

Potencial nutricional y fitohelmíntico de los extractos acuosos de *Tithonia diversifolia* Hemsl. (Asteraceae) en pequeños rumiantes en el trópico mexicano

José de la Cruz-López¹, Manuel M. Hernández-Villegas^{1,*}, Manuel E. Aranda-Ibáñez², Gloria I. Bolio-López¹, Miguel A. Velázquez-Carmona¹ y Samuel Córdova-Sánchez¹

¹ División de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. Universidad Popular de la Chontalpa. Carretera Cárdenas-Huimanguillo Km 2 S/N, Ranchería Paso y Playa, 86597 Heroica Cárdenas, Tabasco, México

² Área de Ciencia Animal, Colegio de Posgraduados, Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina s/n, 86500 Heroica Cárdenas, Tabasco, México

Resumen

El objetivo de este estudio fue analizar las propiedades nutricionales y evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de *T. diversifolia* contra huevos de *Haemonchus contortus*. Se realizó un perfil fitoquímico, un análisis proximal y un FTIR para conocer los tipos de compuestos, composición química y grupos funcionales presentes en las muestras. Además, se realizaron pruebas de digestibilidad *in situ*. El mayor contenido de proteína fue encontrado en hojas (34,6 %), del mismo modo, ésta, presentó la más alta tasa de digestibilidad (97,6 %). El mayor contenido de fibra detergente ácida correspondió a los tallos con un 37,5 %. Los grupos funcionales detectados fueron hidroxilo (-OH), carbonilos (C=O), típicos de los compuestos observados en el perfil fitoquímico. La actividad antihelmíntica de los extractos obtenidos de *T. diversifolia* fueron sometidos a la prueba de eclosión de huevos sobre *H. contortus*; los extractos fueron probados a las concentraciones de 75 µg/mL, 150 µg/mL, 300 µg/mL y 600 µg/mL. Los resultados de la prueba de inhibición, de la eclosión muestran que el extracto de flores obtuvo el mayor porcentaje de inhibición (100 %), comparado con el 90 % del extracto de hojas a la concentración de 600 µg/mL. Los correspondientes valores de CL₉₀ (Concentración Letal) fueron de 107,3 µg/mL y 464,1 µg/mL, respectivamente. Las propiedades nutricionales de *T. diversifolia* en función de las proteínas y la actividad antihelmíntica observada en los extractos acuosos, muestran el alto potencial que representa para alimentación y salud de rumiantes en el trópico mexicano.

Palabras clave: Fitohelmíntico, nematodos gastrointestinales, nutracéutico, *Tithonia diversifolia*, *Haemonchus contortus*.

Nutritional and phytohelminthic potential of the aqueous extracts of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) in sheep in the Mexican tropics

Abstract

The objective of this study was to analyze the nutritional properties and evaluate the *in vitro* anthelmintic activity of *T. diversifolia* on *Haemonchus contortus* eggs. A phytochemical profile, a proximal

* Autor para correspondencia: manuel.hdez@upch.mx

analysis and an FTIR T were performed to know the types of compounds, chemical composition and functional groups present in the samples. In addition, digestibility tests were performed out *in situ*. The highest protein content was found in leaves (34.6 %), in the same way, it presented the highest digestibility rate with (97.6 %). The highest content of acid detergent fiber corresponded to the stems with 37.5 %. The functional group detected were hydroxyl (-OH), carbonyls (C=O), typical of the compounds observed in the phytochemical profile. The anthelmintic activity of the extracts obtained from *T. diversifolia* were subjected to the egg hatching test on *H. contortus*. The extracts were tested at concentration of 75 µg/mL, 150 µg/mL, 300 µg/mL and 600 µg/mL. The results of the hatching inhibition test show that the flower extract obtained highest percentage of inhibition 100 % compared to 90 % of the leaf extract at the concentration of 600 µg/mL. The corresponding LC₉₀ values were 107.3 µg/mL and 464.1 µg/mL respectively. Nutritional properties of *T. diversifolia* as a function of proteins and the anthelmintic activity observed in aqueous extracts show the high potential that it represents for feeding ruminants health in the Mexican tropics.

Keywords: Phytohelmintic, gastrointestinal nematode, nutraceutical, *Tithonia diversifolia*, *Haemonchus contortus*.

Introducción

En las áreas tropicales, los árboles y arbustos son una fuente importante de forrajes, no solamente porque mantienen su follaje por un periodo más prolongado en comparación con los forrajes convencionales (gramíneas), sino también porque en estas áreas se encuentra el 60 % del total de la población de ganado mundial (Canul-Solis et al., 2018). En áreas tropicales el pastoreo de gramíneas es el sistema de alimentación que prevalece en la producción de pequeños rumiantes (Castañeda-Serrano et al., 2018). Sin embargo, estas especies forrajeras presentan limitaciones nutricionales; por ejemplo, bajos niveles de proteína (6 % a 14 %), alto contenido de fibra detergente neutra (FDN) y baja digestibilidad (Rojas-Schroeder et al., 2017). Estos factores traen como consecuencia bajo consumo de materia seca (MS), provocando bajos índices productivos y reproductivos de los animales.

Otra de las limitantes de importancia económica en la producción de pequeños rumiantes bajo las condiciones tropicales es la infección por nematodos gastrointestinales (NGI), que se refleja en la baja conversión alimenticia, muerte de animales, reducción de los parámetros productivos y reproductivos,

además de altos costos para su control (Sepúlveda-Vázquez et al., 2018). En las últimas décadas, las infecciones por NGI han sido controladas con antihelmínticos (AHs) de diferentes grupos químicos, bencimidazoles, imidazotiazoles, lactonas macrocíclicas, derivado de amino-acetonitrilo y espiroindoles (Kenyon et al., 2016). Sin embargo, el uso regular y excesivo de los AHs ha contribuido al desarrollo generalizado y rápido de resistencia antihelmíntica en muchas de las especies de NGI y actualmente se ha extendido en todo el mundo (Whittaker et al., 2017), limitando la eficacia de los AHs para el control de las infecciones por NGI. Otro tema importante relacionado con el uso de los AHs, es que sus residuos pueden encontrarse en productos de origen animal, como carne y leche y además contaminar el suelo y el agua (Kang et al., 2017).

El uso de especies arbóreas nativas que proporcionan forraje para la alimentación animal y que además presentan algunos metabolitos con acción antihelmíntica representa una opción para superar esta problemática, ya que el forraje que aportan es de buena calidad nutricional y a diferencia de los pastos, siguen produciendo en la época seca. Además, contienen compuestos secundarios (CS)

con potencial para mejorar la salud y nutrición animal. Por ejemplo, los CS que protegen a las plantas de depredadores y plagas, también favorecen los procesos celulares y metabólicos de los hospederos herbívoros (Sepúlveda Velázquez et al., 2018).

Tithonia diversifolia Hemsl (Asteraceae), también conocida como girasol mexicano, es un arbusto perenne o anual y se encuentra distribuida ampliamente en climas tropicales y subtropicales. Tradicionalmente, todas las partes de la planta especialmente las hojas, han sido ampliamente usadas por diferentes culturas para tratar un amplio espectro de padecimientos y enfermedades que van desde la aplicación tópica, desórdenes musculoesqueléticos, abscesos, condiciones dermatológicas, dolor de estómago, diabetes, malaria, fiebre, hepatitis y enfermedades infecciosas (Ajao y Moteetee, 2017). En Kenia, esta especie es también usada en la medicina tradicional contra ectoparásitos en el ganado y para incrementar el consumo de alimento (Chagas-Paula et al., 2012). *T. diversifolia*, también es usada en la alimentación animal porque es una especie con alta capacidad de producción de biomasa (30-70 t/h dependiendo de la densidad de siembra) y rápida recuperación después del corte (Mejía-Díaz et al., 2017). Las hojas y flores muestran un alto índice de calidad nutritiva (Osuga et al., 2012), sugiriendo que puede ser usada como forraje para diferentes especies animales (Castañeda-Serrano et al., 2018). En efecto, la suplementación del ganado con *T. diversifolia* proporciona efectos benéficos incluyendo incremento de la ganancia de peso y producción de leche (Katongole et al., 2016). Diversos autores han reconocido el potencial de *T. diversifolia* para ser utilizada en la alimentación de diferentes especies animales por su valor nutricional, superior al de las gramíneas tropicales, mejorando la degradabi-

lidad de la MS de la dieta en comparación a sistemas convencionales favoreciendo la productividad animal y la rentabilidad del sistema (Mejía-Díaz et al., 2017).

El género *Thitonia* es una importante fuente de ingredientes naturales, particularmente lactonas sesquiterpénicas, diterpenos y flavonoides (Chagas-Paula et al., 2012). Las lactonas sesquiterpénicas son reconocidas por su amplio espectro de actividad biológica, incluyendo actividad significativa contra parásitos protozoarios tropicales (Toledo et al., 2014). Esta especie es ampliamente usada en la medicina tradicional a nivel mundial. Además, *T. diversifolia* se vuelve potencialmente importante para la producción de fitofármacos y para la utilización en la alimentación de rumiantes, por su producción a gran escala y por la facilidad de reproducción. En México, existen muy pocos trabajos respecto a la investigación de las propiedades nutricionales y medicinales que posee *T. diversifolia*, por tanto, el objetivo de este estudio fue analizar las propiedades nutricionales y evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de *T. diversifolia* contra huevos de *Haemonchus contortus*.

Material y métodos

Localización

El trabajo se realizó en el laboratorio de etnoveterinaria de la Universidad Popular de la Chontalpa (UPCH), ubicada en el km 2,0 de la carretera Cárdenas-Huimanguillo. Geográficamente se localiza entre las coordenadas 18° 0' de latitud norte; y 93° 23' de longitud oeste, a una altitud de 10 m s.n.m. Tiene un clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano y un rango de temperatura 26-28 °C. El tipo de suelo predominante es el vertisol (INEGI, 2011).

Colecta del material vegetal

Las hojas, flores y tallos de *T. diversifolia* fueron colectadas en el municipio de Cárdenas, Tabasco (México), durante el mes de agosto del año 2017, en una plantación silvestre ubicada entre las coordenadas 18° 0' de latitud norte y 92° 25' de longitud oeste. El tipo de clima de esta área es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano y un rango de temperatura de 30-32 °C. El material vegetal fue cortado entero (toda la planta) y posteriormente se hizo la separación de cada órgano para el secado, obteniéndose: 500 g de hojas, 100 g de flores y 950 g de tallos, de esta manera se colectó una muestra única sin réplica.

Obtención del extracto

El material vegetal fue secado en una estufa ECOSHEL® (modelo HV-50) durante 48 h a una temperatura de 40 °C, el material fue removido dos veces al día para lograr un secado uniforme. Una vez seco el material, se procedió a molerlo por medio de un molino eléctrico GRINDER® (modelo DF-15), hasta obtener un tamaño de partícula de 250 µm. Posteriormente se midieron en una probeta 100 mL de agua destilada y se colocaron en un vaso de precipitado de 250 mL y se llevó a ebullición; alcanzada esta temperatura se le adicionaron 5 g de polvo de hojas (infusión de hojas), flores (infusión de flores) y tallo (infusión de tallos) de *T. diversifolia* y se dejó enfriar para luego filtrar la solución. La solución final fue envasada en viales para su ultracongelación a -20 °C. Posteriormente fue sometido al proceso de liofilización en un equipo LABCONCO® (modelo 117) para la obtención del extracto y almacenado a 4 °C hasta su uso.

Caracterización química

El contenido de MS se obtuvo mediante secado en una estufa ECOSHEL® (modelo 9023) a 60 °C durante 72 h, la proteína cruda (PC) se determinó mediante la técnica de micro Kjeldahl usando el factor $N \times 6,25$ (AOAC, 1999), el contenido de ceniza se determinó por incineración a 550 °C durante 4 h, la FDN y la fibra detergente acida (FDA) se determinaron de acuerdo con la técnica de Van Soest et al. (1999), usando un analizador de fibra Ankom 2000®.

Digestibilidad in situ (DIS)

La evaluación *in situ* se realizó en el rancho del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, ubicado en el km 25 de la carretera Cárdenas-Coatzacoalcos. Se utilizaron tres bovinos machos cruzados y fistulados en el rumen alimentados con pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*) que fueron asignados a tres tratamientos con tres réplicas en un diseño completamente al azar. T1: Hojas de *T. diversifolia*; T2: Flores de *T. diversifolia* y T3: tallos de *T. diversifolia*. Para evaluar la DIS se utilizó la técnica de bolsa de nylon (Mehrez y Ørskov, 1977), empleando bolsas de (5 cm × 10 cm con un tamaño de poro promedio de 50 µm). Estas bolsas se secaron previamente a 60 °C por 24 h, hasta llevarlas a un peso constante. En cada bolsa se colocaron 5 g de MS de cada muestra; las bolsas fueron colocadas en la porción ventral del rumen y sujetadas a una cadena. Las bolsas fueron retiradas del rumen a las 48 h después de incubadas y posteriormente se lavaron a chorro circulante a baja presión, hasta que el agua salió igual de cristalina, las bolsas con los residuos se secaron en una estufa de desecación a 60 °C durante 48 h. La DIS de cada periodo de incubación se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$DIS = \frac{\text{Cantidad inicial de la muestra} - \text{Residuo después de la incubación}}{\text{Cantidad inicial de muestra}} \times 100$$

Perfil fitoquímico

Las pruebas fitoquímicas para detectar la presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides y terpenoides, quinonas, saponinas y taninos fueron realizadas con los extractos acuosos de hojas, flores y tallos de *T. diversifolia*, de acuerdo a los métodos previamente descritos por Domínguez (1979). Estas pruebas están basadas en la observación visual de cambio de color o de la formación de precipitados después de adicionar un reactivo específico. Para detectar la presencia de diferentes metabolitos se utilizaron las pruebas de: Alcaloides (Dragendorff y Mayer), Cianidina (Flavonoides), Salkowsky (Esteroides y terpenoides), Taninos (Gelatina sal y Cloruro Férrico), Terpenoides Quinonas (Bornträger) y Saponinas (Liebarmann-Burchard).

Determinación de polifenoles totales

Para la extracción de los polifenoles extraíbles totales (PET) se pesaron 100 mg de cada muestra, desengrasada previamente con hexano; así mismo se extrajeron por agitación 1 min en Vórtex con 1 mL de metanol (CH₃OH) al 80 %; seguidamente las muestras fueron colocadas a baño maría durante 15 min a 50 °C. La mezcla fue centrifugada a 10.000 rpm durante 15 min. Posteriormente para la cuantificación se utilizaron 200 µL del extracto obtenido y se le adicionaron 1500 µL de agua destilada. La reacción se llevó a cabo agregando 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu y 200 µL de carbonato de sodio al 5 % a cada una de las muestras; el ácido gálico fue utilizado como solución estándar. Las muestras y la solución estándar se mezclaron en un equipo de Vórtex y se dejaron reposar durante 30 min en la oscuridad. La absorbancia fue medida a 765 nm en un espectrómetro (Thermoelectron, Genesys® 10 UV). Todas las muestras fueron realizadas por triplicado.

Adicionalmente, se preparó una solución stock de 0,1 mg/mL de ácido gálico para establecer la curva de calibración y determinar como equivalente de ácido gálico (GAE) (mg/GAE g⁻¹ BS) (Makkar et al., 1993).

Análisis FTIR

Para determinar los grupos funcionales presentes en las muestras de *T. diversifolia* se utilizó un espectrómetro FTIR Perkin Elmer®, (modelo Spectrum GX) usando aditamento de reflectancia total atenuada (ATR) con cristal de diamante, en un intervalo de 4000 cm⁻¹ a 700 cm⁻¹ y 16 barridos. Para asegurar que los resultados obtenidos fueran representativos de las muestras (hojas, flores y tallos), de cada una de las fracciones se realizaron interferogramas de tres puntos diferentes.

Obtención de huevos de *H. contortus*

Para la obtención de huevos de *H. contortus* se utilizó un cordero donador macho entre 3 meses y 4 meses de edad, cruzado de razas tropicales. El cordero fue alojado en un corral con piso de concreto para evitar reinfecciones con otras especies de NGI. El proceso de adaptación fue de 7 días; durante este periodo el animal fue monitoreado para determinar la carga parasitaria. Posteriormente, el cordero fue desparasitado con dos antihelmínticos comerciales: Levamisol al 12 % (Pfizer-Fort Dodge®) 7,5 mg por kg de peso vivo (P.V.) vía subcutánea y Albendazol (Zoetis®) 5,0 mg por kg de P.V. vía oral. A los 7 días se corroboró que el animal se encontraba libre de parásitos. Se procedió a infectar al cordero con 60.000 larvas de *H. contortus* vía oral. 14 días después de la inoculación de las larvas, el animal fue monitoreado diariamente para conocer la evolución de la infección e iniciar con la recolección de huevos.

Prueba de eclosión de huevos

Esta prueba fue realizada de acuerdo a la guía de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP) (Colles et al., 1992). Se utilizaron cuatro concentraciones de los extractos de los diferentes órganos de *T. diversifolia* 75 µg/mL, 150 µg/mL, 300 µg/mL y 600 µg/mL y un control positivo que fue el Tiabendazol (Sigma-Aldrich®) 5 µg/mL y el control negativo PBS (Phosphate Buffered Saline), los cuales fueron distribuidos en placas de 24 pocillos con cuatro réplicas por concentración y grupo control. En cada pocillo se colocaron 150 µL de una solución que contenía 100 huevos y 850 µL de solución de cada uno de los extractos de *T. diversifolia*, para obtener un volumen final de 1 mL. Posteriormente las placas fueron incubadas por 48 h a una temperatura de 28 °C. Al final de este tiempo se añadió una gota de yodo para detener la eclosión y posteriormente se procedió a contar el número de huevos y larvas L1, a través de un microscopio (VELAB®).

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos y cuatro réplicas. T1 (control negativo); T2 (control positivo); T3 (75 µg/mL); T4 (150 µg/mL); T5 (300 µg/mL) y T6 (600 µg/mL). Se evaluaron tres extractos de *T. diversifolia*: hojas, flores y tallos. La va-

riable de respuesta fue el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos. Para conocer las diferencias entre tratamientos se realizó un análisis de varianza utilizando un nivel de significancia del 5 % ($P < 0,05$). Los análisis se realizaron con el software SPSS, versión 15.0 para Windows. La comparación de medias se realizó mediante la prueba post hoc de Tukey ($P < 0,05$). La determinación de la DL_{50} y DL_{90} (Dosis Letal) se realizó a través del análisis probit por medio del paquete estadístico Polo-Plus (LeOra software, 2003).

Resultados

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de los componentes encontrados de los órganos evaluados de *T. diversifolia*. Como puede observarse se encontraron diferencias significativas $P < 0,05$ en el contenido de proteína, donde el valor máximo registrado para hojas fue (34,7 %) y el valor mínimo para tallos (7,8 %). En el porcentaje de MS no se encontraron diferencias significativas $P > 0,05$.

El tamizaje cualitativo fitoquímico de los extractos acuosos de hojas, flores y tallos de *T. diversifolia* muestra la presencia abundante de esteroides, terpenoides, fenoles y taninos, y con presencia moderada de alcaloides y quinonas. También se puede observar en la Tabla 2, la presencia débil de flavonoides, taninos y ausencia de saponinas.

Tabla 1. Medias de la composición química de órganos de *T. diversifolia* y desviación estándar.
Table 1. Mean chemical composition of *T. diversifolia* organs and standard deviation.

Muestra	Proteína (%)	MS (%)	FDN (%)	FDA (%)	Digestibilidad <i>In situ</i> (%)	Cenizas (%)
Hojas	34,7 ± 0,12 ^a	19,5 ± 0,21 ^a	30,6 ± 0,71 ^a	5,1 ± 0,13 ^a	97,6 ± 2,75 ^a	14,8 ± 0,37 ^a
Flores	14,1 ± 0,05 ^b	17,3 ± 0,14 ^a	28,2 ± 3,33 ^a	11,0 ± 2,19 ^b	88,1 ± 0,32 ^a	7,8 ± 0,06 ^b
Tallos	7,8 ± 0,04 ^c	15,9 ± 0,21 ^a	56,9 ± 1,02 ^b	37,5 ± 0,45 ^c	51,9 ± 1,83 ^b	8,3 ± 0,21 ^b

Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente $P < 0,05$.

Tabla 2. Compuestos químicos encontrados en los extractos de *T. diversifolia*.
 Table 2. Chemical compounds found the extracts of *T. diversifolia*.

Extracto	Alcaloides	Esteroides/ terpenoides	Fenoles	Flavonoides	Quinonas	Saponinas	Taninos
Hojas	++	+++	+	-	++	-	+++
Flores	+	++	+++	+	+	-	-
Tallos	-	+	-	-	+	-	+

+ = Presencia débil; ++ = Moderada; +++ = Abundante; - = Ausencia.

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en el contenido de polifenoles en los diversos órganos de *T. diversifolia*, sin embargo, el extracto de flores mostró una ligera tendencia superior a los otros órganos (Tabla 3). Esto coincide con lo observado en el análisis fitoquímico que muestra mayor abundancia de estos compuestos.

Análisis FTIR

En la figura 1 se observan los interferogramas de hojas, tallos y flores de *T. diversifolia*, donde se muestran las bandas de absorción a 3400 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1755 cm^{-1} , 1607 cm^{-1} , 1391 cm^{-1} y 1078 cm^{-1} ; estas bandas son específicas de grupos funcionales hidroxil-

Tabla 3. Medias \pm error estándar de polifenoles extraíbles totales en *T. diversifolia*.
 Table 3. Mean \pm standard error of total extractable polyphenols in *T. diversifolia*.

Órgano	Polifenoles extraíbles (mg GAE g ⁻¹)
Hoja	17,64 \pm 1,5 ^a
Flor	19,27 \pm 0,3 ^a
Tallo	16,73 \pm 0,02 ^a

GAE: equivalente de ácido gálico por 100 g; \pm SE: Error estándar.

Letras semejantes en la misma columna no difieren estadísticamente $P > 0,05$.

los (OH), metilos (CH₃), metilenos (CH₂), carbonilos (C=O), dobles enlaces C=C, fenoles (O-H) y enlaces C-O respectivamente, encontrados principalmente en compuestos terpénicos.

En la Tabla 4 se muestran las medias de los extractos de hojas, flores y tallos de *T. diversifolia* a las diferentes concentraciones. Las mayores concentraciones probadas del extracto acuoso de flores de *T. diversifolia* (150 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$ y 600 $\mu\text{g/mL}$) mostraron

la tasa más alta de inhibición de la eclosión 98,5 %, 99,7 % y 100 %, respectivamente. El comportamiento de los tres extractos fue de manera dosis-dependiente. Los porcentajes menores de eficacia fueron observados en el extracto de tallos de *T. diversifolia*, en todas las concentraciones probadas. El resultado de la determinación de la DL₅₀ y DL₉₀ demuestra que el extracto acuoso de hojas mostró la menor DL₅₀ y el extracto de flores mostró la

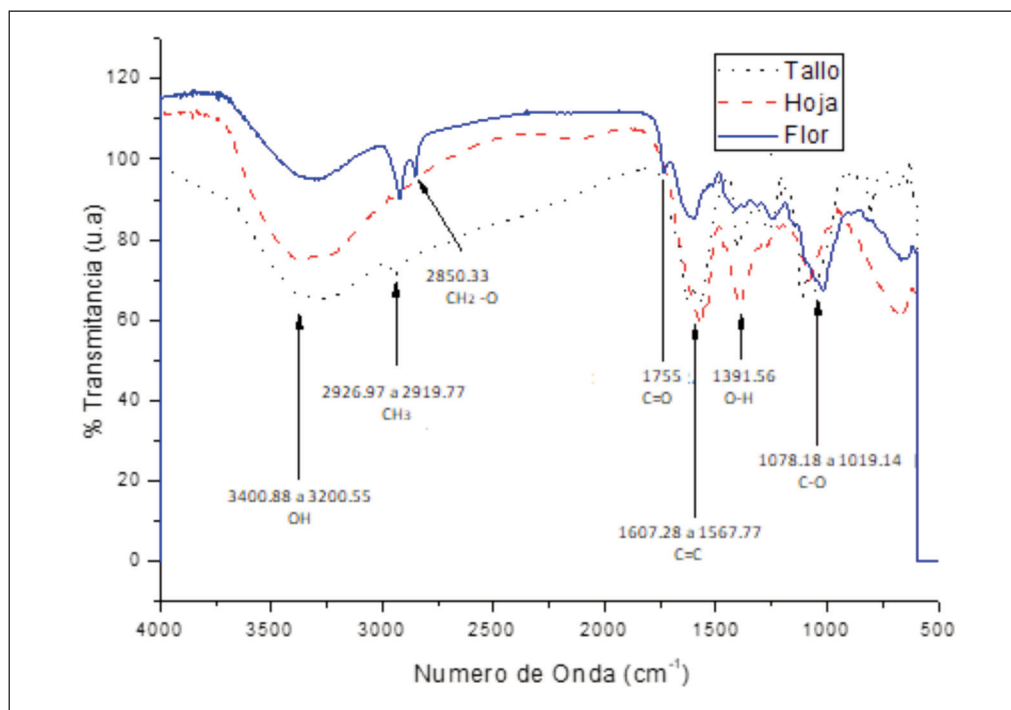


Figura 1. Interferograma de los extractos acuosos de hojas, flores y tallos de *T. diversifolia*.
 Figure 1. Interferogram of leaves, flowers and stems of extracts from *T. diversifolia*.

Tabla 4. Medias del porcentaje de eficacia \pm error estándar de inhibición de la eclosión de los extractos acuosos de *T. diversifolia* contra huevos de *H. contortus*.
 Table 4. Mean efficacy percentage \pm standard error of the of inhibition of *T. diversifolia* extracts against *H. contortus* eggs

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Tipo de extracto		
	Flores	Hojas	Tallos
600	100 \pm 2,1 ^a	90,0 \pm 2,8 ^a	81,4 \pm 13,7 ^a
300	99,7 \pm 0,2 ^a	89,2 \pm 4,5 ^a	64,3 \pm 18,6 ^a
150	98,5 \pm 1,5 ^a	80,0 \pm 1,5 ^a	58,0 \pm 13,2 ^a
75	80,0 \pm 5,0 ^b	73,2 \pm 8,5 ^b	27,7 \pm 6,3 ^b
Tiabendazol 0,05 control (+)	92,5 \pm 2,1 ^a	93,7 \pm 0,6 ^a	93,1 \pm 2,1 ^a
Control negativo (PBS)	6,2 \pm 1,8 ^c	5,2 \pm 0,6 ^c	5,7 \pm 1,2 ^c

Letras diferentes en la misma columna representan diferencia significativa ($P < 0,05$).

PBS = Phosphate Buffered Saline.

Tabla 5. Concentración letal requerida para inhibir el 50 % (CL₅₀) y 90 % (CL₉₀) de la eclosión de huevos, y límites inferior y superior al 90 % de los extractos de hojas, flores y tallos de *T. diversifolia*.

Table 5. Lethal concentration required to inhibit to 50 % (CL₅₀) and 90 % (CL₉₀) of the hatching of eggs, and lower and higher confidence limits than 90 % of the extracts of leaves, flowers and stems of *T. diversifolia*.

Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	LC 90 % inferior-superior (µg/mL)	CL ₉₀ (µg/mL)	LC 90 % inferior-superior (µg/mL)
EAH	11,73	4,91-20,29	464,06	363,77-661,32
EAF	27,86	12,43-41,68	107,28	86,24-131,92
EAT	160,97	134,64-188,36	1184,68	843,83-1960,98

EAH: Extracto acuoso de hojas; EAF: Extracto acuoso de flores; EAT: Extracto acuoso de tallos.

menor DL₉₀, lo que indica la eficacia de ambos extractos para inhibir la eclosión de huevos de *H. contortus* (Tabla 5).

Discusión

En este estudio los extractos acuosos de flores, hojas y tallos de *T. diversifolia* fueron caracterizados química y fitoquímicamente para conocer su potencial nutricional y medicinal (antihelmíntico); para lo cual se realizó la evaluación *in vitro* mediante la prueba de eclosión de huevos contra el nematodo *H. contortus*. Las hojas de *T. diversifolia* mostraron un alto contenido de proteína (34,7 %), muy similar a lo reportado por Roothaert y Paterson (1997), quienes encontraron porcentajes de proteína en hojas entre 29 % a 38 %, y muy superior a los valores de 27,5 %, 25 % y 20 % reportados por Mejía-Díaz et al. (2017), Tendonkeng et al. (2014) y Ramírez-Rivera et al. (2010), respectivamente. Según Juárez-Hernández et al. (2004), la edad al corte ejerce un efecto considerable en el rendimiento y la calidad del forraje (en términos de proteína y relación hoja/tallo). Lo interesante en *T. diversifolia* es que la proporción de la proteína de paso es mayor que la proteína degradable en el rumen. Murgueito

(2005) afirma que esta arbustiva puede reemplazar 35 % del concentrado (15,7 % de PC y 29,8 % de FDN) en vacas lecheras sin afectar la producción y la calidad de la leche. Según Van Sao et al. (2010), se pueden obtener hasta 6 t/ha de proteína cruda.

En cuanto a la degradabilidad *in situ* encontrada, esta fue de 97 % en hojas, muy similar a lo encontrado por Orestes et al. (2008), quienes reportaron valores entre 85 % y 90 % de degradabilidad de la MS. Comparado con los valores obtenidos por Mahecha y Rosales (2005), en las leguminosas forrajeras *Leucaena leucocephala* (79 %), *Gliricidia sepium* (82,1 %) y *Enterolobium cyclocarpum* (87,6 %) el porcentaje de digestibilidad de *T. diversifolia* en este estudio fue superior.

Dada las propiedades nutricionales de *T. diversifolia*, como fuente proteica, ésta también ha sido utilizada como forraje en la alimentación de cabras (Odedire y Oloidi, 2014), estos autores sugieren que las hojas de *T. diversifolia* pueden servir como suplemento forrajero para cabras con un nivel de inclusión hasta del 30 % sin presentar efectos secundarios.

Los resultados obtenidos en este estudio revelan que los extractos acuosos de hojas y flores de *T. diversifolia* evaluados muestran una

buena actividad antihelmíntica contra huevos del nematodo *H. contortus*. El género *Tithonia* presenta una gran diversidad química, comprende principalmente terpenoides y flavonoides. *T. diversifolia* es la especie más investigada y varios estudios han revelado el potencial de esta planta y sus constituyentes. Los terpenoides como sesquiterpenos, diterpenos, monoterpenos y compuestos alicíclicos han sido aislados de las hojas, tallos y flores de *T. diversifolia* (Kuo y Chen, 1998; Zhao et al., 2012). Los terpenoides son los metabolitos más comunes en esta especie y son los principales componentes de muchos aceites esenciales. Los sesquiterpenos son un gran grupo de metabolitos secundarios con un esqueleto de quince carbonos (C₁₅), formado por tres unidades de isopreno y existen una amplia variedad de formas (Ajao y Moteetee, 2017). Otros grupos de compuestos en *T. diversifolia* son las lactonas sesquiterpénicas, las cuales son distintas químicamente de los sesquiterpenos por la presencia de un sistema γ -lactona. Ejemplos de estos compuestos son los metabolitos tagitinina A-C y F, que han sido aislados de esta planta (Baruah et al., 1979). Las hojas de *T. diversifolia* han sido usadas extensivamente en la medicina tradicional de Nigeria para tratar la fiebre, la malaria y otros padecimientos. El compuesto antiplasmodial tagitinina C ha demostrado ser el principio activo responsable del uso de hojas de *T. diversifolia* en el tratamiento de la malaria (Goffin et al., 2002). Las pruebas cualitativas y los análisis de FTIR de los extractos de *T. diversifolia*, muestran que los principales grupos funcionales -OH (3400 cm⁻¹); grupos carbonilo C=O (1755 cm⁻¹), como ésteres, ácidos carboxílicos y cetonas, dobles enlaces C=C (1607 cm⁻¹) son característicos de las sesquiterpenlactonas reportadas en la literatura como la tagitinina (Zhou et al., 2012).

No existen reportes sobre la actividad antihelmíntica de *T. diversifolia* sobre NGI, por lo que este estudio constituye el primer hallazgo de esta especie sobre huevos de *H. con-*

tortus. Los datos obtenidos muestran que el extracto acuoso de flores mostró el mayor porcentaje de inhibición *in vitro* (100 %) en la mayor concentración evaluada (600 μ g/mL) y, a la misma dosis, el extracto de hojas y tallos mostraron 90 % y 81 % de inhibición de la eclosión de huevos, respectivamente. El extracto de flores mostró mayor porcentaje de inhibición, atribuida posiblemente a la presencia de lactonas sesquiterpénicas identificadas en la flor (1755 cm⁻¹) y la presencia de fenoles (1391 cm⁻¹) en ese extracto. Los compuestos fenólicos han sido asociados con la resistencia de plantas a una variedad de plagas y patógenos, la investigación ha revelado una correlación de los niveles elevados de compuestos fenólicos con la resistencia de la planta a la infección por nematodos. Diversos compuestos fenólicos han mostrado actividad nematocida, como el pirocatecol, el ácido salicílico y el ácido 4-hidroxibenzoico los cuales exhibieron eficacia nematocida contra *C. elegans* y *M. incognita* (Zhou et al., 2012). Adicionalmente, la presencia de taninos que probablemente actuaron de manera sinérgica para producir un efecto mayor que los otros extractos.

Por otro lado, los polifenoles incluidos en la dieta son la fuente más diversa de nutraceuticos, que han demostrado un enorme potencial para modular varias características de la salud y la enfermedad (Sharma y Padwad, 2020).

Los metabolitos responsables de la actividad antihelmíntica de los extractos acuosos de *T. diversifolia*, fenoles, terpenoides y taninos han mostrado actividad nematocida contra diferentes especies de nematodos siendo capaces de interrumpir el ciclo de vida del nematodo y afectar la eclosión del huevo y desarrollo de la larva (Molan y Farah, 2010; Hoste et al., 2012). Vargas-Magaña et al. (2014) proponen posibles mecanismos de como los extractos de planta inhiben la eclosión del huevo, ellos teorizan tres mecanismos: primero, el extracto afecta la permeabilidad del cascarón; se-

gundo, el extracto inhibe algunas enzimas involucradas en la eclosión; y tercero el extracto afecta los receptores de eclosión que se encuentran en el cascarón.

Conclusiones

De acuerdo a los análisis realizados para conocer las propiedades nutricionales de *T. diversifolia*, se demuestra que los atributos que posee en cuanto a proteína, representa un potencial para ser utilizada en la alimentación de rumiantes en el trópico mexicano. Las pruebas *in vitro* revelaron el potencial antihelmíntico de los extractos acuosos de hojas y flores de *T. diversifolia* para inhibir la eclosión de huevos en un porcentaje de 80 % a 100 % con las concentraciones de 150 µg/mL a 600 µg/mL y con una CL₉₀ de 464,1 µg/mL y 107,3 µg/mL respectivamente.

Referencias bibliográficas

- Ajao AA, Moteetee NA (2017). *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. (Asteraceae: Heliantheae), an invasive plant of significant ethnopharmacological importance: A review. *South African Journal of Botany* 113: 396-403. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.09.017>.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1999). *Official Method of Analysis* 16th Ed. Washington DC, USA. 1200 pp.
- Baruah NC, Sharman RP, Madhusudanan KP, Thyagarajan G, Herz W, Murari R (1979). Sesquiterpene lactones of *Tithonia diversifolia* stereochemistry of the tagitinins and related compounds. *Journal of Organic Chemistry* 44: 1831-1835. <https://doi.org/10.1021/jo01325a018>.
- Canul-Solis JR, Castillo-Sánchez LE, Escobedo-Mex JG, López-Herrera MA, Lara-Lara PE (2018). Rendimiento y calidad forrajera de *Gliricidia sepium*, *Tithonia diversifolia* y *Cynodon nlemfuensis* en monocultivo y sistema agroforestal. *Agrociencia* 52: 853-862.
- Castañeda-Serrano RD, Piñeros-Varón R, Vélez-Giraldo A (2018). Foliage of tropical arboreal species in feeding ovines (*Ovis aries*): intake, digestibility and balance nitrogen. *Boletín Científico Centro de Museos Historia Natural* 22: 58-68. <https://doi.org/10.17151/bccm.2018.22.1.4>.
- Chagas-Paula DA, Oliveira RB, Rocha BA, Da Costa FB (2012). Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity* 9: 210-234. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100019>.
- Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ (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. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90141-u](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90141-u).
- Domínguez XA, (1979). *Métodos de investigación fitoquímica*. Ed. Limusa, S.A. México, D.F. 281 pp.
- Goffin E, Ziemons E, De Mol P, De Madureira MDC, Martins AP, Da Cunha AP, Philippe G, Tits M, Angenot L, Fredrich M (2002). *In vitro* antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: Tagitinin C. *Planta Medica* 68: 543-545. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32552>.
- Hoste H, Martínez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA (2012). Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology* 186: 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.042>.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) (2011). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Cárdenas, Tabasco. México. pp. 2-3.
- Juárez-Hernández J, Bolaños ED, Reinoso M (2004). Contenido de proteína por unidad de materia seca acumulada en pastos tropicales. Época de nortes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 38(4): 423-430.

- Kang J, Park SJ, Park HC, Hossain MA, Kim MA, Son SW, Lim CM, Kim TW, Cho BH (2017). Multiresidue screening of veterinary drugs in meat, milk, egg, and fish using liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 182: 635-652. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2350-y>.
- Katongole CB, Kabirizi JM, Nanyeenya WN, Kigongo J, Nviiri G (2016). Milk yield response of cows supplemented with sorghum stover and *Tithonia diversifolia* leaf hay diets during the dry season in northern Uganda. *Tropical Animal Health and Production* 48: 1463-1469. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1119-1>.
- Kenyon F, Rinaldi L, McBean D, Pepe P, Bosco A, Melville L, Devin L, Mitchell G, Ianniello D, Charlier J, Vercruyse J, Cringoli G, Levecke B (2016). Pooling sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and *Nematodirus* infection. *Veterinary Parasitology* 225: 53-60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.022>.
- Kuo YH, Chen CH (1998). Sesquiterpenes from the leaves of *Tithonia diversifolia*. *Journal of Natural Product* 61: 827-828. <https://doi.org/10.1021/np970530h>.
- LeOra software (2003). POLO: A user's guide to Probit Or LOGit analysis. Berkeley, USA. 19 pp.
- Mahecha L, Rosales M (2005). Valor nutricional del follaje de Botón de Oro (*Tithonia diversifolia* [Hemsl. Gray]), en la producción animal en el trópico. *Livestock Research for Rural Development* 17: 100.
- Makkar HPS, Blümmel M, Borowy NK, Becker K (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlation with Chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61: 161-165. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740610205>.
- Mehrez AZ, Ørskov ER (1977). A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *The Journal of Agricultural Science* 88(3): 645-650. <https://doi.org/10.1017/S0021859600037321>.
- Mejía-Díaz E, Mahecha-Ledesma L, Angulo-Arizala J (2017). *Tithonia diversifolia*: especie para ramoneo en sistemas silvopastoriles y métodos para estimar su consumo. *Agronomía Mesoamericana* 28(1): 289-302. <https://doi.org/10.15517/am.v28i1.22673>.
- Molan AL, Faraj AM (2010). The effects of condensed tannins extracted from different plant species on egg hatching and larval development of *Teladorsagia circumcincta* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Folia Parasitologica*. 57: 62-68. <https://doi.org/10.14411/fp.2010.008>.
- Murgueito E (2005). Silvopastoral systems in the neotropics. En: *Silvopastoralism and sustainable land management* (Ed. Mosquera-Losada MR, Rigueiro-Rodríguez A, McAdam J), pp. 24-29. CABI Publishing, Wallingford, UK. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845930011.0024>.
- Odedire JA, Oloidi FF (2014). Feeding wild sunflower (*Tithonia diversifolia* Hemsl., A. Gray) to West African dwarf goats as a dry season forage supplement. *World Journal of Agricultural Research* 2: 280-284. <https://doi.org/10.12691/wjar-2-6-6>.
- Orestes LOL, Valenciaga-Gutiérrez D, Ruiz-Vázquez TE, Ruiz-Barrera O, Castillo-Castillo Y, González-García H, Rodríguez-Muela C, Hernández AD, Chongo-García B, Arzola-Álvarez C, Cairo-Sotolongo J (2008). Efecto de la edad de corte en la capacidad fermentativa *in vitro* y la dinámica de degradación ruminal *in situ* de *Tithonia diversifolia*. *Zootecnia Tropical* 26(3): 243-247.
- Osuga IM, Abdulrazak SA, Muleke CI, Fujihara T (2012). Potential nutritive value of various parts of wild sunflower (*Tithonia diversifolia*) as source of feed for ruminants in Kenya. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 10: 632-635.
- Ramírez-Rivera U, Sanginés-García JR, Escobedo-Mex JG, Cen-Chuc F, Rivera-Lorca JA, Lara-Lara PE (2010). Effect of diet inclusion of *Tithonia diversifolia* on feed intake, digestibility and nitrogen balance in tropical sheep. *Agroforestry Systems* 80: 295-302. <https://doi.org/10.1007/s10457-010-9320-0>.
- Rojas-Schroeder JA, Sarmiento-Franco L, Sandoval-Castro CA, Santos-Ricalde RH (2017). Utilización

- del follaje del Ramón (*Brosimum alicastrum* Swarth) en la alimentación animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 20: 363-371.
- Roothaert LR, Paterson TR (1997). Recent work on the production and utilization of tree fodder in East Africa. *Animal Feed Science and Technology* 69: 39-51. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)81621-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)81621-5).
- Sepúlveda-Vázquez J, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Martínez-Puc JF, Chan-Pérez JI (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science* 5 (2): 79-95.
- Sharma R, Padwad Y (2020). Perspectives of the potential implications of polyphenols in influencing the interrelationship between oxidative-inflammatory stress, cellular senescence and immunosenescence during aging. *Trends in Food Science & Technology* 98: 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.004>.
- Tendonkeng F, Fogang Zogang B, Sawa C, Boukila B, Tendonkeng PE (2014). Inclusion of *Tithonia diversifolia* in multinutrient blocks for West African dwarf goats fed *Brachiaria* straw. *Tropical Animal Health Production* 46: 981-986. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0597-2>.
- Toledo JS, Ambrosio SR, Borges CHG, Manfrim V, Cerri DG, Cruz AK, Da Costa FB (2014). *In Vitro* Leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* Promastigotes and Amastigotes. *Molecules* 19: 6070-6079. <https://doi.org/10.3390/molecules19056070>.
- Van Sao N, Mui NT, Van Binh D (2010). Biomass production of *Tithonia diversifolia* (Wild Sunflower), soil improvement on sloping land and use as high protein foliage for feeding goats. *Livestock Research for Rural Development* 22(8): 151.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10): 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Vargas-Magaña JJ, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Chan-Pérez JI (2014). Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology* 206(3): 322-327. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.008>.
- Whittaker JH, Carlson SA, Jones DE, Brewer MT (2017). Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 40: 105-115. <https://doi.org/10.1111/jvp.12330>.
- Zhao GJ, Zhong XX, Chen WS, Li X, Sun LN (2012). Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology* 44: 250-254. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.06.019>.
- Zhou JL, Wang K, Wang J, Xu J, Zhao T, Shan CL (2012). Secondary Metabolites with antinematodal activity from higher plants. In: *Studies in Natural Products Chemistry* (Ed. Atta-ur-Rahman), pp. 67-114. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59514-0.00003-1>.

(Aceptado para publicación el 22 de abril de 2021)