



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTI-FASCIOLA CON DIVERSOS
EXTRACTOS DE ALGUNAS PLANTAS MEXICANAS USADAS EN LA
MEDICINA TRADICIONAL.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A
STEPHANIE IBARRA MORENO

TUTORES:
DR. OSVALDO FROYLÁN IBARRA VELARDE
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

CÓMITE TUTORAL:
DRA. YAZMÍN ALCALÁ CANTO
Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia.

DR. PEDRO MENDOZA DE GIVES
Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal.

México, D.F. JULIO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

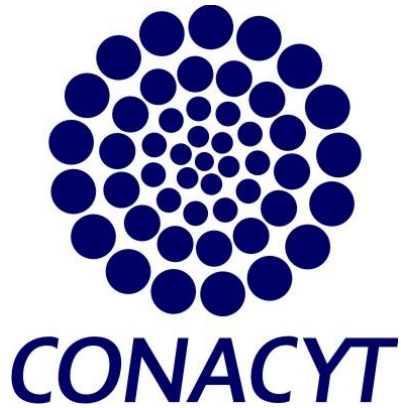
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:



Por la oportunidad brindada de pertenecer a este programa de posgrado de la UNAM.



Por brindarme una beca durante el tiempo que duraron mis estudios de Doctorado.



Por brindarme apoyo durante la estancia Doctoral en el extranjero.

AGRADECIMIENTOS.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** con orgullo, a la **Facultad de Estudios Superiores Iztacala** por darme mi licenciatura con cariño y a la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** por darme mi formación profesional durante el posgrado.

Al Instituto de **Salud Carlos III** por la confianza y enseñanzas durante la estancia doctoral.

A mi tutor y mentor **Dr. Froylán Ibarra Velarde** por su gran apoyo, colaboración y enseñanzas en todo momento para realizar este trabajo.

Al co-tutor de este trabajo el **Dr. Guillermo Ávila Acevedo** por la paciencia y ayuda durante este trabajo.

A mi comité tutorial la **Dra. Yazmín Alcalá Canto** y al **Dr. Pedro Mendoza de Gives** por sus aportaciones y sugerencias durante este trabajo.

Al Laboratorio de Fitoquímica de la Fes -Iztacala por su tiempo y espacio para realizar los extractos y en especial a la **Dra. Anita** por enseñarme a manejar los equipos.

Al Laboratorio de Inmunología de Mucosas de la Fes Iztacala por apoyo de materiales, técnicas y espacio durante el trabajo, en especial a la **Dra. Leticia Moreno Fierros**, a la Dra. Ana García Hernández y a la M.C. Damaris Ilhui.

A la Unidad de Helmintos del Servicio de Parasitología por su gran colaboración a nivel académico, profesional y personal en especial a la **Dra. Teresa Garate**, Dra. María de Jesús Peterguer, M.C. Luccianna Vaccaro, M.C. Pamela Campioli y Dra. Ana García.

A todas las personas que fueron compañeros, algunos amigos y otros conocidos a lo largo de estos 4 años me quedo con lo mejor de cada uno de ellos Lupita, Concepción, José Manuel, Aldo, Lucía, Yeniel, Dulce, Elisa, gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

A MI **MAMA LETICIA MORENO** POR TODO SU APOYO Y AMOR A LO LARGO DE ESTOS AÑOS NO SOLO EN EL ÁMBITO ESTUDIANTIL SINO COMO MADRE, AMIGA Y CONSEJERA.

A MI **PAPA MAXIMILIANO IBARRA** POR SU CARIÑO INCONDICIONAL, AFECTO Y COMPRENSIÓN A LO LARGO DE MI VIDA.

A MI QUERIDA **ABUE SILVIA FIERROS** POR HABERME CUIDADO DESDE QUE NACI HASTA AHORA POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO CUANDO MÁS LO NECESITO.

A MI QUERIDO **ABUELO ARMANDO MORENO** QUE YA NO ESTA CON NOSOTROS POR HABERME ENSEÑADO TANTAS COSAS DE LA VIDA Y POR HABER SIDO COMO UN PADRE PARA MI DURANTE MI NIÑEZ Y POR HABER CONFIADO SIEMPRE EN MI.

A MI QUERIDA **BISABUELA CLEMENTINA** QUE AUNQUE YA NO ESTES SIEMPRE TE TENDRÉ UN LUGAR ESPECIAL EN MI CORAZON Y DOY GRACIAS A DIOS EL HECHO DE HABERTE CONOCIDO.

A **MIS ABUELITOS** DE COTIJA MICHOÁCAN **SALVADOR IBARRA Y RAQUEL BARAJAS** POR SU AMOR, CONFIANZA Y CONSEJOS.

A MIS LINDAS HERMANAS **DANIELA Y GISSELLE** POR SER MIS MOTORES EN LA VIDA PARA SEGUIR AVANZANDO Y CRECIENDO DÍA A DÍA.

A MIS TIOS **FRANCISCO MORENO, ARMANDO MORENO Y LAURA HERRERA** POR HABERME CUIDADO Y ALENTANDO DESDE PEQUEÑA Y POR TODAS SUS ATENCIONES QUE SIEMPRE HAN TENIDO CONMIGO.

EN GENERAL A TODA MI FAMILIA CERCANA Y LEJANA, POR ESTAR SIEMPRE EL PENDIENTE DE MI.

A MIS MEJORES AMIGOS **LUCERO, JESAE, NEITH, GABRIEL, RICARDO, CRISTIAN, SALLY, DENNIS** ENTRE OTROS, GRACIAS POR TODO Y FORMAR PARTE DE MI VIDA EN ESTE TIEMPO.

INDICE.

ASBTRACT	9
RESUMEN	10
1.INTRODUCCIÓN	11
1.1.1 El parasitismo	11
1.1.2 Los Helmintos	11
1.1.3 Los Trematodos	11
1.1.4 Subclase digenea	11
1.2 <i>Fasciola hepatica</i>	12
1.2.1 Importancia Económica.....	12
1.2.2 Morfología de <i>Fasciola hepatica</i>	13
1.2.3 Hospederos	15
Huésped Intermediario	15
Hospedadores definitivos.....	16
1.2.4 Ciclo biológico:	16
1.2.5 Patogenia.....	17
1.2.6 Signos y síntomas	18
1.2.7 Diagnóstico clínico.....	19
1.2.8 Control químico contra <i>Fasciola hepatica</i>	19
1.2.9 ¿qué se necesita para controlar a <i>Fasciola hepatica</i> en el ganado?.....	20
1.3 Las plantas.....	21
1.3.1 La etnobotánica.....	21
1.3.2 Plantas en México	21
1.3.3 Plantas medicinales	22
1.3.4 Importancia de las plantas medicinales	22
1.3.5 Mercado Actual de Plantas medicinales en México.....	23
1.3.6 La Fitoquímica	24
1.3.7 Toxicidad en plantas.....	24
Metabolitos secundarios.....	25
1.3.8 Principales metabolitos secundarios en la plantas	25
2. ANTECEDENTES.....	27
3. JUSTIFICACIÓN	29

4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVO.....	30
5.1 Objetivos Particulares.	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1 Plantas a estudiar.	31
6.2 Colecta del material vegetal.....	32
6.3 Elaboración de extractos.....	33
6.4 Evaluación <i>in vitro</i> de extractos crudos contra <i>Fasciola hepatica</i>	33
6.5 Evaluación de la Toxicidad	37
6.6 Recuperación de fracciones del mejor extracto en el modelo <i>in vitro</i>	38
7. RESULTADOS.....	38
7.1 Plantas medicinales utilizadas.....	38
7.2 Preparación de extractos a utilizar.....	40
7.3 Primera evaluación <i>in vitro</i> con el modelo de <i>Fasciola hepatica</i>	41
7.4 Determinación de la dosis mínima letal.....	43
7.5 Evaluación de la toxicidad.....	53
7.6 El mejor extracto	55
7.7 Evaluación <i>in vitro</i> de las 18 fracciones obtenidas a partir del extracto hexánico de <i>Achillea millefolium</i> (plumajillo).....	56
7.8 Cromatografía de columna de las fracciones efectivas.	57
7.9 Evaluación <i>in vitro</i> de las 57 fracciones de “FAactiva”.....	58
7.10 Purificación de los compuestos activos.	59
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIONES.....	65
10. PERSPECTIVAS	67
11. BIBLIOGRAFÍA.....	67
12. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	79

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Fig.1 Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i>	17
Fig. 2 Biosíntesis de los metabolitos secundarios	27
Fig. 3 Tratamiento de las plantas	33
Fig. 4 Obtención de extractos	34
Fig.5 Ensayo por escrutinio	35
Fig. 6 Placas con tratamiento	37
Fig. 7 Metodología de extracción	42
Fig. 8 Fasciolas en el modelo <i>in vitro</i>	43
Fig. 9 Caja de 24 pozos	43
Fig.10 Cromatografía de columna	56
Fig.11 Cromatografía de papel	56
Fig.12 Eficacia de las fracciones probadas	58
Fig. 13 “FAactiva” con celita	58
Fig. 14 cromatografía de papel de las fracciones de “FAactiva”	59
Fig. 15 fracción A (7 componentes) y fracción B (4 componentes)	60
Fig. 16 Fasciolas muertas con Fracciones de FAactiva	65
Tabla 1. Plantas medicinales utilizadas	33
Tabla 2. Tipos de toxicidad	38
Tabla 3. Características de las plantas utilizadas	41
Tabla 4. Plantas con actividad fasciolocida	43

Tabla 5. Efecto anti <i>Fasciola hepatica</i> a una concentración de 500mg/Lt.....	45
Tabla 6. Efecto anti <i>Fasciola hepatica</i> a una concentración de 250mg/Lt.....	46
Tabla 7. Efecto anti <i>Fasciola hepatica</i> a una concentración de 125mg/Lt	47
Tabla 8. Efecto anti <i>Fasciola hepatica</i> a una concentración de 60mg/Lt.....	48
Tabla 9. Efecto anti <i>Fasciola hepatica</i> con chaparro amargo	48
Tabla 10. Dosis mínima letal de los extractos hexánicos probados	52
Tabla 11. Grupos de ratones utilizados	55
Tabla 12. Estado de los ratones CD1 tratados	55
Tabla 13. Eficacia de las fracciones probadas	57
Tabla 14. Evaluación in vitro de las fracciones de “FAactiva”	59
Gráficos A. Dosis de 500, 250 y 125 mg/Lt a las 24 horas post tratamiento.....	49
Gráficos B. Dosis de 500, 150 y 125 mg/Lt a las 48 horas post tratamiento.....	50
Gráficos C. Dosis 500, 250, 125 mg/Lt a las 72 horas post tratamiento.....	51
Gráficos D. Estudio Probit de los extractos efectivos	52

ASBTRACT

The aim of this study was to evaluate the hepatic fasciolasis *in vitro* and *in vivo* with extracts of some plants with antiparasitic effect used in traditional Mexican ethnobotany. 20 plants were collected which were dried, processed and assessed under *in vitro* conditions with the respective fractions (hexane, ethyl acetate and methanol), totaling 60 extracts tested. Plants that showed fasciolicide activity *in vitro* were *Castela tortuosa* (chaparro amargo), *Achillea millefolium* (plumajillo), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Justicia spicigera* (muicle), *Limpia critridora* (cedrón), *Populus alba* (álamo), *Mentha piperita* (menta), *Chenopodium graveolens* (epazote de zorrillo), *Lippia graveolens* (orégano), *Artemisia mexicana* (estafiate) y *Artemisia absinthium* (ajenjo), being the hexanics fractions which showed greater fasciolicide efficacy. Additionally the minimum lethal dose was determined of these extracts indicating concentrations of 125, 250, and 500mg/L depending on the extract under study. Also, with these fractions a study of toxicity was carried out in mice CD1 administering a single oral dose of 5, 50, 500, 2500 and 5000 mg / kg. 20 days after administration a kidney and liver histology of mice was performed observing all safety statements above. Subsequently, using *Achillea millefolium* another 18 different fractions were isolated, which were tested *in vitro* at 500mg/L, with 5 repetitions each. These fractions that continued to show high fasciolicide activity were mixed forming the "FAactiva" obtaining additional 57 chromatographical fractions where the F11-F17 and F41-36 fractions were evaluated *in vitro* at showed 100% fasciolicida efficacy.

Key Words:

Fasciola hepatica, fasciolicide, extracts, medicinal plants, *in vitro*, toxicity, secondary metabolites.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue el de evaluar el efecto anti-*Fasciola hepatica* *in vitro* e *in vivo* de extractos de algunas plantas con efecto antiparasitario utilizadas en la etnobotánica mexicana tradicional. Se colectaron 20 plantas las cuales, se secaron, procesaron y evaluaron bajo condiciones *in vitro* con sus respectivas fracciones (hexánica, acetato de etilo y metanol), totalizando 60 extractos probados. Las plantas que mostraron actividad fasciolicida *in vitro* fueron: *Castela tortuosa* (chaparro amargo), *Achillea millefolium* (plumajillo), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Justicia spicigera* (muicle), *Limpia critridora* (cedrón), *Populus alba* (álamo), *Mentha piperita* (menta), *Chenopodium graveolens* (epazote de zorrillo), *Lippia graveolens* (orégano), *Artemisia mexicana* (estafiate) y *Artemisia absinthium* (ajenjo), siendo las fracciones hexánicas las que mostraron mayor eficacia fasciolicida. Adicionalmente se determinó la dosis mínima letal de estos extractos indicando concentraciones de 125, 250, y 500mg/L, dependiendo del extracto bajo estudio. Asimismo, con estas fracciones se realizó un estudio de toxicidad en ratones CD1 administrando una dosis oral y única de 5, 50, 500, 2500 y 5000 mg/kg. A los 20 días posteriores a la administración se realizó histología de riñón e hígado de los ratones observando total inocuidad de los extractos antes mencionados. Posteriormente, utilizando *Achillea millefolium* se aislaron otras 18 distintas fracciones, las cuales fueron probadas *in vitro* a 500mg/L, con 5 repeticiones cada una. Estas fracciones que continuaron mostrando alta actividad fasciolicida se mezclaron formando la "FAactiva" obteniendo cromatográficamente 57 fracciones adicionales de donde la F11-F17 y la F 36-F41 evaluadas *in vitro* a 500mg/L mostraron 100% de eficacia fasciolicida. Concluyendo que estas fracciones se encuentra el efecto anti-fasciola.

Palabras clave:

Fasciola hepatica, fasciolicidas, extractos, plantas medicinales, *in vitro*, toxicidad, metabolitos secundarios

1.INTRODUCCIÓN

1.1.1 El parasitismo

El parasitismo es la forma de vida más extendida en el planeta. Todo ser vivo tiene parásitos, tanto las plantas como los animales y cada especie tiene parásitos especialistas. De esta manera los virus, bacterias, protozoarios, artrópodos, anélidos y moluscos pueden ser parásitos (Salgado, 2009).

1.1.2 Los Helmintos

Los gusanos o lombrices parasitarias de animales son conocidos como helmintos, este grupo incluye los acantocéfalos, nematodos, y platelmintos. Estos gusanos pueden parasitar al ser humano y a sus animales domésticos, algunos de ellos poseen un ciclo biológico de un solo huésped y una forma de transmisión sencilla, mientras que otros presentan un complicado ciclo biológico que puede incluir a varios huéspedes, así mismo su tamaño varía extraordinariamente teniendo helmintos desde los 0.3 mm como *Ancylostoma braziliense*, a los 12 metros de longitud para la *Taenia saginata* (Kassai,1998), (Salgado, 2009).

1.1.3 Los Trematodos

Dentro del grupo de los Helmintos encontramos a la clase Trematoda los cuales incluye tres subclases de formas parásitas estrechamente relacionadas, los Digenea, un gran taxón de importancia económica y médica; los Aspidogastrea, un pequeño taxón sin importancia médica ni económica y los Monogenea. Los trematodos de interés en patología humana son los digenéticos, estos precisan dos huéspedes para completar su ciclo vital (Gill y Beeching, 2004).

1.1.4 Subclase digenea

Los digenéticos, se llaman normalmente duelas, son endoparásitos comunes de todos los vertebrados; peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Algunos causan enfermedades en el ganado y en el hombre. Hay más de 11 000 especies de digenéticos (más que todos los demás platelmintos juntos), su desarrollo es indirecto y los ciclos biológicos incluyen por lo menos dos estadios infectivos, de ahí su nombre (dos generaciones).

El primer hospedador intermediario es típicamente un caracol gasterópodo y si hay un segundo hospedador intermediario se trata normalmente de un artrópodo y el hospedador definitivo siempre es un vertebrado (Tay et al., 2002).

1.2 *Fasciola hepatica*

La duela del hígado (*Fasciola hepatica*) es un platelminto digeneo de la clase de los trematodos, caracterizado por su forma lanceolada, con dos ventosas, una bucal y otra ventral y un ciclo biológico de dos hospedadores, un molusco gasterópodo anfibio y un mamífero (Gallego, 2007). Este parásito se localiza en los canales biliares y la vesícula biliar de herbívoros y omnívoros, incluido el hombre; así mismo es el agente causal de una de las parasitosis más difundidas del ganado, la fascioliasis, considerada como una de las enfermedades parasitarias más importantes del mundo de los rumiantes domésticos (Ibarra, 2000). La fasciolosis, conocida también como distomatosis hepática, hígado podrido o mal de botella, es una enfermedad parasitaria debido a la acción y presencia de *Fasciola hepatica*, tremátodo que se aloja en los conductos biliares de ovinos, bovinos, muchas especies domésticas y silvestres, incluyendo al hombre (Nari, 1988). Esta entidad parasitaria es considerada mundialmente como una de las enfermedades más importantes de los rumiantes domésticos (Boray, 1982). En México, su presencia se ha demostrado en 29 estados y su transmisión se da a través de la ingestión de pastura contaminada, la cual lleva la fase larvaria infectante denominada metacercaria, que posteriormente migra al hígado (Nari, 1988).

1.2.1 Importancia Económica

Las pérdidas ocasionadas por este trematodo son cuantiosas y se dividen en directas e indirectas:

Las pérdidas directas se adjudican las muertes de animales y decomiso del hígado cuando estos son sometidos a inspección en el rastro. Es pertinente notar que las ocasionadas por muerte se dan generalmente en ovinos debido a una alta ingestión de metacercarias (Nari, 1988; Cervantes, Cuellar y Silva, 1997).

Las pérdidas indirectas rebasan por mucho a las directas, estas consisten en disminución de peso, anemia progresiva, mala conversión alimenticia (síndrome de desnutrición), resequedad de la piel, mal estado de la carne, mala calidad de la lana, baja producción de leche esto ocurre con la fasciolosis crónica. Así mismo produce infertilidad precoz y los abortos retardan el intervalo entre parto y parto, mal estado físico (caquéctico) como consecuencia bajo desarrollo de las crías ya que retarda el crecimiento del 30% al 50% y mayor susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas y parasitarias (Lapage, 1971; Quiroz, 1986; Nari y Fiel, 1988).

Por otro lado, datos obtenidos en México nos indican que de 36 millones de bovinos, 18 millones están expuestos a la infección por *Fasciola hepatica*, esto es debido al ganado localizado en zonas reconocidas como "fasciolosas". Sin embargo estudios epidemiológicos muestran que alrededor de 5 millones están realmente infectados y si reconocemos que cada animal pierde en su vida productiva 30 kilogramos de carne y a su vez multiplicamos estas pérdidas por \$60 pesos que actualmente cuesta cada kilo, se obtiene una pérdida global de alrededor de \$10,000,000.00. Esto nos indica que se requieren entre 8 y 12 millones de dosis de fasciolicidas por año para tratar de controlar esta parasitosis (Nari y Fiel, 1988).

1.2.2 Morfología de *Fasciola hepatica*

Estado Adulto

La duela del hígado es un trematodo aplanado dorsoventralmente de forma foliácea, ancha anteriormente formando un cono posterior. Su cuerpo está cubierto por pequeñas espinas; posee una ventosa oral en el extremo superior, otra ventral a la altura de los "hombros"; el esófago se bifurca a poca distancia de la ventosa oral, formando ramas primarias y secundarias que se extienden hasta la parte posterior del cuerpo. Su forma adulta mide entre 18-50 mm por 4-14 mm. Es hermafrodita y vive enrollada sobre sí misma en los conductos biliares de los ovinos, porcinos, asnos y humanos donde depositan sus huevos. Cada parásito adulto puede llegar a producir hasta 20,000 huevos al día (Quiroz, 1984; Astrada,1971).

Huevo

Los huevos son depositados en los conductos biliares y tienen dimensiones de 130 - 150 por 63 - 90 micras (μm), poseen un opérculo; su cáscara es relativamente delgada, está teñida por pigmentos biliares de tonos amarillos en su interior, donde numerosas células vitelinas y ahí yace el cigoto de color claro en posición central. Los huevos al ser eliminados con las heces todavía no son maduros (sin embrionar). La maduración se efectúa en el agua entre 9 a 15 días a temperaturas de 22 a 25°C (Astrada, 1971; Dunn, 1983; Soulsby, 1987).

Miracidio

Es una larva ciliada que mide 150 por 40 μm , que eclosiona tras la maduración de los huevos, posee una mancha ocular en forma de X con acción fototrópica pasiva, glándulas y espolón cefálico, éste se dirige hacia la superficie del agua; nada activamente de un lado a otro hasta que encuentra al hospedador intermediario, un caracol pulmonado de agua dulce de la familia *Lymnaeidae* entre las especies que podemos encontrar son; *Limnaea cubensis*, *L. columella*, *L. obrusa*, *Fossaria humilis*, *F. bulimoides*, *F. viatrix* (Georgi, 1990; Cruz, 2004). Penetrándolo a través de la cavidad respiratoria o por el tegumento del pie con ayuda de un botón cefálico, localizándose generalmente en las glándulas digestivas (hepatopáncreas) (Georgi y Marion 1990).

Esporoquistes y redias

Las larvas miracidio que penetran las células epiteliales del caracol pierden su cubierta de cilios y se vuelven esféricos y se transforman en esporoquistes o esporocistos que mide 500 μm dentro del caracol; a las 3 semanas se forma la primera generación de 5 a 10 masas germinativas que se convierten en redias. Pasando una semana más se forma la segunda generación de redias, éstas fuerzan la pared del esporoquiste y continúan creciendo en las glándulas intestinales del caracol; en su pared corporal las redias forman más de 50 masas germinativas, que dan lugar a las cercarías (Astrada, 1971; Georgi y Mario, 1990).

Cercaria

Después de 6 a 8 semanas las cercarías abandonan a las redias a través de su abertura tocológica y al caracol por su aparato respiratorio, las cercarias son larvas libres que nadan activamente en el agua, donde maduran después de abandonar al caracol en grandes cantidades (1 miracidio produce unas 500 a 650 cercarias) (Astrada,1971). Cabe mencionar que la evolución cuantitativa y cualitativa de la descendencia de *Fasciola hepatica* en la formación de redias, está relacionado con el estado de nutrición y edad del caracol, un caracol en óptimas condiciones puede dar origen a una segunda generación de redias, llegando un miracidio a producir hasta 600 cercarias (Quiroz, 1984). Las cercarías liberadas miden de 260 a 320 por 200 a 240 μm y su cola propulsora mide 500 μm de longitud; estas nadan activamente de un lado a otro y después se redondean.

Metacercaria

La metacercaria es la forma infectante para los rumiantes, el hombre y demás animales que sirven de hospedador definitivo, se encuentran enquistadas en la vegetación acuática semi-sumergida que normalmente comen los animales y el hombre. Al ser consumidas llegan al duodeno donde se desenquistan liberando un parásito juvenil que perfora la pared intestinal alojándose en la cavidad peritoneal, posteriormente avanza a la cápsula de glisson, perforándola para llegar al parénquima hepático del cual se alimentan y migran a los conductos biliares donde se desarrollan hasta el estado adulto y se empiezan a reproducir, los huevos salen al exterior con la bilis y materias fecales (Astrada, 1971; Drugueri y Modern, 2002).

1.2.3 Hospederos

Huésped Intermediario

El huésped intermediario de *Fasciola hepatica* se encuentra limitado a caracoles pulmonados del género *Limnaea*. Estos caracoles son anfibios, viven en tierra húmeda o en lugares de agua poco profunda y no estancada.

En condiciones de sequía o frío, tanto el caracol como los estadios intermedios, disminuyen su actividad metabólica pudiendo sobrevivir varios meses para reaparecer cuando las condiciones les resulten favorables. Teniendo en consideración que temperaturas inferiores a los 10° C inhiben la actividad del caracol intermediario. La capacidad de reproducción depende de las condiciones ecológicas y de nutrición, se estima que en condiciones óptimas la producción diaria es de 40 a 60 huevos (DPD.CDC, 2009; Vázquez, 2000).

Hospedadores definitivos

Fasciola hepatica afecta principalmente a bovinos, ovinos y caprinos, pero también puede afectar a otros mamíferos herbívoros y omnívoros, entre los que se encuentran equinos, porcinos, lagomorfos, roedores y el hombre. En su forma juvenil se localiza en el peritoneo parietal derecho y en el parénquima hepático. Una vez que alcanza su madurez se localiza en los conductos biliares. (DPD.CDC, 2009).

1.2.4 Ciclo biológico:

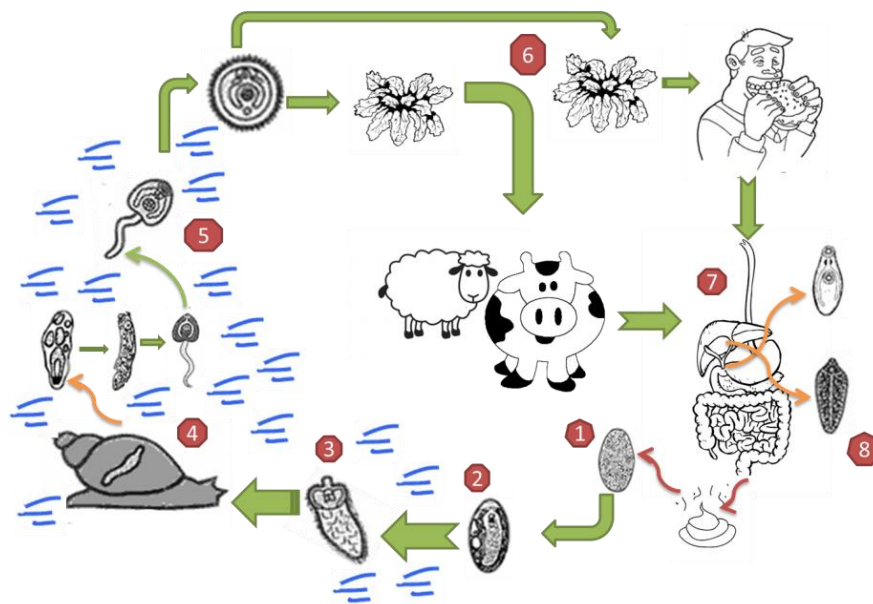


Figura 1. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica* (DPD.CDC, 2009).

- 1.- Los huevos abandonan al hospedador definitivo con las heces.
- 2.- De los huevos eclosionan larvas ciliadas llamadas miracidios.
- 3.- Las larvas miracidio penetran en el hospedador intermediario, un caracol de agua dulce.
- 4.- En el interior del caracol, las larvas miracidio se transforman en esporocistos, que se desarrollan en redias y éstas en cercarias.
- 5.- Las cercarias abandonan el caracol y tras un periodo de vida libre en el agua se enquistan sobre plantas acuáticas, transformándose en metacercarias.
- 6.- Las metacercarias son ingeridas por el ganado o por los humanos, en los hospedadores definitivos se desenquistan en el duodeno (7).
- 8.- Del duodeno pasan a los conductos biliares, donde originan a los adultos que producirán huevos que abandonarán el hospedador cerrando el ciclo. El período prepatente (desde la ingestión, hasta que la *Fasciola hepatica* adulta está en condiciones de poner huevos), es de unas 10 semanas (DPD.CDC, 2009).

1.2.5 Patogenia

La patogenicidad de *Fasciola hepatica* depende en gran medida al número de metacercarias ingeridas, su viabilidad y si es primera o segunda infección, así como el tipo de hésped y su edad. Los ovinos son más susceptibles que los bovinos y los jóvenes siempre mucho más que los adultos al sufrir esta afección. En caso de que los trematodos adultos se encuentren en los conductos biliares, el hígado presenta puntos de abscesos, fibrosis y colangitis hiperplásica y en caso de bovinos es común presentar una calcificación de los conductos biliares (calcifilaxis) y en una presentación más agresiva la lesión característica es una hepatitis traumática (Dunn,1983).

La presencia de *Fasciola hepatica* a nivel hepático inflama la cavidad peritoneal y produce adherencias laxas al diafragma y a los órganos vecinos, la capsula de Glisson se engrosa y presenta microabscesos de color blanquecino, esto aunando de que los conductos biliares se vean dilatados y esclerosados, esto es debido al contacto físico del parásito y que produce sustancias químicas como prolina y cistein proteasas para abrirse paso a través del tejido hepático (Alcalá,2005). El bovino es la única especie que puede rechazar a la fasciola adulta y la inmunidad adquirida es de tipo humoral y de tipo celular (Basso, 1992; Ramírez, 2007).

1.2.6 Signos y síntomas

Existen tres formas en que se presenta la enfermedad: aguda, subaguda y crónica. Dependiendo la época del año y el clima puede haber infestaciones masivas en bovinos y ovinos que luego de dos o tres semanas se puede manifestar en una fasciolosis aguda especialmente en animales jóvenes. Estos síntomas son acompañados de una muerte fulminante, siendo la presentación aguda más común en ovinos y ocasionada por el tránsito sin rumbo de las fasciolas inmaduras por el hígado (Olaechea,1994).

La forma subaguda es aquella donde la infestación dura un largo periodo de tiempo y existen lesiones en el parénquima hepático debido a la presencia de parásitos adultos en los conductos biliares. Se produce la muerte unos meses más tarde a diferencia de la fasciolosis aguda. En cuanto a la infestación crónica muchas veces no existen síntomas ni signos hasta ya muy avanzado el tiempo y ellos son: falta de peso, debilidad general, edema submandibular y palidez de mucosas. En casos de muerte las lesiones y las fasciolas son muy evidentes. Como los signos clínicos de la Distomatosis son inespecíficos se necesita la confirmación del laboratorio o a través de una necropsia para arribar a un diagnóstico definitivo (Drugueri y Modern, 2002).

1.2.7 Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico es difícil ya que comparte signos con otras enfermedades como las parasitosis gastrointestinales, paratuberculosis, salmonelosis inicial entre otras y en general los síntomas aparecen en los casos crónicos. En casos de muerte las lesiones y las fasciolas son muy evidentes, aunque en infestación temprana es difícil encontrar la fasciolas jóvenes, siendo de ayuda para el diagnóstico la información epidemiológica y el conocimiento de la existencia del caracol intermediario (Contreras, 1974). El diagnóstico de laboratorio más usado es la detección de huevos en materia fecal. Siendo las técnicas de flotación, sedimentación o filtrado las más utilizadas (Quiroz, 2003). Las pruebas inmunológicas se usan en humanos y en trabajos experimentales y son entre otras la fijación de complemento, Inmuno electrotransferencia y realización de ELISA. Mientras que en sangre se buscan enzimas liberadas por el daño de los hepatocitos, la glutamato-oxalaacetato amino-transferasa (GOT). Más tarde aparece la gama-glutamyl transferasa (GGT) por los daños de los conductos biliares. La caída del hematocrito y de la albúmina suele ser evidente así como el aumento de los eosinófilos (Blood, 2002).

1.2.8 Control químico contra *Fasciola hepatica*.

El control de la fasciolosis se realiza habitualmente mediante el uso de fasciolicidas los cuales son costosos y cada vez menos eficaces en virtud del uso indiscriminado y equívoco que se hace de ellos, generando como consecuencia serios problemas de resistencia que día con día disminuyen aún más su eficiencia. Durante décadas se han utilizado diversos compuestos químicos llamados fasciolicidas, mismos que pertenecen a los siguientes grupos químicos:

Grupos químicos a que pertenecen los Fasciolicidas

1. Hidrocarbonados halogenados: tetracloruro de carbono, hexacloroetano.
2. Compuestos nitrofenólicos y aminas aromáticas: disofenol, nitroxinil, niclofolan, hexaclorofeno, bitionol y diamfenetide.
3. Salicilanilidas: oxiclozanida, brotianide, rafoxanide, closantel y bromosalan.

4. Bencimidazoles o pro-bencimidazoles: albendazol, netobimim, triclabendazol.
5. Sulfonamidas: clorsulón (Ibarra et al., 1997).

(La mayoría de estas sustancias están probadas para su uso en ovinos y bovinos).

El último fasciolicida lanzado al mercado fue el triclabendazol, que es un derivado del bencimidazol, y ha sido usado rutinariamente desde 1983 cuando hizo su aparición en el mercado internacional (Keiser et al., 2005; Fairweather, 1999). Sin embargo hasta el momento no ha habido el lanzamiento de un nuevo compuesto fasciolicida ya que, como es sabido, el producir un nuevo compuesto químico cuesta millones de dólares y la Industria Farmacéutica difícilmente invierte tales cantidades en fármacos que se desconoce si a la mitad del camino de la investigación, resulta ser carcinogénico, teratogénico o muy caro, por lo que no sería rentable. Con base en lo descrito anteriormente se puede inferir que existe un serio escepticismo en invertir dinero en el descubrimiento y desarrollo no sólo de fasciolicidas sino de antiparasitarios en general y esto puede conducir a que en un futuro los parásitos vayan desarrollando mayor resistencia a los fármacos existentes por lo que se manifiesta necesario visualizar e investigar nuevas alternativas tendientes a lograr un eficiente control de la fasciolosis.

1.2.9 ¿qué se necesita para controlar a *Fasciola hepatica* en el ganado?

Aunado a los tratamientos, se necesitan diseñar programas de control eficiente; utilizando la información epidemiológica local, siendo el objetivo disminuir la oferta de infección a animales susceptibles, en donde la prevención y el proteger a los animales más jóvenes es la clave para controlar a esta parasitosis.

También es importante conocer el historial en el uso de antiparasitarios, fechas de tratamiento, topografía, tipo de pasturas y potreros, carga animal, rotaciones, etc.,. Concluyendo que: un control eficiente debe estar basado en la acción sobre los tres componentes del ciclo de *Fasciola hepatica*:

- Control sobre el parásito en el animal mediante el uso estratégico de fasciolicidas (Herrera, 1991).

- Control de los estadios libres mediante manejo del ganado.- Esta estrategia se basa en restringir áreas de pastoreo a los animales susceptibles mediante el uso de buenos alambrados y rotación de pastoreo durante épocas críticas (Olaechea, 1994).

- Control de los hospederos intermediarios.- Se trata de controlar o disminuir la población de caracoles mediante el uso de molusquicidas (Entrecasso, 2003). Aquí es importante mencionar que se pueden usar químicos como el sulfato de cobre o la N-tritil morfolina en épocas de actividad del caracol. El control biológico es difícil pero hay avances en este campo por competidores de *Lymnaea* (Olaechea, 1994).

1.3 Las plantas

Las plantas constituyen una importante fuente de alimento y recurso para muchos animales. Las diversas características defensivas de las plantas son producto de la evolución en respuesta a sus distintos depredadores, los cuales tienden a ser especialistas y han logrado superar sus defensas para así poder alimentarse de ellas. Existen varios mecanismos por los cuales las plantas disminuyen el ataque de depredadores, estos mecanismos químicos, son a base de metabolitos secundarios (saben de forma desagradable, inhiben la ingestión o la asimilación, son venenosos, o pegajosos) (Ramos et al., 1998).

1.3.1 La etnobotánica

Es una disciplina científica, que estudia e interpreta la historia de las plantas en las sociedades antiguas y actuales. Lo más destacable de esta ciencia, es su dedicación a la recuperación y estudio del conocimiento que las sociedades, etnias y culturas de todo el mundo han tenido y tienen, sobre las propiedades de las plantas y su utilización en todos los ámbitos de la vida (Barrera, 1983).

1.3.2 Plantas en México

México es el cuarto lugar a nivel mundial en diversidad florística con más de 25.000 especies registradas, de las 250.000 que existen a nivel mundial y se calcula que hay más de 30.000 aún no descritas dentro del territorio nacional, la superficie forestal del país comprende 73.3% de su territorio, así mismo existen más de 6.000 especies de plantas medicinales registradas hasta el momento.

Aunado a lo anterior se encuentra la valiosa cultura médica popular, resguardada durante siglos por los curanderos, quienes tienen el conocimiento y la experiencia en el uso medicinal de los recursos vegetales, hecho que ha permitido procurar la salud de gran parte de la población nacional (Rzedowski, 1978; Sánchez, 1984).

1.3.3 Plantas medicinales

Una planta medicinal es un recurso, cuya parte o extractos se emplean como drogas en el tratamiento de alguna afección. La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de droga vegetal y puede suministrarse bajo diferentes formas (Rodríguez et al., 2004; Díaz, 1976).

1.3.4 Importancia de las plantas medicinales

Aún en la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna ha analizado y estudiado los efectos terapéuticos de las plantas, para formar grupos con las plantas de efectos similares y así conocer los principios activos responsables de aliviar o curar ciertas enfermedades (Rodríguez, 2004). Un análisis de esta naturaleza debe ser realizado como una acción multidisciplinaria con la intervención de botánicos, químicos, farmacólogos, farmacognostas, entre otros (Borrego, 1994). Actualmente las plantas medicinales no han perdido el interés ya que entre el 15 y 20% de los medicamentos actuales contienen principios derivados de plantas y entre 2 al 5% de las personas utilizan extractos crudos de las plantas para curar sus dolencias. Es conveniente comentar que si el extracto crudo posee el efecto farmacológico, podría parecer contradictorio el hecho de tener que aislar el principio activo que contiene pero ello es justificado si consideramos que:

- La ingestión oral de extracto puede tener, en algunos casos, menos efectos que la aplicación intramuscular del principio activo aislado.
- Debe conocerse la pureza y concentración de la droga al administrarse, lo que no será posible al utilizarse directamente como extracto.
- La concentración del principio activo en las plantas es pequeña (generalmente 0,1-2,0% en la planta; en otros casos menor que 0,01%).

- El aislamiento y conocimiento estructural de compuestos de plantas, podría dar a lugar a diseñar reacciones para producir derivados semi-sintéticos. Por lo tanto es de gran importancia aislar los principios activos de las plantas, y su localización en las diferentes partes de las mismas, o en los diferentes extractos, debe ser motivo de ensayos biológicos adecuados (Lock, 1997).

1.3.5 Mercado Actual de Plantas medicinales en México

Estudios realizados por (Betancourt y Gutiérrez, 1999) reportan que de manera cotidiana se comercializan frescas y deshidratadas cerca de 250 especies provenientes principalmente de las zonas centro y sur del país. La recolección y venta de plantas medicinales en México comparte características socioeconómicas, culturales y ambientales con lo que sucede en otros países latinoamericanos:

- Patrones de consumo de acuerdo con la farmacoterapia dominante.
- Consumo no industrial del recurso principalmente en comunidades rurales e indígenas.
- Excesivo intermediarismo en la comercialización de las plantas medicinales y sus productos derivados.
- Más del 90% de las plantas medicinales que se consumen provienen de poblaciones silvestres sin algún tipo de manejo sustentable.
- Los principales actores sociales que intervienen en la cadena de comercialización son: el recolector, el acopiador local, el acopiador regional, el mayorista y el detallista.
- La recolección excesiva de algunas especies con alta demanda comercial ha provocado una fuerte disminución de sus poblaciones llegando incluso a considerarse como amenazadas y en peligro de extinción.
- Se carece de un programa nacional de plantas medicinales que integre efectivamente los distintos aspectos relacionados con estos recursos: etnobotánica, botánica, ecología, fitoquímica, farmacología, toxicología, cultivo, procesamiento, control de calidad, establecimiento de microempresas, comercialización y promoción.

- Incremento en la adulteración o sustitución de plantas completas o de sus partes así como de sus productos fitofarmacéuticos.

Actualmente solo existen 15 empresas importantes, vinculadas con el mercado herbolario, del país. Aunando esto el consumo de plantas medicinales en comunidades indígenas y personas de niveles socioeconómicos bajos se ha mantenido a pesar de persecuciones, hostigamientos, prohibiciones y desinterés de los distintos niveles de gobierno. Actualmente a las empresas extranjeras les interesa adquirir de nuestro país la materia prima vegetal poniendo obstáculos para la introducción de productos herbolarios mexicanos. Los países que tienen registrados actualmente como demandantes de materias primas y extractos de plantas medicinales nacionales son: Alemania, Estados Unidos (mercado hispano), España, Alemania, Francia, Japón, Holanda, Suiza, Italia (Gutiérrez et al., 2004).

1.3.6 La Fitoquímica

La Fitoquímica es una disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales.

Las plantas producen una diversidad de sustancias, producto del metabolismo secundario, algunas responsables de la coloración y aromas de flores y frutos, otras vinculadas con interacciones ecológicas, como es el caso de la atracción de polinizadores. Actualmente, se ha demostrado la mayoría de ellos participan en el mecanismo de defensa de las plantas. La fitoquímica permite aislar e identificar los principios activos de numerosas plantas con importante actividad biológica, tal es el caso de las plantas medicinales (Lock, 1997).

1.3.7 Toxicidad en plantas

Se entiende por "toxicidad" a la cantidad de una sustancia que, bajo un conjunto específico de condiciones, causa efectos detrimentales.

La toxicidad indica la potencia de una sustancia venenosa y no la afección producida por ésta. La toxicidad se expresa como la cantidad de la sustancia en mg/kg de peso vivo que origina efectos biológicos determinados, en un tiempo dado y en una especie

establecida. Existen diversos indicadores de toxicidad, siendo uno de los más usados la "dosis letal 50" (LD50); este es un indicador estadístico de toxicidad aguda, el cual señala la cantidad del tóxico que causa la muerte del 50% de los animales intoxicados (Peña, 2009; Ellen, 2000).

Metabolitos secundarios

Las plantas producen compuestos primarios importantes para su metabolismo. También producen compuestos secundarios que le sirven para atraer polinizadores, ahuyentar o matar parásitos y prevenir enfermedades infecciosas. Cada familia de plantas utiliza precursores químicos comunes originando diferentes resultados, ayudándolas a sobrevivir en el medio. Cabe mencionar que por muchos años los metabolitos secundarios de las plantas fueron desconocidos o menospreciados como productos finales de procesos metabólicos, sin función específica o directamente como productos de desecho de las plantas. El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, que estaban interesados en estas sustancias descubriendo su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, cosméticos y otros materiales utilizados en la industria agrícola actual. Actualmente se sabe que un gran porcentaje de los principios activos medicinales de plantas está comprendido dentro de los metabolitos secundarios, estos son utilizados por casi un 80% de la población mundial y así mismo se han identificado más de 10.000 productos químicos que intervienen en la defensa de las plantas, así mismo estas son materia prima para la elaboración, de casi el 45 % de los productos farmacéuticos del mundo. Sin embargo apenas el 1 % de las especies de las selvas han sido estudiadas con este fin, por ende se necesitan más estudios (Lock, 1997).

1.3.8 Principales metabolitos secundarios en la plantas

-Terpenoides.- Todos los terpenoides, tanto los que participan en el metabolismo primario como los más de 25.000 metabolitos secundarios, son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato o "5-carbono isopentenil difosfato") que se forman en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante, están distribuidos ampliamente en las plantas y

2. ANTECEDENTES

En México, la investigación de las plantas medicinales ha venido desarrollándose con altibajos y con profundas contradicciones conceptuales entre los grupos que se han formado.

En la primera mitad del siglo XX, el modelo científico estuvo exclusivamente basado en los principios conceptuales que desarrollaron las poderosas industrias químico-farmacéuticas extranjeras, al saber: que las plantas medicinales son recursos naturales de los cuales se obtiene la materia prima y que a partir de la cual se aísla un principio activo medicinal que a su vez sintetizado químicamente permite el desarrollo de un nuevo medicamento; esta visión propicio durante mucho tiempo, la idea de que en México no se cuenta con los recursos técnicos y económicos suficientes para competir con los grandes consorcios farmacéuticos extranjeros, para el desarrollo de nuevos medicamentos (Lozoya, 1994).

En los últimos años se cuentan ya con procedimientos modernos, el estudio de las plantas medicinales ha recibido gran impulso, tratando de aislar extractos metabólicos, así como sustancias activas con potencial farmacéutico (Martínez, 1989). Ejemplo de ello son los estudios realizados por (Kubo et al., 1992; Kubo y Chaudhuri 1993) con la planta medicinal *Castela tortuosa*. Estos estudios han guiado al aislamiento de un grupo de sustancias conocidas como cuasinoides (chaparramarina, chaparrinona y castelalina) que han demostrado tener diversa actividad biológica, como un inhibidor del crecimiento en plagas de insectos o como tratamiento en enfermedades diarreicas. La estructura de estas sustancias ha sido establecida por medio de métodos espectroscópicos (Kubo et al., 1992; Kubo y Chaudhuri 1993).

Otro ejemplo, son las investigaciones realizadas por (Long-Ze et al., 2007) a partir de *Lippia graveolens*; quienes han cuantificado veintitrés tipos de flavonoides diferentes (galangina, metilgalangina, pinocebrina, naringenina, floretina) de todas las estructuras de la planta y especialmente de las hojas, estas sustancias han mostrado tener propiedades analgésicas, antiinflamatoria, antipirética, antiparasitarias, además de poseer grandes beneficios nutricionales.

Por otro lado, (Yu et al., 1988) identificó veintiuno tipos de flavonoides en *Gymnosperma glutinosum*, estas sustancias han revelado tener propiedades antiparasitarias, pero también contienen componentes tóxicos para el ganado que lo consume, (Canales et al., 2007) también han encontrado actividad antibacterial y antifúngica de estas sustancias. Así mismo se están probando extractos de plantas para otros parásitos. (Nik et al., 1999) y su grupo estudiaron la actividad anti-malaria con distintos extractos clorofórmicos y metanólicos de *Piper sarmentosum*, *Andrographis paniculata* y *Tinospora crispa* encontrándose que inhibe el crecimiento en el modelo *in vitro* con dosis de 0.05 y 2-5 mg/ml a las 24 y 48 horas post tratamiento. (Abdel-Ghaffar et al., 2011) trabajaron con distintos extractos clorofórmicos y acuosos de coco, cebolla, ajo, entre otros y probaron su actividad antihelmítica con modelos *in vitro* de *Hymenolepis diminuta*, *H. microstoma*, *Taenia taeniaeformis* y *Fasciola hepatica*, *Echinostoma caproni*, mostrando resultados alentadores. También (Ferreira et al., 2011) probaron el efecto trematocida con extractos etanólicos de *Artemisia annua*, *Asimina triloba* y *Artemisia absinthium* en modelos *in vitro* de *Fasciola hepatica* y *Echinostoma caproni* mostrando mortalidad a dosis de 2 mg/ml y 0.2mg/ml a las 20 a 48 horas en ambos modelos, al realizar cromatografía de papel se encontró que todas las plantas poseen compuestos similares siendo estos los presuntos responsables de dicha actividad trematocida. (Egualea et al., 2011) mostraron que extractos crudos de varias plantas medicinales (*Senna occidentalis*, *Leonotis ocymifolia*, *Leucas martinicensis*, *Rumex abyssinicus* y *Albizia schimperiana*) inhibió el desarrollo de huevos y larvas del nemátodo *Haemonchus contortus* en un modelo *in vitro* utilizando concentraciones de 0.11 mg/ml hasta 50 mg/ml dependiendo la planta y tipo de extracto (alcohólico o acuoso).

Estos y más estudios demuestran que el uso de diversas plantas medicinales, es un campo de investigación promisorio y que a futuro podría establecer las bases en el control de muchos parásitos que afectan a la industria ganadera mexicana o mundial. Por lo anterior señalado, el uso de plantas medicinales y/o sus metabolitos, representa una interesante alternativa para investigar mediante diversas

metodologías la actividad anti-*Fasciola hepatica* de estos productos como una alternativa para disminuir la contaminación química del medio ambiente, alteración de la ecología así como problemas de resistencia a los fasciolicidas condicionado por el uso inadecuado de estos.

3. JUSTIFICACIÓN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial debida a la acción del trematodo del hígado *Fasciola hepatica*, el cual afecta principalmente a los bovinos y ovinos así como a otras especies animales incluyendo al hombre.

Su importancia radica en las cuantiosas pérdidas económicas que produce a la industria pecuaria, las cuales se pueden reducir a través del tratamiento químico del ganado.

A través de las décadas se ha tratado de mejorar las metodologías diagnósticas y se ha impulsado la producción de fármacos más eficaces que los ya existentes con la idea a obtener un control integral de esta trematodosis.

Sin embargo los parásitos, tarde o temprano desarrollan resistencia a estos fármacos, por lo que se debe de investigar métodos alternativos de control. Uno de estas alternativas es el estudio de las sustancias activas de varias plantas con características antihelmínticas (Borgsteede et al., 1998; Díaz, 2000).

4. HIPÓTESIS

Si en la naturaleza las plantas se defienden de insectos, parásitos u otros organismos produciendo sustancias toxicas, entonces se puede afirmar que los extractos obtenidos a partir de algunas plantas mexicanas utilizadas en la medicina tradicional, tienen efecto antihelmíntico superior al 80% contra los estadios juveniles y adultos de *Fasciola hepatica* aplicándolo en el modelo *in vitro*.

5. OBJETIVO

Determinar, evaluar y elucidar el efecto anti-*Fasciola hepatica in vitro* utilizando extractos de algunas plantas mexicanas con actividad antiparasitaria.

5.1 Objetivos Particulares.

- De acuerdo a estudios etnobotánicos determinar las mejores opciones de plantas medicinales que pudieran tener un efecto antiparasitario contra *Fasciola hepatica*
- Preparar extractos crudos de las fracciones de hexano, acetato de etilo y metanol de acuerdo a la diferente polaridad a partir de las hojas, tallo y flor, de las plantas seleccionadas
- Evaluar *in vitro* las 3 fracciones de extractos obtenidas contra estadios inmaduros de *Fasciola hepatica*.
- Determinar la dosis mínima letal de los extractos que muestren actividad fasciolicida
- Evaluar la toxicidad de los mejores extractos fasciolicidas en ratones CD1 por medio de histopatología.
- Aislar y elucidar las principales fracciones del extracto vegetal más efectivo en el modelo *in vitro* con ayuda de cromatografía de columna y que a su vez este extracto no resulte ser tóxico.
- Evaluar *in vitro* las fracciones obtenidas de la mejor planta y elucidar cual es el compuesto activo contra *Fasciola hepatica* de dicha planta.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Plantas a estudiar.

A nivel de educación popular no formal, uno de los principales problemas al que nos enfrentamos cuando estudiamos las plantas medicinales son los diferentes nombres que tiene la misma planta en las regiones y países, para ellos existe los estudios etnobotánicos y con ellos podemos encontrar la especie de la planta y sus nombres comunes, así como sus usos, formas y partes utilizadas de las mismas para preparar los remedios o productos galénicos (Columba, 2007). Basándonos en estudios etnobotánicos encontramos diferentes plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana contra disentería, vomito, vermífugo, nauseas, mala absorción, diarrea, empachos, digestivos. Todas ellas se encuentran en las cercanías de Morelos y Puebla: (Columba, 2007; Rodríguez et al., 2009)

***Buddleja cordata* (Tepozán)**

***Cordia elaeagnoides* (Cordia)**

***Mentha piperita* (Mentha)**

***Aloysia gratissima* (Hierba blanca)**

***Ipomoea purga* (Hoja Xalapa)**

***Thymus vulgaris* (Tomillo)**

***Ruta graveolens* (Ruda)**

***Achillea millefolium* (Plumajillo)**

***Lippia graveolens* (Orégano)**

***Gymnosperma glutinosum* (Popote)**

***Argemone ochroleuca* (Espinillo)**

***Artemisia absinthium* (Estafiate)**

***Justicia spicigera* (Muicle)**

Populus alba (Álamo)

Chenopodium graveolens (Epazote de Zorrillo)

Limpia critriodora (Cedrón)

Artemisia absinthium (Ajenjo)

Ageratum houstonianum (Semilla de Zopilote)

Jacquinia macrocarpia (Palo Santo)

Castela tortuosa (Chaparro Amargo)

Tabla 1. Plantas medicinales utilizadas.

6.2 Colecta del material vegetal.

Las plantas fueron colectadas en los alrededores del pueblo de Zapotitlán Salinas Puebla y del Estado de Morelos, el material vegetal se recolecto manualmente por desgajamiento. Posteriormente la corteza se secó a la sombra en hojas de papel periódico, para después procesarla en un molino manual y almacenar la corteza molida en costales. También se colectaron algunos ejemplares herborizados para su depósito e identificación en el herbario IZTA de la FES-Iztacala de la UNAM.



Figura 3. Tratamiento de las plantas.

6.3 Elaboración de extractos.

Los extractos fueron obtenidos en el laboratorio de Fitoquímica de la UBIPRO de la Fes-Iztacala. Las partes de las plantas (hojas, flores y tallo) fueron extraídos con disolventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol), con ayuda de un rotavapor se realizaron 3 destilaciones por cada fracción cada 3-4 días dependiendo la planta. Los extractos fueron concentrados en frascos para su posterior evaluación, teniendo 3 extractos para cada planta a estudiar (Ávila et al., 1993; Ávila y et al., 2005; Yu et al., 1988).



Figura 4. Obtención de extractos

6.4 Evaluación *in vitro* de extractos crudos contra *Fasciola hepatica*.

Estas evaluaciones se realizaron en el laboratorio de Quimioterapia Experimental del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

a) Preparación de las muestras vegetales.-

Se utilizaron 0.0125 gramos de extracto vegetal, se depositaron en tubos eppendorf y se solubilizaron en 50 μ l de solvente (metanol, hexano, acetato de etilo) o DMSO dependiendo de cada extracto, unas vez solubilizados se prepararon las correspondientes diluciones con la finalidad de obtener las concentraciones requeridas para las distintas evaluaciones llevadas a cabo en el modelo *in vitro* de *Fasciola hepatica* (0.500mg/ml, 0.250 mg/ml, 0.125 mg/ml y 60mg/ml) (Munguía, 2009).

b) Operación de ensayo para escrutinio.-

Se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos marca Nunc. Por cada pozo se depositaron 1.6 ml de medio completo + 0.2 ml del extracto solubilizado + 0.2 ml conteniendo 10 fasciolas por pozo, mismas que fueron desenquistadas artificialmente tal y se ha descrito (Rivera et al., 2005). Inicialmente los extractos se probaron a concentraciones de 0.500mg/ml.



Figura 5. Ensayo por escrutinio

c) Repeticiones.-

Los extractos que mostraron actividad a concentración de 0.500mg/ml fueron evaluados de nuevo en las diluciones antes mencionadas para determinar la concentración mínima letal.

Cada extracto se evaluó por duplicado así mismo se contó con 4 pozos como testigo los cuales contenían únicamente fasciolas y 50µl de solvente, cada ensayo se mantuvo en período de incubación por 4 días a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%, para corroborar que el experimento estuviera bien realizado (Ibarra,1997).

d) Procedimiento para el desquistamiento de metacercarias de *Fasciola hepatica*:

1. Mantener las metacercarias a 4°C.
2. Limpiar con alcohol al 70% la campana de extracción.
3. Prender la campana una hora antes de las labores.
4. Colocar las metacercarias a temperatura ambiente por 30 minutos antes.
5. Separarlas del papel polietileno con cuidado.
6. Realizar el medio de activación: 0.040 g de ditionato de sodio + 10 ml. De agua destilada.
7. Agitar en vortex hasta que se disuelva
8. Colocar las metacercarias con cuidado.
9. Aplicar gas CO₂ por tres minutos, burbujeando el tubo.
10. Incubar una hora y media a 37°C.
11. Pasando este tiempo se realizaron dos lavados con 20 ml de agua destilada cada uno a 37°C.
12. Se prepara el medio de emergencia: 4.5 ml de solución de Hank's + 0.5 ml de bilis de bovino = 5 ml de volumen total, a temperatura de 37°C .
13. Colocar en el medio de emergencia a las metacercarias e incubarlas por 2.5 horas a 37° en de 5 % de CO₂

14. Pasando las 2.5 horas de incubación el líquido se vierte en una caja petri y se le añade el medio nutritivo RMPI con suero bovino a una concentración de 1/1.

15. En cada pozo de la placa de cultivo se depositaran 10 fasciolas recién desenquistadas con el compuesto a probar.

Esta metodología *in vitro* fue de acuerdo a lo realizado por (Ibarra, 1984) y modificada por (Rivera et al., 2004).

e) Interpretación de la prueba.-

Las fasciolas fueron examinadas cuidadosamente en los días 1, 2 y 3 utilizando un microscopio invertido, la actividad de los extractos fue medida por comparación de la sobrevivencia de las fasciolas bajo tratamiento con relación a las fasciolas testigo no tratadas. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en condiciones asépticas utilizando una campana de flujo laminar (Vercruysse et al., 2001).



Figura 6. Placas con tratamientos

f) Interpretación de la prueba Análisis estadístico.-

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar diferencias de eficacia entre dosis, tiempo y grupos de los extractos evaluados. Se utilizó la prueba de F de Fisher y la función Probit. (Peña y et al., 2001; Ellen, 2000).

6.5 Evaluación de la Toxicidad

a) Evaluación de la Toxicidad Aguda en Ratones CD1.-

La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia (Tabla 2). Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales (Ellen, 2000). Para este ensayo se realizaron grupos de 3 y 5 ratones machos CD1 de entre 10 a 12 semanas de edad, a los cuales se les administró de manera oral una única dosis con cánula; una suspensión del extracto a probar + 2-5 μ l alcohol absoluto para disolver el extracto + 995-998 μ l de metil celulosa como vehículo. Siendo observados diariamente durante 20 días posteriores a la administración notando su apetito, pelaje, actividad motriz, mucosas, así mismo se tuvo al grupo testigo conformado con 6 animales (alcohol absoluto + metil celulosa).

Las dosis utilizadas (Tabla 2) fueron de 5mg/kg, 50mg/kg, 500mg/kg y 5000mg/kg. 20 días después del tratamiento los animales fueron sacrificados y se realizó histopatología en hígado y riñón para descartar efectos colaterales tóxicos, ya que ningún animal tratado murió ni aún en la dosis más alta (Sanchana y Hargreaves 2007).

TOXICIDAD SUSTANCIA	DOSIS TOXICA
Extrema	≤ 1 mg/kg
Alta	1-50 mg/kg
Moderada	50-500 mg/kg
Leve	0.5 - 5 g/kg
Inocua	> 5 g/kg

Tabla 2. Tipos de toxicidad

6.6 Recuperación de fracciones del mejor extracto en el modelo *in vitro*

Cromatografía de columna.-

Se utilizó para la separación de los compuestos y purificación del mejor extracto. Como fase estacionaria se usó gel de sílice y los disolventes elegidos fueron hexano y dicloro-metano para realizar las posteriores mezclas. Cada 250 ml de líquido se recuperaba y se destilaba. Se realizaron constantemente cromatografías de papel para ir juntando las fracciones iguales, obteniendo al final 18 fracciones las cuales se probaron nuevamente en el modelo *in vitro*.

6.7 Evaluación *in vitro* de las fracciones obtenidas.

Nuevamente se realizaron las evaluaciones en el modelo *in vitro* con fasciolas recién desenquistadas, pero únicamente se utilizó la concentración de 0.500mg/ml ya que no se contaba con mucha cantidad de extracto hexánico de *Achillea millefolium* (plumajillo). Las fracciones activas fueron nuevamente sometidas a una cromatografía de columna, para una mayor purificación.

7. RESULTADOS.

7.1 Plantas medicinales utilizadas.

De acuerdo a estudios etnobotánicos realizados por Columba y colaboradores acerca de plantas medicinales los estados de Morelos y Puebla se seleccionaron algunas plantas que fueran anteriormente utilizadas en la medicina tradicional mexicana contra disentería, vómito, vermífugo, náuseas, mala absorción, diarrea, empachos, digestivos etc., en la tabla 3 se observan las plantas utilizadas con su nombre científico, nombre común, lugar de recolección, usos en la medicina tradicional y parte usada de la planta para realizar los extractos correspondientes.

<i>Nombre</i>	Nombre común	Usos en etnobotánica	Parte utilizada	recolección
<i>Buddleja cordata</i>	Tepozán	Problemas dermatológicos heridas e inflamación de la piel. trastornos digestivos, úlceras, dolor garganta y diurético.	Hoja y tallo	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Cordia elaeagnoides</i>	Cueramo	Úlceras, tos, picaduras de alacrán, diarrea, infecciones intestinales y reumas	Hoja y tallo	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Mentha piperita</i>	Menta	Analgésico, antiséptico, colerético, antiespasmódico, antihelmíntico y antiparasitario	Hoja y tallo	Cuernava Morelos
<i>Hedeoma piperitum Benth</i>	Hierba blanca	Gingivitis, diarrea, disentería blanca, lombrices y amibas	parásitos, Hoja y tallo	Cuernavaca Morelos
<i>Portlandia ghiesbreghtiana Baillon</i>	Hola Jalapa	de Parásitos intestinales	Hoja y tallo	Cuernavaca Morelos
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	Afecciones gastrointestinales, vermífugo, Desinfectante, expectorante,	Hoja, flor y tallo	Cuernavaca Morelos
<i>Ruta chalepensis</i>	Ruda	Dolor de muela, diarrea, lombrices, amibas, empachos, amibas, solor estómago, estreñimiento.	Hoja, flor y tallo	Cuernavaca Morelos
<i>Achillea millefolium</i>	Plumajillo	Antiespasmódica, Antiinflamatorias, digestiva, carminativa, colerética, antirreumáticas,	astringente, Hoja, flor y tallo	Cuernavaca Morelos
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	Tos, catarro y la bronquitis, estomacales, diarrea y para la digestión.	expectorante. cólicos Hoja y tallo	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Gymnosperma glutinosum</i>	Popote	Reumatismo, fiebre, diarrea, fiebre diurético, antipalúdico, digitálico y antiséptico.	amarilla, Hoja, flor y tallo	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Argemone ochroleuca</i>	Espinillo	Sarna, verrugas, mal de bilis, dolor de cabeza, reumas, antiespasmódico y narcótico.	Hoja, flor y tallo	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Artemisia mexicana</i>	Estafiate	cicatrizante, dismenorrea, bronquitis, vómitos, antiséptico.	desparasitante, Hoja y tallo	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Justicia spicigera</i>	Muicle	Contra diarrea y disentería. En respiratorias, dolores de cabeza y de riñón	afecciones Hoja y tallo	Cuernavaca Morelos
<i>Populus alba</i>	Álamo	Afecciones urinarias, Ciática, problemas digestivos, Analgésico, antiinflamatorio, cicatrizante, diurético, vermífugo.	astringente, Hoja y tallo	Cuernavaca Morelos

<i>Nombre</i>	Nombre común	Usos en etnobotánica	Parte utilizada	recolección
<i>Chenopodium graveolens</i>	Epazote de zorrillo	antihelmínticas, diarrea, amibiasis, disentería, empachos, indigestión	Hoja y tallo	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Limpia critriodora</i>	Cedrón	Digestivo, dispepsias Dolores menstruales alteraciones nerviosas	y Hoja y tallo	Cuernavaca Morelos
<i>Artemisia absinthium</i>	Ajenjo	acción protectora sobre el hígado y mal de vesícula, antiespásmica, desparasitante y diurético.	Hoja y tallo	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Swietenia humilis</i>	Semilla de zopilote	Expulsar parásitos, indigestión, mal de bilis, vermífugo.	Hoja y tallo	Cuernavaca Morelos
<i>Jacquinia macrocarpia</i>	Palo santo	Expulsar parásitos, diarrea, cólicos, disentería, tos y asma.	Hoja y tallo	Cuernavaca Morelos
<i>Castela tortuosa</i>	Chaparro amargo	Antiparasitario intestinal , Disenterías, diarreas crónicas sensibilidad en la región hepática.	Hoja y tallo	Zapotitlán Salinas Puebla

Tabla 3. Características de las plantas utilizadas.

7.2 Preparación de extractos a utilizar.

Se obtuvieron 3 fracciones crudas de cada planta de distintas polaridad, de esta forma se obtuvieron aproximadamente 60 extractos, los cuales fueron almacenados en frascos para su posterior evaluación en el modelo *in vitro*, en la figura 7 se explica la metodología llevada a cabo.

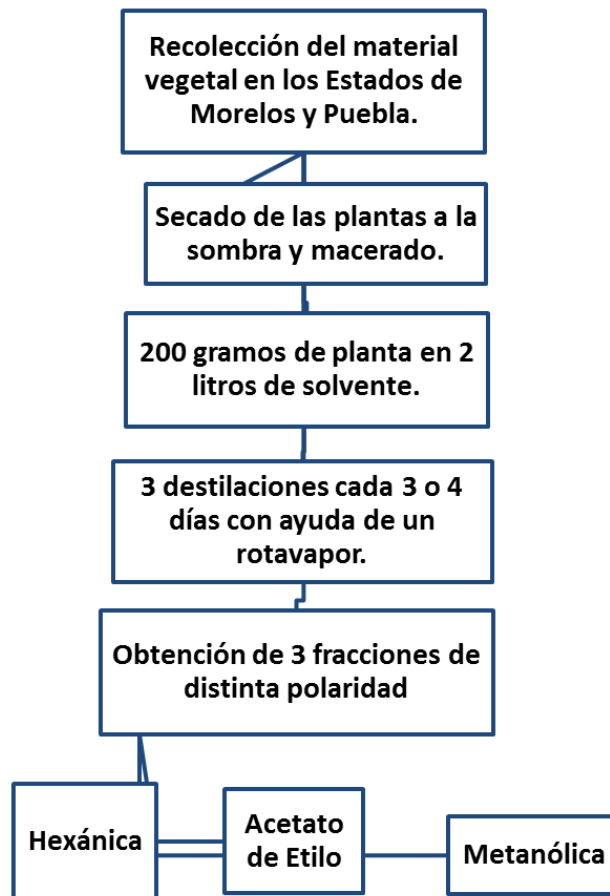


Figura 7. Metodología de extracción.

7.3 Primera evaluación *in vitro* con el modelo de *Fasciola hepatica*.

De acuerdo al método ya establecido de desenquistamiento y evaluación de nuevos compuestos *in vitro* se procedió a evaluar cada extracto obtenido, realizando de 3 a 6 repeticiones dependiendo la eficacia observada, cada 24 horas se revisaron las placas y anotaron observaciones durante los siguientes 3 días (Figura 9), anotando cuantas fasciolas vivas y fasciolas muertas había en cada pozo en la figura 8 se observa la diferencia entre ambas. La primera concentración utilizada fue de 500mg/L o 0.500mg/ml y siempre se contó con 4 pozos testigos en cada placa.

En la tabla 4 se muestran todas las plantas que resultaron tener actividad fasciolocida, es interesante mencionar que las plantas que tuvieron efecto fasciolocida fue únicamente su fracción hexánica, menos *Castela tortuosa* (chaparro amargo) en el cual sus tres fracciones obtuvieron efecto.



Figura 8. Fasciolas en el modelo *in vitro*

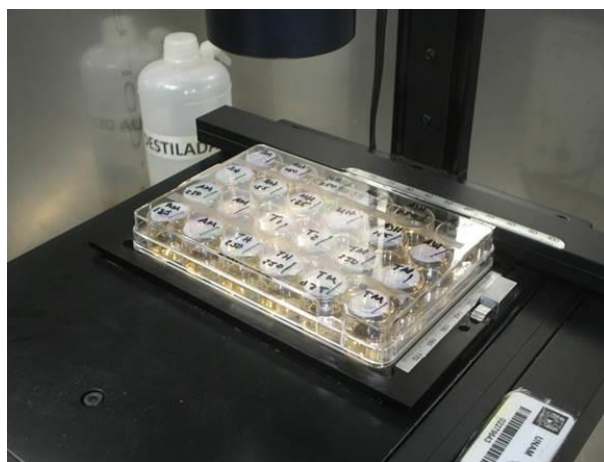


Figura 9 Caja de 24 pozos

Castela tortuosa (Chaparro amargo)

Achillea millefolium (Plumajillo)

Thymus vulgaris (Tomillo)

Justicia spicigera (Muicle)

Limpia critridora (Cedrón)

Populus alba (Álamo)

Mentha piperita (Mentha)

Chenopodium graveolens (Epazote de zorrillo)

Lippia graveolens (Orégano)

Gymnosperma glutinosum (Popote)

Artemisia mexicana (Estafiate)

Artemisia absinthium (Ajenjo)

Tabla 4. Plantas con actividad fasciolocida

7.4 Determinación de la dosis mínima letal.

Los extractos que obtuvieron actividad fasciolocida a una concentración de 500mg/L, o 0.500 mg/ml (tabla 5), observamos como algunas plantas como el tomillo obtuvo una eficacia del 99% a las 72 horas post tratamiento, pero otras plantas como el ajeno obtuvo un 100% de eficacia a las 48 horas. Se llevaron a cabo 7 repeticiones por extracto de planta y se trabajaron con distintas diluciones. En la tabla 6 por ejemplo se muestra que a una dilución de 250mg/L o 0.250mg/ml, el ajeno, muicle, orégano, estafiate, plumajillo y menta continuaron teniendo efecto fasciolocida durante las primeras 72 horas post- tratamiento. En la tabla 7 se muestra la dilución de 125mg/L o 0.125mg/ml, observamos cómo la menta, el estafiate y el plumajillo siguieron manteniendo esta actividad fasciolocida. Finalmente en la tabla 8 a una concentración de 60mg/L o 0.060mg/ml ninguna planta tuvo efecto, tan solo el plumajillo alcanzó un 10% de efecto a las 72 horas. La única excepción fue el chaparro amargo que obtuvo efecto en sus tres fracciones (hexano, acetato de etilo y metanol) como se observa en la tabla 9.

En todas las pruebas se tuvieron al menos 4 pozos con 10 testigos cada uno y con la misma cantidad de disolventes utilizada. En la tabla 10 se muestra de manera más clara la dosis mínima letal para cada uno de los extracto hexánicos probados en el modelo *in vitro*.

Planta	Fracción	Fasciolas Totales	24 horas Eficacia	48 horas Eficacia	72 horas Eficacia	Parte utilizada	Testigos
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)	Héxanica	70	71%	88%	99%	Hoja, flor, tallo	0
<i>Artemisia absinthium</i> (Ajenjo)	Hexánica	70	98%	100%	100%	Hoja y tallo	0
<i>Limpia critridora</i> (Cedrón)	Hexánica	60	70%	80%	88%	Hoja y tallo	0
<i>Chenopodium graveolens</i> (epazote de zorrillo)	Hexánica	60	98 %	100%	100%	Tallo, hoja y flor	0
<i>Populus alba</i> (Álamo)	Hexanica	60	100 %	100%	100%	Tallo y hoja	0
<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Popote)	Hexánica	60	60%	100%	100%	Tallo y hoja	0
<i>Justicia spicigera</i> (Muicle)	Hexánica	60	100 %	100%	100%	Tallo y hoja	0
<i>Lippia graveolens</i> (orégano)	Hexánica	60	100%	100%	100%	Tallo y hoja	0
<i>Artemisia mexicana</i> (estafiate)	Hexánica	60	94%	100%	100%	Hola y tallo	0
<i>Mentha piperita</i> (Mentha)	Hexánica	60	100%	100%	100%	Hoja y tallo	o
<i>Achillea millefolium</i> (Plumajillo)	Hexánica	70	100%	100%	100%	Hoja, flor, tallo.	0

Tabla 5. Efecto anti *Fasciola hepatica* a una concentración de 500mg/L.

Planta	Fracción	Fasciolas T.	24 horas Eficacia	48 horas Eficacia	72 horas Eficacia	Parte utilizada	Testigos
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)	Héxanica	60	0%	0%	0%	Hoja, flor, tallo	0
<i>Artemisia absinthium</i> (Ajenjo)	Hexánica	70	70%	100%	100%	Hoja y tallo	0
<i>Limpia critridora</i> (Cedrón)	Hexánica	60	0%	0%	0%	Hoja y tallo	0
<i>Chenopodium graveolens</i> (epazote de zorrillo)	Hexánica	40	0%	10%	10%	Tallo, hoja y flor	0
<i>Populus alba</i> (Álamo)	Hexanica	40	0%	20 %	20%	Tallo y hoja	0
<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Popote)	Hexánica	40	0%	10%	12%	Tallo y hoja	0
<i>Justicia spicigera</i> (Muicle)	Hexánica	70	80 %	100%	100%	Tallo y hoja	0
<i>Lippia graveolens</i> (orégano)	Hexánica	70	80%	90%	100%	Tallo y hoja	0
<i>Artemisia mexicana</i> (estafiate)	Hexánica	70	87%	100%	100%	Hola y tallo	0
<i>Mentha piperita</i> (Mentha)	Hexánica	70	88%	100%	100%	Hoja y tallo	o
<i>Achillea millefolium</i> (Plumajillo)	Hexánica	80	100%	100%	100%	Hoja, flor, tallo.	0

Tabla 6. Efecto anti *Fasciola hepatica* a una concentración de 250mg/L.

Planta	Fracción	Fasciola s T.	24 horas Eficacia	48 horas Eficacia	72 horas Eficacia	Parte utilizada	Testigos
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)	Héxanica	20	0%	0%	0%	Hoja, flor, tallo	0
<i>Artemisia absinthium</i> (Ajeno)	Hexánica	40	0%	10%	10%	Hoja y tallo	0
Limpia critridora(Cedrón)	Hexánica	20	0%	0%	0%	Hoja y tallo	0
<i>Chenopodium graveolens</i> (epazote de zorrillo)	Hexánica	20	0%	0%	0%	Tallo, hoja y flor	0
<i>Populus alba</i> (Álamo)	Hexanica	20	0%	0 %	0%	Tallo y hoja	0
<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Popote)	Hexánica	20	0%	0%	0%	Tallo y hoja	0
<i>Justicia spicigera</i> (Muicle)	Hexánica	40	0 %	0 %	0%	Tallo y hoja	0
<i>Lippia graveolens</i> (orégano)	Hexánica	40	0%	10%	10%	Tallo y hoja	0
<i>Artemisia mexicana</i> (estafiate)	Hexánica	70	60%	100%	100%	Hola y tallo	0
<i>Mentha piperita</i> (Mentha)	Hexánica	70	60%	100%	100%	Hoja y tallo	o
<i>Achillea millefolium</i> (Plumajillo)	Hexánica	70	100%	100%	100%	Hoja, flor, tallo.	0

Tabla 7. Efecto anti *Fasciola hepatica* a una concentración de 125mg/L.

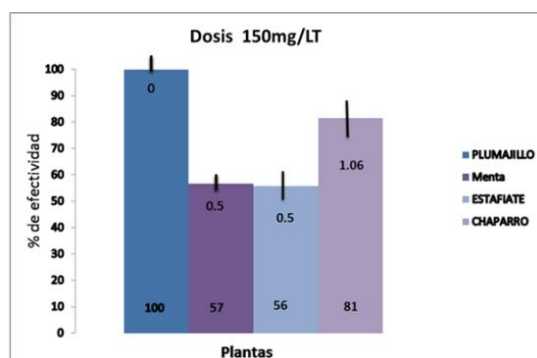
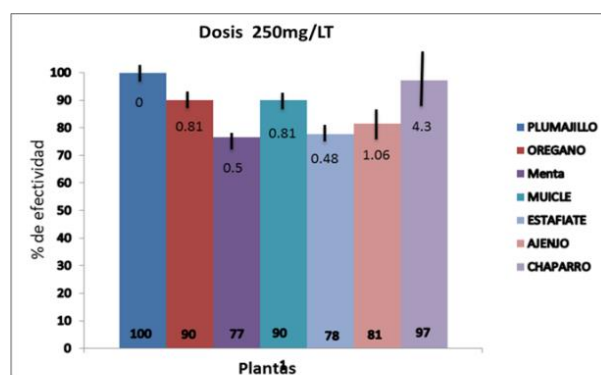
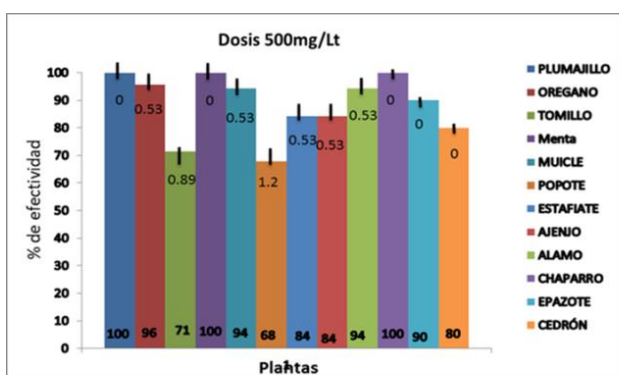
Planta	Fracción	Fasciolas Totales	24 horas Eficacia	48 horas Eficacia	72 horas Eficacia	Parte utilizada	Testigos
<i>Artemisia mexicana</i> (estafiate)	Hexánica	20	0%	0%	0%	Hola y tallo	0
<i>Mentha piperita</i> (Mentha)	Hexánica	20	0%	0%	0%	Hoja y tallo	0
<i>Achillea millefolium</i> (Plumajillo)	Hexánica	20	0%	0%	10%	Hoja, flor, tallo.	0

Tabla 8. Efecto anti *Fasciola hepatica* a una concentración de 60mg/L.

Planta	Fracción	Fasciolas T.	24 horas Eficacia	48 horas Eficacia	72 horas Eficacia	Parte utilizada	Testigos
<i>Castela tortuosa</i> (chaparro amargo) 500mg/lt	Hexánica	60	100%	100%	100%	Hola y tallo	0
	Ac.Etilo	60	80%	80%	80%		
	Metanol	60	100%	100%	100%		
<i>Castela tortuosa</i> (chaparro amargo) 250mg/lt	Hexánica	60	100%	100%	100%	Hoja y tallo	0
	Ac. Etilo	40	20%	20%	20%		
	Metanol	60	80%	100%	100%		
<i>Castela tortuosa</i> (chaparro amargo) 125mg/lt	Hexánica	40	80%	100%	100%	Hoja, tallo.	0
	Ac.Etilo	20	0%	0%	0%		
	Metanol	40	60%	70%	70%		
<i>Castela tortuosa</i> (chaparro amargo) 50 mg/lt	Hexanica	20	0%	0%	0%	Hoja, tallo	0
	Metanol	20	0%	0%	0%		

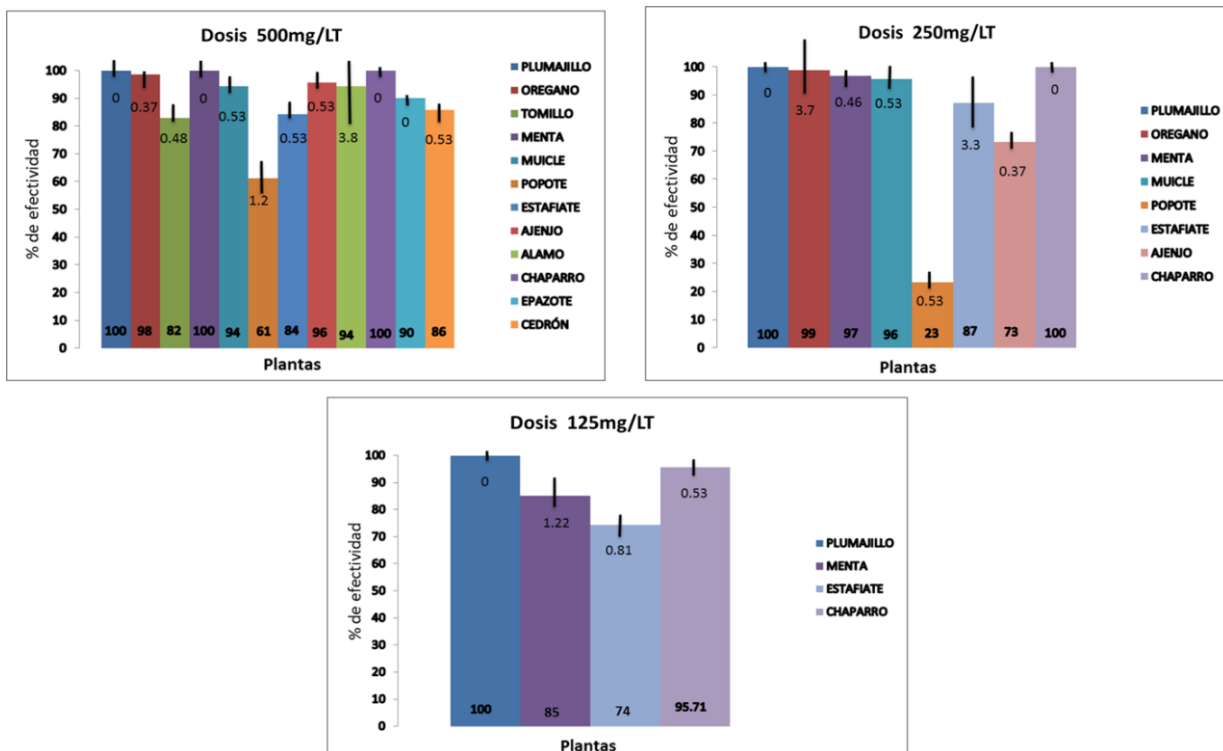
Tabla 9. Efecto anti *Fasciola hepatica* con chaparro amargo a distintas concentraciones.

En las siguientes gráficas se muestra de forma más visual las diferencias que hubo en entre los extractos, tiempo y dosis. En los gráficos A, vemos que a las 24 horas post tratamiento a una dosis de 500 mg/L varias plantas obtuvieron entre el 90% y 100% de efectividad entre ellas: plumajillo, orégano, menta, muicle, álamo, chaparro amargo y epazote de zorrillo y fue de forma constante en todas las repeticiones ya que la desviación estándar fue de 0 o 0.53, a una dosis de 250 mg/L más de la mitad de las plantas no tuvo este mismo efecto, pero las plantas que si siguieron mostraron actividad fue del 77 – 100% y también de manera constante teniendo a: plumajillo, orégano, muicle y chaparro amargo como las mejores. Finalmente a una dosis de 125 mg/L, la actividad se redujo notoriamente y tan solo el plumajillo mantuvo esta constancia del 100%, seguido del chaparro amargo con un 81% pero con una desviación estándar notoria del 1.06.



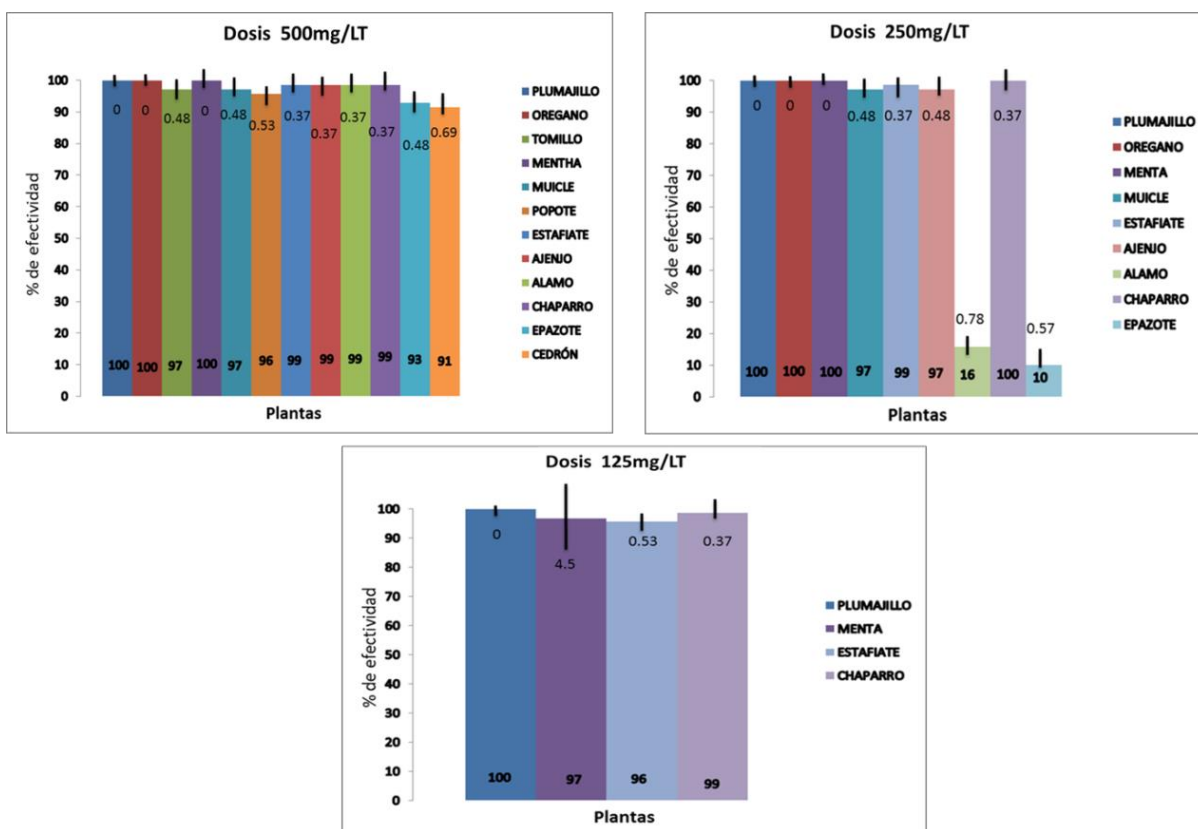
Gráficos A. Dosis de 500, 250 y 125 mg/L a las 24 horas post tratamiento.

En los gráficos B, mostramos el efecto a las 48 horas post tratamiento, en la dosis de 500 mg/L, observamos que varias plantas tuvieron un efecto constante, de entre el 84% al 100% destacando el plumajillo, orégano, menta, muicle, estafiate, ajeno, chaparro amargo, epazote de zorrillo y cedrón. Pero en algunas de ellas hubo inconsistencias en las repeticiones como por ejemplo el popote y el álamo teniendo desviaciones estándar del 1.2 y 3.8 respectivamente. En la dosis de 250 mg/L nuevamente más de la mitad de las plantas disminuyó su eficacia, pero algunas como plumajillo, menta, muicle, ajeno y chaparro amargo mantuvieron constancia entre las repeticiones y eficacia entre el 73% al 100%, mientras que el orégano y el estafiate también tuvieron un buen porcentaje de eficacia, pero su desviación estándar fue del 3.7 y 3.3 por lo tanto no fue tan confiable esta eficacia. Finalmente a una dosis de 125 mg/ L nuevamente solo plumajillo, menta, estafiate y chaparro amargo obtuvieron efecto fasciolicida de entre el 74 % y el 100%.



Gráficos B. Dosis de 500, 250 y 125 mg/L a las 48 horas post tratamiento

En el gráfico C se muestra el efecto a las 72 horas después del tratamiento, en la dosis de 500 mg/L como se muestra en la gráfica, todas las plantas obtuvieron una efectividad constante de entre el 91% y el 100%, analizando los resultados esta dosis en este período de tiempo fue la que mejor tuvo efecto anti-fasciola. En la dosis de 250 mg/L, nuevamente se notó esta tendencia a disminuir el efecto en varias plantas, sin embargo se mantuvo constante el efecto del: plumajillo, orégano, menta, muicle, estafiate, ajeno y chaparro amargo; y tan solo el álamo y el epazote de zorrillo obtuvieron unos porcentajes muy bajos de efectividad del 16% y el 10% respectivamente. Para finalizar en la dosis de 125mg/L nuevamente solo el plumajillo, la menta, el estafiate y el chaparro amargo obtuvieron efectividad de entre 96% y 100%, pero esta vez la menta tuvo una alta desviación estándar de 4.5.



Gráficos C. Dosis 500, 250, 125 mg/L a las 72 horas post tratamiento

Con estos resultados en la tabla 10 se muestran las dosis mínimas letales, de todas las plantas que tuvieron actividad fasciolicida, en donde se observa que las mejores fueron chaparro amargo, menta, plumajillo y estafiate ya que las cuatro plantas alcanzaron una dosis mínima letal de 125 mg/L.

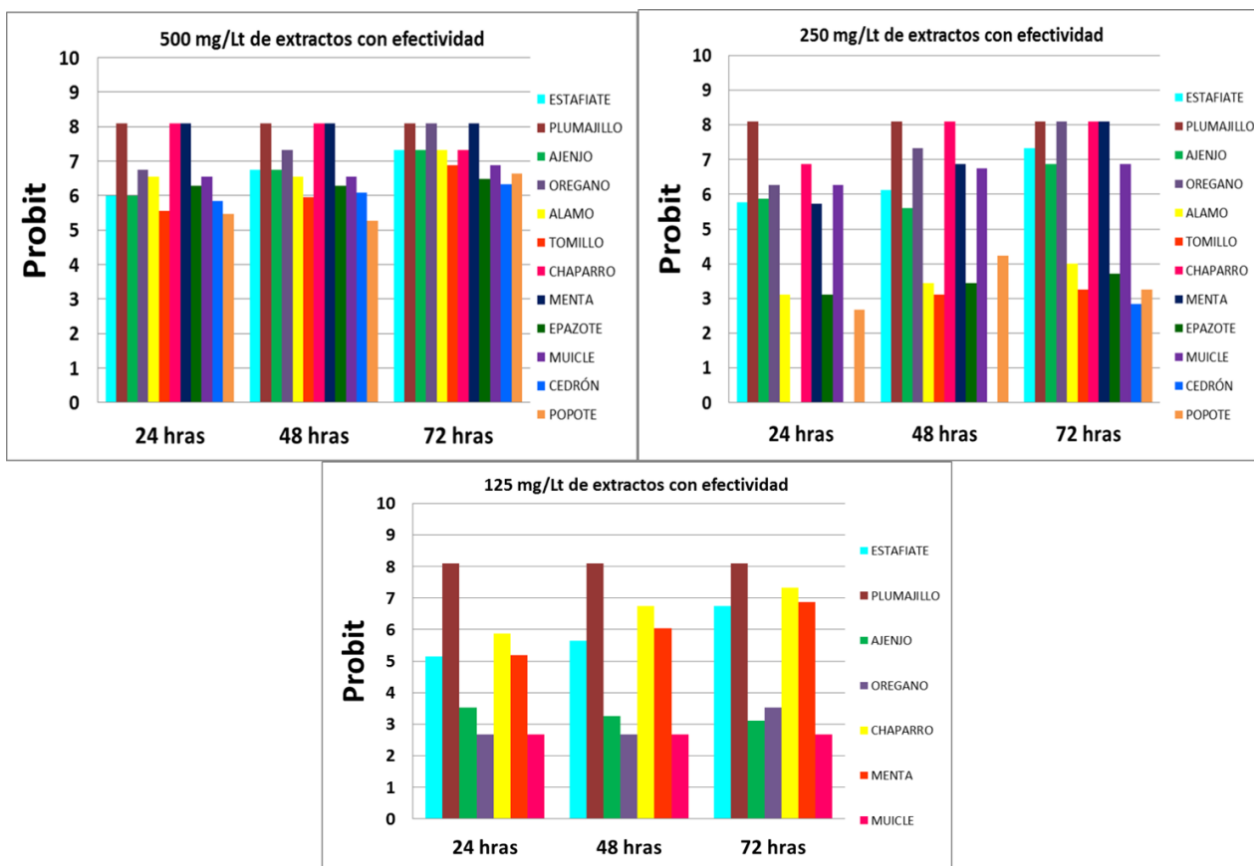
EXTRACTO	DOSIS MÍNIMA LETAL
<i>Castela tortuosa</i> (Chaparro amargo)	125 mg/L
<i>Mentha piperita</i> (Menta)	125 mg/L
<i>Achillea millefolium</i> (Plumajillo)	125 mg/L
<i>Artemisia mexicana</i> (Estafiate)	125 mg/L
<i>Lippia graveolens</i> (Orégano)	250mg/L
<i>Justicia spicigera</i> (Muicle)	250mg/L
<i>Artemisia absinthium</i> (Ajenjo)	250mg/L
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)	500mg/L
<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Popote)	500mg/L
<i>Populus alba</i> (Álamo)	500mg/L
<i>Chenopodium graveolens</i> (Epazote de zorrillo)	500mg/L
<i>Limpia critridora</i> (Cedrón)	500mg/L

Tabla 10. Dosis mínima letal de los extractos hexánicos probados.

Se realizó una ANOVA general con los grupos de extractos de plantas que tuvieron efecto fasciolicida; el cual demostró que a las 24 horas post tratamiento los grupos utilizados tienen una F de 0.050 y un valor crítico de 2.06, por lo tanto no hay variación entre el tipo de planta utilizada a las 24 horas. Pero por dosis se obtiene una F de 19.5 y un valor crítico de 2.8 por lo tanto si hay variación entre la dosis de extracto utilizada en cada experimento.

A las 48 horas post tratamiento por compuesto entre los grupos de extractos de plantas se obtuvo una F de 0.9 y un valor crítico de 2.0, por lo tanto no existe variación entre el tipo de planta utilizada, pero por dosis se tiene una F de 18 y un valor crítico de 2.81 por lo tanto si hay variación entre las dosis utilizadas.

Finalmente a las 72 horas por compuesto se obtuvo una F de 0.82 y un valor crítico de 2.06 por lo tanto entre compuestos usado no hay variación pero por dosis utilizada se tuvo una F de 17.61 y un valor crítico de 2.8 por lo tanto si hay variación entre dosis utilizada. En conclusión podemos observar que en los distintos tiempos post tratamiento (24, 48 y 72 horas), entre compuestos utilizados no hay diferencias significativas en su eficacia fasciolicida, pero respecto a las dosis utilizadas si hay una diferencia estadística significativa que va independiente a los tiempo post tratamiento (Gráficos A, B y C).



Gráficos D. Estudio Probit de los extractos efectivos.

Al realizarse el estudio PROBIT (inversa de la función de la distribución) se determinó que el compuesto con menor variación estadística fue la *Justicia spicigera* (Muicle), sin embargo al calcularse la ANOVA CL50 se determinó que el extracto más potente fue *Achillea millefolium* (plumajillo), seguido por *Castela tortuosa* (chaparro amargo), *Mentha piperita* (menta) y *Artemisia mexicana* (estafiate); Mientras que los menos potentes fueron *Thymus vulgaris* (tomillo), *Gymnosperma glutinosum* (popote), *Populus alba* (álamo), *Chenopodium graveolens* (epazote de zorrillo) y *Limpia critridora* (cedrón).

Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a determinar la concentración letal media (CL50) de todas las muestra de plantas y realizar un ANOVA de un solo factor obteniendo una F de 44 y un valor crítico de 2.21 por lo tanto si existen variación significativa entre la dosis de extracto utilizada, el tipo de planta utilizada y el tiempo transcurrido post tratamiento.

Así mismo se realizó un ANOVA de un factor de la CL50 con las plantas más potentes (estafiate, plumajillo, chaparro amargo y menta) obteniendo una F de 1.72 y un valor crítico de 4, por lo tanto no existe variación significativa entre los extractos más potentes con respecto al tiempo transcurrido post tratamiento y a la dosis utilizada.

7.5 Evaluación de la toxicidad.

Teniendo estos alentadores resultados se decidió montar un pequeño ensayo de toxicidad con los extractos hexánicos más prometedores, ya que muchas plantas son tóxicas para vertebrados y debíamos comprobar que fueran inocuas, se utilizaron ratones machos CD1 de 10-12 meses, ya que esta cepa es muy grande y fuerte para resistir mejor la dosis de extracto con cánula gástrica, en la tabla 11 se muestran las dosis suministrada y el número de ratones utilizado. Los ratones fueron observados durante 14 días (Tabla 12) y después sacrificados. Originalmente se buscaba encontrar la DL50, pero ni siquiera en la dosis más alta de extracto 5 gramos/kilogramo de peso, existieron bajas de animales, por lo tanto ninguno de los extractos con actividad fasciolocida se presume de ser tóxico (Tabla 12).

Para estar 100% seguros de que fueran inocuos dichos extractos se verifico que no hubiera daños en órganos de síntesis de compuestos como hígado y riñón, dichos órganos fueron llevados al departamento de histopatología de La FMVZ, para que evaluarán si existía algún daño, afortunadamente no se no se encontró nada anormal en los órganos antes mencionados entre los grupos testigo y los animales con tratamiento.

Dosis utilizadas	Núm de Ratones machos CD1
0.005gr o 5 mg/kg	5
0.05 gr o 50 mg/kg	5
0.5 gr o 500 mg/kg	3
5 gr o 5000 mg/kg	3

Tabla 11. Grupos de ratones utilizados.

Plantas a probar	Estado del animal	Hígado y riñón
<i>Achillea millefolium</i>	Buen estado	Sin daño
<i>Mentha piperita</i>	Un poco de inapetencia	Sin daño
<i>Castela tortuosa</i>	Buen estado	Sin daño
<i>Artemisia mexicana</i>	Buen estado	Sin daño
<i>Lippia graveolens</i>	Buen estado	Sin daño
<i>Justicia spicigera</i>	Buen estado	Sin daño

Tabla 12. Estado de los ratones CD1 tratados

7.6 El mejor extracto

Con estos resultados se decidió trabajar con la fracción hexánica de *Achillea millefolium* (plumajillo), ya que ella mostró ser la más efectiva en el modelo *in vitro*, es de muy fácil obtención, ya que se encuentra todo el año, así mismo casi no existen estudios científicos sobre esta planta, sin embargo es bastante conocida en la medicina tradicional por sus bondades medicinales, otra ventaja es que el extracto es muy soluble a diferencia de otros que necesitan más disolvente para solubilizarse y no resultó ser tóxica en los ratones machos CD1 aún en la concentración más alta. Por lo tanto se procedió a realizar una cromatografía de columna Figura 9 con 60 gramos de extracto crudo hexánico de plumajillo, la mezclas seleccionadas y sus concentraciones fueron hexano - diclorometano (8-2, 6-4, 5-5, 2,8), diclorometano 100%, diclorometano - acetona (8-2, 5-5, 2-8), acetona 100%, acetona - metanol (8-2,5-5,2-8) y metanol 100%. Cada recuperación 250 ml, destiló y se procedía a realizar cromatografía de papel para así ir separando y juntaron las fracciones iguales o distintas (fig. 10) obteniéndose finalmente 18 fracciones diferentes.



Fig.10 Cromatografía de columna

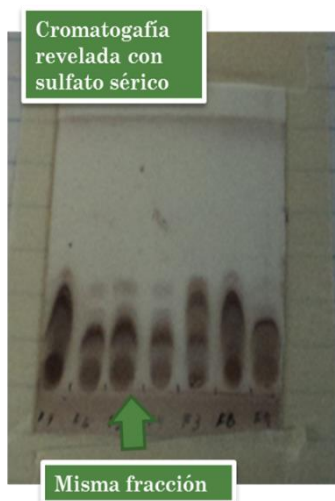


Fig.11 Cromatografía de papel

7.7 Evaluación *in vitro* de las 18 fracciones obtenidas a partir del extracto hexánico de *Achillea millefolium* (plumajillo).

Una vez obtenidas las 18 fracciones diferentes de los 60 gramos de plantas se evaluó cada una con 4 repeticiones a concentraciones de 500mg/L o 0.500mg/ml, en el modelo *in vitro* de *Fasciola hepatica*. En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos, en donde se observa que las primeras 6 fracciones no tuvieron ningún efecto fasciolocida, mientras que a partir de la séptima hasta la treceava se observó efecto fasciolocida desde las 24 horas – hasta las 72 horas post tratamiento, mientras que a partir de la fracción 14 hasta la 18 no se mostró nuevamente ningún efecto. Cabe destacar que la doceava fracción fue la mejor y mostró 100% de eficacia dentro de las primeras 24 horas. En la Figura 12 se aprecian mejor estos resultados.

No. De fracción	Clave	repeticiones	concentración	efecto	Horas
F1	F1	4	500mg/L	NO	
F2	F6	4	500mg/L	NO	
F3	F9	4	500mg/L	NO	
F4	AM	4	500mg/L	NO	
F5	F10	4	500mg/L	NO	
F6	F12	4	500mg/L	NO	
F7	F16	6	500mg/L	SI	48 H
F8	F19	6	500mg/L	SI	48 H
F9	F21	6	500mg/L	SI	48 H
F10	F23	6	500mg/L	SI	24 H
F11	F23B	6	500mg/L	SI	24 H
F12	F25	6	500mg/L	SI	48 H
F13	F26	6	500mg/L	SI	72 H
F14	F35	4	500mg/L	NO	
F15	F36	4	500mg/L	NO	
F16	F39	4	500mg/L	NO	
F17	F43	4	500mg/L	NO	
F18	F46	4	500mg/L	NO	

Tabla 13. Eficacia de las fracciones probadas

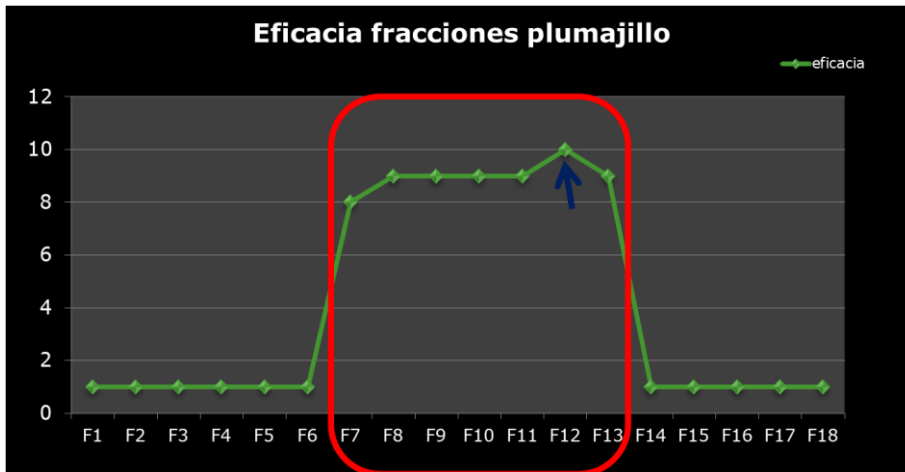


Figura 12. Eficacia de las fracciones probadas

7.8 Cromatografía de columna de las fracciones efectivas.

Se decidió juntan las fracciones con actividad fasciolicida siendo ellas la F9, F10, F11, F12 y F13 creando una fracción completamente activa que denominamos como “FAactiva” (Figura 13), se comenzó a realizar nuevamente el fraccionamiento de esta nueva “FAactiva” (Figura 14). Obteniendo 57 fracciones distintas pero en muy poca cantidad por lo cual no se pudo probar cada fracción a distintas concentraciones como se tenía planeado.



Figura 13. “FAactiva” con celita

7.9 Evaluación *in vitro* de las 57 fracciones de “FAactiva”.

Nuevamente se empleó el modelo *in vitro* contra *Fasciola hepatica* para evaluar estas 57 fracciones obtenidas (Fig.14), se tuvieron que evaluar de forma salteada ya que no se contaba con tantas metacercarias para la prueba, teniendo de 3 a 6 repeticiones dependiendo la fracción y siempre se utilizó una concentración de 0.500 mg/ml los resultados fueron los siguientes:

De la fracción 1 hasta la fracción 10 no existe efecto fasciolicida, de la fracción 11 a la 17 existe un efecto del 100% a las 24 horas post tratamiento, de la fracción 18 hasta la fracción 35 no hubo efecto, y de la fracción 36 hasta la fracción 41 nuevamente existió un 100% de efectividad a las 24 horas y finalmente de la fracción 42 hasta la fracción 57 no hubo actividad alguna (Tabla 14). Nuevamente se contó con 2 testigos por placa.

Fracciones	repeticiones	concentración	efecto	horas	% eficacia
F1—F10	3	0.500mg/ml	No	72 Hr.	0%
F11--F17	6	0.500mg/ml	Si	24 Hr.	100%
F18--F35	3	0.500 mg/ml	No	72 Hr.	0%
F36—F41	6	0.500mg/ml	Si	24 Hr.	100%
F42—F57	3	0.500 mg/ml	No	72 Hr.	0%

Tabla 14. Evaluación *in vitro* de las fracciones de “FAactiva”

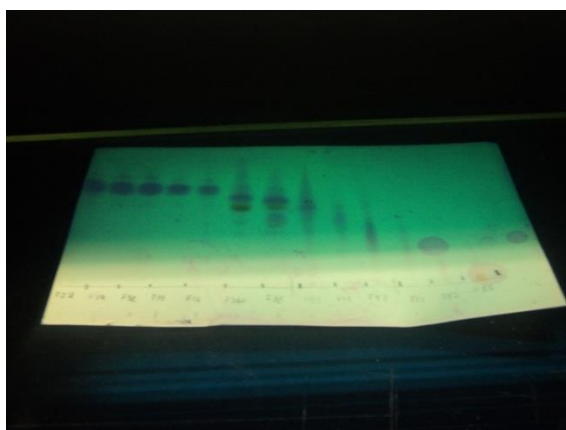


Figura 14. Fracciones de “FAactiva”

7.10 Purificación de los compuestos activos.

Con estos resultados tenemos 2 fracciones efectivas, (Figura 15) la primera fracción A tiene 4 metabolitos secundarios y la segunda (fracción B) tiene alrededor de 7 por lo tanto se procedió a purificar estas fracciones nuevamente con una pequeña cromatografía de columna. Cabe decir que en este punto se comenzaron a tener grandes dificultades por la mínima cantidad que teníamos de cada compuesto y final fue imposible determinar cuáles fueron exactamente los metabolitos secundarios encargados del efecto anti-fasciola en el modelo *in vitro*. Sin embargo es un hecho de que *Achillea millefolium* (plumajillo) posee una formidable efecto fasciolicida en menos 24 horas mata al 100% de las fasciolas y además no demuestra ser tóxico para vertebrados.

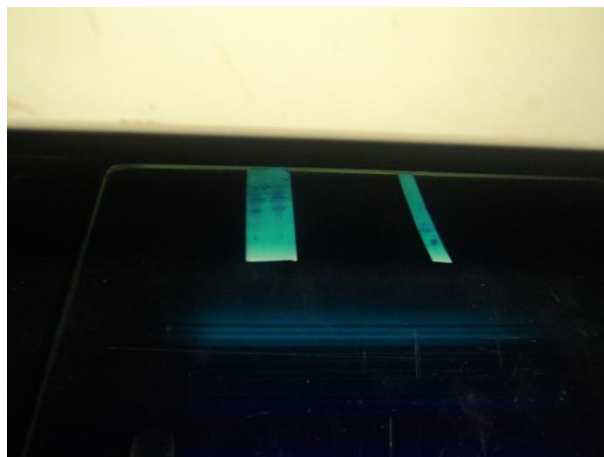


Figura 15. Fracción A y fracción B

8. DISCUSIÓN.

La fasciolosis como bien hemos explicado es una enfermedad parasitaria a nivel mundial, en la actualidad causa grandes pérdidas económicas directas e indirectamente y la única forma de prevención y erradicación es con el uso de desparasitantes, anteriormente se trató de prevenir controlando los estadios libres mediante el pastoreo rotativo (Liébano et al., 1992) y al caracol intermediario pero estas medidas no fueron suficientes y contaminaban el medio ambiente.

Los fasciolicidas usados actualmente se agrupan en cinco grupos químicos: Fenoles halogenados: Bitionol (Bitin, Accamer), Hexaclorofeno, Niclofolan (Bilevon) y Nitroxinil (Trodx).

Salicilanilidos: Brotianida (Dirian), Closantel (Flukiver, Seponver, Supaverm, Cosicare), Oxiclozanida (Nilzan, Zani) y Rafoxanida (Ranizole, Flukanide).

Benzimidazoles: Albendazol (Valbazen), Triclabendazol (Fasinex), Luxabendazol (Fluxacur).

Sulfonamidas: Clorsulon (Ivomec F, Curarem e Ivomec plus)

Fenoxialquenos: Diamfenetida (Coriban).

Sin embargo el uso indiscriminado y a la mala dosificación de estos fasciolicidas a provocado resistencia y no solo en *Fasciola hepatica* sino en otros parásitos de importancia ganadera (Campos et al., 1997). Por lo que actualmente es importante estudiar nuevas opciones para controlar a los parásitos y una de ellas es utilizando plantas, el estudiarlas cada vez está tomando más fuerza ya que no solo los parásitos están generando resistencia sino también bacterias, virus y hongos, (Jackson et al., 2000) por lo que varias líneas de investigación se están dedicando a crear nuevos medicamentos con ayuda de plantas; (Nik et al., 1999) Ellas poseen diferentes bondades y muchas de ellas ni siquiera están descritas, todas poseen distintos metabolitos secundarios con los cuales han prevalecido y evolucionado ante las adversidades. (Egualéa et al., 2011).

La importancia de este estudio radica en la evaluación de plantas medicinales de fácil obtención, de cercana localización y de las cuales ya existían estudios previos de etnobotánica para combatir enfermedades gastrointestinales, pero casi ninguna de ellas había sido probadas en el modelo experimental *in vitro* con *Fasciola hepatica*.

Los ensayos realizados *in vitro* con estos 60 extractos de plantas, sirvieron para corroborar que generalmente la fracción hexánica es la que posee efectos anti-*Fasciola hepatica* y seguramente esta eficacia pueden ser similares en otros modelos de parásito (Bahuaud et al., 2006) esto puede ser debido a que los metabolitos secundarios que se encuentran en esta fracción hexánica pueden ser en mayor o menor medida similares entre todas las plantas que sirven para controlar problemas gastrointestinales, estudios previos han demostrado que en esta fracción pueden encontrarse efectos antioxidantes y antimicrobianos (Deena et al., 2000).

Pero aun así de todas las plantas utilizadas tan solo *Castela tortuosa* (chaparro amargo) había sido probada con anterioridad contra trematodos de aquí la importancia de estudiar cada una de ellas en el modelo *in vitro* con *Fasciola hepatica*.

En el reino vegetal, las plantas medicinales pueden ser una arma de doble filo ya que poseen efectos curativos pero si se exceden en cantidad o si se consume alguna parte tóxica puede causar enfermedad o hasta la muerte, ya que desde la antigüedad ellas fueron las causantes de la primera muerte por intoxicación o envenenamiento y actualmente a nivel mundial se presentan episodios tóxicos entre en 1% y el 7.2% (Columba y Castillo 2007). Por lo cual es de gran importancia realizar estudios de toxicidad a nuevas plantas que prometen ser las pioneras de nuevos medicamentos ya que puede eliminar tanto al parásito como al hospedero, la forma más común de intoxicación por plantas es la toxicidad gastrointestinal expresada principalmente en forma de vómitos y/o diarreas, la segunda fase de intoxicación por plantas se va directamente sobre el sistema cardiovascular y cuando la intoxicación es crónica aparece la toxicidad en hígado y riñón.

Las plantas estudiadas, demostraron afortunadamente no originar ninguno de estos síntomas tóxicos, ya que los distintos grupos de ratones CD1 tratados no perecieron, ni enfermaron tan solo el grupo al que se le administró menta sufrió un poco de inapetencia, pero aun así ni en la dosis más alta de 50 miligramos por kilogramos de peso, no existieron bajas de animales, aunque posiblemente como cualquier medicamento en exceso no medido si podría causar daños (Cancela, 2011).

Una vez obtenida la dosis mínima letal de los extractos hexánicos con efecto anti-fasciola y comprobando que no fueran tóxicos para vertebrados, se procedió a trabajar con la mejor planta siendo ella *Achillea millefolium* (*plumajillo*), la cual pertenece a la clase Magnoliopsida y Familia Asteraceae (compuesta). Se eligió esta planta debido a que fue la más efectiva en el modelo *in vitro*, se solubiliza fácilmente a la hora de las diluciones, es fácil obtención todo el año y no existen estudios contra *Fasciola hepatica*.

El plumajillo contiene varios elementos como aceite esencial (0,3-1%), azulenos (20-50%), F flavonoides, ácido caféico, ácido valeriánico, ácido fórmico, alcohol metílico, ácido ascórbico, ácido salicílico, L lactonas sesquiterpénicas, alcaloides, C cumarina y E eugenol y varias escencias y resinas. Se utiliza en la medicina tradicional como antiinflamatorio, aperitivo, eupéptico, colerético, hipoglucemiante suave y antimicrobiano, hemostático, cicatrizante, antiespasmódico, diurético y antipirético (Columba y Castillo, 2007; Rodríguez et al., 2009). Las infusiones con las hojas se usan como astringentes, combatir inapetencia, gastritis, dispepsias hiposecretoras, espasmos digestivos, náuseas, vómitos, disquinesias hepatobiliares, colecistitis, flebitis, varices, hemorroides y su uso tópico en heridas, úlceras dérmicas, quemaduras y hemorroides (Rodríguez et al., 2009).

Estudios anteriores sobre el plumajillo :

(Ferda et al., 2003) Estudiaron el efecto antioxidante y antimicrobial *in vitro* del aceite y el extracto metanólico de *Achillea millefolium* encontrando 36 compuestos en el aceite Eucalyptol, camphor, α -terpineol, β -pineneO y borneol fueron los principales. El aceite mostró actividad antioxidante y antimicrobial contra *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *Candida albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter lwoffii* Y *Candida krusei* pero el extracto metanólico no mostró ninguna actividad.

(Figueiredo et al., 2006) Analizaron el aceite esencial de tallo y flor de *Achillea millefolium* ssp, por medio de cromatografía de gases. Los dos aceites contenían 80% de monoterpenos.

(Gordana et al., 2005) Trabajaron con extractos aéreos de *Achillea clavennae*, *Achillea holosericea*, *Achillea linguata* and *Achillea millefolium* (hexano:éter:metanol = 1:1:1) y fue probada su capacidad antimicrobial contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, en *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enteritidis* y dos hongos (*Aspergillus niger* and *Candida albicans*. En donde los 4 extractos mostraron una gran actividad, *Achillea clavennae* fue el que mostro más actividad así mismo se elucidó compuestos como ácidos grasos, alquenos, monoterpenos, guaninos, sesquiterpenos y flavonoides.

(Bozin et al. 2008) Probaron de manera *in vitro*, el efecto antioxidante y antimicrobial de dos especies de *Achillea millefolium* se evaluaron los compuestos por cromatografía de gases y se evaluó contra 21 bacterias.

Estos estudios demuestran que *Achillea millefolium* posee efectos medicinales pero únicamente se han probado contra bacterias y hongos, nunca se han probado contra nematodos y no existe ningún estudio con la planta recolectada en Morelos, ya que dependiendo el origen geográfico las plantas cambian su estructura, aunque sean de la misma especie, para acoplarse y sobrevivir (Hernández, 2003; Pascual, 2001).

Una vez obtenidas las 18 fracciones del plumajillo mediante separación por cromatografía de columna se probaron individualmente, observando que algunas fracciones si eran eficaces al 100% y otras tuvieron un 0% de efectividad, estas fracciones activas se juntaron y denominaron “FAactiva”, solo dos partes de ella poseen este efecto y es del 100% en menos de 24 horas. En la Fig. 13 podemos observar cómo estas fracciones dejan prácticamente fijas a las fasciolas recién desenquistadas. Estas dos fracciones activas se juntaron y nuevamente se purifico con cromatografía de columna, esta vez se obtuvieron 57 fracciones y obtuvimos varios cristales pero lamentablemente ninguno de ellos mostraron actividad en el modelo *in vitro*, por cual se puede decir que ellas trabajan juntas.

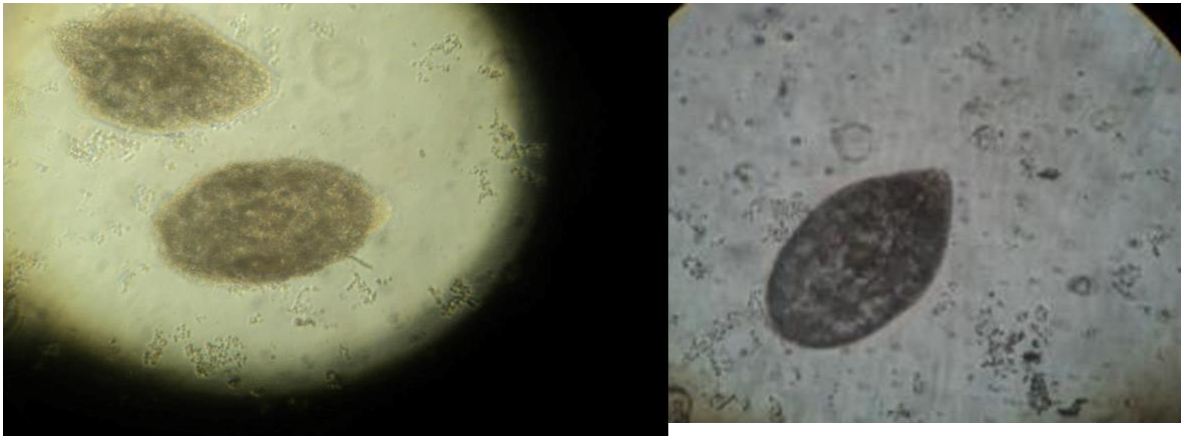


Figura. 16 Fasciolas muertas con fracciones de “FAactiva”

9. CONCLUSIONES.

1. De los 60 extractos probados, solo 11 extractos hexánicos, 1 de acetato de etilo y 1 de metanol mostraron tener capacidad fasciolocida causando la mortalidad entre el 80-100% entre las 24-72 horas post tratamiento.
2. La fracción hexánica es la que mostró mayor capacidad fasciolocida por lo tanto se puede suponer que es algún metabolito secundario o principio activo en común que se encuentra en estas plantas la que genera esta actividad.
3. Todos los extractos evaluados se realizaron a partir del tallo, flor y hoja evitando utilizar raíz y fruto debido a que ahí puede encontrarse las partes tóxicas de la planta.
4. Los extractos con actividad causan a las fasciolas tratadas poca movilidad, desintegración de sus órganos internos y finalmente una inminente destrucción de su pared corporal, estas características también son causadas por fasciolocidas comerciales por lo tanto se puede presumir que estos extractos provocan similares efectos.
5. En todos los casos en el grupo testigo las fasciolas permanecieron en perfectas condiciones hasta 7 días después de la prueba por lo tanto se concluye que existe una gran flora medicinal que no ha sido probada en modelos de infección y que solo son usadas por un restringido grupo de personas enfocadas en la medicina tradicional.
6. *Castela tortuosa*, *Mentha piperita*, *Achillea millefolium*, *Artemisia mexicana* poseen una dosis mínima letal contra *Fasciola hepatica* de 125 mg/L; Mientras que *Lippia graveolens* y *Justicia spicigera* poseen una actividad de 250mg/L y *Thymus vulgaris*, *Gymnosperma glutinosum*, *Populus alba*, *Chenopodium graveolens*, *Limpia critridora* y *Artemisia absinthium* una actividad de 500mg/L respectivamente.
7. En el estudio de toxicidad se formaron distintos grupos y se utilizaron distintas concentraciones de los extractos antes mencionados, encontrándose que ninguno de los extractos propicio la muerte de los ratones tratados y al observar su apariencia física y comportamiento durante 14 días, se notó que no había diferencia entre el grupo testigo y los grupos tratados.

- 8.** Para asegurar la inocuidad de los mismos se llevaron a histopatología hígado y riñón de los ratones con la dosis más alta de extracto (5mg/Kg) y se encontró que no había daño en ninguno de los órganos antes mencionados.
- 9.** Se decidió trabajar con el extracto hexánico de *Achillea millefolium* (Plumajillo), ya que es una planta que cuenta relativamente con pocos estudios, pero sin embargo es conocida por sus bondades medicinales además fue la mejor planta en el modelo *in vitro* y no es tóxica para vertebrados.
- 10.** En la cromatografía de columna de obtuvieron 18 fracciones, de las cuales 5 resultaron ser activas a un 100% en modelo *in vitro* con *Fasciola hepatica*, por lo tanto se juntaron y formaron la “FAactiva”.
- 11.** En el fraccionamiento de “FAactiva”, se obtuvieron 57 fracciones, de las cuales solo dos partes resultaron poseer efecto del 100% en el modelo *in vitro*.
- 12.** En la purificación de estas 2 fracciones A y B se obtuvieron 2 cristales los cuales no mostraron actividad, por lo tanto trabajan juntas pero se necesitan más estudios para confirmarlo.

10. PERSPECTIVAS

Con estos resultados promisorios en *in vitro* y con la certeza de que no son tóxicos en mamíferos se propone probar estos extractos al hospedero definitivo de esta parasitosis (ovinos o bovinos).

Las plantas son un recurso para la obtención de nuevos fármacos y tratamientos para las enfermedades parasitarias existentes en nuestro país. Los estudios de etnobotánica son muy útiles para localizar a plantas como posibles candidatos para el uso de nuevos antiparasitarios, por lo tanto se recomienda seguir probando nuevos extractos de plantas como anti-parasitarios no solo en el modelo de *Fasciola hepatica* si no es otros modelos de interés pública y ganadera.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. ABDEL-GHAFFAR F, KLIMPEL S, KHALED AS, AKSU G, FISCHER K, BIANCA STRASSEN, MEHLHORN H. The effects of different plant extracts on nematodes Parasitology Research 2011; 108, (4): 1047-1054.
2. ALCALÁ Y, IBARRA VF, GARCÍA J, SUMANO H. *Fasciola hepatica* proteolytic activity in liver revealed by in situ zymography Parasitol Rev 2005; 96, (3): 308-311.
3. ASTRADA MT. Ciclo evolutivo de *Fasciola hepatica* Editorial Córdoba 1971; 24-30.
4. ÁVILA AJG, MARTÍNEZ CG, MUÑOZ LJL. *In vitro* Antimicrobial Activity of Various Plant Extracts used by Purepecha against some Enterobacteriaceae. International Journal of Pharmacognosy 1993; 31, (1): 61-64.

5. ÁVILA AJG, CASTAÑEDA CMC, BENÍTEZ FJC, DURÁN DA, BARROSO VR, MARTÍNEZ CG, MUÑOZ LJL, MARTÍNEZ CA, ROMO DE VIVAR A. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia* 2005; 76, 301-309.
6. BAHUAUD D, MARTÍNEZ-ORTIZ DE VA UNA COMA AQUI? MONTELLANO C, CHAUVEAU S, PREVOT F, TORRES-ACOSTA F, FOURASTE I, HOSTE H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 2006; 132, (6): 545-554.
7. BASSO DE NILDA MB. Bases de la Parasitología Veterinaria. Editorial Hemisferio Sur, 1992, 157 p.p.
8. BARRERA A. Catálogo del museo de etnobotánica de Córdoba España. España. 1983. <http://ww.uco.es/organiza/servicios/jardín/etnobot.html>.
9. BETANCOURT ASY, GUTIÉRREZ DMA. Proyecto Mercados Verdes Herbolarios Informe técnico final. Fondo de América del Norte para la Cooperación Ambiental (FANCA), Ecología Y Desarrollo de Tlaxcala y Puebla A.C. México, D.F. 1999. 250 p.p.
10. BLOOD D. Manual de Medicina Veterinaria 9ª edición. Editorial McGraw Hill. Interamericana. España. 1992. 400 p.p.
11. BORGSTEEDE FHM. Gastrointestinal helminthiasis: Anthelmintic resistance and how to prevent and control. *Symposium Parasitology International* 47 1998; (Suppl): 23-48.
12. BORREGO EG. Herbario Medicinal del IMSS. Editorial A. Aguilar 1994. 200 p.p.

13. BORAY JC, CROWFOOT PD, STRONG MB, ALLISON JR, SCHELLENBAUM M, VON ORELLI M, SARASIN G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole". *Veterinary Record* 1982.; 113, (14):315-317.
14. BOZIN B, MIMICA-DUKIC N, BOGAVAC M, SUVAJDZIC L, SIMIN N, SAMOJLIK I, COULADIS M. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele essential oils. *Molecules*. 2008; 13(9):58-68.
15. CAMPOS RR, LIMÓN NE, SÁENZ FMA. Efectividad en ovinos del albendazol y oxfendazol administrados solos o combinados contra nemátodos resistentes y susceptibles al tricabendazol. *Téc. Pecuaria en México*. 1997; 35(1):47-51.
16. CANALES M, HERNÁNDEZ T, SERRANO R, HERNÁNDEZ LB, DURAN A, RÍOS V, SIGRIST S, HERNÁNDEZ HLH, GARCÍA AM, ANGELES-LÓPEZ O, FERNÁNDEZ-ARAIZA, MA, AVILA G. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 110, (2) 343-347.
17. CANCELA MADP. Efectos secundarios de las cápsulas de harpagófito. *Contraindicaciones del hapagófito*. 2011; www.plantasparacurar.com/efectos-sekundarios-de-las-capsulas-de-harpagofito
18. CERVANTES RMA, CUELLAR O, SILVA MR. Evaluación del período de reinfestación por nemátodos gastroentéricos en ovinos tratados con Closantel, Ivermectinas o Moxidectina. *Memoria IX Congreso Nacional de Producción Ovina*. AMTEO. 1997; Querétaro, Qro. 150-155 p.p.

19. COLUMBA M, CASTILLO E. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Conabio, México. 2007. 405 p.p.
20. CONTRERAS JA. Abortos debidos a Fasciolosis en una hacienda Venezolana Nota Médica de Veterinaria 1976; 2:190-195.
21. CSEKE LJ, ARA K, PETER BK, SARA W, JAMES AD, HARRY L. Natural products from plants. Editorial CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, FL. 2006 .611 p
22. CRUZ MI, FIGUEROA JA, CORREA D, RAMOS ME, LECUMBERRI LJ, QUIROZ RH. Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of México. Vet. Parasitol. 2004; 87, 87-93.
23. DEENA MJ, THOPPIL, JE. Antimicrobial activity of essential oil of *Lantana camara*. Fitoterapia. 2000 71 (4) 453-455.
24. DÍAZ JL. Índice y sinonimias de las plantas medicinales de México. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. 1976. 358 p.p.
25. DÍAZ RPG, TORRES HMM, OSORIO AH, PÉREZ PAR, PULIDO AAM, BECERRIL P YJG, HERRERA H. Resistencia genética a parásitos gastrointestinales en ovinos y sus cruzas en el trópico mexicano. Agrociencia. 2000; 34 (1)13-20.
26. DUNN A. Helmintología veterinaria. 2da Ed. El Manual Moderno S.A. México D.F. 1983.112-137 p.p.
27. DPDCDC.1999;www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Fascioliasis.htm.
28. DRUGUERI L, MODERN D. Parasitología Veterinaria (Parte 1). 2002 www.zoetecnocampo.com/Documentos/parasit1.htm.

29. ELLEN K, SILBERGEL D. HOMOGENEIZAR Toxicología herramientas y enfoques.2000;www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/33.pdf
30. EGUALEA T, TADESSEB D,GIDAYA M. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. Journal of Ethnopharmacology 2011; 137. (1) 108–113 p.p.
31. ENTRECASSO C. *Fasciola hepatica*: Un problema de que avanza hacia el este de la cuenca del Salado. Estación experimental agropecuaria Balcarce. Grupo de Sanidad Animal INSTA Argentina. 2003. www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/21-fasciola_hepatica.html.
32. FAIRWEATHER I, BORAY JC. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management”. Veterinary Journal. 1999; 158 (2): 81-112.
33. FERDA C, MEHMET U, BEKTA,S T, DIMITRA D, MOSCHOS P, ATALAY, S H. A,SKIN A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanolextracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium Afan.* (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology. 2003; 87(1): 215–220.
34. FERREIRA JFS, PEADEN P, KEISER J. *In vitro* trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*. Parasitology Research. 2011; 109. (6): 1585-1592.
35. FIGUEIREDO AC, BARROSO JG, PAIS MSS, SCHEFFER JJC. Composition of the Essential Oils from Leaves and Flowers of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. Flavour and Fragrance Journal. 1992; 7. (1): 219–222.
36. GALLEGO BJ. Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 2007. Universidad de Barcelona. Barcelona. España. 516 p.p.

37. GEORGI JR, MARION EG. Parasitology for veterinarians. 5a quinta edición. 1990. W.B. Saunders Company. U.S.A
38. GILL GV, BECHING NJ. Lectures notes on tropical medicine. 5 edition. 2004. Blackwell, U.S.A 279 p.p.
39. GORDANA S, NIKO R, TOSHIHIRO H, RADOSAV P. *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. Journal of Ethnopharmacology 2005; 101. (1): 185-190.
40. GUTIERRÉZ D, GUTIERRÉZ MA, BETANCOURT A. El mercado de plantas medicinales en México, situación actual y perspectivas de desarrollo. Editorial iberoamericana para el comercio justo de plantas medicinales y sus derivados (RICOPLAM-RIPROFITO). 2004. Jardín Botánico Universitario, Secretaría de Investigación Científica, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Red Mexicana de Plantas Medicinales y Aromáticas S.C.L.
41. HERRERA RD. Tratamiento químico de nematodos gastroentéricos y pulmonares en rumiantes. En diagnóstico y control de parásitos en animales y el hombre. México. Editorial UNAM. 1991. 631-634 p.p.
42. HERNÁNDEZ T, CANALES M, AVILA JG, DURAN A, CABALLERO J, ROMO DE VIVAR A, LIRA R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México) Journal of Ethnopharmacology. 2003; 88. (2-3); 181-188.
43. HERNÁNDEZ T, CANALES M, ÁVILA JG, GARCÍA AM, MARTÍNEZ A, CABALLERO J, ROMO DE VIVAR A, LIRA R. Composition and antibacterial activity of Essentials oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). Journal of Ethnopharmacology. 2005; 96. (3): 551-554.

44. IBARRA QF, JENKINS DC. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. Z. Parasitenkd. 1984. 70: 655-666 p.p.
45. IBARRA VF, MONTENEGRO C, FLORES C, ALICIA HC, CASTILLO BR. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. 1997. www.ejournal.unam.mx/rvm/vol31-01/RVM31107.pdf.
46. IBARRA VF. Temas selectos de Parasitología Volumen 1. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México D.F. 2000. 200 p.p.
47. JACKSON F. Anthelmintic resistance in goats. En: 1er. Curso internacional Nuevas perspectivas en el diagnóstico y control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. FMVZ-UADY. Mérida, Yucatán, México. 2000. 49-52 p.p.
48. KASSAI T. Helminología Veterinaria. Editorial Acribia. Zaragoza España. 1998 68-88 p.p.
49. KAUFMAN PB. Natural products from plants CRC Press, Boca Raton, Fla. London. 1999. 343 p.p.
50. KEISER J, ENGELS D, BÜSCHER G, UTZINGER J. Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis Expert Opinion on Investigational Drugs 2005; 14(12): 1513-1526.
51. KUBO I, YOSHIHIRO M, CHAUDHURI SK. Structure of chaparramarina, a quassinoid from *Castela tortuosa*. Phytochemistry 1992; 31(9): 3262-3264.
52. KUBO I, CHAUDHURI SK. A quassinoid glucoside from the bark of *Castela tortuosa*. Phytochemistry. 1993; 32(1): 215-217.
53. LAPAGE, G. Parasitología veterinaria. Editorial Continental. México DF. 1971. 600 p.p.

54. LIÉBANO HEV, VÁZQUEZ PA, CID R. Determinación de larvas infectantes de nemátodos gastroentéricos en pasto durante dos períodos del año en un clima tropical húmedo. *Revista Técnica Pecuaria*. 1992; 30. (1): 31-36.
55. LIN YL, NEUMAN P, MARBRY T. The flavonoids In: Dominguez XA. Editorial *Phytochemical methods frontiers*. *Rev. Lat. de Química. Supl Especial*. 1990. 92-130 p.p.
56. LOCK OU. Análisis fitoquímicos y metabolitos secundarios. Capítulo IV, Pontifica Universidad Católica de Perú. 1997. www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf.
57. LONG-ZE L, MUKHOPADHYAY S, ROBBINS RJ, HARNLY JM. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007; 20. (5): 361-369
58. LOZOYA X. Estado actual del conocimiento en plantas medicinales mexicanas. México, IMEPLAM. 1976.
59. LOZOYA X. Herbario Medicinal del IMSS. Editorial Aguilar. México, IMEPLAM. 1994.
60. MARTÍNEZ M. Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas. 6ª edición. México DF. 1989.
61. MARTÍNEZ R, DOMENECH C, MILLÁN, PINO S. Fascioliasis, revisión clínico-epidemiológica y diagnóstico. *Rev. Cubana Hig Epidemiol*. 2012; volumen 50. No.1 Ciudad de la Habana ene.-abr.
62. MUNGUÍA XJA. Evaluación *in vivo* e *in vitro* de fasciolocida experimental solubilizado con ciclodextrinas. Tesis de Doctor en Ciencias, Universidad Autónoma de México, México D.F. 2009. 96 p.p.

63. NARI A, FIEL C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos: Bases epidemiológicas para su prevención y control. Editorial Hemisferio Sur. México D.F. 1988. 200 p.p.
64. NARI A. Diagnóstico y control de resistencia antihelmíntica en pequeños rumiantes Memorias. II Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos y XI Congreso Nacional de Producción Ovina. Mérida, Yucatán. 2001. Niec.
65. NEMENGI P. Biostatistical Analysis. 3rd. Ed. London (UK) Prentice Hall. 1996. 300 p.p.
66. NIK NA, RAHMANA F, TAKAHISA K, SOMEI T, KIKUCHI Y, MUSTAFA A. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 64. (3): 249–254.
67. OLAECHEA FV. Epidemiología y Control de *Fasciola hepatica* en Argentina En: Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos. 1994. Fiel C. Ed. Hemisferio Sur. 1994, 213- 233 p.p.
68. PASCUAL ME, SLOWING K, CARRETERO E, SÁNCHEZ MD, VILLAR A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology; 2001; 76(3): 201-214.
69. PEÑA CE, DEAN EC CARTER, FELIX AF. 2001. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. 2001 <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxambPeña C>.
70. QUIROZ RH. Parasitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos Editorial Limusa, México D.F. 1984. 400 p.p.

71. QUIROZ RH, FLORES CR, IBARRA VF. Epidemiología Fasciolosis. Volumen conmemorativo del centenario del descubrimiento del ciclo de *Fasciola hepatica*. Instituto de investigaciones forestales y agropecuarias. México D.F. 1986, 335-403 p.p.
72. QUIROZ RH, CASTELLANOS HAA. Diagnóstico de la prevalencia de *Fasciola hepatica* de bovinos sacrificados en empacadoras y rastros de México. Editorial Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 1991. 335-360 p.p.
73. QUIROZ RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa, México. D.F. 2003. 232-239 p.p.
74. RAMÍREZ A. Estudios biofarmacéuticos de alfaBIOF10 un nuevo agente fasciolicida. Tesis de grado de Maestría en ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 2007.
75. RAMOS G, FRUTOS P, MANTECÓN AR, GIRÁLDEZ FJG. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. Archivos de zootecnia. 1998. ISSN 0004-0592, Vol. 47, N° 180.
76. RIVERA N, IBARRA F, ZEPEDA A, FORTOUL T, HERNÁNDEZ A, CASTILLO R. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment *in vitro* and *in vivo* with an experimental fasciolicide. Parasitology Research; 2004; 93: 283-286.
77. RIVERA N, IBARRA F, ZEPEDA A, FORTOUL T, CANTÓ G, HERNÁNDEZ A, CASTILLO R. The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphtyloxy)-1H-benzimidazole called compound alpha on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in its natural host. Parasitology Research 2005; 95.(1):379-382.

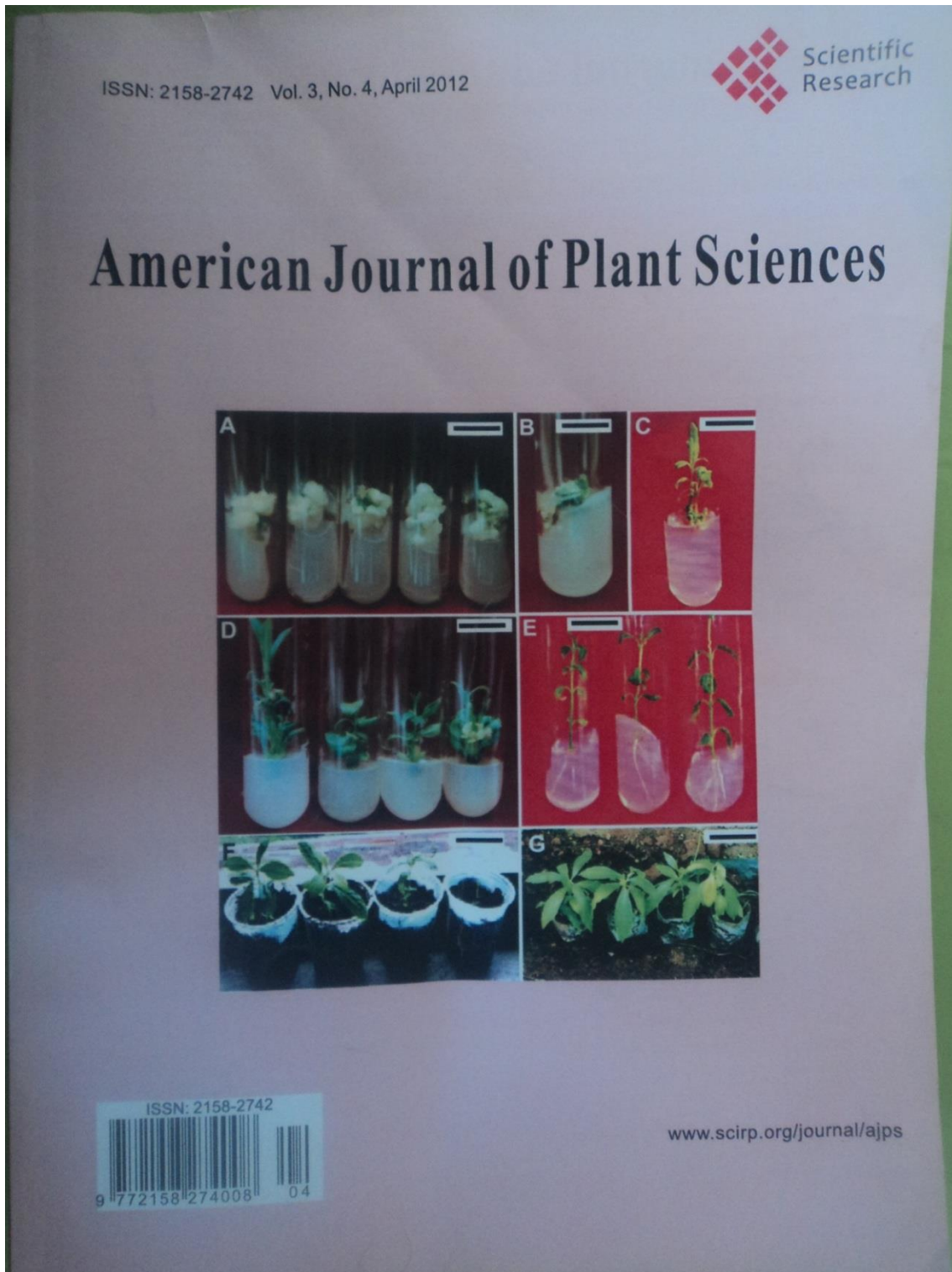
78. RODRÍGUEZ LP, CASTILLO E, ESTRADA SS, Actividad espasmolítica de algunas especies de plantas medicinales del estado de Morelos. México Facultad de Farmacia y Centro de Investigación en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México. 2004. 200 p.p.
79. RODRÍGUEZ A, COOMBES J, JIMENEZ R. Plantas silvestres den puebla herbario y jardín botánico BUAP. Editorial Herbario BUAP Puebla, Mexico, 2009. 236 p.p.
80. RZEDOWSKI J. Vegetación de México. 4a. reimpression. Editorial Limusa. México, DF. 1988. 468 p.p.
81. SALGADO MG. Manual de prácticas de Parasitología con énfasis en helmintos parásitos de peces de agua dulce y otros animales silvestres de México. Instituto de Biología. UNAM. 2009. Proyecto PE209106
82. SÁNCHEZ SO. La flora del Valle de México. Editorial Herrero. México DF. 1984. 976 p.p.
83. SANCHANA M, HARGREAVES AJ. Toxicological testing: *in vitro* and *in vivo* models. En: Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles. (Gupta RC, ed.) Academic Press, New York. 2007.
84. SOULSBY E JL. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Editorial Interamericana/McGraw-Hill. México D.F. 1987. 823 p.p.
85. TAY J, LARA AR, VELASCO CO, GUTIÉRREZ QM. Parasitología Médica. Méndez Editores, 7a. edición, 2002, México, D.F. 504 p.p.
86. Tlahui Medic 1. desde el 25 de Agosto. 1996. www.tlahui.com/plante1.html
87. VÁZQUEZ PVM Agentes etiológicos y ciclo de vida de los nemátodos gastrointestinales. En: 1er. Curso Internacional Nuevas Perspectivas en el

diagnóstico y control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Mérida, Yuc. 2000.1-5 p.p.

88. VERCRUYSE J, HOLDSWORTH P, LETONIA T, BARTH D, CONDER G, HAMAMOTO K, OKANO K. International harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines. *Veterinary Parasitology*. 2001; 96. (6): 171-193.

89. YU S, FANG N, MABRY TJ. Flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry*. 1988; 27 (1): 171-177.

12. ARTÍCULOS PUBLICADOS.



In Vitro Evaluation of Fasciolicide Activity with Hexane, Methanol and Ethyl Acetate with Extracts Processed and Obtained from Some Mexican Plants Used in Traditional Medicine Based on Ethno Botanical Studies

Stephanie Ibarra-Moreno^{1,2*}, Froylán Ibarra-Velarde¹, José Guillermo Ávila-Acevedo²

¹Depto. De Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria, Y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria, México D.F., México; ²Lab. De Fittoquímica, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Avenida de los Barrios S/N Tlalnepantla de Baz, Edo. De México.
Email: *stephibamor@hotmail.com

Received December 13th, 2011; revised January 13th, 2012; accepted February 20th, 2012

ABSTRACT

Fasciolosis is a parasitic disease of world distribution affecting mainly domestic ruminants. The control of this disease is carried out using chemical fasciolicides which, in some cases, have been observed to have environmental problem such as pollution resistance. An alternative is to investigate extracts from plants with anti-*Fasciola hepatica* effects, taking advantage of the great diversity of flora of our country. The aim of this paper is to identify, assess and elucidate the anti-*Fasciola hepatica* effect *in vitro* using antiparasitic extracts of some plants used in Mexican ethno botany. We collected, dried, processed and tested *in vitro* about 20 plants with their respective chemical elements (hexane, ethyl acetate and methanol), obtaining results of a total of 60 extracts tested. The *in vitro* evaluations were carried out for 3 days, and the efficacy of each extract was compared with an untreated control group. Each test was repeated 6 times with 13 extracts that showed greater fasciolicide activity. Results from these 13 extracts tested ranged from 80% to 100% activity and the plants tested were: *Castela tortuosa* (chaparro amargo), *Achillea millefolium* (plumajillo), *Thymus vulgaris* (thyme), *Justicia spicigera* (muicle), *Limpia critridora* (cedron), *Populus alba* (Alamo), *Mentha piperita* (mint), *Chenopodium graveolens* (epazote de zorrillo), *Lippia graveolens* (oregano), *Artemisia mexicana* (estafiate) and *Artemisia absinthium* (wormwood), which is the hexane variable which showed higher fasciolicide capacity; using a dose of 500 gr/Lt in all the trials. Further *in vitro* studies should be conducted to obtain the LD50 of each extract to be able to isolate the main active element found in the hexane variable.

Keywords: *Fasciola hepatica*; Fasciolicide; Extracts; Medicinal Plants; *In Vitro*

1. Introduction

Fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* is a worldwide parasitic disease which hampers animal production and which occasionally infects humans [1]. Its importance lies in the great economic losses ranging from the confiscation of the livers of infected animals to weight loss, growth retardation, reduced production of meat, milk or wool, decreased resistance to other diseases, inhibited reproduction, miscarriages and even death [1-3]. All the above mentioned added to the high costs of deworming makes it one of the costliest parasites of livestock worldwide. Since currently treatment is based on the use of chemical dewormers which often create resistance, poor security and harm to the environment when dis-

carded, alternative methods of control should be studied [4,5]. One alternative is using plants with anthelmintic properties according to ethnobotanical studies [6,7]. Plants have different defensive traits in response to different predators, which tend to be special [8,9]. These mechanisms act with the help of secondary metabolites (they have an unpleasant taste, they inhibit ingestion or assimilation and they are poisonous or sticky) [10,11].

Mexico is in fourth place worldwide in floristic diversity with more than 25,000 recorded species likewise there are over 6000 species of medicinal plants reported so far [12].

According to ethnobotanical studies, plants were selected and crude extracts were prepared from the hexane, ethyl acetate and methanol fragments according to the different polarities from their leaves, stems and flowers

*Corresponding author.

[13]. Therefore, based on the fact that in nature wild plants defend themselves against insects, parasites or other organisms by producing toxic substances, it can be stated that the extracts obtained from some Mexican plants used in traditional medicine have an anthelmintic effect of over 80% against the juvenile and adult stages of *Fasciola hepatica* [14,15].

This study was aimed to identify, assess and elucidate the anti-*Fasciola hepatica* *in vitro* with crude extracts of some Mexican plants recorded with antiparasitic activity used in traditional medicine against dysentery, vomiting, vermifuge, nausea, bad absorption, diarrhea and indigestion [16,17].

2. Materials and Methods

2.1. Location of the Study

The plant extract process was carried out in the laboratory of phytochemistry of the UBIPRO in the College the Estudios Superiores Iztacala, and the *in vitro* evaluations were conducted in the laboratory of Experimental Chemotherapy of the Parasitology Department of the Veterinary Faculty of the National Autonomous University of Mexico.

2.2. Collection of Plant Material

All plants were collected from the states of Puebla and Morelos, (central part of Mexico). The plant material was collected manually by breaking it off, subsequently it was dried in the shade on sheets of paper; then it was in a manual mill and the shredded bark was stored in paper bags.

2.3. Preparation of Extracts

Leaves, flowers and stems were extracted with solvents of different polarity (hexane, ethyl acetate and methanol), using a rota-evaporator. Then three distillations were performed for each fraction every three to four days, depending on the plant. The extracts were concentrated in different vials for later evaluation.

2.4. In Vitro Evaluation

Newly excysted flukes were obtained by artificial excystment of *F. hepatica* metacercariae. For the evaluation, 5 mg of crude extract of each plant were placed in eppendorf tubes, adding 20 µl of methanol to dissolve the extract and were taken to a concentration of 500 mg/Lt. Culture dishes with 24 wells brand Nunc were used. In

each well were 1.6 ml of complete medium (RPMI/bovine serum), 0.2 ml of solubilized extract and 0.2 ml containing 10 flukes. On each plate, 4 control wells were used without treatment containing only the solvent used to dissolve the extracts. In this way the vegetable extracts were tested in quadruplicate and plant extracts that showed activity were reevaluated 7 times to ensure good results. Each trial remained in incubation at 37°C for 4 days under an atmosphere of 5% of CO₂.

2.5. Interpretation of Test

The flukes were carefully examined on days 1, 2 and 3 using an inverted microscope at 40×. The activity of the extracts was measured by comparing the survival of the treated flukes relative to the untreated control flukes. All procedures were performed under aseptic conditions using a laminar air flow cabinet.

% Efficacy was assessed using the formula (1) below.

When the efficacy rate obtained was above 80%, it was considered that the extract possessed fasciolicide activity.

3. Results and Discussion

(Table 1) Shows the characteristics of the plants used in the *in vitro* tests, here is the scientific name, common name, the site collects, the parts used to make the extract and its uses in traditional medicine.

It was found, as shown in (Table 2), that from the 60 extracts tested, 11 hexane extract, 1 of methanol and 1 acetate had fasciolicide activity, exerting 80% - 100% mortality between 24 - 72 hours post treatment, is worth mentioning that in all trials was used a control group, which survived up to 7 days.

It is important to note that it was the hexane fraction that exhibited the best capacity; we can therefore assume that it is a metabolite or an active principle that is common in these plants that produce this fasciolicide effect [18].

Finally in (Table 3) shows the plants that had the greatest effect fasciolicide.

These extracts were made from the stems, flowers and leaves of the plants tested avoiding the use of roots which may contain toxic parts of the plant in question [19].

When revising the flukes with the inverted microscope, it was observed that these extracts caused marked relaxation, disintegration of their internal organs and later an imminent disintegration of the body wall. These features

$$\frac{\text{No. of flukes in the control group} - \text{No. of flukes in the treated group}}{\text{No. of the flukes in the control group}} \times 100 \quad (1)$$

Table 1. Medicinal plants used and uses of ethnobotany in Mexico.

Name	Common Name	Ethnobotanical Uses	Part Used	Collection Site
<i>Buddleja cordata</i>	Tepozán	Injured skin problems and inflammation of the skin, digestive disorders, ulcers, sore throat and diuretic.	Leaf and stem	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Cordia alliodora</i>	Cuacamo	Ulcers, cough, scorpion stings, diarrhea, intestinal infections and rheumatism	Leaf and stem	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Mentha piperita</i>	Mantha	Analgesic, antiseptic, choleric, antispasmodic, anthelmintic and antiparasitic	Leaf and stem	Cuernavaca Morelos
<i>Hedeoma piperitum</i> Benth	Hierba blanca	Gingivitis, diarrhea, dysentery white, parasites, worms and amoebas	Leaf and stem	Cuernavaca Morelos
<i>Portulaca oleraceae</i> L.	Holz de Jalapa	Intestinal Parasites	Leaf and stem	Cuernavaca Morelos
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	Gastrointestinal Disorders, vermifuge, disinfectant, expectorant,	Leaf and stem	Cuernavaca Morelos
<i>Ruta chalepensis</i>	Ruda	Toothache, diarrhea, worms, amoeba, indigestion, amoeba, stomach pain, constipation.	Leaf and stem/flower	Cuernavaca Morelos
<i>Achillea millefolium</i>	Plamajillo	Antispasmodic, anti-inflammatory, astringent, digestive, carminative, choleric, antirheumatic,	Leaf and stem/flower	Cuernavaca Morelos
<i>Lippia graveolens</i>	Orégano	Cough, colds and bronchitis, expectorant, stomach cramps, diarrhea and digestion.	Leaf and stem	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Gymnospermaglutinosum</i>	Popote	Rheumatism, fever, diarrhea, yellow fever, diuretic, antimalarial, digitalis and antiseptic.	Leaf and stem/flower	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Argemone ochroleuca</i>	Espinillo	Scabies, warts, bad bile, headache, rheumatism, antispasmodic and narcotic.	Leaf and stem/flower	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Artemisia mexicana</i>	Estafiate	Healing, dysmenorrhea, deworming, bronchitis, vomiting, antiseptic.	Leaf and stem	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Jussiaea sparganaria</i>	Mucile	Diarrhea and white dysentery. In respiratory disorders, headaches and kidney	Leaf and stem	Cuernavaca Morelos
<i>Populus alba</i>	Alamo	Urinary tract infections, sciatica, digestive problems, analgesic, anti-inflammatory, astringent, healing, diuretic, vermifuge.	Leaf and stem	Cuernavaca Morelos
<i>Chenopodium graveolens</i>	Epazote de zorrillo	Anthelmintic, diarrhea, amoebiasis, dysentery, indigestion,	Leaf and stem	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Limpia crinitodora</i>	Cedron	Digestive, dyspepsia, Menstrual pain, nerve damage	Leaf and stem	Cuernavaca Morelos
<i>Artemisia abrotanum</i>	Ajenjo	Protective action on liver and bad gallbladder antispasmodic, diuretic and dewormer.	Leaf and stem	Zapotitlán Salinas Puebla
<i>Sweetenahumilis</i>	Semilla de zopilote	Expel parasites, indigestion, bad bile, vermifuge.	Leaf and stem	Cuernavaca Morelos
<i>Jacquinia macrocarpa</i>	Palo santo	Expel parasites, diarrhea, colic, dysentery, cough and asthma.	Leaf and stem	Cuernavaca Morelos
<i>Castela tortuosa</i>	Chaparro amargo	Intestinal antiparasitic, dysentery, chronic diarrhea, tenderness in the liver region.	Leaf and stem	Zapotitlán Salinas Puebla

Table 2. Effectiveness as a percentage of fasciolicide effect on the fractions of the plant used at a concentration of 500 mg/Lt.

Plant	Fraction	Efficacy 1 day	Efficacy 2 day	Efficacy 3 day	Flukes total
<i>Buddleja cordata</i>	Hexane	0%	0%	0%	40
(tepozán)	Ethyl acetate	0%	0%	0%	40
	Methanol	0%	0%	0%	40
<i>Cordia elaeagnoides</i>	Hexane	0%	10%	10%	40
(cuzcuzmo)	Ethyl acetate	0%	0%	0%	40
	Methanol	0%	0%	0%	40
<i>Mentha piperita</i>	Hexane	100%	100%	100%	70
(Menta)	Ethyl acetate	0%	10%	10%	40
	Methanol	0%	0%	0%	40
<i>Hedeoma piperitum</i>	Hexane	10%	20%	30%	50
(Hierba blanca)	Ethylacetate	0%	0%	0%	40
	Methanol	0%	0%	10%	40
<i>Portlandia ghiesbreghtiana</i>	Hexane	20%	20%	30%	50
(hoja de jalapa)	Ethyl acetate	0%	10%	20%	50
	Methanol	0%	0%	10%	40
<i>Achillea millefolium</i>	Hexane	100%	100%	100%	70
(plumajillo)	Ethyl acetate	10%	10%	10%	40
	methanol	10%	20%	20%	40
<i>Lappia graveolens</i>	Hexane	100%	100%	100%	70
(oregano)	Ethyl acetate	0%	10%	10%	40
	Methanol	10%	10%	10%	40
<i>Gymnosperma glutinosum</i>	Hexane	0%	0%	0%	40
(popoto)	Ethyl acetate	0%	0%	0%	40
	Methanol	0%	0%	0%	40
<i>Argemone ochroleuca</i>	Hexane	0%	0%	10%	40
(aspinillo)	Ethyl acetate	0%	0%	0%	40
	Methanol	0%	10%	10%	40
<i>Artemisia mexicana</i>	Hexane	94%	100%	100%	70
(estafiate)	Ethyl acetate	10%	20%	20%	40
	Methanol	0%	10%	10%	40
<i>Justicia spicigera</i>	Hexane	100%	100%	100%	70
(muñile)	Ethyl acetate	0%	0%	10%	40
	Methanol	10%	10%	10%	40
<i>Populus alba</i>	Hexane	100%	100%	100%	70
(alamo)	Ethylacetate	0%	10%	10%	40
	Methanol	0%	10%	20%	40
<i>Chenopodium graveolens</i>	Hexane	98%	100%	100%	70
(opazote zorrillo)	Ethylacetate	0%	0%	0%	40
	Methanol	10%	10%	20%	40
<i>Limpia crinitodora</i>	Hexane	70%	80%	88%	70
(cedra)	Ethyl acetate	0%	10%	10%	40
	Methanol	0%	0%	20%	40
<i>Artemisia absinthium</i>	Hexane	98%	100%	100%	70
(njenjo)	Ethyl acetate	10%	10%	10%	40
	Methanol	10%	20%	20%	40
<i>Swieteniahumilis</i>	Hexane	30%	30%	30%	40
(semilla de zapilote)	Ethylacetate	0%	0%	0%	40
	Methanol	10%	10%	10%	40
<i>Jacquinia macrocarpa</i>	Hexane	20%	30%	30%	50
(palo santo)	Ethyl acetate	0%	0%	0%	40
	Methanol	10%	20%	20%	40
<i>Castela tortuosa</i>	Hexane	100%	100%	100%	70
(chaparro amargo)	Ethyl acetate	80%	80%	80%	60
	Methanol	100%	100%	100%	70
<i>Thymus vulgaris</i>	Hexane	97%	98%	100%	70
(Tomillo)	Ethyl acetate	0%	0%	0%	40
	Methanol	0%	0%	0%	40

Table 3. Plants that showed the greatest fasciolicide effect in hexane fraction.

<i>Achilleamillefolium</i> (Plumajillo)
<i>Menthapiperita</i> (Menta)
<i>Lippigraveolens</i> (Orégano)
<i>Jussiaea spicigera</i> (Muñile)
<i>Artemisia mexicana</i> (estafiate)
<i>Populus alba</i> (Alamo)
<i>Artemisia abrotanum</i> (Ajenojo)
<i>Chenopodiumgraveolens</i> (Epezote de zorrillo)
<i>Thymusvulgaris</i> (Tomillo)
<i>Lippia crinitidora</i> (Cedron)
<i>CastelaTortuosa</i> (Chaparrosmargo) In the three fraction (hexane, ethyl acetate and methanol)

are also caused by the effect of commercial fascioliscide; it can therefore be assumed that these extracts can cause similar effects [20-22].

With regard to the other fragments (ethyl acetate and methanol) no notorious fascioliscide activity was detected, since very limited activity (10%) was demonstrated during the testing of the extracts.

It is important to point out that all the flukes from the control group remained in perfect condition during the test; hence, it is a fact that these particular medicinal plants had not been tested using *in vitro* models and that they were used only by a restricted group of people focused on traditional medicine.

Considering the strong evidence of the promising activity exerted under *in vitro* evaluation, it is recommended that further evaluations be carried out to obtain the LD50 for the determination of the active ingredient(s) which produce the fascioliscide activity [13,23].

4. Conclusion

From 60 plant extracts tested under *in vitro* conditions at a concentration of 500 mg/Lt against newly excysted *Fasciola hepatica metacercariae*, 11 from the hexane extracts and 1 ethyl acetate and methanol, showed percentages of 80% to 90% efficacy.

REFERENCES

- [1] F. Ibarra, J. Figueroa and H. Quiroz, "Parasitología Veterinaria Volumen II Helmintos," U.N.A.M., México D.F., 2011.
- [2] Tay and Velasco, "Parasitología Médica," Editorial Méndez, Séptima Edición, México D.F., 2002.
- [3] A. Nari and C. Fiel, "Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos: Bases Epidemiológicas Para su Prevención y Control," Editorial Hemisferio Sur México D.F., 1988.
- [4] F. V. Olaechea, "Fasciola Hepatica," Red de Helminología de FAO para América Latina y el Caribe, Conferencia Electrónica, septiembre 2004, pp. 159-188.
- [5] R. Campos, N. Limón and F. Sáenz, "Efectividad en Ovinos del Albendazol y Oxfendazol Administrados Solos o Combinados Contra Nematodos Resistentes y Susceptibles al Triabendazol," *Téc. Pecuaria en México*, 1997.
- [6] J. Díaz, "Índice y Sinonimias de las Plantas Medicinales de México. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales," Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F., 1976.
- [7] T. Hernández, M. Canales, J. Ávila, A. Duran, J. Caballero, A. Romo de Vivar and R. Lira, "Ethnobotany and Antibacterial Activity of Some Plants Used in Traditional Medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México)," *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 88, No. 2-3, 2003, pp. 181-188.
- [8] T. Hernández, M. Canales, J. Avila, A. Garcia, A. Martinez, J. Caballero, A. Romo de Vivar and R. Lira, "Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae)," *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 96, No. 3, 2005, pp. 551-554. doi:10.1016/j.jep.2004.09.044
- [9] M. Martínez, "Las Plantas Medicinales de México," Ediciones Botas., México, 1989.
- [10] M.Pascual, K. Slowing, E. Carretero, D. Sánchez Mata, A. Villar, "Lippia: Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology," *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 76, No. 3, 2011, pp. 201-214. doi:10.1016/S0378-8741(01)00234-3
- [11] G. Soria Rocha, "Descripción de Especies Vegetales de la Selva Baja Caducifolia del Cañón de Los Lobos, Municipio de Yauatepec, Morelos," Programa Florístico-Ecológico, UAEM, México, 1985, pp. 163.
- [12] J. Rzedowski, "Vegetación de México," LIMUSA, México, 1978, p. 472.
- [13] Lock, "Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios," Capítulo IV, Pontificia Universidad Católica de Perú, 1997. <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf>
- [14] J. Vecrucusse, P. Holdsworth, T. Letonia, D. Barth, G. Conder and K. Hamamoto, "International Harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines," *Veterinary Parasitology*, Vol. 96, No. 6, 2001, pp. 171-193. doi:10.1016/S0304-4017(00)00443-X
- [15] P. Rodríguez, P. Castillo and S. Estrada, "Actividad Espasmolítica de Algunas Especies de Plantas Medicinales del estado de Morelos," México Facultad de Farmacia y Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuba farmacia 2004, VI Encuentro Iberoamericano Sobre las Ciencias

- Farmacéuticas y Alimentarias, 2004.
- [16] M. Columba and E. Castillo, "Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos," Universidad Autónoma del estado de Morelos Conabio, Mexico, 2007, p. 405.
- [17] O. F. Ibarra and D. C. Jenkins "An *in Vitro* Screen for New Fasciolicidal Agents," *Parasitology Research*, Vol. 70, No. 5, 1984, pp. 655-661. [doi:10.1007/BF00926594](https://doi.org/10.1007/BF00926594)
<http://www.springerlink.com/content/h2321x15g416f701/fulltext.pdf>
- [18] R. Pérez, "Actividad Antimicrobiana de *Oedogonium capillare*," *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 30, No. 3, 2007, pp. 26-29.
<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/579/57938305.pdf>
- [19] G. Domínguez, M. Ángel and B. Aguilar, "El Mercado de Plantas Medicinales en México Situación Actual y Perspectivas de Desarrollo," 2004.
<http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-003.html>
- [20] N. Rivera, F. Ibarra, A. Zepeda, T. Fortoul, G. Cantó, A. Hernández and R. Castillo, "The Effect of the 5-Chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylony)-1H-benzimidazole Called Compound Alpha on the Tegument of Immature *Fasciola hepatica* in Its Natural Host," *Parasitology Research*, Vol. 95, 2005, pp. 379-382. [doi:10.1007/s00436-005-1304-z](https://doi.org/10.1007/s00436-005-1304-z)
- [21] N. Rivera, F. Ibarra, A. Zepeda, T. Fortoul, A. Hernández, R. Castillo, "Tegumental Surface Changes in Adult *Fasciola hepatica* Following Treatment *in Vitro* and *in Vivo* with an Experimental Fasciolicide," *Parasitology Research*, Vol. 93, 2004, pp. 283-286.
[doi:10.1007/s00436-004-1127-3](https://doi.org/10.1007/s00436-004-1127-3)
- [22] I. Fairweather and J. C. Boray, "Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and Its Management," *Veterinary Journal*, Vol. 158, No. 2, 1999, pp. 81-112.
[doi:10.1053/vjil.1999.0377](https://doi.org/10.1053/vjil.1999.0377)
- [23] K. Ellen and R. Silbergeld, "Toxicología Herramientas y Enfoques," 2000
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/33.pdf>

ISSN: 2158-2742

Vol. 3, No. 7, July 2012



Scientific
Research

American Journal of Plant Sciences



ISSN: 2158-2742



9 772158 274008 07

www.scirp.org/journal/ajps

Obtaining the Minimum Lethal Dose against *Fasciola hepatica* *In Vitro* Using Plant Extract Hexanes with Fasciolicide Activity and Toxicity Evaluation on CD1 Male Mice

Stephanie Ibarra-Moreno^{1,2*}, Froylan Ibarra-Velarde¹, Jose Guillermo Avila-Acevedo²

¹Depto de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria, Y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria, México D.F., México; ²Lab. de Fitoquímica, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, Avenida de los Barrios S/N Tlalnapantla de Baz, Edo. de México.

Email: *stephibamor@hotmail.com

Received January 11th, 2012; revised February 19th, 2012; accepted March 16th, 2012

ABSTRACT

Fascioliasis is a parasitic disease of worldwide distribution affecting mainly cattle and sheep. Its importance lies in the economic losses it produces in the livestock industry. Its control is carried out by using a chemical fasciolicide showing resistance problems and environmental contamination. Looking for an alternative control for this disease the present study was aimed at determining the hexane anti-*Fasciola hepatica* in the *in vitro* effect of some plant extracts and the minimum lethal dose of the mentioned extracts. All selected plants were tested *in vitro* at concentrations of 500, 250, 125 and 50 mg/L: *Achillea millefolium* (plumajillo), *Artemisia absinthium* (wormwood), *Artemisia mexicana* (estafiate), *Castelartortuosa* (chaparromargo), *Chenopodium graveolens* (epazote de zorrillo), *Gymnospermaglutinosum* (popote) *Justicia spicigera* (muicle), *Limpia critridora* (cedron), *Lippiagraveolens* (oregano), *Menthapiperita* (Mint), *Populus alba* (alamo) and *Thymus vulgaris* (thyme). Subsequently proceeded to perform a toxicity study with these fractions in CD1 male mice 10 - 13 weeks of age, forming groups of 3 - 5 animals they were administered a single oral dose being (5 mg/kg, 50 mg/kg, 500 mg/kg, 2500 mg/kg and 5000 mg/kg) and were kept under observation 20 days, later were sacrificed and a kidney and liver histology was performed, finding the safety of the extracts. To perform the toxicity study with these fractions, groups of five CD1 male-mice were formed, they were treated with oral doses of 5, 50, 500, 2500 and 5000 mg/kg, administered with a cannule. All mice were kept under observation for 20 days. Finally they were sacrificed to perform histology of the kidney and liver in search of possible side effects. Results show that none of the extracts exhibited that fasciolicide activity for mice CD1 even at the highest dose therefore finding the safety of the extracts.

Keywords: *Fasciola hepatica*; Plant Extracts; *In Vitro*; Minimum Lethal Dose; Toxicity

1. Introduction

Fascioliasis is a parasitic disease of worldwide distribution [1]. It is due to the action of the liver fluke *Fasciola hepatica*, which affects primarily cattle and sheep and other animal species including humans [2]. Its importance lies in the resulting economic losses it produces in the livestock industry, which can be reduced through chemical treatment of livestock [3,4].

Over the years the private industry has tried to improve diagnostic methods and promote the production of more effective drugs with the purpose of obtaining a comprehensive control of this trematodosis [5,6]. How-

ever, since the parasites eventually develop resistance to these drugs, alternative methods such as the study of active substances of several plants with anthelmintic properties were considered essential to study [7].

Mexico is the fourth place worldwide in floristic diversity with more than 25,000 recorded species, of the 250,000 that exist in the world and there are estimated to be 30,000 more within the national-territory; the country's forest area comprises 73.3% of its territory. Moreover, there are over 6000 species of medicinal plants reported so far [8,9].

Based on ethnobotanical studies we have found different plants used in Mexican traditional medicine against dysentery, vomiting, vermifuge, nausea, poor absorption,

*Corresponding author.

diarrhea, indigestion, etc. [10,11]. From these plants we have processed hexane extracts which were previously tested in an *in vitro* model against immature stages of *Fasciola hepatica*, yielding an efficiency of between 80% - 100% in the first 3 days at a concentration of 500 mg/Lt [12]. The following plants were selected for screening:

Achillea millefolium (plumajillo)
Artemisia absinthium (wormwood)
Artemisia mexicana (estafiate)
Castela tortuosa (chaparro amargo)
Chenopodium graveolens (epazote de zorrillo)
Gymnospermaglutinosum (popote)
Justicia spicigera (muicle)
Limpia crithidora (cedron)
Lippia graveolens (oregano)
Menthapiperita (mint)
Populus alba (alamo)
Thymus vulgaris (thyme)

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of Plant Extracts

The plant parts (leaves, flowers and stems) were extracted with a hexane solvent using a rota-evaporator. Then 3 distillations were performed every 3 - 4 days depending on the plant. The extracts were concentrated in different vials for later evaluation.

2.2. In Vitro Fasciolicide Evaluation of the Minimum Lethal Dose with Hexane Extracts

These evaluations were conducted in the Experimental

$$\frac{\text{No. of flukes in the control group} - \text{No. of flukes in the treated group}}{\text{No. of the flukes in the control group}} \times 100$$

2.6. Evaluation of Acute Toxicity in Mice CD1

CD1 male mice were formed in groups of 5 animals each. They were treated with different oral doses of the extracts previously selected. We use CD1 mice because they are strong, economical, easily produced and used in biological assays or in preliminary studies where the specific genotype is not important.

Extracts were prepared as a suspension/solution at concentrations of 500 mg/L, 250 mg/L, 125 mg/L and 50 mg/L, 2 - 5 μ l absolute alcohol was used to dissolve the extract plus 995 - 998 μ l of methyl cellulose as a vehicle. The suspension was administered with a cannule and the mice were under observation for 20 days (appetite, hair, motor activity, mucous etc.). The untreated control group (n = 6) dosed only with absolute alcohol + methyl cellulose was also observed in the same manner. Finally mice were sacrificed to carry out the histopathology of the

Chemotherapy Laboratory, Department of Parasitology, College of Veterinary Medicine of the National Autonomous University of Mexico (Figure 1).

2.3. Preparation of Plant Extracts for Evaluation

5 mg of extract were placed in vials of 30 ml. Then the corresponding dilutions were prepared so as to obtain the concentrations required for the anti-*Fasciola hepatica* biological evaluation, these being (500 mg/L, 250 mg/L, 125 mg/L and 50 mg/L).

2.4. Operation of the Test for Screening

Culture dishes of 24 Nunc brand wells were used. For each well 1.6 ml of complete medium there was deposited 0.2 ml of a solubilized extract and 0.2 ml containing 10 newly excysted flukes per well. Each trial remained in incubation for 4 days at 37°C under an atmosphere of 5% CO₂.

2.5. Interpretation of the Test

The flukes were examined carefully on days 1, 2 and 3 using an inverted microscope at 40 \times . The activity of the extracts was assessed by a comparison of the surviving treated flukes with the untreated control flukes. All procedures were performed under sterile conditions using a laminar flow cabinet, as previously described by Rivera [13].

% Efficacy was assessed using the following formula [14]:

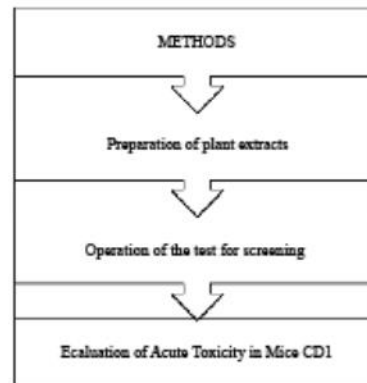


Figure 1. Methodology.

liver and kidney searching for possible toxic side effects.

3. Results and Discussion

Table 1 shows the *in vitro* fasciolicide activity of the hexanes plant extracts here is the scientific name, common name, number of flukes used, concentration used, and effectiveness for three days.

It is important to note only the hexane fraction was used in these trials because this fraction was shown to have the most effective in previous trials [15] and we can therefore assume that it is a metabolite or an active principle that is common in these plants that produce this

fasciolicide effect. It was found, as shown in (Table 2) the minimum lethal dose of hexane extracts with fasciolicide activity in percent. Finally it is shown in (Table 2) the toxicity of hexane extracts in CD1 male mice for 20 days. In all *in vitro* tests were no controls with the same amount of solvent to solubilize the extracts and always remained alive for up to 7 days and in the same way the control mice remained healthy with methyl cellulose as a vehicle utilized.

Plants are a resource for obtaining new drugs and treatments for existing parasitic diseases in our country. [9,14,15] Ethnobotanical studies are very useful to locate

Table 1. *In vitro* fasciolicide activity of the hexanes plant extracts.

Plant	Total flukes	Concentration	1 Day efficacy	2 Day efficacy	3 Day efficacy	Part of the plant used
<i>Achillea millefolium</i> (Plumajillo)	70	500 mg/L	100%	100%	100%	Leaf, flower stem
	70	250 mg/L	100%	100%	100%	
	70	125 mg/L	100%	100%	100%	
	40	50 mg/L	0%	0%	10%	
<i>Artemisia absinthium</i> (wormwood)	70	500 mg/L	98%	100%	100%	Leaf and stem
	70	250 mg/L	70%	100%	100%	
	40	125 mg/L	0%	0%	10%	
<i>Artemisia mexicana</i> (costafina)	70	500 mg/L	94%	100%	100%	Leaf and stem
	70	250 mg/L	80%	100%	100%	
	70	125 mg/L	60%	100%	100%	
	40	50 mg/L	0%	0%	0%	
<i>Castelortuosa</i> (chaparroamarago)	70	500 mg/L	100%	100%	100%	Leaf and stem
	60	250 mg/L	100%	100%	100%	
	40	125 mg/L	80%	100%	100%	
	40	50 mg/L	0%	0%	0%	
<i>Chenopodium graveolens</i> (apazote de zorrillo)	60	500 mg/L	98%	100%	100%	Leaf, flower and stem
	40	250 mg/L	0%	0%	10%	
	20	125 mg/L	0%	0%	0%	
<i>Gymnospermaglutinosum</i> (Popote)	60	500 mg/L	60%	100%	100%	Leaf and stem
	40	250 mg/L	0%	10%	20%	
	20	125 mg/L	0%	0%	0%	
<i>Justicia spicigera</i> (Muñcla)	60	500 mg/L	100%	100%	100%	Leaf and stem
	70	250 mg/L	80%	100%	100%	
	40	125 mg/L	0%	0%	0%	
<i>Limpicacitridora</i> (Cadrón)	60	500 mg/L	70%	80%	88%	Leaf and stem
	60	250 mg/L	0%	0%	0%	
<i>Lippigraveolens</i> (oregano)	60	500 mg/L	100%	100%	100%	Leaf and stem
	70	250 mg/L	80%	90%	100%	
	40	125 mg/L	0%	10%	10%	
<i>Mentha piperita</i> (Mint)	70	500 mg/L	100%	100%	100%	Leaf and stem
	70	250 mg/L	80%	100%	100%	
	70	125 mg/L	60%	100%	100%	
	40	50 mg/L	0%	0%	0%	
<i>Populus alba</i> (Álamo)	60	500 mg/L	100%	100%	100%	Leaf and stem
	40	250 mg/L	0%	20%	20%	
	20	125 mg/L	0%	0%	0%	
<i>Thymus vulgaris</i> (thyme)	70	500 mg/L	71%	88%	99%	Leaf, flower and stem
	60	250 mg/L	0%	0%	0%	
	20	125 mg/L	0%	0%	0%	

Table 2. Minimum lethal dose of hexane extracts with fasciolicide activity (*in vitro* model).

Extract hexanic	Minimum lethal dose <i>in vitro</i> (%)
<i>Achilleamillefolium</i> (plumajillo)	125 mg/L
<i>Artemisia mexicana</i> (estafiate)	125 mg/L
<i>Castela tortuosa</i> (chaparro amargo)	125 mg/L
<i>Menthapiperita</i> (manza)	125 mg/L
<i>Justicia spicigera</i> (muicla)	250 mg/L
<i>Lippiagraveolens</i> (oregano)	250 mg/L
<i>Artemisia absinthium</i> (Ajuajo)	500 mg/L
<i>Chenopodiumgraveolens</i> (apazote de zorrillo)	500 mg/L
<i>Gymnospermaglutinosum</i> (Popota)	500 mg/L
<i>Limpiacritridora</i> (Cadron)	500 mg/L
<i>Populus alba</i> (alamo)	500 mg/L
<i>Thymusvulgaris</i> (tomillo)	500 mg/L

plants as possible prospects for the use of new antiparasitic drugs [10,14,16]. Various plants had previously been studied, obtained and processed to find several hexane extracts with fasciolicide activity in the *in vitro* model [15].

Thus in the present study we worked with these same extracts at different concentrations to find the minimum lethal dose *in vitro* since it was found that not all the hexane extracts had the same fasciolicide activity [15].

The results obtained showed that *Achilleamillefolium*, *Artemisia Mexicana*, *Castelatortuosa*, *Menthapiperita*, have a minimal lethal dose of 125 mg/L. *Justiciaspicigera* and *Lippiagraveolens* have a 250 mg/L activity. *Artemisia absinthium*, *Chenopodiumgraveolens*, *Gymnospermaglutinosum*, *Limpiacritridora*, *Populusalba* and *Thymus vulgaris*, have an activity of 500 mg/L respectively (Tables 1, 2). These results were obtained by means of different repeated tests *in vitro* model [17,18].

Then we proceeded to perform a toxicity study by forming various groups using different concentrations of the extracts above. It was found that none of the extracts led to the death of the treated mice. They were observed for 20 days noting their physical appearance and behavior, and it was observed that there was no difference between the control group and the treated group (Table 3) [19,20].

To ensure their safety the mice with the highest dose of extract (5000 mg/kg) were submitted to liver and kidney histopathology and no damage was found to any of the above mentioned organs [21].

Table 3. Toxicity of hexane extracts in CD1 male mice for 20 days.

Extract	Dose used	Animal number	State of the animal
<i>Achilleamillefolium</i> (Plumajillo)	0.5 mg/kg	3	Good
	5 mg/kg	3	Good
	50 mg/kg	5	Good
	500 mg/kg	5	Good
	5000 mg/kg	5	Good
<i>Artemisia absinthium</i> (Ajuajo)	0.5 mg/kg	3	Good
	5 mg/kg	3	Good
	50 mg/kg	5	Good
	500 mg/kg	5	Good
	5000 mg/kg	5	Good
<i>Artemisia mexicana</i> (Estafiate)	0.5 mg/kg	3	Good
	5 mg/kg	3	Good
	50 mg/kg	5	Good
	500 mg/kg	5	Good
	5000 mg/kg	5	Good
<i>Castela tortuosa</i> (Chaparro amargo)	0.5 mg/kg	3	Good
	5 mg/kg	3	Good
	50 mg/kg	5	Good
	500 mg/kg	5	Good
	5000 mg/kg	5	Good
<i>Justicia spicigera</i> (muicla)	0.5 mg/kg	3	Good
	5 mg/kg	3	Good
	50 mg/kg	5	Good
	500 mg/kg	5	Good
	5000 mg/kg	5	Good
<i>Lippiagraveolens</i> (Oregano)	0.5 mg/kg	3	Good
	5 mg/kg	3	Good
	50 mg/kg	5	Good
	500 mg/kg	5	Good
	5000 mg/kg	5	Good
<i>Menthapiperita</i> (Manza)	0.5 mg/kg	3	Good
	5 mg/kg	3	Good
	50 mg/kg	5	Good
	500 mg/kg	5	Good
	5000 mg/kg	5	Good
<i>Populus alba</i> (Alamo)	0.5 mg/kg	3	Good
	5 mg/kg	3	Good
	50 mg/kg	5	Good
	500 mg/kg	5	Good
	5000 mg/kg	5	Good
<i>Thymusvulgaris</i> (Tomillo)	0.5 mg/kg	3	Good
	5 mg/kg	3	Good
	50 mg/kg	5	Good
	500 mg/kg	5	Good
	5000 mg/kg	5	Good

Considering these promising results under *in vitro* conditions and being certain that they are not toxic to mammals we propose that these extracts on the definitive host of these parasites, viz., sheep and cattle be tested [21,22].

4. Conclusion

Our results are promising and suggest carrying tests *in*

vivo in the definitive host of *Fasciola hepatica* (cattle or sheep) and do a phytochemical study from plants showed more effective.

5. Acknowledgements

This study is supported by project PAPPIT.

REFERENCES

- [1] Basso y Nilda, "Bases de la Parasitología Veterinaria," Hemisferio Sur, México, 1992, p. 157.
- [2] F. Ibarra, J. Figueroa and H. Quiroz, "Parasitología Veterinaria Volumen II Helmintos," UNAM, México D.F., 2011.
- [3] Tay and Velasco, "Parasitología Médica," Editorial Mendez, Séptima Edición, México D.F., 2002
- [4] A. Nari and C. Fiel, "Enfermedades Parasitarias de Importancia Económica en Bovinos: Bases Epidemiológicas para su Prevención y Control," Editorial Hemisferio Sur México D.F., 1988.
- [5] F. Froylán, N. Montenegro, Y. Vera, R. Castillo, A. Hernández and P. Ochoa, "Eficacia Comparativa de un Fasciolocida Experimental, Triclabendazol y Closantel en Bovinos Infectados en Forma Natural con *Fasciola hepatica*," *Veterinaria México*, Vol. 33, No. 3, 2002, pp. 237-245.
- [6] F. Froylán, N. Montenegro, J. Flores, A. Hernández and R. Castillo, "Evaluación de Cuatro Vehículos para Formular un Fasciolocida Experimental," *Veterinaria México*, Vol. 1, No. 1, 2000, pp. 1-7.
- [7] F. H. M. Borgsteede, "Gastrointestinal Helminthiasis: Anthelmintic Resistance and How to Prevent and Control," *Symposium Parasitology International*, Vol. 47, 1998, pp. 23-48.
- [8] J. Rzedowski, "Vegetación de México," LIMUSA, México, 1978, p. 472.
- [9] J. Díaz, "Índice y Sinonimias de las Plantas Medicinales de México. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales," Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F., 1976.
- [10] M. Columba and E. Castillo, "Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos," Universidad Autónoma del estado de Morelos Conabio, Mexico, 2007, p. 405.
- [11] G. Domínguez, M. Ángel and B. Aguilar, "El Mercado de Plantas Medicinales en México Situación Actual y Perspectivas de Desarrollo," 2004. <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-003.html>
- [12] J. Vercurryse, P. Holdsworth, T. Letonia, D. Barth, G. Conder and K. Hamamoto, "International Harmonisation of Anthelmintic Efficacy Guidelines," *Veterinary Parasitology*, Vol. 96, No. 6, 2001, pp. 171-193. [doi:10.1016/S0304-4017\(00\)00443-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00443-X)
- [13] N. Rivera, F. Ibarra, A. Zepeda, T. Fortoul, A. Hernandez and R. Castillo, "Tegumental Surface Changes in Adult *Fasciola hepatica* Following Treatment *In Vitro* and *In Vivo* with an Experimental Fasciolicide," *Parasitology Research*, Vol. 93, No. 4, 2004, pp. 283-286. [doi:10.1007/s00436-004-1127-3](https://doi.org/10.1007/s00436-004-1127-3)
- [14] F. Ibarra and D. C. Jenkins, "An *In Vitro* Screen for New Fasciolocidal Agents," *Parasitology Research*, Vol. 70, No. 5, 1984, pp. 655-661. [doi:10.1007/BF00926594](https://doi.org/10.1007/BF00926594) <http://www.springerlink.com/content/h2321x15g416r701/fulltext.pdf>
- [15] S. Ibarra-Moreno, F. Ibarra and J. G. Avila, "In Vitro Evaluation of Fasciolicide Activity with Hexane, Metanol and Ethyl Acetate with Extracts Processed and Obtained from Some Mexican Plants Used in Traditional Medicine Based on Ethno Botanical Studies," *American Journal of Plant Sciences (AJPS)*, Vol. 3, No. 4, 2012, pp. 506-511.
- [16] T. Hernández, M. Canales, J. G. Avila, A. Duran, J. Caballero, A. Romo de Vivar and R. Lira, "Ethnobotany and Antibacterialactivity of Someplantsused in Traditional Medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México)," *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 88, No. 2, 2003, pp. 181-188.
- [17] M.Pascual, K. Slowing, E. Carretero, D. Sánchez Mata and A. Villar, "Lippia: Traditional Uses, Chemistry and Pharmacology," *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 76, No. 3, 2011, pp. 201-214. [doi:10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)
- [18] D. Bahuaud, C. Martinez-Ortiz de Montellano, S. Chauveau, F. Prevot, F. Torres-Acosta, I. Fouraste and H. Hoste, "Effects of Four Tanniferous Plant Extracts on the *In Vitro* Exsheathment of Third-Stage Larvae of Parasitic Nematodes," *Parasitology*, Vol. 132, No. 6, 2005, pp. 545-554.
- [19] M. Sachana and A. J. Hargreaves, "Toxicological Testing *In Vitro* and *In Vivo* Models. En: Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles," Academic Press, New York, 2007. <http://www.ropana.cl/Toxivet/Relacion%20Dosis-Respuesta.htm>
- [20] C. Klaaseen and J. Watkins III, "Fundamentos de Toxicología," Mc Graw Hill Interamericana, México, 2005, p. 536.
- [21] A. Lagarto, J. Tillán, R. Vega and Y. Cabera, "Toxicidad Aguda oral de Extractos Hidroalcohólicos de Plantas Medicinales," *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Vol. 1, No. 4, 1999, pp. 8-26.
- [22] M. Rivera, L. Macías, M. Tinoco, I. García and I. Ruiz, "Toxicidad Aguda en rata y Ratón de la Casiopeína (gli)," 2do. Congreso Nacional de Química Médica (CNQM) 2000.

Presenta:

Stephanie Ibarra Moreno

La estancia fue realizada en la Unidad de Helmintos del Servicio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III. Durante la misma, se me entreno en técnicas básicas de biología molecular aplicadas en el control de la fasciolosis producidas por *Fasciola hepatica*, el nombre del Proyecto es: “Caracterización de cDNAs de *Fasciola hepatica* de interés diagnóstico y/o vacunal” a cargo de la Dra. Teresa Garate.

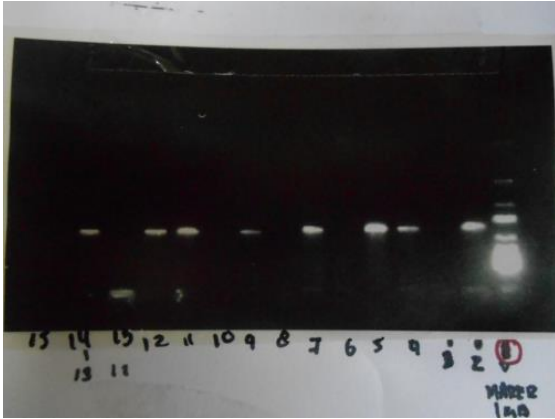
Actualmente dicho laboratorio se dedica a purificar las catepsinas L, las cuales son productos secretados por *Fasciola hepatica* y son muy utilizadas para el inmunodiagnóstico desde muy temprana la infección (a partir de los 10 días), de ahí su importancia de tenerlas de forma aislada, las más conocidas son ProCl1, ProCl2, ProCl3, ProCl4 y ProCl5, con esta última se empezó a trabajar a partir de un molde de ADNc de adulto de *Fasciola hepatica* sintetizados el 28-10-2010, primeramente se clonaron en un vector pGEM-T easy. Cabe notar que la proCl5 posee un péptido señal, con sitio de corte entre las pos 15 y 16 VFA-SN y es casi idéntica al inicio y al final a la ProCl1, a la hora de secuenciar y asegurar que es la ProCl5 se tiene una base de datos y su código es llamado Blast = AF271385.1 y en el Genbank= AAF76330 pero es muy escasa por lo que es muy difícil encontrarla y se necesitan muchas restricciones a la hora de realizar los PCR.

Los cebadores que se utilizaron en esta primera clonación fueron:

For ProCl5 Td: TCAAATGACGATTTGTGGCATCAATGGAAGCGA

Rev ProCl5 Td: TCACGGAAATTGTGCCACCATCGGGACA

Se necesitó de tres ensayos para finalmente obtenerla y se trabajó con la colonia 13, para comprobar que no hubiera mutaciones de procedió a alinear dicha colonia junto a la orf de la ProCl5 .



TCAAATGACGATTTTGTGGCATCAATGGAAAGCGAATTTTCAATAAAGAATACAATGGAGCT Majority
 10 20 30 40 50 60
 1 TCAAATGACGATTTTGTGGCATCAATGGAAAGCGAATTTTCAATAAAGAATACAATGGAGCT AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 1 TCAAATGACGATTTTGTGGCATCAATGGAAAGCGAATTTTCAATAAAGAATACAATGGAGCT Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 GACCGATGACCAACAGAGAAAATATTTGGGAAACAAAATGTGAAAATATATCCAAAGAAACAACA Majority
 70 80 90 100 110 120
 61 GACCGATGACCAACAGAGAAAATATTTGGGAAACAAAATGTGAAAATATATCCAAAGAAACAACA AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 61 GACCGATGACCAACAGAGAAAATATTTGGGAAACAAAATGTGAAAATATATCCAAAGAAACAACA Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 CTGGCCCAACATCTCGGTCCTGCTACCTACAAGTTGGGAAATGAAACCAATTCACCCGATATG Majority
 130 140 150 160 170 180
 121 CTGGCCCAACATCTCGGTCCTGCTACCTACAAGTTGGGAAATGAAACCAATTCACCCGATATG AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 121 CTGGCCCAACATCTCGGTCCTGCTACCTACAAGTTGGGAAATGAAACCAATTCACCCGATATG Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 ACATTCGAGGCAATTCAAAAGCCAAAATATCTAAACAAGAAATGCCACGCGCGCTCTGAGTTACTC Majority
 190 200 210 220 230 240
 181 ACATTCGAGGCAATTCAAAAGCCAAAATATCTAAACAAGAAATGCCACGCGCGCTCTGAGTTACTC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 181 ACATTCGAGGCAATTCAAAAGCCAAAATATCTAAACAAGAAATGCCACGCGCGCTCTGAGTTACTC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 TCAACACGGTATCCCATATAAGGCTAAACAAGCGTGTGTATCCCGACAGAAATGACTGGCGCTC Majority
 250 260 270 280 290 300
 241 TCAACACGGTATCCCATATAAGGCTAAACAAGCGTGTGTATCCCGACAGAAATGACTGGCGCTC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 241 TCAACACGGTATCCCATATAAGGCTAAACAAGCGTGTGTATCCCGACAGAAATGACTGGCGCTC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 GAATCCGGTTATGTGACGGGAGGTTGAAAGATCAGGGGAGGCTGTGGTTCTTGTGGGCTTCTC Majority
 310 320 330 340 350 360
 381 GAATCCGGTTATGTGACGGGAGGTTGAAAGATCAGGGGAGGCTGTGGTTCTTGTGGGCTTCTC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 381 GAATCCGGTTATGTGACGGGAGGTTGAAAGATCAGGGGAGGCTGTGGTTCTTGTGGGCTTCTC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 TCAAACAAGGCTATGGAAGGACAGTATATGAAAAACAACAAGAACTAGTATTTCAATTC Majority
 370 380 390 400 410 420
 361 TCAAACAAGGCTATGGAAGGACAGTATATGAAAAACAACAAGAACTAGTATTTCAATTC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 361 TCAAACAAGGCTATGGAAGGACAGTATATGAAAAACAACAAGAACTAGTATTTCAATTC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 TCTGAACAAACAAGTGTGATTTGAGCCCTGATTTTGGCAATTTATGCTTGTAAATGGTGGAA Majority
 430 440 450 460 470 480
 421 TCTGAACAAACAAGTGTGATTTGAGCCCTGATTTTGGCAATTTATGCTTGTAAATGGTGGAA AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 421 TCTGAACAAACAAGTGTGATTTGAGCCCTGATTTTGGCAATTTATGCTTGTAAATGGTGGAA Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 CTAATGCAAAATGCAATATTTGAAACCGATTTGGATTTGGCAAAACCGAGTCTTCTTAT Majority
 490 500 510 520 530 540
 481 CTAATGCAAAATGCAATATTTGAAACCGATTTGGATTTGGCAAAACCGAGTCTTCTTAT AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 481 CTAATGCAAAATGCAATATTTGAAACCGATTTGGATTTGGCAAAACCGAGTCTTCTTAT Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 CCTTACAGGGCTCTGTGGAAAGCAAGTGTCTATACAACGAGCAGTTGGGAGTGTGCCAAAAGCTC Majority
 550 560 570 580 590 600
 541 CCTTACAGGGCTCTGTGGAAAGCAAGTGTCTATACAACGAGCAGTTGGGAGTGTGCCAAAAGCTC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 541 CCTTACAGGGCTCTGTGGAAAGCAAGTGTCTATACAACGAGCAGTTGGGAGTGTGCCAAAAGCTC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 ACTGGCTACTATACGGTACATTTCTGGAGATGAGGTTAGAAATTTGCAAAATCTAGTGGTGGC Majority
 610 620 630 640 650 660
 681 ACTGGCTACTATACGGTACATTTCTGGAGATGAGGTTAGAAATTTGCAAAATCTAGTGGTGGC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 681 ACTGGCTACTATACGGTACATTTCTGGAGATGAGGTTAGAAATTTGCAAAATCTAGTGGTGGC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 GAAGGACCTGCTGGCGGCTGCTTGGATGTGGAGTCAAGCTTTCATGATGTACAAGGAGTGGCTC Majority
 670 680 690 700 710 720
 661 GAAGGACCTGCTGGCGGCTGCTTGGATGTGGAGTCAAGCTTTCATGATGTACAAGGAGTGGCTC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 661 GAAGGACCTGCTGGCGGCTGCTTGGATGTGGAGTCAAGCTTTCATGATGTACAAGGAGTGGCTC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 ATTTATCAGAGCCAAAATTTGTTACCCGGATCGTTTGAACCATGGAGTGTGGCTGTGCTGGCTC Majority
 730 740 750 760 770 780
 721 ATTTATCAGAGCCAAAATTTGTTACCCGGATCGTTTGAACCATGGAGTGTGGCTGTGCTGGCTC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 721 ATTTATCAGAGCCAAAATTTGTTACCCGGATCGTTTGAACCATGGAGTGTGGCTGTGCTGGCTC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 TATGGAAATCAGGATGGTACTGACTACTGATTGGTGAACCAAGTTGGGAAACGGTGGCTGGC Majority
 790 800 810 820 830 840
 781 TATGGAAATCAGGATGGTACTGACTACTGATTGGTGAACCAAGTTGGGAAACGGTGGCTGGC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 781 TATGGAAATCAGGATGGTACTGACTACTGATTGGTGAACCAAGTTGGGAAACGGTGGCTGGC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 GGTGAGGACGCTTACATTCGAATGGTTAGAAAAGAGGTTAACTGTGTGGAAATTTGCTTCTC Majority
 850 860 870 880 890 900
 841 GGTGAGGACGCTTACATTCGAATGGTTAGAAAAGAGGTTAACTGTGTGGAAATTTGCTTCTC AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 841 GGTGAGGACGCTTACATTCGAATGGTTAGAAAAGAGGTTAACTGTGTGGAAATTTGCTTCTC Consenso_Proc15_col_13 limpia..s
 CTGGCCAGTGTCCCGATGGTGGCACAATTTCCGCTGA Majority
 910 920 930
 921 CTGGCCAGTGTCCCGATGGTGGCACAATTTCCGCTGA AF21385 FML5 SPS OFF.seq
 921 CTGGCCAGTGTCCCGATGGTGGCACAATTTCCGCTGA Consenso_Proc15_col_13 limpia..s

Al observar que fuera idénticas se procedió a la subclonación, en esta caso se requirió la subclonación en dos vectores distintos pRSET A y Pgex6p1 a partir de la colonia 13, los primers utilizados fueron para Pgex6p1:

Forbambh_procl5: GAGAGAGAGGATCCTCAAATGAC

Rprocl5_XhoI3: TCTCTCTCCTCGAGTCACGGAAATTGTGC

Y para PrsetA:

Forbambh_procl5: GAGAGAGAGGATCCTCAAATGAC

Rprocl5_pstI: TCTCTCTCCTGCAGTTCACGGAAATTGTG



Fig. 2.- Colonias positivas con la ligación 3/1 y 5/1 ProCl5 en pgex6p1 (Bahm/Xho)

Se utilizó la colonia 3 y se llevó a cabo el mismo procedimiento.



Fig. 3.- Colonias positivas crecidas en la placa con las ligaciones 1/3 y 1/5 ProCl5 en PrsetA (bahm/PstI1), se utilizó la colonia 9 se llevó a cabo el mismo procedimiento.

Así mismo se participó en la subclonación de la molécula Fh00023 en el vector eucariota PECFP_C1 a partir de la Colonia 13 de Quiagen FH0023, 9/4/13 en Pgent, los cebadores 5 BamH y 3 Sal I de Roche.

Objetivos realizados:

1. Obtención del ADN plasmídico con cepas de *Fasciola hepatica*. Inmaduras de acuerdo con técnicas vacunales.
2. Purificación de ADN plasmídico de *Fasciola hepatica* con la ayuda de técnicas con ayuda de ribonucleasas y comprobando su purificación aplicándole electroforesis de ADN.
3. Se trabajó en la subclonación de cDNAs recién purificado y fraccionado de *Fasciola hepatica* para obtener las partes deseadas para su utilización en las siguientes pruebas, en este caso fueron ProCl5 y FH0023
4. Se trabajó en la técnica del ADN recombinante para regular la expresión génica Expresión de ADN recombinante, para obtener un gran número de copias del

gen de interés, con ayuda de PCR.

5. Se introduzco el ADN recombinante en una célula anfitriona para propagación del cultivo requerido.
6. Se trabajó en el mantenimiento de *in vitro* de *Fasciola hepatica* y *Taenia crassiceps*, para la obtención de cDNAs.