M. (2020) Productive performance, rumen fermentation and carcass yield of goats supplemented with cascalote fruit (*Caesalpinia coriaria* J. Wild.). *Agroforestry Systems*, 94, 1381–1391. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0312-9>

- Muñiz-Lagunés, A., González-Garduño, R., López-Arellano, M. E., Ramírez-Valverde, R., Ruíz-Flores, A., García-Muñiz, G., Ramírez-Vargas, G., Mendoza-de Gives, P., & Torres Hernández, G. (2015). Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 47, 1049-1054. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0826-3>
- Nawab, A., Tang, S., Gao, W., Li, G., Xiao, M., An, L., Wu J., & Liu, W. (2020) Tannin Supplementation in animal feeding; mitigation strategies overcome the toxic effects of tannins on animal health: A Review. *Journal of Agricultural Science*, 12(4), 217-230. <https://doi.org/10.5539/jas.v12n4p217>
- Olivares, P. J., Gutiérrez, S. I., Rojas, H. S., Valencia, A. M. T., Mireles, M. E. J., & Córdova, I. A. (2012). Seasonal prevalence of *Strongyle* in Creole goats of the Tierra Caliente region, State of Guerrero, México. *Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences*, 2(3), 216-220. http://www.roavs.com/pdf-files/Issue_3_2012/216-220.pdf
- Olmedo, J. A., Rojo, R. R., Arece, G. J., Mohamed, A. Z. S., Kholif, E. A., & Morales, A. E. (2014). In vitro of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Italian Journal of Animal Science*. 13(4), 303-307. <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3104>
- Pérez- Pérez, C., Hernández-Villegas, M. M., Cruz- Burelo, P., Bolio-López, G. I., & Hernández-Bolio, G. I. (2014). Efecto antihelmítico in vitro del extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gastrointestinales de ovinos. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 17(1), 105-111. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93930735013.pdf>
- Pérez, V., Doce, R. R., García-Pariente, C., Hervás, G., Carmen Ferreras, M., Mantecón, Á. R., & Frutos, P. (2011). Oak leaf (*Quercus pyrenaica*) poisoning in cattle. *Research in Veterinary Science*, 91(2), 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.12.015>
- Poné, J. W., Florence, K. T., Mbida, M., Tedonkeng, E. P., & Bilong C. F. B. (2011). In vitro activities of acetonic extracts from leaves of three forage legumes (*Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena diversifolia*) on *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(2), 125-128. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(11\)60051-5](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(11)60051-5)
- Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). Productos Naturales Vegetales. Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata. Pag. 16. <https://doi.org/10.35537/10915/27885>
- Sánchez-Carranza, J. N., Álvarez, L., Marquina-Bahena, S., Salas-Vidal, E., Cuevas, V., Jiménez, E. W., Rafael, A., Veloz, G., Carraz, M. and González-Maya, L. (2017). Phenolic compounds isolated from *Caesalpinia coriaria* induce S and G2/M phase cell cycle arrest differentially and trigger cell death by interfering with microtubule dynamics in cancer cell lines. *Molecules*, 22(4), 666. <https://doi.org/10.3390/molecules22040666>
- SAS. (2002). Statistical Analysis System, Institute SAS/STAT User's Guide. Version 8, 6th Edition, SAS Institute, Cary, 112 p.
- Veloz-García, R. A., Martín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Muñoz-Sánchez, C. I., Guevara-Olvera, L., Miranda-López, R., González-Chavira, M. M., Torres-Pacheco, I., Guzmán-Maldonado, S. H., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, L., & Guevara-González, R. G. (2004). Antimutagenic and antioxidant activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(13), 1632–1638. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1852>
- Von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M. A., Mendoza-de-Gives, P., Valles-de la Mora, B., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., & Castillo-Gallegos, E. (2015). Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Veterinary Parasitology*, 214 (1-2),89-95. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.10.005>
- Zabré, G., Kaboré, A., Bayala, B., Katiki, L. M., Costa-Júnior, L. M., Tamboura, H. H., Adrien, M.G., Belem, A. M. G., Abdalla, A. L., Niderkorn V., Hoste, H., & Louvandini, H. (2017). Comparison of the in vitro anthelmintic effects of *Acacia nilotica* and *Acacia raddiana*. *Parasite*. 24, 44. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017044>
- Zapata, S. R., Velásquez, V. R., Herrera, O. L. V., Ríos, O. L., & Polanco, E. D. N. (2016). Prevalencia de Nematodos Gastrointestinales en Sistemas de Producción Ovina y Caprina bajo Confinamiento, Semiconfinamiento y Pastoreo en Municipio de Antioquia, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(2), 344-354. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11647>