

Eficacia antiparasitaria *in vitro* del extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de ovinos

D. Vergara¹, F. Sagüés², J. Passucci³, E. J. Späth⁴, M. M. Lloberas⁵,
C. A. Saumell⁶, F. C. Moreno⁷

Recibido: 04 de agosto de 2020. Aprobado: 27 de mayo de 2021

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la eficacia del extracto de quebracho (*Schinopsis spp.*), rico en taninos condensados, en el control de *H. contortus* de ovinos, ya que existen evidencias de que estos taninos pueden reducir la excreción de huevos, la fecundidad de las hembras y la carga de parásitos adultos. Para evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* sobre larvas infectantes de *H. contortus* susceptibles a todos los grupos químicos, se utilizó el test de inhibición de migración larval (IML) a 3 concentraciones diferentes (5 mg/ml, 15 mg/ml y 30 mg/ml). El efecto de los tratamientos fue analizado mediante un análisis de varianza y la estimación de las diferencias entre grupos se realizó por medio de la prueba LSD Fisher. Los resultados del test *in vitro* demostraron una reducción de la migración larval que varió entre el 74% y el 80%, a las concentraciones de entre 5 mg/ml y 30 mg/ml. Del análisis de varianza surgen diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0494$). Al realizar la prueba de comparación de medias se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los promedios de migración a las diluciones de 5 mg/ml y 15 mg/ml, y de 5 mg/ml y 30 mg/ml, mientras que no se detectaron diferencias significativas entre la dilución de 15 mg/ml y 30 mg/ml. Estos resultados señalaron que el extracto de quebracho, a las diluciones evaluadas *in vitro*, presentó actividad antihelmíntica sobre larvas L3 susceptibles de *H. contortus*. Sin embargo, se requiere ampliar los estudios *in vivo* para demostrar un efecto antihelmíntico en ovinos.

Palabras claves: ovinos, extracto de quebracho, *Haemonchus contortus*.

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad del Cauca, Popayán, Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP, Argentina. EEA Inta Balcarce, Argentina. dvergara@unicauca.edu.co

² Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina.

⁴ Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP. EEA Inta Balcarce, Argentina.

⁵ Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP. EEA Inta Balcarce, Argentina.

⁶ Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.C.P.B.A., Tandil, Argentina.

⁷ EEA Inta Balcarce, Argentina.

***In vitro* antiparasitic efficacy of the quebracho extract (*Schinopsis balansae*) on infecting larvae of *Haemonchus contortus* of sheep**

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate *in vitro* efficacy of the quebracho extract (*Schinopsis spp.*), rich in condensed tannins, against *H. contortus* in sheep, since there is evidence that this tannin these tannins can reduce egg excretion, fecundity of females and the burden of adult parasites. A larval migration inhibition (IML) test with 3 different concentration (5 mg/ml, 15 mg/ml, and 30 mg/ml) was used to evaluate the *in vitro* anthelmintic effect upon infective *H. contortus* larvae, from a susceptible strain to all chemical groups were utilized with 3 different concentration (5 mg/ml, 15 mg/ml, and 30 mg/ml). The effect of the treatments was submitted to a variance analysis and the estimation of the differences between groups was evaluated using LSD Fisher test. Results from the *in vitro* test, revealed a reduction of the larval migration that varies from 74% to 80%, at the concentrations between 5 mg/ml to 30 mg/ml. From the analysis of variance, significant differences appear between treatments ($p = 0,0494$). After performing the mean comparison test were performed, significant differences ($p < 0,05$) were found between the migration averages at dilutions of 5 mg/ml and 15 mg/ml, and between 5 mg/ml and 30 mg/ml, while were not detected significant differences between the dilution of 15 mg/ml and 30 mg/ml. These results indicated that quebracho extract at the dilutions evaluated *in vitro* showed anthelmintic activity on L3 susceptible to *H. contortus*. However, it is necessary to conduct further studies *in vivo* to demonstrate an anthelmintic effect in sheep.

Keywords: sheep, quebracho extract, *Haemonchus contortus*.

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo el control de nematodos gastrointestinales en rumiantes se ha realizado casi exclusivamente con fármacos antihelmínticos; sin embargo, el inadecuado uso de estos medicamentos como las inexactas dosificaciones, la aplicación continua del mismo principio activo y elevada frecuencia de tratamientos condujeron al desarrollo de resistencia a la mayoría de principios químicos comúnmente disponibles (resistencia múltiple), especialmente en explotaciones ovinas y caprinas (Gasbarre 2014; Kaplan y Vidyashankar 2012; Birhan *et al.* 2020).

Los nematodos gastrointestinales (NGI) se caracterizan por una elevada prolificidad, adaptabilidad y resistencia a diversas condiciones climáticas que les confieren una amplia distribución geográfica y una alta prevalencia, tanto en regiones con clima templado como tropical (Hoste y Torres 2011; Calvete *et al.* 2014) y sus afecciones causan importantes pérdidas económicas que oscilan entre un 10% y un 50% (Azando *et al.* 2011; Hoste *et al.* 2012; Naeem *et al.* 2021).

El género *Haemonchus* spp. pertenece a la familia *Trichostrongylidae*. *Haemonchus contortus* se considera el nematodo más patógeno en pequeños rumiantes (Arse-

nopoulus *et al.* 2021). Este parásito se destaca por su elevada patogenicidad, por causar significativas pérdidas económicas, por su amplia distribución geográfica y por ser uno de los principales géneros parasitarios, que presenta resistencia múltiple a tratamientos antihelmínticos (Gasbarre 2014; Hernández 2011; Arsenopoulus *et al.* 2021; Naeem *et al.* 2021). La elevada patogenicidad en el parásito adulto está dada por la característica de succionar sangre capilar de la pared del estómago del hospedador, lo que conduce a cuadros severos de anemia con la ocasional muerte de los animales infectados. La primera consecuencia de la infección por *H. contortus* es la reducción significativa en la producción animal, que incluye disminución del crecimiento de los animales y disminución de la producción de leche y lana, lo que resulta en pérdidas económicas para los productores (Arsenopoulus *et al.* 2021).

Haemonchus contortus se encuentra distribuido en todo el mundo. Las condiciones climáticas tienen un significativo impacto en el desarrollo de la infección. El clima cálido y húmedo de los países tropicales y subtropicales es la combinación óptima para el desarrollo de la infección parasitaria en los rumiantes. Sin embargo, el cambio climático está provocando reportes de haemoncosis en países con clima templado. (Naeem *et al.* 2021). *Haemonchus* ha desarrollado resistencia múltiple a los fármacos antihelmínticos comúnmente utilizados, reportándose resistencia simultánea a benzimidazoles, imidazotiazoles, lactonas macrocíclicas y monepantel en muchas partes del mundo (Arsenopoulus *et al.* 2021).

La creciente aparición de resistencia de los nematodos a los antihelmínticos y la presencia de residuos de drogas en

los alimentos y su acción sobre otros organismos en el ambiente han causado la emergente necesidad de encontrar alternativas para el control y reducir el uso de antihelmínticos (Learmount *et al.* 2015; Moreno 2010; Birhan *et al.* 2020). Entre ellas el uso de plantas bioactivas con propiedades antihelmínticas es una de las opciones más prometedoras como tratamiento fitoterapéuticos o nutracéuticos por su comprobada eficacia contra nematodos, como opción de reemplazo parcial o total del uso de químicos sintéticos corrientemente usados, y es un método amigable con el medioambiente (Mederos *et al.* 2012; Moreno 2010).

Hay evidencias que muestran que los taninos condensados (TC) provenientes del extracto de quebracho (*Schinopsis* spp.) y de otros extractos vegetales pueden reducir la excreción de huevos y la fecundidad de las hembras parásitas, al igual que la carga de parásitos nematodos gastrointestinales adultos en rumiantes (Athanasiadou *et al.* 2001; Hoste *et al.* 2012).

El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la eficacia antiparasitaria del extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) presente en un producto comercial de uso animal disponible en el mercado, Bioquina®, sobre larvas infectantes (L3) de *Haemonchus contortus* de ovinos susceptibles a todos los grupos químicos de antihelmínticos, bajo condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

El trabajo experimental se realizó en la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Tandil, Argentina, y fue aprobado por el

Comité de Bienestar Animal de la FCV-UNCPBA (Resol. 021/12).

Se realizó un ensayo *in vitro* para evaluar la eficacia antiparasitaria del extracto de quebracho sobre larvas infectantes (L3) susceptibles de *H. contortus* de ovinos, utilizando la técnica de inhibición de la migración larval (IML) desarrollada por Wagland *et al.* (1992) y modificado por Rabel *et al.* (1994) y Demeler *et al.* (2010). Las larvas se obtuvieron a partir de cultivos de materia fecal de ovejas infectadas con cepas susceptibles provenientes de cultivos puros de *H. contortus*. El cultivo y posterior recuperación de larvas infectivas se realizó siguiendo las técnicas descriptas por Henriksen y Korsholm (1983), y Baermann (1917), respectivamente, citadas por Fiel *et al.* (2011). Con el fin de imitar las condiciones a las que se expone el parásito en el ambiente gastrointestinal y lograr el contacto directo entre taninos condensados y el nematodo se procedió al desvenne de las larvas utilizando el protocolo del laboratorio de parasitología de la FCV de la UNCPBA, adaptado de la técnica de criopreservación de larvas L3 de nematodos de Van Wyk (1977). Para ello, 5 ml de una solución con 2000 larvas L3/ml fue mezclada con 4 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 0,16%. El proceso fue monitoreado microscópicamente hasta verificar el desvenne del 90% de las larvas L3. Posteriormente, la mezcla fue lavada con solución fisiológica y centrifugada durante 3 minutos a 2500 rpm.

La fuente de taninos utilizada fue el producto comercial Bioquina®, que es una mezcla balanceada de quebracho colorado, en polvo, de uso exclusivo en alimentación animal como aditivo alimenticio. La cantidad usada contenía 573 mg/g de polifenoles totales (PT) y

458 mg/g de taninos totales (TT), según el análisis químico del Laboratorio de Estudios Físicoquímicos de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, UNL, Santa Fe, Argentina. La determinación de los PT se realizó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Folin y Ciocalteu 1927) y la de TT mediante la técnica gravimétrica de Makkar (PVPP) (Makkar *et al.* 1993).

Las diluciones evaluadas fueron 5 mg/ml, 15 mg/ml y 30 mg/ml, elegidas por antecedentes previos debido a que son comparables con las concentraciones usadas *in vivo* (Moreno 2010). Para ello, en un erlenmeyer que contenía 100 mg de extracto de quebracho (EQ), se agregaron 50 ml de solución *buffer* fosfato (0,1 M fosfato, 0,05M NaCl; pH 7,2), se mezcló a 20°C, durante 2 h, y se sonicó durante 4 min. A partir de esa solución madre, se realizaron las diluciones en serie, las cuales fueron almacenadas en tubos de ensayo plásticos debidamente sellados, rotulados y mantenidos en gradilla a temperatura ambiente.

Para el test se construyeron filtros con tubos de acrílico transparente (20 mm de largo y 7 mm de diámetro interno) a los que se les adhirió una malla de 20 µm en uno de sus extremos y fueron fijados de a 6 en una barra de acrílico, según diseño descrito por Demeler *et al.* (2010). Se utilizaron tubos de 2 ml a los que se les agregó 0,4 ml de extracto de quebracho (EQ) con las diluciones finales (5 mg/ml, 15 mg/ml, y 30 mg/ml) y, aproximadamente, 200 larvas L3 suspendidas en 0,1 ml de solución acuosa.

Se realizaron 10 repeticiones para las diluciones de 15 mg/ml y 30 mg/ml y, por disponibilidad de larvas, 7 repeticiones para la dilución de 5 mg/ml. Un control negativo (larvas L3 en *buffer* fosfato) y un control positivo (larvas L3 muertas),

a 70°C por 10 min en un baño maría (Álvarez, comunicación personal) con 6 repeticiones, se corrieron en paralelo.

Los tubos dispuestos en gradillas se ubicaron dentro de un recipiente plástico con tapa y fueron llevados a estufa de incubación (37°C por 16 h). Posteriormente, el contenido de los tubos (0,5 ml) fue transferido a los filtros colocados sobre placas de cultivo celular de 24 celdas e incubados a 37°C por 18 h para permitir a las larvas migrar a través de estos dentro de cada celda en la placa. Luego, los filtros fueron removidos de las placas y el número total de larvas en cada celda y en los filtros fue contado con la ayuda de un microscopio óptico y un microscopio invertido. Una gota de solución de lugol fue adicionada a cada celda cuando fue necesario para matar las larvas L3 y favorecer su conteo.

La inhibición de la migración larval (IML) se determinó usando la siguiente fórmula:

$$IML = A - B/A \times 100$$

Donde:

A: proporción de larvas migradas en el control negativo.

B: proporción de larvas migradas en los tratamientos.

Los porcentajes de migración de larvas L3 de *H. contortus* ajustados por un control (*buffer*) (variable respuesta) a 3 diluciones diferentes de extracto de quebracho (5 mg/ml, 15 mg/ml y 30 mg/ml) (variable explicativa) se compararon mediante un análisis de varianza y la estimación de las diferencias entre grupos (*a posteriori*) se realizó por medio de la prueba LSD Fisher, utilizando el procedimiento PROC GLM de SAS V.9.2 (SAS, 2009).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra la estadística descriptiva de la variable migración larval después de la incubación de larvas infectivas de *H. contortus* con extracto de quebracho a diluciones de 5 mg/ml, 15 mg/ml y 30 mg/ml. Los resultados mostraron un alto porcentaje promedio de migración de larvas L3 de *H. contortus* en el tratamiento control negativo (92,35% con un error estándar de 0,97) y, en general, bajos porcentajes promedios en las diluciones evaluadas. Las concentraciones de 15 mg/ml y 30 mg/ml fueron las de menor porcentaje promedio de migración.

Del análisis de varianza surgen diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0494$). Al realizar la prueba de comparación de medias se evidenciaron

TABLA 1. Porcentaje de migración de larvas infectivas de *H. contortus* después de la incubación con extracto de quebracho a 5 mg/ml, 15 mg/ml y 30 mg/ml

Dilución (mg/ml)	N	% de migración promedio	EE	CV	Mín.	Máx.
Control (-)	6	92,35	0,97	2,5	90,34	96,19
5	7	26,89(a)	1,49	14,69	19,19	31,42
15	10	20,36(b)	1,58	24,58	13,95	27,87
30	10	20,95(b)	2,09	31,60	14,14	33,63

Letras diferentes indican diferencias significativas al 0,05. EE: error estándar; CV: coeficiente variación
Fuente: elaboración propia con base en los resultados de investigación.

diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los promedios de migración a las diluciones de 5 mg/ml y 15 mg/ml y a las diluciones de 5 mg/ml y 30 mg/ml,

mientras que no se detectaron diferencias significativas entre la dilución de 15 mg/ml y la de 30 mg/ml.

TABLA 2. Resultados de comparaciones de medias de porcentaje de migración larval para las distintas diluciones de extracto de quebracho analizadas

Diluciones (mg/ml)	Estimada	Error estándar	t-Valor	p valor
5 vs. 15	6,53	2,69	2,43	0,0229
5 vs. 30	5,94	2,68	2,21	0,0368
15 vs. 30	-0,59	2,44	-0,24	0,8111

Fuente: elaboración propia con base en los resultados de investigación.

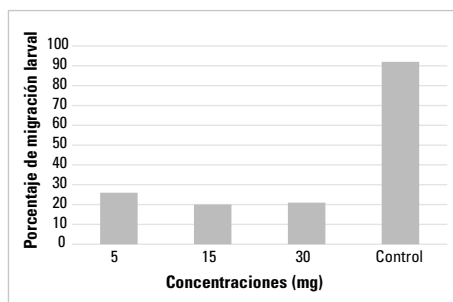


FIGURA 1. Porcentaje promedio de migración de larvas infectivas de *H. contortus* y desvíos estándar según tratamiento

Fuente: elaboración propia con base en los resultados de investigación.

DISCUSIÓN

El efecto del extracto de quebracho (EQ) demostrado en el presente estudio es acorde con una serie de trabajos *in vitro* que respaldan las propiedades antihelmínticas de los taninos condensados (Alonso Díaz *et al.* 2008; Calderón-Quintal *et al.* 2010).

Los resultados obtenidos mostraron una significativa acción del extracto de quebracho en la inhibición de la migración de larvas infectantes L3 de *H. contortus* de ovinos a las diferentes concentraciones

evaluadas. Las diferencias significativas entre la dilución más baja de 5 mg/ml y las diluciones de 15 mg/ml y 30 mg/ml indican que, a mayor concentración, mayor es el efecto sobre la migración larval. Sin embargo, se observó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de migración entre las concentraciones de 15 mg/ml y 30 mg/ml (tabla 1), lo que sugiere que por más que se aumente la concentración de extracto de quebracho el efecto sobre la IML no se incrementaría.

El efecto inhibitorio del extracto de quebracho en la migración de larvas L3 de *H. contortus* ovino observado en nuestro estudio concuerda con los resultados obtenidos por Athanasiadou *et al.* (2001), quienes evaluaron *in vitro* el efecto antihelmíntico de los TC del extracto de quebracho, sobre la viabilidad de larvas L3 de *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* y *Trichostrongylus vitrinus* en ovinos a concentraciones de 0, 12,5, 25, 50 y 100 mg/ml, mediante la prueba de desarrollo y viabilidad larval. Moreno (2010) evaluó *in vitro* el efecto antihelmíntico de extractos de plantas nativas australianas sobre L3 de *H. placei*, *H.*

contortus, *Cooperia* spp. y *Trichostrongylus colubriformis*, utilizando la técnica de IML a concentraciones de 5 mg/ml, 15 mg/ml y 30 mg/ml, encontrando efectos inhibitorios de la migración larval con los diferentes extractos de plantas en cada uno de los géneros parasitarios evaluados. Uno de los desafíos cuando se usan extractos para medir la actividad antihelmíntica de plantas medicinales está relacionado con la concentración de compuestos activos en el extracto y aquel encontrado en la planta. Un extracto de planta obtenido mediante algún proceso de extracción inevitablemente tiene una alta concentración de compuestos activos. En la mayoría de los casos esto no se corresponde con la concentración de compuestos activos consumidos por el hospedador parasitado cuando la planta es incluida en sus dietas. Como consecuencia es común observar alta eficacia antihelmíntica de plantas medicinales cuando sus extractos son probados *in vitro* o cuando estos son ofrecidos como suplemento medicinal. Sin embargo, la eficacia no es alta cuando la planta entera es ofrecida al hospedador parasitado (Moreno 2010).

El efecto de los vegetales con propiedades antihelmínticas contra L3 de helmintos en ensayos *in vitro* parece depender de la concentración a la que sean sometidos. Entre los autores que pregonan esta idea se encuentran Alonso Díaz *et al.* (2008), quienes, al evaluar el efecto de 4 extractos de plantas taníferas tropicales a diferentes concentraciones en larvas L3 susceptibles de *H. contortus* caprino, encontraron inhibición en la migración larval con los extractos de plantas con niveles más altos de polifenoles totales, taninos totales y taninos condensados demostrando efecto dosis dependiente. Hoste *et al.* (2009) observaron reducciones en la migración larval con

concentraciones similares, pero de extractos de plantas leñosas contra larvas L3 de *H. contortus*, *T. circumcincta* y *T. colubriformis* de ovinos y caprinos. Birhan *et al.* (2020) investigaron la actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos de plantas taníferas tropicales sobre la inhibición del desarrollo larvario de *Haemonchus contortus* en ovejas y encontraron que los extractos demostraron un efecto inhibitorio dependiente de la dosis. Molan *et al.* (2000) encontraron que extractos de *Sulla* (*Hedysarum coronarium*) adicionados al fluido ruminal y abomasal inhiben la migración de larvas L3 de *H. contortus* en un 72% y 81%, respectivamente, a la concentración de 1 mg/ml de TC. Es probable que diferencias metodológicas, tipo y concentraciones de TT hayan contribuido a variaciones de eficacia entre nuestros resultados y los reportes anteriormente citados. En nuestro estudio se evaluó el efecto inhibitorio utilizando L3 desvainadas con el fin de simular las condiciones fisiológicas de las larvas en el hospedador, mientras que en los ensayos previamente mencionados, a excepción de Alonso Díaz *et al.* (2008), se utilizaron larvas L3 envainadas. Además, presentan diferencias relacionadas con tiempos y temperaturas de incubación. Varios estudios *in vitro* reportan que existe una relación dosis-dependiente entre la eficacia antihelmíntica y la concentración de los metabolitos secundarios de las plantas (MSP) (taninos o flavonoides) presentes en los extractos de plantas (Alonso *et al.* 2008; Athanasiadou *et al.* 2001; Azando *et al.* 2011; Birhan *et al.* 2020). Sin embargo, en nuestro estudio las concentraciones de 15 mg/ml y 30 mg/ml que fueron las más altas utilizadas y de mejor comportamiento, mostraron una tendencia a estabilizar el efecto antihelmíntico, lo que indica que probablemente existe un umbral antihelmíntico

para los taninos utilizados en este ensayo. Estas variaciones dosis-dependientes probablemente estén determinadas por las diferentes características químicas de los TC, las proporciones de cada uno de ellos en las fuentes y la etapa parasitaria (Birhan *et al.* 2020; Hounzangbe *et al.* 2005; Paolini *et al.* 2003b). Brunet *et al.* (2011), en un estudio en el que compararon cambios ultraestructurales entre larvas L3 desenvainadas y envainadas de *H. contortus* y *T. colubriformis* expuestos a TC de extracto de esparceta (*Onobrychis viciifoli*) describieron que los cambios funcionales en la biología de las larvas L3 estuvieron determinados por una acción directa de los TC del extracto sobre la estructura del nematodo. En larvas L3 envainadas, las lesiones parecen estar asociadas principalmente con la cutícula, ocasionando un bloqueo en la regulación fisicoquímicas que esta realiza y afectando intercambios entre el medioambiente y el parásito, resultando en asfixia y toxicidad celular debida a la acumulación de productos metabólicos. Con respecto a las larvas L3 desenvainadas, el daño más frecuentemente observado ha sido en células intestinales, posiblemente debido a la ingestión de algunos metabolitos secundarios presentes en los extractos que podrían interferir con los procesos digestivos de las larvas y afectar su nutrición (Brunet *et al.* 2011). Alowanou *et al.* (2019) reportaron que la IML de los extractos evaluados en su estudio puede ser atribuida a la presencia de MSP como saponinas, alcaloides, taninos y flavonoides que se encontraron en las hojas de las plantas estudiadas. Estos MSP pueden difundirse a través de la cutícula de las larvas o hacia sus células intestinales para inhibir la migración o causar su mortalidad.

Alonso Díaz *et al.* (2011) compararon la diferencia de sensibilidad entre larvas L3 envainadas y desenvainadas de *H. contortus*

con extractos de plantas tropicales ricas en taninos mediante las técnicas de IML y la de inhibición de larvas desenvainadas (IML), encontrando una potente inhibición de la motilidad de las larvas L3 de *H. contortus* desenvainadas, en relación con las envainadas. Resultados similares fueron reportados por Son de Fernex *et al.* (2012). La capacidad de las larvas L3 desenvainadas para alimentarse favorecerían el accionar de los polifenoles, ya que afectarían directamente los sistemas digestivo y muscular, determinantes para la supervivencia larval (Athanasidou *et al.* 2001; Brunet *et al.* 2011; Hoste *et al.* 2012).

Aunque existe numerosa información acerca de la actividad antihelmíntica del extracto de quebracho, en general, los estudios realizados a la fecha presentan resultados dispares. Es necesario que los resultados generados *in vitro* sean validados con estudios *in vivo*. Algunos estudios han encontrado concordancia entre los resultados *in vitro* e *in vivo* (Athanasidou *et al.* 2000a; Paolini *et al.* 2003a, 2003b). Sin embargo, se requiere prudencia en la extrapolación de los resultados *in vitro* a condiciones *in vivo*, debido a que los componentes químicos de las plantas pueden ser modificados luego de pasar por el tracto digestivo, particularmente rumen y pueden afectar a los taninos por degradación bacteriana y formación de complejos con proteínas (Paolini *et al.* 2004). Por otro lado, las diferencias dosis-respuestas encontradas en los estudios citados, sugiere la necesidad de continuar con otras investigaciones que permitan establecer un umbral de actividad antihelmíntica.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio *in vitro* sugieren la existencia de propiedades

antihelmínticas asociadas al extracto de quebracho y, si bien su eficacia no es comparable a la de los antihelmínticos químicos convencionales, su aplicación podría estar justificada al no dejar residuos en el animal ni en el ambiente y que además puedan tener efectos nutricionales o beneficios en el metabolismo del animal aún poco conocidos.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Ignacio Álvarez y personal del Laboratorio de farmacología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (Civeta) (UNCPBA-CICPBA-Conicet), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro, Tandil, Argentina; Laboratorio de Parasitología-INTA Balcarce; laboratorio de Bioquímica Clínica y Enfermedades Metabólicas-INTA Balcarce. Finalmente, a la firma Porfenc S. R. L.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Este trabajo no recibió fondos de financiación de ninguna entidad.

REFERENCIAS

Alonso Díaz MA, Torres Acosta JFJ, Sandoval Castro CA, Hoste H. 2011. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 181(2-4):360-364.

Alonso Díaz MA, Torres Acosta JFJ, Sandoval Castro CA, Aguilar Caballero AJ, Hoste H. 2008. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed

to four tropical tanniferous plant extracts. *Vet Parasitol.* 153(3):313-319.

Alowanou GG, Olounladé PA, Akouèdegne GC, Faihun AML, Koudandé DO, Hounzangbé-Adoté S. 2019. *In vitro* anthelmintic effects of *Bridelia ferruginea*, *Combretum glutinosum*, and *Mitragyna inermis* leaf extracts on *Haemonchus contortus*, an abomasal nematode of small ruminants. *Parasitol. Res.* 118:1215-1223.

Arsenopoulus KV, Fthenakis GC, Katsarou EI, Papadopoulos E. 2021. Haemonchosis: A challenging parasitic infection of sheep and goats. *Animals (Basel).* 11(2):363. Doi: 10.3390/ani11020363. PMID: 33535656; PMCID: PMC7912824.

Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet Parasitol.* 99(3):205-219.

Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. 2000a. Sequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol.* 30(9):1025-1033.

Azando EVB, Hounzangbé Adoté MS, Olounladé PA, Brunet S, Fabre N, Valentin A, Hoste H. 2011. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol.* 180(3):292-297.

Baermann G. 1917. Eine einfache methode zur auffindung von Ankylostomum (Nematoden)-larven in erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Ned. Indie,* 57: 131-137.

Birhan M, Gesses T, Kenubih A, Dejene H, Yayeh M. 2020. Evaluation of anthelmintic activity of tropical tanniferous plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Vet Med Research Reports.* 11:109-117.

Brunet S, Fourquaux I, Hoste H. 2011. Ultrastructural changes in the third stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol Int.* 60(4):419-424.

Calderón-Quintal J, Torres-Acosta J, Sandoval-Castro C, Alonso M, Hoste H, Aguilar-Caballero

- A. 2010. Adaptación de *Haemonchus contortus* a los taninos condensados: ¿puede ser posible? Arch Med Vet. 42:165-171.
- Calvete C, Ferre LM, Lacasta D, Calavia R, Ramos JJ, Ruiz de Arkaute M, Uriarte J. 2014. Variability of the egg hatch assay to survey benzimidazole resistance in nematodes of small ruminants under field conditions. Vet Parasitol. 203(1-2):102-113.
- Demeler J, Kuttler G, Von Samson Himmelstjerna G. 2010. Adaptation and evaluation of three different *in vitro* tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. Vet Parasitol. 170(1):61-70.
- Folin O, Ciocalteu V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J Biol Chem. 73(2):627-650.
- Gasbarre LC. 2014. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US. Vet Parasitol. 204(1-2):3-11.
- Henriksen S, Korsholm H. (1983). A method for culture and recovery of gastrointestinal strongyle larvae. Nord Vet Med. 35:429-430.
- Hernández Barral A. 2011. Estudio de la respuesta inmune frente a *Haemonchus contortus* en dos razas ovinas canarias. [Tesis doctoral]. [Gran Canaria, España] Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- Hoste H, Martínez Ortiz de Montellano C, Manolarakia F, Brunet S, Ojeda Robertos N, Fourquaux I, Torres Acosta JFJ, Sandoval Castro CA. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin rich tropical and temperate legumes against nematode infections. Vet Parasitol. 186(1-2):18-27.
- Hoste H, Torres Acosta JFJ. 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. Vet Parasitol. 180(1-2):144-154.
- Hoste H, Brunet S, Paolini V, Bahuau D, Chauveau S, Fouraste I, Lefrileux Y. 2009. Compared *in vitro* anthelmintic effects of eight tannin-rich plants browsed by goats in the southern part of France [internet]. [Citado 2012 Jul 10]. Disponible en: <http://omciheamorg/om/pdf/a85/00801039pdf>
- Hounzangbe Adote MS, Paolini V, Fouraste I, Moutairou K, Hoste H. 2005. *In vitro* effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. Res Vet Sci. 78(2):155-160.
- Kaplan RM, Vidyashankar AN. 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. Parasitología Veterinaria. 186(1-2):70-78.
- Learnmount J, Gettinby G, Boughtflower V, Stephens N, Hartley K, Allanson P, Barrecheguren Gutierrez A, Perez D, Taylor M. 2015. Evaluation of 'best practice' (SCOPS) guidelines for nematode control on commercial sheep farms in England and Wales. Vet Parasitol. 207(3-4):259-265.
- Makkar HPS, Blummel M, Borowy NK, Becker B. 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. J Sci Food Agr. 61(2):161-165.
- Mederos A, Waddell L, Sánchez J, Kelton D, Peregrine AS, Menzies P, Vanleeuwen J, Rajic A. 2012. A systematic review-meta-analysis of primary research investigating the effect of selected alternative treatments on gastrointestinal nematodes in sheep under field conditions. Prev Vet Med. 104(1-2):1-14.
- Molan AL, Alexander RA, Brookes IM, McNabb WC. 2000. Effects of an extract from *sulla* (*Hedysarum coronarium*) containing condensed tannins on the migration of three sheep gastrointestinal nematodes *in vitro*. Proc New Zeal SocAn. 60:21-25.
- Moreno FC. 2010. Control de nematodos gastrointestinales en rumiantes usando metabolitos secundarios de las plantas. Implicancias del proceso de automedicación en caprinos. [Tesis doctoral]. [Tandil, Argentina]. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
- Naeem M, Iqbal Z, Roohi N. 2021. Ovine haemonchosis: a review. Trop Anim Health and Prod. 53(19). Doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02439-8>
- Paolini V, Frayssines A, De La Farge F, Dorchies P, Hoste H. 2003a. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae

- of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet Res.* 34(3):331-339.
- Paolini V, Bergeaud JP, Grisez C, Prevot F, Dorchies PH, Hoste H. 2003b. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 113(3):253-261.
- Paolini V, Fouraste I, Hoste H. 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology.* 129(1):69-77.
- Rabel B, McGregor R, Douch PGC. 1994. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *Int J Parasitol.* 24(5):671-676.
- SAS. 2009. *Statistical Analysis Systems*, Version 9.2 Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Son de Fernex EV, Alonso Díaz MA, Valles de la Mora B, Capetillo Leal CM. 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Exp Parasitol.* 131(4):413-418.
- Van Wyk JA, Gerber HM, Van Aardt WP. 1977. Cryopreservation of the infective larvae of the common nematodes of ruminants Onderstepoort. *J Vet Res.* 44(3):173-194.
- Wagland BM, Jones WO, Hribar L, Bendixen T, Emery DLA. 1992. A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int J Parasitol.* 22(8):1183-1185.

Forma de citación del artículo:

Vergara D, Sagüés F, Passucci J, Späth EJ, Lloberas MM, Saumell CA, Moreno FC. 2021. Eficacia antiparasitaria in vitro del extracto de quebracho (*Schinopsis balansae*) sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de ovinos. *Rev Med Vet Zoot.* 68(3): 189-199. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v68n3.99899>