



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**VALORACIÓN *IN VITRO* DE LA EFICACIA ANTI-FASCIOLA DE EXTRACTOS
DE PLANTAS DE VERACRUZ, MEXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JOSÉ MANUEL ALVAREZ MERCADO

Asesores:

MVZ DR. Froylán Ibarra Velarde.

MVZ DR. Miguel Ángel Alonso Díaz.

México, D.F.

2013



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.

DEDICATORIA

A mis padres María Concepción y Mariano quienes me han guiado, aconsejado y sobretodo me han apoyado en cada etapa de mi vida, gracias por todo el cariño y comprensión y sobre todo a enseñarme que no debo rendirme sin importar que tan difícil sea el camino.

A mis hermanos: Mario, Marco Antonio y Edith gracias por tantos recuerdos, risas y demás experiencias que hemos compartido en estos 25 años. Siempre me cuidaron y procuraron aun cuando la diferencia de edades era enorme. Gracias por ser mis ejemplos de vida.

A mis sobrinos: Karen, Víctor Manuel, María Fernanda, Luis Gabriel y Ana Sofía. Espero que el esfuerzo depositado en estas páginas sea un ejemplo para ustedes, nunca se rindan y siempre den su mejor esfuerzo.

A mis tíos: Roberto[†], Reinalda, Teresa[†] y Juan quienes han sido segundos padres para mí. Gracias por todas las atenciones que me han dado no puedo dejar de agradecerles.

Alex Ibarra, Daniella González, Miguel Pardo, Tania Moreno, Adriana Martínez, Emiliano Hernández, Elizabeth Hernández, Argentina Ruiz, Francisco Ramírez, Cinthya Ruiz, Tania Peredo, Sara Rodríguez, Angélica Damián, Vania González, Karina Cervantes, Francisco Osorio, Alejandra Téllez, Alonso Ezeta, Edna Zúñiga, Mario Reyes, Hugo Roque, Adrianita Delgado, Israel Romero y Alejandro Salas...
GRACIAS POR SER LOS MEJORES AMIGOS DEL MUNDO “Ustedes siempre serán mi fortaleza, porque fueron los únicos que conocieron mis debilidades”

Finalmente Adriana de la Parra Rangel, gracias por todo el cariño y apoyo que me das TE QUIERO MUCHO, estás conmigo cuando necesito luchar, eres mi fuerza y mis puños, me abrazas al llorar y escuchas mis inquietudes “*hagamos un trato yo quisiera contar con usted, es tan lindo saber que usted existe, uno se siente vivo*”

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores los doctores Froylán Ibarra Velarde y Miguel Ángel Alonso Díaz, quienes me brindaron su confianza y apoyo incondicional que me han brindado durante la realización de esta tesis, brindándome consejos para mejorar tanto profesional como personalmente. Gracias por confiar en mí.

A mi honorable jurado:

MVZ Arturo Federico Olguín y Bernal.

MVZ Evangelina Romero Callejas.

MVZ Alberto Ramírez Guadarrama.

MVZ Froylán Ibarra Velarde

MVZ David Paez Esquiliano.

A todo el personal técnico y académico del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) y al Departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM, en especial a la Dra. Yolanda Vera Montenegro por apoyarme tanto en tesis como durante mis estudios de licenciatura. Gracias por ser mis maestros durante todos estos años.

A los doctores Guillermo Ávila Acevedo y Ana María García Bores así como a todo el personal del laboratorio de fitoquímica de la FES Iztacala por apoyarme y ayudarme de la manera más atenta y desinteresada, en especial a Stephanie Ibarra Moreno quien me enseñó a desenquistar artificialmente *Fasciola hepatica*.

Al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca de Ayudante de Investigador aprobada como apoyo a miembros de Nivel III del SNI, para desarrollar las actividades concernientes a esta tesis

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) por abrirme sus puertas y dejarme pertenecer a esta gran institución.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.	1
I. INTRODUCCIÓN.	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.	4
2.1 Impacto de <i>Fasciola hepatica</i> en la ganadería.	4
2.2 Ciclo Biológico de <i>Fasciola hepatica</i>.	5
2.3 Patogenia y patogenicidad de <i>Fasciola hepatica</i>.	7
2.3.1 Lesiones causadas por <i>Fasciola hepatica</i> .	10
2.4 Diagnóstico.	10
2.5 Métodos de prevención y control.	12
2.5.1 Antihelmínticos que actúan contra <i>Fasciola hepatica</i> .	12
2.6 Herbolaria y plantas medicinales.	16
III. JUSTIFICACIÓN.	18
IV. HIPÓTESIS.	19
V. OBJETIVO.	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
6.1 Localización del estudio.	21
6.2 Colecta del material vegetativo y preparación de los extractos.	21
6.3 Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia anti-fasciola de los extractos.	23
6.4 Interpretación de la prueba.	24
6.5 Medición de la eficacia.	25
6.6 Análisis de datos.	25

VII. RESULTADOS.	26
7.1 Eficacia de los extractos.	26
VIII. DISCUSIÓN.	36
IX. CONCLUSIÓN.	40
X. ANEXOS	41
10.1 Anexo 1. Colecta de plantas.	41
10.2 Anexo 2. Rendimientos de los extractos.	42
XI. REFERENCIAS	44

RESUMEN

ALVAREZ MERCADO JOSÉ MANUEL. **Valoración *in vitro* de la eficacia anti-fasciola de extractos de plantas de Veracruz, México.** (Bajo la dirección de los Dres. Froylán Ibarra Velarde y Miguel Ángel Alonso Díaz).

El objetivo del presente estudio, fue evaluar bajo condiciones *in vitro* el efecto anti-*Fasciola hepatica* de 15 extractos de plantas provenientes de los municipios de Martínez de la Torre, Nautla y Tlapacoyan, Veracruz. La obtención de extractos e identificación de especímenes de plantas se realizó en el laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala-UNAM. Para la evaluación se utilizaron fasciolas recién desenquistadas en forma artificial incubadas en placas estériles de cultivo de 24 pozos a 37°C y mantenidas en atmósfera de CO₂ al 5%. Estas fueron expuestas por triplicado a concentraciones de 500, 250 y 125 mg / L de cada extracto. La eficacia fue valorada como porcentaje de mortalidad con base en el número de fasciolas vivas y muertas, realizando las lecturas a las 24, 48 y 72 horas con ayuda de un microscopio invertido a 40x. Todas las evaluaciones fueron llevadas a cabo bajo condiciones asépticas, utilizando una campana de flujo laminar. Las plantas que mostraron mayor actividad fueron evaluadas nuevamente, adicionando otra concentración de 375 mg / L con el objeto de confirmar los resultados, así como calcular la concentración letal 50 %, 90 % y 99 % (CL₅₀, CL₉₀, y CL₉₉). Los resultados indicaron que los extractos de Lantana (*Lantana camara*), Gordolobo (*Bocconia frutescens*), Hierba santa (*Piper auritum*), Estafiate (*Artemisia mexicana*) y Guandúl (*Cajanus cajan*) tuvieron eficacia anti-fasciola *in vitro* a las 24, 48 y 72 hs, (P < 0.05). Las CL₅₀, CL₉₀, y CL₉₉ obtenidas con estos extractos fueron: Estafiate (92.85, 210.44 y 410.04 mg / L); Guandúl (382.73, 570.09 y 788.9 mg / L); y Hierba Santa (369.96, 529.94 y 710.34 mg / L), respectivamente. Se concluye que de los quince extractos probados, cinco demostraron eficacia promisoría anti-fasciola *in vitro*, indicando que posiblemente podrían incorporarse como una alternativa más en la estrategia del control integral de la fasciolosis. Futuros estudios sobre toxicidad y evaluación biológica *in vivo* mediante pruebas controladas en rumiantes, determinarán el potencial fasciolicida real de estos extractos.



I. INTRODUCCIÓN.

El campo de la parasitología veterinaria tiene amplias implicaciones dentro de la salud humana y animal. Las parasitosis continúan siendo un factor que limita la producción y el bienestar animal, e indudablemente el control de estos es una tarea primordial para el MVZ. ¹

Dentro de las parasitosis más importantes en el área veterinaria, está la fasciolosis que es una enfermedad parasitaria de distribución mundial causada por el trematodo *Fasciola hepatica*. Este parásito se localiza en los conductos biliares de ovinos, bovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos y en ocasiones en el hombre. Se le considera la enfermedad hepática más importante ya que causa pérdidas económicas estimadas en miles de millones de dólares. ²⁻⁴

En la estimación de estas pérdidas se incluyen la disminución de los parámetros productivos (ganancia de leche y/o carne), reproductivos (abortos, intervalos entre partos más largos y baja en eficiencia reproductiva), decomisos de hígados así como muertes directas. ⁵

El control de esta enfermedad se ha basado en la aplicación de productos químicos que debido a su uso indiscriminado y/o a un mal uso (ej. dosificación incorrecta), muestran menor eficacia debido al desarrollo de resistencia por parte del parásito. ⁶⁻⁸



Durante las últimas cinco décadas el control de las parasitosis se ha realizado a través de quimioprofilaxis intensiva, basada en el uso repetido de fármacos. Sin embargo, esta solución se ha convertido en una fuente de preocupación pública debido al aumento del riesgo de residuos químicos en alimentos, creando así una tendencia hacia producciones orgánicas y sustentables, esto sumado a la aparición de poblaciones de parásitos resistentes a los tratamientos actuales que obligan a encontrar nuevas soluciones a este problema.⁹

Una alternativa al control químico es la etno-veterinaria que incluye el posible uso de plantas con efecto anti-fasciola. Estudios recientes han demostrado que algunas plantas poseen efecto parasiticida; por ejemplo, plantas comunes como el Estafiate (*Artemisia mexicana*), la Menta (*Mentha piperita*), el Plumajillo (*Achillea millefolium*), el Ajo (*Allium sativum*), la Pimienta (*Piper nigrum*) y la Papaya (*Carica papaya*) así como algunas gramíneas y leguminosas.¹⁰⁻¹³

Dada la gran diversidad de ecosistemas que posee nuestro país, el posible uso de plantas con efecto antiparasitario representa un abanico de posibilidades que ha sido poco explorado. Se conoce que muchas plantas poseen mecanismos de defensa en respuesta a diferentes depredadores, los cuales pueden ser utilizados para el control de parásitos. Estos mecanismos actúan a través de metabolitos secundarios (MS) que pueden generar malos sabores, inhiben la ingestión, asimilación o también algunos pueden ser venenosos.^{9, 14 y 15}



II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Impacto de *Fasciola hepatica* en la ganadería.

El ganado ovino, caprino y bovino desde el punto de vista de producción, participan activamente en la economía mundial ya que son la fuente principal de leche, lana y carne roja. En estos animales, las pérdidas en la producción causadas por enfermedades de origen parasitario ocasionan disminución en los ingresos, pobreza en los países subdesarrollados y riesgos en la seguridad alimentaria de los países desarrollados. Para mejorar la salud animal se requiere un mayor esfuerzo en el ámbito de la investigación y desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y terapias en contra de *Fasciola hepatica*.¹

Los efectos negativos en la economía ocasionados por *F. hepatica* son difíciles de calcular, pero en los Estados Unidos se estima que se pierden 5,5 millones de dólares anuales por mortalidad y morbilidad, y 2,5 millones por decomiso de hígados dañados.²⁻³

Productivamente las infecciones con este parásito se pueden manifestar como decrementos en producción de leche y lana, baja fertilidad, costos de tratamientos, etc. Las pérdidas económicas se pueden dividir en dos tipos directas e indirectas.

Las pérdidas directas se deben a la disminución en los parámetros productivos como: ganancia de peso (GDP) que varía del 8-28% en bovinos y entre 30-350gr / semana en ovinos, conversión alimenticia (CA), producción láctea que baja entre un 5% en infecciones moderadas hasta un 14%, así mismo la infección influye en la cantidad de sólidos totales (ST) y los kg de leche producidos por lactación,



intervalos entre parto, los cuales se ven también afectados aumentado hasta en 20 días, resultando en 0.5 servicios más por concepción.¹⁶⁻¹⁸

Las pérdidas indirectas hacen referencia a los incrementos en los costos de alimentación, debido a los trastornos nutricionales causados por la enfermedad. Además de una pérdida en las ganancias por los decomisos a las canales infectadas.¹⁸

2.2 Ciclo Biológico de *Fasciola hepatica*.

El parásito adulto se aloja en los conductos biliares del hospedero definitivo (HD) donde vierte sus huevos, los cuales pasan al duodeno junto con la bilis y de ahí son evacuados con las heces. En condiciones de temperatura (26°C) y humedad (80%) adecuadas, los huevos se desarrollan y eclosionan aproximadamente entre 2 y 3 semanas. Los huevos no eclosionan hasta estar libres en el agua, pues las condiciones anaeróbicas de las heces impiden su desarrollo. La primera fase larvaria es el miracidio, este es ciliado y posee dos manchas oculares semilunares. Pueden vivir libres hasta 24 horas. Al aproximarse a un caracol hospedero intermediario (HI), (caracoles del género *Lymnaea spp*), los receptores quimio tácticos del miracidio los dirigen hacia las sustancias del mucus del caracol.



Una vez en contacto con los caracoles, los miracidios segregan una sustancia histolítica que facilita su entrada, penetran en ellos y se transforman en la segunda fase larvaria el esporocisto; en un periodo de 14 días este produce y libera de 5 a 8 redias.

Cada redia origina a redias hijas o de segunda generación y estas a las cercarías. La cercarí es la última fase evolutiva que parasita al caracol, después de 4 a 6 semanas las cercarías abandonan a las redias a través de la abertura tocológica de estas últimas y a su vez del caracol a través de su aparato respiratorio, una vez fuera requieren de un medio acuático para sobrevivir.

En el agua, las cercarias se adhieren a objetos, especialmente plantas o a la superficie inferior de la película superficial del agua; pierden su color y segregan a su alrededor un quiste de doble pared.

Una vez hecho, esto la ahora llamada metacercaria constituye la fase infectante, estas son ingeridas por el hospedero definitivo junto con el alimento o el agua. El desenquistamiento consta de dos fases: activación y de emergencia.

La fase de activación se lleva a cabo en el rumen, en una atmósfera de anhídrido carbónico concentrado, a una temperatura de 39°C. La segunda fase o de emergencia tiene lugar en el duodeno, donde la bilis, activa enzimas de la metarcercaria, que provocan la apertura del orificio de emergencia del quiste.¹⁸



Las metacercarias se alimentan de la mucosa intestinal y después perforan rápidamente la pared intestinal. La mayoría de las ahora fasciolas están en el peritoneo 24 horas después del desenquistamiento, desde allí emigran hacia el hígado. A las 90 horas pos infección comienza a penetrar la serosa del hígado ; en este momento las fasciolas tienen forma lanceolada y miden de 1 – 2 mm.

Tras un periodo de migración, alimentación y crecimiento rápido en el parénquima de aproximadamente 6 semanas, los parásitos se alojan finalmente en los conductos biliares a partir de los 40 días pos infección aproximadamente, donde alcanzan la madurez sexual.

Las fasciolas se auto fecundan y los primeros huevos aparecen en las heces del hospedador a partir de los 55 – 60 días desde la ingestión de las metarcecarías.¹⁶⁻

19

2.3 Patogenia y patogenicidad de *Fasciola hepatica*.

Durante el paso a través de la pared intestinal o la cavidad abdominal, *Fasciola hepatica* no causa ningún cambio apreciable, provocándose las lesiones más importantes en el hígado. Se pueden distinguir clínicamente una forma aguda y otra crónica causada por diferentes fases de desarrollo del parásito en el hígado.¹⁸⁻¹⁹



La forma aguda se presenta ante una invasión masiva de fasciolas jóvenes que producen una inflamación aguda en el tejido hepático, con profusas hemorragias, inflamación periférica y conductos de perforación, en estas zonas participan productos metabólicos tóxicos producidos por el parásito y de la destrucción de los hepatocitos del HD.

Por la acción bacterífera, se pueden encontrar focos de supuración, algunos ovinos albergan esporas de *Clostridium novyi* en el hígado, la invasión de las formas jóvenes de fasciolas puede dar lugar a hepatitis necrótica infecciosa.

Acción mecánica e irritativa, ya que durante el paso del parásito a través del hígado las espinas del tegumento causan daño y esto lleva a una acción traumática donde se debilita y perfora la cápsula hepática y por lo tanto puede provocar peritonitis. También interviene obstruyendo el conducto colédoco alterando el flujo normal de la bilis, por lo tanto los alimentos no se digieren correctamente y causa un síndrome de mala digestión.

En la necropsia, el hígado aparece engrosado, pálido y friable. Muestra numerosos tractos hemorrágicos sobre la superficie, así como depósitos de fibrina en la superficie hepática y peritoneal, material gris-rojizo, que corresponde a células infiltradas.

La forma crónica es la más frecuente y la consecuencia más importante es una fibrosis hepática, el daño hepático es de amplitud variable. En bovinos se presenta calcifilaxis, es decir la calcificación de los conductos biliares. Existe acción expoliatriz hematófaga que causa anemia, así mismo el parásito también se alimenta de bilis, por lo cual reduce la cantidad y altera su composición.



Formas emigrantes pueden llegar a las venas hepáticas, después de haber pasado por circulación pulmonar, llegan a diversos órganos como fasciolas erráticas: nódulos linfáticos, páncreas, músculo, pulmón, bazo, peritoneo, útero y placenta (bovina y caprina), donde estos son encapsulados y mueren.¹⁶⁻¹⁹

En infecciones masivas, los animales afectados pueden morir súbitamente sin manifestaciones clínicas, o pueden mostrar debilidad, inapetencia, dolor a la palpación abdominal y pueden llegar a morir un par de días después. En casos menos agudos, puede haber pérdida de peso y acumulación de líquido en el abdomen (ascitis). También son frecuentes eosinofilia, anemia, hipoalbuminemia, altos niveles de transaminasas ALT (alanina aminotransferasa) y ASL (aspartato aminotransferasa) en el suero e incremento de la colesterinemia.¹⁸

La forma crónica se presenta cuando el huésped ingiere dosis moderadas pero sostenidas de metacercarias. Los signos son anemia progresiva, debilidad, pérdida de apetito, edema submandibular, ascitis, diarrea y pérdida de peso. La parasitosis tiene un efecto acumulativo a través de los años.

En los cerdos, la fasciolosis es en general asintomática y se manifiesta clínicamente cuando hay factores debilitantes como nutrición deficiente o enfermedades concurrentes.

La parasitosis también se ha descrito en équidos y en conejos. En la oveja se encuentra casi exclusivamente la forma aguda, y en los bovinos la forma crónica, la cual pocas veces llega a tener consecuencias fatales.^{2, 16, 18, 19}



La patogenicidad de *F. hepatica* está determinada por una serie de factores; el HD, los ovinos son más susceptibles que los bovinos y los suinos, mientras que los equinos son los más resistentes, la cantidad de metacercarias ingeridas, temperatura a la que se desarrollan y si se trata de una infección o reinfección.

2.3.1 Lesiones causadas por *Fasciola hepatica*.

Las lesiones pueden dividirse en una fibrosis hepática y colangitis hiperplásica. La migración de fasciolas inmaduras a través del hígado provoca tractos migratorios, destrucción del parénquima hepático, hemorragia y necrosis.

También hay formación de trombos en las venas hepáticas y sinusoides, lo cual obstruye el flujo y provoca una necrosis isquémica y coagulativa. Tras unas 4 o 6 semanas post infección se deposita colágeno y hay fibrosis.

Hay engrosamiento de los conductos biliares, los cuales se encuentran dilatados, llenos de bilis, fasciolas inmaduras y llegan a poseer un color grisáceo.¹⁷⁻¹⁹

2.4 Diagnóstico.

Una combinación de estrategias de control son utilizadas para minimizar las infestaciones de fasciola pero la habilidad para diagnosticar una infección activa es primordial para cualquier programa de control.



Actualmente el diagnóstico se realiza obteniendo información epidemiológica referente al carácter enzoótico de la enfermedad en la zona, la presencia de caracoles lineidos y su presentación en años lluviosos así como su carácter estacional, además se puede observar baja de peso en casos de fasciolosis crónica, elevada mortalidad en los casos de fasciolosis aguda y anemia en casos subagudos. Los hallazgos a la necropsia nos permiten ver lesiones características donde se debe de hacer el diagnóstico diferencial con otras infecciones parasitarias como: dicroceliosis y paramfistomosis.

Observando el estado general del animal y los signos clínicos que presentan: diarrea, edema submandibular, emaciación, anorexia, palidez de las mucosas, alteraciones de enzimas en bioquímica sanguínea, abortos, etc.^{1, 17, 18, 19}

El uso de la técnica coprológica por sedimentación es el método estándar, esto debido a que es preciso, barato, fácil de realizar y demuestra la presencia de una infección activa con la presencia de huevos del trematodo en las heces y así poder diferenciarlos de otros trematodos.¹⁶

Actualmente existen diversas técnicas inmunológicas: difusión doble en agar, inmunolectroforesis, contra inmunolectroforesis, hemaglutinación pasiva, aglutinación en látex, inmunofluorescencia, fijación de complemento, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ó Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) indirecto, DIG (Diffusion In Gel ó Difusión en gel)-ELISA, DOT-ELISA (ELISA en punto). Análisis serológicos de la respuesta de anticuerpos en plasma y leche han sido introducidos para el diagnóstico de *Fasciola hepatica*.



Desafortunadamente este tipo de diagnóstico no diferencia entre infecciones activas e infecciones anteriores ya que los anticuerpos contra *Fasciola hepatica* pueden persistir en el suero por meses o incluso años después de que no se presenten vermes, esto produce falsos positivos y por lo tanto son poco confiables.^{1, 20, 21}

2.5 Métodos de prevención y control.

La profilaxis debería de comprender las siguientes medidas:

- Eliminación de los parásitos en los HD infectados.
- Reducción del número de moluscos HI.
- La rotación de pastos, drenado de terrenos inundados, movilización del ganado HD con el fin de reducir el riesgo de infección

2.5.1 Antihelmínticos que actúan contra *Fasciola hepatica*.

Durante décadas la quimioterapia tanto en México como a nivel mundial, ha sido la forma habitual de control de la fasciolosis, en virtud de haber demostrado ser hasta el momento el método más eficaz para remover los parásitos cuando estos se encuentran en el HD.



A través del tiempo se han desarrollado un considerable número de fasciolicidas los cuales han mostrado eficacia de mayor o menor grado contra las diferentes etapas de fasciola.

Con esta base, la Industria Farmacéutica ha desarrollado diversos fasciolicidas, los cuales pertenecen a los siguientes grupos:

1.- Fenoles Halogenados.

Hexaclorofenol: Al entrar en circulación general se une en alto porcentaje a proteínas plasmáticas; se metaboliza y elimina por bilis lo cual resulta de utilidad contra los trematodos que se encuentran en los conductos biliares.

Bitionol: Inhibe la fosforilación oxidativa, lo que disminuye el metabolismo glucolítico del parásito. Altera el equilibrio digestivo y excretor. Interfiere en la embriogénesis del parásito, lo que permite usarlo como profiláctico.

Niclofolán: Derivado del hexaclorofenol se trata de un desacoplante de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias

Nitroxinil: Actúa inhibiendo la fosforilación oxidativa, puede inducir el cese de inmediato de contracciones musculares del parásito.

2.- Salicilanilidas.

Rafoxanida: interviene en la formación de compuestos de alta energía, como ATP, ADP y otros, además de que transporta cationes a través de la membrana e interfiere en la fosforilación oxidativa en la mitocondria del parásito.



Closantel: Daña la cutícula del trematodo, causando erosiones en las fasciolas adultas. Bloquea las rutas energéticas, en especial la fosforilación oxidativa, causando graves trastornos en el metabolismo del parásito, que muere en uno o dos días. En las fasciolas sobrevivientes produce un efecto atrófico que imposibilita sus funciones de crecimiento y reproducción.

3.- Benzimidazoles.

3.1 Benzimidazoles carbamatos

Albendazol: Inhibe la polimerización de la tubulina y la enzima reductasa de fumarato, lo que produce deficiencia en la generación de energía y por lo tanto la muerte del parásito.

Mebendazol: Bloquea el paso de la glucosa al parásito, con la consecuente disminución de glucógeno y ATP. Induce la desorganización de la tubulina.

3.2 Probenzimidazoles

Netobimina: Este fármaco es convertido por la microflora gastrointestinal en un metabolito sulfóxido y posteriormente en el hígado sufre otra conversión que da como resultado la formación de albendazol y albendazol sulfóxido, estos productos son los que confieren la actividad antihelmíntica.



3.3 Benzimidazoles Halogenados

Triclabendazol. Su mecanismo de acción consiste en unirse a la tubulina bloqueando el paso de la glucosa al parásito, con la consecuente disminución de glucógeno y ATP.

4.-Sulfonamidas.

Clorsulón. Inhibe enzimas que participan en la obtención de energía.

5.-Fenoxialcanos.

Dianfenetidina: Este fármaco requiere activación en el hígado con lo que forma un metabolito aminado, el cual produce cambios en tegumento que hacen susceptible al parásito ante la acción de enzimas.

Siendo en México los más utilizados son el nitroxinil, closantel, rafoxanida, albendazol y triclabendazol.^{18, 22}



2.6 Herbolaria y plantas medicinales.

Por siglos las personas han usado plantas con fines curativos. Se habla en registros escritos acerca del uso de plantas desde hace 5000 años en la cultura sumeria.

Durante el curso de la historia para la humanidad el uso de plantas como fuente para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos ha pasado inadvertido, por el contrario se ha favorecido a los fármacos diseñados artificialmente, los cuales han acabado con el dominio de los productos naturales.²³

Las plantas y sus extractos han sido usados como remedios para dolores de cabeza e infecciones de origen bacteriano, micótico, viral y parásitida, pero en los últimos 20 a 30 años los científicos se han dedicado a determinar si estos son efectivos, y si lo son, el modo de acción de estos.

Se tiene conocimiento de aproximadamente 250,000 especies de plantas a nivel mundial, de estas menos del 10% ha sido investigado para conocer sus propiedades farmacológicas, lo que representa una vasta fuente de recursos sin explotar con potencial para desarrollar nuevos antiparasitarios.²⁴

Dada la gran diversidad de ecosistemas que hay en nuestro país, la oportunidad de encontrar plantas cuyos compuestos bioactivos tengan un efecto anti-fasciola aumenta significativamente, siendo los MS, los de mayor importancia en cuanto al desarrollo de nuevas alternativas para el control de las parasitosis.



Entre los metabolitos que han demostrado actividad contra una amplia gama de parásitos se encuentran: alcaloides, saponinas, skimmiaepinas A y C, taninos o flavonoides, terpenos (4 Di-terperno, monoterpenos) y xantonas.²⁴

Estos compuestos actúan de diversas maneras, algunos actúan como inmunomoduladores modificando la interacción parásito-huésped estimulando los mecanismos de defensa, aumentando la proteína de paso y formando compuestos con aminoácidos que pertenecen a la cutícula de los parásitos.^{9, 15, 25}

Diversos estudios *in vitro* han demostrado que es posible usar plantas para combatir algunos parásitos como son: *Fasciola hepatica*, *Giardia spp*, *Haemonchus contortus*, *Leishmania infantum*, *Plasmodium falciparum*, *Rhipicephalus microplus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trypanosoma*, *Trypanosoma brucei brucei*, y *Trypanosoma cruzi*, a través de la elaboración de extractos con solventes orgánicos y su consecuente evaluación *in vitro* e *in vivo* obteniendo resultados prometedores.^{9-15, 24-30}



III. JUSTIFICACIÓN

El uso normal e indiscriminado de fármacos fasciolicidas ha favorecido el desarrollo de resistencia hacia las diversas familias de fármacos que actúan contra *Fasciola hepatica* que aunado al daño que estos productos ocasionan al medio ambiente obliga al MVZ a buscar nuevas alternativas de control. Ante esto la etno-veterinaria representa una alternativa para el control de este parásito.



IV. HIPÓTESIS

Los extractos de quince plantas colectadas en el trópico veracruzano presentarán efecto anti-*Fasciola hepatica in vitro*.



V. OBJETIVO

Evaluar y determinar *in vitro* el efecto anti-*Fasciola hepatica* de quince extractos de plantas de Martínez de la Torre, Nautla y Tlapacoyan Veracruz, México.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Localización del estudio.

La colecta de plantas se llevó a cabo en los municipios de Tlapacoyan, Martínez de la Torre y Nautla Veracruz, México. Después, las plantas se transportaron al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) para su secado y preparación para la identificación taxonómica.

La obtención de extractos e identificación de especímenes de plantas se realizó en el laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala-UNAM y la evaluación anti-Fasciola se hizo en el laboratorio de quimioterapia experimental del Depto. de Parasitología de la FMVZ-UNAM.

6.2. Colecta del material vegetativo y preparación de los extractos.

La colecta de la plantas se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Columba et al. (2007) y Rodríguez et al. (2009)³¹⁻³²

En este estudio se seleccionaron plantas en base a: el uso popular que se les da, los reportes bibliográficos donde algunas plantas han mostrado efecto contra otros parásitos y entrevistas con personas de los municipios anteriormente mencionados.^{9-15, 24-30, 33}



Las plantas seleccionadas para su evaluación e identificación fueron: *Acacia cornígera* (Cuerno de toro 2147 IZTA), *Acacia farnesiana* (Espinillo blanco 2164 IZTA), *Artemisia absinthium* (Ajenjo 2155 IZTA), *Artemisia mexicana* (Estafiate 2156 IZTA), *Bocconia frutescens* (Gordolobo 2153 IZTA), *Cajanus cajan* (Guandúl 2164 IZTA), *Cordia spp* (Mata caballo), *Hibiscus rosa – sinensis* (Rosa de china 2149 IZTA), *Lantana camara* (Lantana 2160 IZTA), *Leucaena diversifolia* (Leucaena 2169 IZTA), *Melia azedarach* (Piocho 2161 IZTA), *Mentha sp* (Hierbabuena 2163 IZTA), *Ocimum basilicum* (Albahaca 2154 IZTA), *Piper auritum* (Hierba santa 2165 IZTA) y *Teloxys ambrosioides* (Epazote verde 2157 IZTA).

Después de la colecta, se tomó una muestra representativa de cada una para su identificación taxonómica en el herbario de la FES Iztacala. Se colectó un promedio de 700 g de hojas frescas de cada planta, las cuales fueron transportadas a las instalaciones del CEIEGT donde se secaron en un horno por 3 días a 60°C. En el anexo 1 se presenta la información sobre el lugar y la fecha de colecta de cada planta así como el peso en base húmeda y en base seca.

De las hojas de cada planta, se hicieron extractos usando solventes de diferente polaridad (Hexano, Acetato de Etilo y Metanol). Estos se elaboraron de acuerdo a lo descrito por Harnborne, 1970 y Trease, 1987 con 100 g de materia seca de cada planta a los cuales se les adicionó 500 ml del solvente, después se destiló el contenido de solventes bajo las condiciones de temperaturas y revoluciones por minuto (RPM) siguientes:



1) en el caso del hexano a 40°C y 50 RPM, 2) para acetato de etilo a 65°C y 60 RPM y 3) para metanol a 60°C y 90 RPM mediante el uso de un rota evaporador soxlet®.³⁴⁻³⁵

Para cada planta, se realizaron 3 destilaciones cada 3 ó 4 días dependiendo del tipo de planta. Posteriormente, los extractos fueron colocados en cajas petri y almacenados en refrigeración hasta su posterior evaluación. En el anexo 2 se presenta la información sobre el rendimiento en extracto de cada planta procesada.

6.3 Evaluación *in vitro* de la eficacia anti-fasciola de los extractos.

Para evaluar el efecto anti-fasciola de cada extracto, se utilizaron fasciolas recién desenquistadas artificialmente (aproximadamente seis horas después del desenquistamiento), de acuerdo a lo descrito por Ibarra y Jenkins, 1984. Una vez desenquistadas, las metacercarias se expusieron durante una hora en un medio de activación (ditionato de sodio y agua destilada), seguido de dos horas más en un medio de emergencia (solución de Hank y bilis de bovino), incubando a 37°C y 5% de CO₂. Finalmente se suspendieron en 90 ml de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640® más 90 ml, suero bovino y 1.5 ml de antibiótico a una densidad de 100 individuos/ml.³⁶

Para la evaluación *in vitro* se utilizaron 500 mg de extracto crudo de cada planta que se colocaron en tubos eppendorf a los que se les añadió 0.1ml de metanol



para disolver el extracto y se aforó a 10 ml. Se realizaron diluciones dobles para preparar concentraciones de 500, 250 y 125 mg / L en cajas de cultivo marca NUNC[®] de 24 pozos.

En cada pozo se depositó 1.6 ml de medio RPMI-1640[®], 0.2 ml del extracto solubilizado y 0.2 ml conteniendo 10 fasciolas. Por cada placa, se usaron 4 pozos testigo sin tratamiento, 3 contenían solamente el medio completo, el último medio RPMI 1640[®] más 0.2ml de metanol.

De esta manera los extractos vegetales fueron probados por triplicado y aquellos que mostraron mayor actividad se evaluaron en 3 ocasiones más, adicionando otra concentración de 375 mg / L, con el objetivo de confirmar los resultados así como calcular la concentración letal para matar al 50 % de las fasciolas (CL₅₀), la concentración letal para matar al 90 % de las fasciolas (CL₉₀) y la concentración letal para matar al 99 % de las fasciolas (CL₉₉). Cada prueba permaneció en incubación a 37°C durante 4 días bajo una atmósfera de CO₂ al 5%.

6.4 Interpretación de la Prueba

Las fasciolas bajo estudio se examinaron a las 24, 48 y 72 hs post-exposición con el extracto mediante un microscopio invertido a 40 x. La actividad de los extractos se midió comparando la sobrevivencia de las fasciolas tratadas con relación a las fasciolas del grupo testigo. Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo condiciones asépticas utilizando una campana de flujo laminar.



6.5 Medición de la eficacia.

La eficacia se midió utilizando la siguiente fórmula (Abbott, 2004):

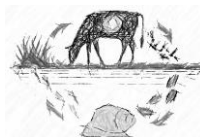
$$\text{Eficacia (\%)} = \frac{\text{No.de Fasciolas en el grupo Testigo} - \text{No.de Fasciolas en el grupo Tratado}}{\text{No de Fasciolas en el grupo Testigo}} \times 100$$

Cuando un extracto mostró una eficacia *in vitro* mayor al 80% se consideró que posee actividad fasciolicida.^{14, 25, 36}

6.6 Análisis de datos

Para evaluar el efecto anti-fasciola de las diferentes concentraciones evaluadas dentro de cada extracto, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas (STATGRAPHICS v.16.1.17)³⁷. Se utilizó un valor de $P < 0.05$.

Para calcular la CL_{50} , CL_{90} y CL_{99} de los extractos que tuvieron efecto anti-fasciola *in vitro*, se realizó una análisis PROBIT con el programa POLO PLUS (LeOra Software, 2003).³⁸



VII. RESULTADOS.

7.1 Eficacia de los extractos.

En todos los bioensayos *in vitro* que se realizaron en este estudio, no hubo mortalidad en los tratamientos control (0 mg / L).

En los cuadros 1, 2 y 3 se observa que cinco de los quince extractos evaluados tuvieron eficacia anti-fasciola *in vitro* a las 24, 48 y 72 hs, respectivamente ($P < 0.05$). De estos, el extracto de Lantana (*Lantana camara*), Gordolobo (*Bocconia frutescens*) y Estafiate (*Artemisia mexicana*) mostraron una eficacia del 100% a una concentración de 500 mg / L a las 24 hs ($P < 0.05$). Mientras que a las 48 hs el extracto de Guandúl (*Cajanus cajan*) mostró una eficacia del 100% a una concentración de 500 mg / L ($P < 0.05$) y los de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) y Estafiate (*Artemisia mexicana*) actuaron a 250 mg / L ($P < 0.05$). Finalmente a las 72 hs de exposición el extracto de Estafiate (*Artemisia mexicana*) mostró actividad en la concentración de 125 mg / L ($P < 0.05$) y el de Hierba santa (*Piper auritum*) a una concentración de 500 mg / L ($P < 0.05$).



Cuadro 1. Eficacia anti-fasciola *in vitro* de extractos de plantas nativas de Veracruz, México a las 24 hs.

Nombre común	Nombre científico	Eficacia (%) ^c			
		0 mg/l	125mg/l	250 mg/l	500 mg/l
Cuerno de toro	<i>Acacia cornígera</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Guandúl	<i>Cajanus cajan</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Espinillo blanco	<i>Acacia farnesiana</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Lantana	<i>Lantana cámara</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^b
Hibiscus	<i>Hibiscus rosa - sinensis</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Gordolobo	<i>Bocconia frutescens</i>	0 ^a	3±0.06 ^a	83±0.21 ^b	100 ^b
Piocho	<i>Melia azedarach</i>	0 ^a	7±0.11 ^a	7±0.11 ^a	7±0.11 ^a
Leucaena	<i>Leucaena diversifolia</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Mata Caballo	<i>Cordia spp</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Epazote Verde	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
H. Santa, hinojo	<i>Piper auritum</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
H. buena	<i>Mentha sativa</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
H. Maestra	<i>Artemisia absinthium L.</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Albahaca	<i>Ocimum basiliam</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Estafiate	<i>Artemisia mexicana</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^b

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. P<0.05

^c valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.



Cuadro 2. Eficacia anti-fasciola *in vitro* de extractos de plantas nativas de Veracruz, México a las 48 hs.

Nombre común	Nombre científico	Eficacia (%) ^C			
		0 mg/l	125mg/l	s 250 mg/l	s 500 mg/l S
Cuerno de toro	<i>Acacia cornígera</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Guandúl	<i>Cajanus cajan</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Espinillo blanco	<i>Acacia farnesiana</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Lantana	<i>Lantana cámara</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^b
Hibiscus	<i>Hibiscus rosa - sinensis</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Gordolobo	<i>Bocconia frutescens</i>	0 ^a	10±0.1 ^a	87±0.23 ^b	100 ^b
Piocho	<i>Melia azedarach</i>	0 ^a	7±0.11 ^a	7±0.11 ^a	7±0.11 ^a
Leucaena	<i>Leucaena diversifolia</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Mata Caballo	<i>Cordia spp</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Epazote Verde	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
H. Santa, hinojo	<i>Piper auritum</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	40±0.52 ^b
H. buena	<i>Mentha sativa</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
H. Maestra	<i>Artemisia absinthium L.</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Albahaca	<i>Ocimum basilium</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Estafiate	<i>Artemisia mexicana</i>	0 ^a	63±0.15 ^b	77±0.21 ^b	100 ^b

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. P<0.05

^c valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.



Cuadro 3. Eficacia anti-fasciola *in vitro* de extractos de plantas nativas de Veracruz, México a las 72 hs.

Nombre común	Nombre científico	Eficacia (%) ^c			
		0 mg/l	125mg/l	250 mg/l	500 mg/l
Cuerno de toro	<i>Acacia cornígera</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Guandúl	<i>Cajanus cajan</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^b
Espinillo blanco	<i>Acacia farnesiana</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Lantana	<i>Lantana cámara</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^b
Hibiscus	<i>Hibiscus rosa - sinensis</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Gordolobo	<i>Bocconia frutescens</i>	0 ^a	10±0.1 ^a	100 ^b	100 ^b
Piocho	<i>Melia azedarach</i>	0 ^a	7±0.11 ^a	7±0.11 ^a	13±0.11 ^a
Leucaena	<i>Leucaena diversifolia</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Mata Caballo	<i>Cordia spp</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Epazote Verde	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
H. Santa, hinojo	<i>Piper auritum</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^b
H. buena	<i>Mentha sativa</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
H. Maestra	<i>Artemisia absinthium L.</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Albahaca	<i>Ocimum basilium</i>	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Estafiate	<i>Artemisia mexicana</i>	0 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. P<0.05

^c valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.



Los cinco extractos que mostraron eficacia anti-fasciola *in vitro* mayor al 80% fueron evaluadas por segunda ocasión incluyendo una concentración de 375 mg / L para poder determinar la CL50, CL90 y CL99. Los resultados fueron consistentes a los bioensayos previamente descritos (Cuadros 4, 5 y 6).

Cuadro 4. Segunda evaluación de la Eficacia anti-fasciola *in vitro* de extractos de plantas nativas de Veracruz, México a las 24 hs.

Extracto	Eficacia % ^C				
	0 mg / L	125 mg / L	250 mg / L	375 mg / L	500 mg / L
Estafiate (<i>Artemisia mexicana</i>) n=10	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^b	100 ^b
Gordolobo (<i>Bocconia frutescens</i>)	0 ^a	0 ^a	17±0.29 ^b	100 ^b	100 ^b
Lantana (<i>Lantana camara</i>)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	100 ^b
Hierba santa (<i>Piper auritum</i>)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Guandúl (<i>Cajanus cajan</i>)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	37±0.06 ^b	37±0.06 ^b

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. P<0.05.

^c valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.

Cuadro 5. Segunda evaluación de la Eficacia anti-fasciola *in vitro* de extractos de plantas nativas de Veracruz, México a las 48 hs.

Extracto	Eficacia % ^C				
	0 mg / L	125 mg / L	250 mg / L	375 mg / L	500 mg / L
Estafiate (<i>Artemisia mexicana</i>) n=10	0 ^a	70±0.1 ^b	90 ^b	100 ^b	100 ^b
Gordolobo (<i>Bocconia frutescens</i>)	0 ^a	0 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b
Lantana (<i>Lantana camara</i>)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	93±0.06 ^b	100 ^b
Hierba santa (<i>Piper auritum</i>)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	73±0.06 ^b	73±0.06 ^b
Guandúl (<i>Cajanus cajan</i>)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	67±0.06 ^b	67±0.06 ^b

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. P<0.05

^c valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.



Cuadro 6. Segunda evaluación de la Eficacia anti-fasciola *in vitro* de extractos de plantas nativas de Veracruz, México a las 72 hs.

Extracto	Eficacia % ^C				
	0 mg / L	125 mg / L	250 mg / L	375 mg / L	500 mg / L
Estafiate (<i>Artemisia mexicana</i>) n=10	0 ^a	93±0.06 ^b	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Gordolobo (<i>Bocconia frutescens</i>)	0 ^a	0 ^a	100 ^b	100 ^b	100 ^b
Lantana (<i>Lantana camara</i>)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	93±0.06 ^b	100 ^b
Hierba santa (<i>Piper auritum</i>)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	83±0.06 ^b	100 ^b
Guandúl (<i>Cajanus cajan</i>)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	93±0.06 ^b	93±0.06 ^b

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. P<0.05

^c valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.

En el cuadro 7 y las figuras 1, 2 y 3, se observan las CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₉ para los extractos de Estafiate (*Artemisia mexicana*), Guandúl (*Cajanus cajan*) y Hierba santa (*Piper auritum*). No fue posible calcular las concentraciones letales para los extractos de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) y Lantana (*Lantana camara*) debido a su elevada eficacia (100%).



Cuadro 7. Concentraciones letales de extractos con efecto anti-*Fasciola hepatica in vitro*.

Extracto	CL 50 (mg/L)	LCI-LCS	CL 90 (mg/L)	LCI-LCS	CL 99 (mg/L)	LCI-LCS	D.E	χ^2 (gl=10)
Estafiate <i>(Artemisia mexicana)</i>	92.85	42.16-124.50	210.44	166.78-306.78	410.04	288.46-1135.26	±2.197	5.893
Guandúl <i>(Cajanus cajan)</i>	382.73	327.13-444.12	570.09	479.89-908.48	788.9	603.92-1768.30	±3.653	15.258
Gordolobo <i>(Bocconia frutescens)</i>	369.96	318.77-419.83	529.94	457.78-748.36	710.34	567.74-1298.47	±3.813	14.702

LCI/Limite de confianza inferior, LCS Limite de confianza superior, χ^2 valor de chi-cuadrada, gl/ grados de libertad. P < 0.05.



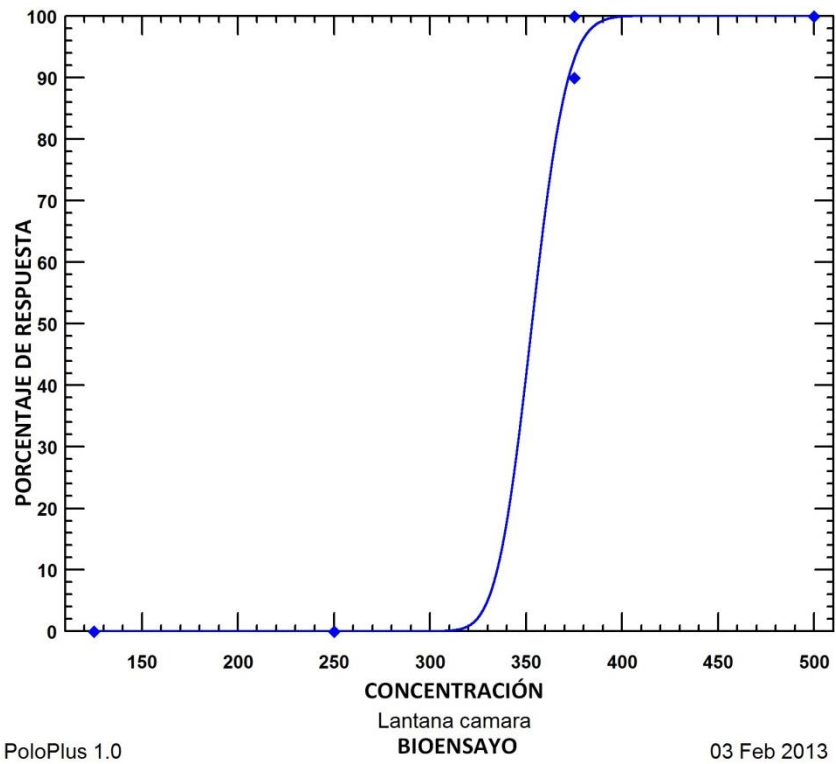
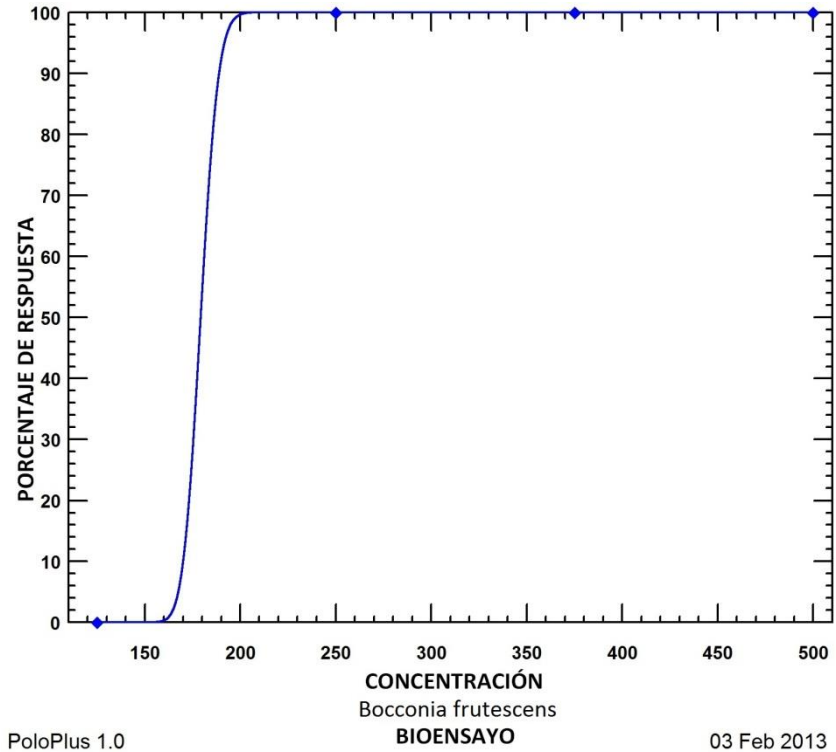


Figura 1. Comportamiento de las CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₉ de los extractos de *Bocconia frutescens* y *Lantana camara* expresando efecto anti-*Fasciola hepatica in vitro*.



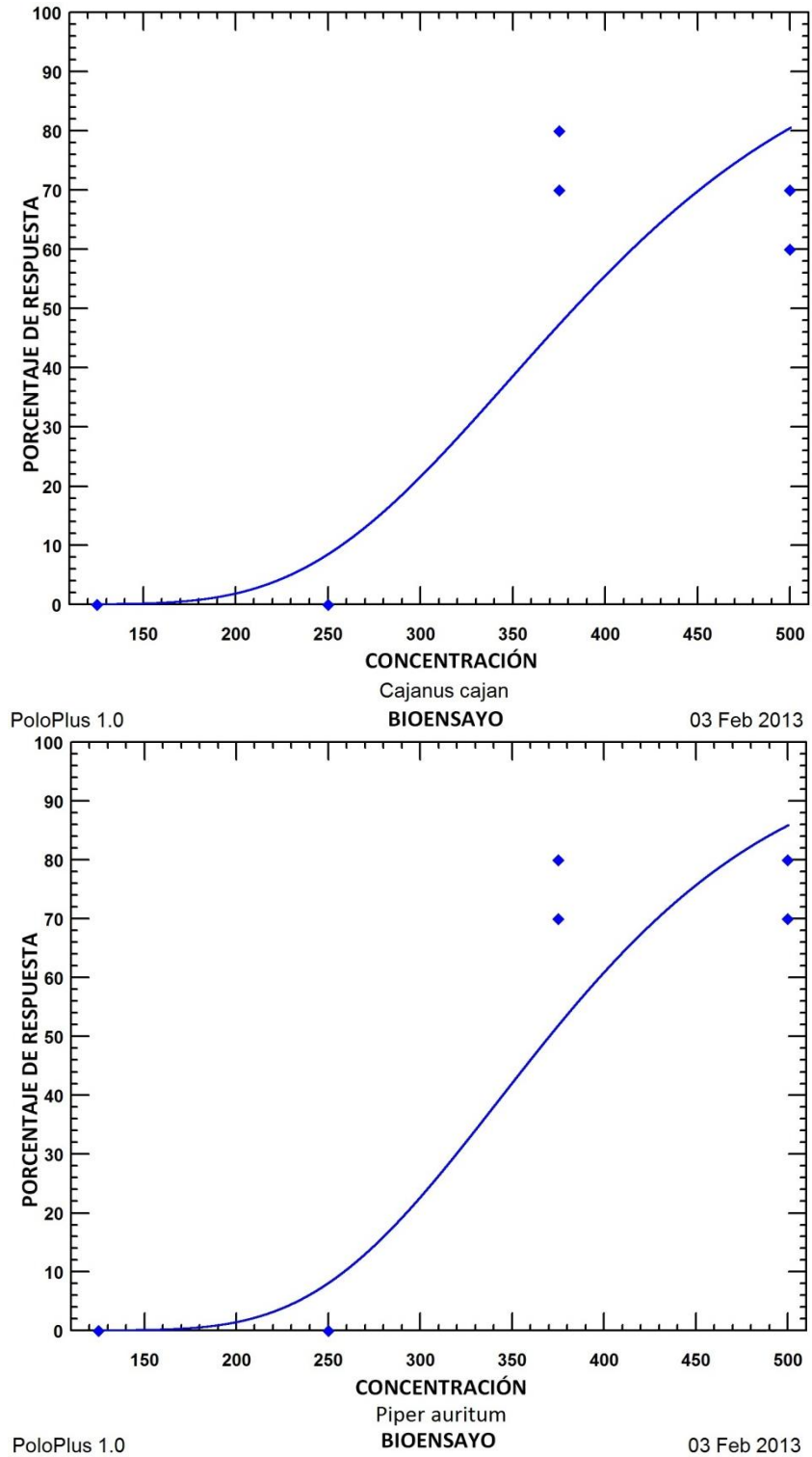


Figura 2. Comportamiento de las CL₅₀, CL₉₀ y CL₉₉ de los extractos de *Cajanus cajan* y *Piper auritum* expresando efecto anti-*Fasciola hepatica in vitro*.



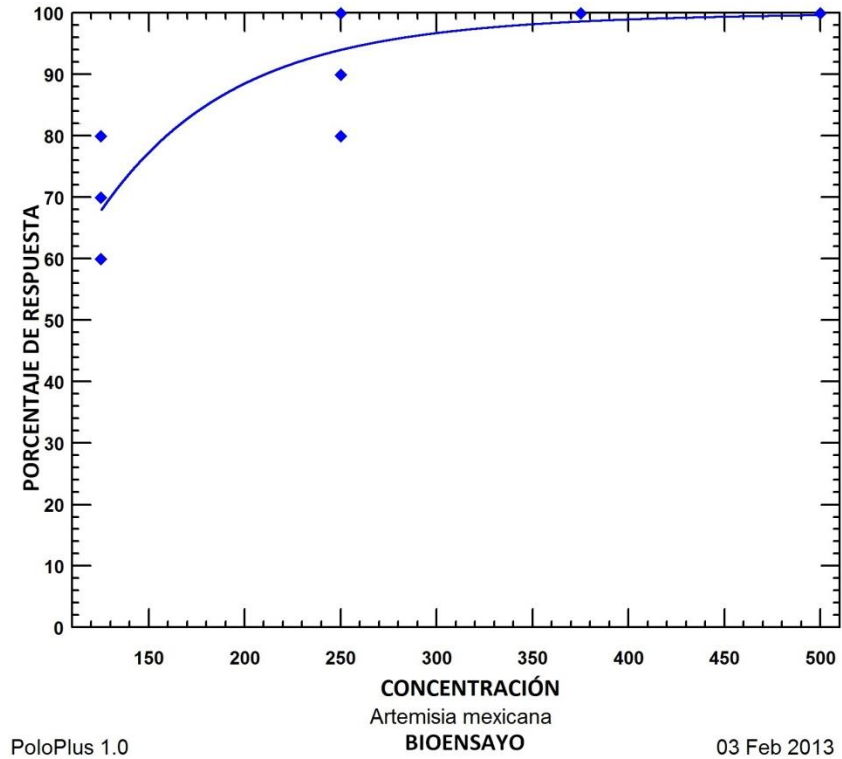


Figura 3. Comportamiento de las CL_{50} , CL_{90} y CL_{99} del extracto de *Artemisia mexicana* expresando efecto anti-*Fasciola hepatica in vitro*.



VIII. DISCUSIÓN.

Los extractos de plantas representan hoy en día una posible alternativa para realizar un control eficaz de la fasciolosis en los rumiantes domésticos. Sin embargo, este campo ha sido poco explorado por lo que se manifiesta la necesidad de desarrollar nuevas investigaciones que tiendan a determinar cuál es su potencial contra *Fasciola hepatica*.

En el presente estudio, de quince extractos analizados, cinco mostraron un efecto anti-fasciola *in vitro* [Estafiate (*Artemisia mexicana*), Gordolobo (*Bocconia frutescens*), Lantana (*Lantana camara*), Hierba santa (*Piper auritum*) y Guandúl (*Cajanus cajan*)]. Dentro de estas, el extracto de Estafiate (*Artemisia mexicana*) mostró eficacia anti-fasciola a partir de una concentración de 125 mg / L y se determinaron las CL50, CL90 y CL99. En un estudio similar, Ibarra et al. (2012) reportaron una eficacia anti-fasciola del 100% con el extracto de Estafiate (*Artemisia mexicana*) a las mismas concentraciones que se utilizaron en este estudio, lo cual de alguna manera muestra que existe una actividad anti-fasciola intrínseca por parte de este extracto aun cuando fue evaluado en estudios y tiempos diferentes.¹⁴ Esto indica, que este extracto puede ser una alternativa al control químico de *Fasciola hepatica*, sólo, después de su evaluación *in vivo* así como previos estudios de toxicidad. Al respecto, existen estudios en ratones CD1 que demostraron que el extracto de Estafiate (*Artemisia mexicana*) no tuvo ningún tipo de toxicidad en tejido hepático o renal.³⁹



No obstante, es necesario realizar estudios *in vivo* con el uso de las CL determinadas en este estudio utilizando rumiantes como modelo experimental así como la identificación de los compuestos secundarios de plantas asociados al efecto anti-fasciola.

Otros extractos de plantas que tuvieron una elevada eficacia anti-fasciola *in vitro* en este estudio fueron el de Hierba santa (*Piper auritum*), el de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) y el del Guandúl (*Cajanus cajan*). Hasta el día de hoy, no existen estudios donde se haya evaluado el efecto anti-fasciola de estas plantas. No obstante, y debido a que se han reportado efectos benéficos para la salud con extractos de estas plantas, es posible que mediante su administración directa a rumiantes se obtenga un efecto similar *in vivo*. Por ejemplo, Ghanem et al. (2012) reportaron un efecto protector y antioxidante en plantas de la familia Piperaceae, de la cual se desprende la Hierba santa (*Piper auritum*), y sus fracciones en cultivos de hepatocitos de ratones⁴⁰. Akinloye et al. (2011) también encontraron un efecto hepatoprotector del *Cajanus cajan* en ratones, no se han reportado efectos tóxicos de estas plantas.⁴¹

Lantana (*Lantana camara*) posiblemente por ser una planta tóxica para el ganado bovino y ovino no tiene reportes de eficacia anti-fasciola hasta el día de hoy. Este trabajo es el primer reporte del efecto anti-fasciola *in vitro* del extracto de Lantana. Sin embargo, es necesario considerar algunos otros efectos no deseables como la fotosensibilización y las alteraciones hepáticas que provocan en los animales que consumen esta planta.



Aquí es importante hacer notar que si en estudios continuados esta planta demuestra ser de gran impacto fasciolicida, sería motivo para realizar estudios adicionales con el objeto de identificar los compuestos responsables de dicha toxicidad. En relación a esto respecto Ghisalberti et al. (2000) mencionan que hay un promedio de 150 especies de este género, pero solo un bajo porcentaje de estas causan toxicidad.

Por lo tanto, es necesario seguir evaluando el o los compuestos que están involucrados en el efecto anti-fasciola *in vitro* y su posible toxicidad en diferentes modelos animales. De esta forma, se podría encontrar otra especie de *Lantana spp*, de la cual no se tenga reportes de toxicidad animal.⁴²

Adicionalmente a esto, diversos estudios fito-químicos han enlistado los diversos MS que estas plantas poseen: 1) Alcaloides, 2) Terpenos, 3) Taninos o flavonoides y 4) Xantonas; Bhanumati et al. (1978), Amarjit et al. (1985), Akihisa et al. (1992), Ruiz et al. (1993), Parmar et al. (1997), Ghisalberti et al. (2000), Liscombe et al. (2005), y Said et al. (2005).⁴²⁻⁴⁹ Estos mismos componentes han demostrado actividad antiparasitaria y son mencionados en estudios hechos por Anthony et al. (2005), Hoste et al. (2006) Alonso et al. (2008), Fernández et al. (2011) y Von son et al. (2012). Por lo tanto, es necesario seguir realizando estudios para conocer la composición química, mediante cromatografía líquida de alta resolución, de los extractos que mostraron efecto anti-fasciola.^{9, 12, 15, 24, 28}



Sin embargo, estos no son los únicos compuestos que poseen estas y otras especies vegetales por lo cual no sería correcto el descartar el efecto de algún otro compuesto (s) bioactivo (s).

Vera et al. (2008) también realizaron bioensayos con *Leucaena leucocephala* en contra de *Fasciola hepatica* donde presentaba la ausencia de actividad en concentraciones de 500 mg / L.¹³ Por otra parte Fernández et al. (2011) usando esta misma leguminosa obtiene una mortalidad del 66.79% en contra de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y 0% de mortalidad en las etapas adultas de las mismas.²⁸

En este estudio al usar *Leucaena diversifolia* tampoco se obtuvo actividad alguna en todas las concentraciones probadas lo que hace suponer que ninguna especie de este género tiene actividad anti-fasciola.

Alonso et al. (2008) analizaron Cornezuelo (*acacia pennatula*) en contra de *Haemonchus contortus*, inhibiendo el desenvaine de la L3 dicho parásito a concentraciones de 1200 µg / ml.¹² Mientras que en este bioensayo se reportó una actividad anti-fasciola del 0 % en todas las concentraciones probadas en los extractos de *Acacia cornigera* y *Acacia farnesiana*.

Singh et al. (2009) e Ibarra et al. (2012) obtienen resultados satisfactorios con extractos etanólicos y hexánicos de *Artemisia absinthium* en contra de *Fasciola hepática*. Estos resultados difieren de los obtenidos en nuestro estudio en virtud de que no se observó actividad anti-fasciola alguna.^{11, 14}



Por lo anteriormente mencionado, el presente estudio aun cuando representa información preliminar, da la pauta para dar continuidad a diferentes investigaciones que demuestren si la información aquí obtenida puede ser repetible y amplificada, con el fin de llegar a obtener sus metabolitos secundarios para finalmente determinar si es uno o la combinación como responsables de la actividad fasciolicida obtenida.

IX. CONCLUSIÓN

Se concluye que de los quince extractos probados, cinco demostraron eficacia promisoría anti-fasciola *in vitro*, indicando que posiblemente podrían incorporarse como una alternativa más en la estrategia del control integral de la fasciolosis.

Futuros estudios sobre toxicidad y evaluación biológica *in vivo* mediante pruebas controladas en rumiantes, determinarán el real potencial fasciolicida de estos extractos.



X. ANEXOS

10.1 Anexo 1. Colecta de plantas.

Nombre común	Nombre científico	Núm ID Herbario Iztacala	Lugar de colecta	Fecha Colecta	Fecha Secado	g BH c/Bolsa	Peso de la Bolsa (g)	g BH	g Ms c/Contenedor	Contenedor(g)	g MS
Cuerno de toro	<i>Acacia cornigera</i>	2147 IZTA	Rancho La Soledad	20/01/2012	23/01/2012	187.0	24.0	163.0	66.0	14.5	51.5
Guandúl	<i>Cajanus cajan</i>	2164 IZTA	Rancho La Soledad	20/01/2012	24/01/2012	783.0	24.0	759.0	397.7	43.5	354.2
Espinillo blanco	<i>Acacia farnesina</i>	2166 IZTA	Rancho Villa del mar 3	23/01/2012	26/01/2012	1085.5	24.0	1037.5	593.6	19.6	554.4
Lantana	<i>Lantana camara</i>	2160 IZTA	Rancho Villa del mar 3	08/02/2012	11/02/2012	336.6	16.4	320.2	185.0	14.5	170.5
Hibiscus	<i>Hibiscus rosa – sinensis</i>	2149 IZTA	Rancho El clarín	20/02/2012	23/02/2012	1,085.0	16.4	1,068.6	233.5	19.4	214.1
Gordolobo	<i>Bocconia frutescens</i>	2153 IZTA	Platanoyacapan	03/03/2012	06/03/2012	1,291.5	37.0	1,254.5	272.1	19.6	252.5
Piocho	<i>Melia azedarach</i>	2161 IZTA	Platanoyacapan	03/03/2012	06/03/2012	1,020.1	37.0	983.1	232.3	19.6	212.7
Leucaena	<i>Leucaena diversifolia</i>	2169 IZTA	Platanoyacapan	03/03/2012	06/03/2012	1,027.5	37.0	990.5	383.9	19.6	364.3
Mata Caballo	<i>Cordia spp</i>		Platanoyacapan	03/03/2012	06/03/2012	894.7	37.0	857.7	323.0	19.6	303.4
Epazote Verde	<i>Teloxys ambrosioides</i>	2157 IZTA	Rancho La Soledad	04/03/2012	07/03/2012	369.8	18.5	351.3	76.6	19.6	57.0
H. Santa, hinojo	<i>Piper auritum</i>	2165 IZTA	Rancho La Soledad	04/03/2012	07/03/2012	971.5	37.0	934.5	207.5	19.6	187.9
H. buena	<i>Mentha sp</i>	2163 IZTA	Martínez de la Torre	22/03/2012	25/03/2012	731.7	42.1	689.6	207.3	19.6	187.7
H. Maestra	<i>Artemisia absinthium</i>	2155 IZTA	Martínez de la Torre	23/03/2012	26/03/2012	700.0	55.5	644.5	286.1	39.2	246.9
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	2154 IZTA	Martínez de la Torre	23/03/2012	26/03/2012	688.6	18.5	670.1	145.1	19.6	125.5
Estafiate	<i>Artemisia mexicana</i>	2156 IZTA	Martínez de la Torre	23/03/2012	26/03/2012	314.6	58.5	256.1	128.3	19.6	108.7



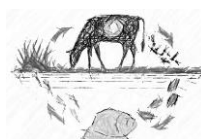
10.2 Anexo 2. Rendimientos de los extractos.

Nombre	Planta molida (g)	Peso caja de petri (g)	Solvente (ml) Hexano	Peso tras destilaciones (g)			Solvente (ml) Acetato de etilo	Peso tras destilaciones (g)			Solvente (ml) Metanol	Peso tras destilaciones (g)			RENDIMIENTO (g)
				1a.	2a.	3a.		1a.	2a.	3a.		1a.	2a.	3a.	
Cuerno de toro	51	9.59	257.5	10.25	10.43	10.59	257.5	11.31	11.82	11.91	257.5	14.03	14.97	15.91	6.32
Guandúl	100	77.36	500	84.82	77.86	78.77	500	79.31	79.96	80.68	500	80.81	82.86	84.74	7.38
Espinillo blanco	100	16.6	500	19.57	21.15	22.02	500	23.82	24.67	25.22	500	30.26	38.32	43.41	26.81
Lantana	100	44.1	500	54.95	44.75	45.04	500	45.21	46.42	47.07	500	47.51	49.92	52.15	8.07
Hibiscus	100	8.38	500	9.77	10.48	11.12	500	12.40	13.04	13.53	500	15.98	17.45	18.92	10.54
Gordolobo	100	8.24	500	9.12	9.54	10.15	500	11.62	12.39	12.75	500	14.97	16.71	18.35	10.11
Piocho	100	43.2	500	44.15	44.33	44.49	500	45.00	45.45	45.60	500	49.10	51.43	53.76	10.53



...Continuación

Nombre	Planta molida (g)	Peso caja de petri (g)	Solvente (ml) Hexano	Peso tras destilaciones (g)			Solvente (ml) Acetato de etilo	Peso tras destilaciones (g)			Solvente (ml) Metanol	Peso tras destilaciones (g)			RENDIMIENTO (g)
				1a.	2a.	3a.		1a.	2a.	3a.		1a.	2a.	3a.	
Leucaena	100	7.91	500	8.64	8.95	9.23	500	10.22	10.61	10.90	500	13.08	15.60	17.25	9.34
Mata Caballo	100	8.39	500	9.46	10.12	10.55	500	11.39	11.78	12.12	500	15.70	18.68	21.66	13.27
Epazote	57	7.91	285	8.34	8.50	8.62	285	9.23	9.77	9.87	285	12.02	13.06	14.10	6.19
H. santa	100	8.26	500	9.15	9.72	10.22	500	10.91	11.59	11.78	500	14.27	16.54	18.81	10.55
H. buena	100	8.38	500	9.43	9.90	10.23	500	11.46	12.10	12.48	500	14.15	15.87	17.13	8.75
H. Maestra	100	7.92	500	8.63	9.18	9.55	500	10.61	11.21	11.45	500	14.20	15.52	16.84	8.92
Albahaca	100	9.76	500	10.66	11.16	11.68	500	14.03	14.32	14.58	500	16.83	18.02	19.21	9.45
Estafiate	100	8.26	500	8.80	9.17	9.57	500	10.89	11.39	11.96	500	13.92	15.13	16.34	8.08



XI. REFERENCIAS.

1. PIEDRAFITA D, SPITHILL TW, SMITH RE, RAADSMA HW. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunol.* 2010:572-581.
2. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización panamericana de la salud 2003; 580:132-141.
3. ORGANIZACIÓN PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Organización para la Alimentación y la Agricultura 2003; 157:35-37.
4. BORAY JC. Flukes of domestic animals. In: Gaafar, SM, Howard, WE, Marsh E, editors. *Parasites, Pests and Predators*, 1985:179–218.
5. DARGIE JD. The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *Int J Parasitol* 1987; 17:453-463.



6. CEBALLOS L, MORENO L, ALVAREZ L, SHAW L, FAIRWEATHER I, LANUSSE C. Unchanged triclabendazole kinetics after co-administration with ivermectin and methimazole: failure of its therapeutic activity against triclabendazole-resistant liver fluke. *Vet Res* 2010; 6:1-8.

7. MOLL L, GAASENBEEK CPH, VELLEMA P, BORGSTEEDE FHM. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet Parasitol* 2000; 91:153-158.

8. OLAECHEA F, LOVERA V, LARROZA M , RAFFO F, CABRERA R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet Parasitol* 2011; 178:364–366.

9. HOSTE H, JACKSON F, ATHANASIADOU S, THAMSBORG SM, HOSKIN SO. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol* 2006; 6:253-261.

10. FERREIRA JFS, PEADEN P, KEISER J. *In vitro* trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*. Trematocidal plant alcoholic extracts. *Parasitol Res* 2011; 109:1585-1592.



11. SINGH TU, KUMAR D, TANDAN SK, MISHRA KS. Inhibitory effect of essential oils of *Allium sativum* and *Piper longum* on spontaneous muscular activity of liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Exp Parasitol* 2009; 123:302–308.
12. ALONSO DMA, TORRES AJFJ, SANDOVAL CCA, AGUILAR CAJ, HOSTE H. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet Parasitol* 2008; 153:313-319.
13. VERA MY, IBARRA VF, RAMIREZ AG, MUNGUÍA XJ. *In vitro* fasciolicide activity of some plant extracts against newly excysted flukes. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2008; 1149:180-182.
14. IBARRA MS, IBARRA VF, ÁVILA AJG. 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. *Am J of Plant Sci* 2012; 3:506-511.
15. VON SON DFE, ALONSO DMA, VALLES DLMB, CAPETILLO LCM. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Exp Parasitol* 2012; 131:413-418



16. QUIROZ RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México: Limusa, 1984.
17. BOWMAN DD. Parasitología para veterinarios 8ª ed. España: Elsevier, 2004.
18. IBARRA VF, FIGUEROA CJA, QUIROZ RH. Parasitología Veterinaria volumen: II Helmintos. México: Editorial Color, S.A de C.V 2011.
19. SOULSBY E JL. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México: Interamericana, 1987.
20. ALMAZÁN C, AVILA G, QUIROZ H, IBARRA F, OCHOA P. Effect of parasite burden in the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. Vet Parasitol 2001; 91:101-112.
21. MEZO M, GONZALES MW, CASTRO JAH, MUIÑO L, UBEIRA FM. Field evaluation of the MM3-SERO ELISA for detection of anti-Fasciola IgG antibodies in milk samples from individual cows and bulk milk tanks. Parasitol Int 2010; 59:610-615.
22. DALTON JP. Fasciolosis. United kingdom: Wallingford. 1999.



23. RASKIN I, RIBNICKY DM, KOAMRNYTSKY S, ILIC N, POULEV A, BORISJUK N, BRINKER A, MORENO DA, RIPOLL C, YAKOBY N, O'NEAL JM, CORNWELL T, PASTOR I, FRIDLENDER B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* 2002; 20:522-531.
24. ANTHONYJP, FYFE L, SMITH H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol* 2005; 21:462-468.
25. ELANGO G, RAHUMAN AA. Evaluation of medicinal plant extracts against ticks and fluke. *Parasitol Res* 2011; 108:513–519.
26. ALONSO DMA, TORRES AJFJ, SANDOVAL CCA, CAPETILLO LC, BRUNET S, HOSTE H. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol* 2008; 153:187-192.
27. ALONSO DMA, TORRES AJFJ, SANDOVAL CCA, HOSTE H. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2011; 181:360-364.



28. FERNÁNDEZ SA, ALONSO DMA, ACOSTA RR, TORRES AJFJ, SANDOVAL CCA, RODRÍGUEZ VRI. *In vitro* acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2011; 175:113-188.
29. CAMURÇA VALF, BEVILAQUA CML, MORAIS SM, MACIEL MV, COSTA CTC, MACEDO ITF, OLIVEIRA LMB, BRAGA RR, SILVA RA, VIEIRA LS, NAVARRO AMC. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 2008; 154:167-170.
30. FERNANDES FF, FREITAS SEP. Acaricidal activity of an oleoresinous extract of *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2007; 147:150-154.
31. COLUMBA M, CASTILLO. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Universidad Autónoma del estado de Morelos. México: Conabio, 2007.
32. RODRÍGUEZ A, COOMBES J, JIMENEZ R. Plantas silvestres de Puebla herbario y jardín botánico BUAP. México: Herbario BUAP, 2009.



33. CANO ALM. Flora Medicinal de Veracruz I. Inventario Etnobotánico. México; Universidad Veracruzana, 1997.
34. HARNBORNE JB. Phytochemical phylogeny; proceedings of the Phytochemical Society Symposium. London: Academic, 1970.
35. TREASE GE. Tratado de farmacognosis. México: Interamericana, 1987.
36. IBARRA OF, JENKINS DC. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. Parasitol Res 1984;70: 655-661.
37. STATPOINT TECHNOLOGIES, INC. Statgraphics Centurion XVI (Computer program) versión 16.1.17(64-bits) EUA, 2011.
38. LEORA SOFTWARE. 2003. In: ROBERTSON JL, PREISLER HK, RUSSELL RM. (Eds.) A user's guide to Probit or Logic Analysis. Berkley, USA, pp. 7-11.
39. IBARRA MS, IBARRA VF, ÁVILA AJG. Obtaining the minimum lethal dose against *Fasciola hepatica in vitro* using plant extract hexanes with fasciolicide activity and toxicity evaluation on CD1 male mice. Am J Plant Sci. 2012; 3:899-903.



40. GHANEM MTM, RADWAN HMA, MAHDY ESM, ELKHOLY YM, HASSANEIN HD, SHAHAT AA. Phenolic compounds from *Foeniculum vulgare* (Subsp. *Pipertum*) (Apiaceae) herb and evaluation of hepatoprotective antioxidant activity. *Phcog Res*, 20212; 4:104-108.
41. AKINLOYE AO, OLANIYI OM. Hepatoprotective effect of *Cajanus cajan* on tissue defense system in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. *Turk J Biochem* 2011; 36:237-241.
42. GHISALBERTI EL. Review *Lantana camara* L (Verbenaceae). *Fitoterapia* 2000; 71:467-486.
43. BHANUMATI S, CHHABRA SC, GUPTA SR, KRISHNAMOORTHY V. Cajaflavone: A new flavonone from *Cajanus cajan*. *Phytochemistry* 1978; 17:2045
44. AMARJIT, SINGH R. Allantoinase from nodules of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Phytochemistry* 1985; 24:415-418.
45. AKIHISA T, NISHIMURA Y, NAKAMURA N, ROY K, GHOSH P, THAKUR S, TAMURA T. Sterols of *Cajanus cajan* and three other leguminosae sedes. *Phytochemistry* 1992; 31:1769-1768.



46. RUIZ CA, CANO AE, DELGADO G. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana mexicana*. *Phytochemistry* 1993; 33:1113-1115.
47. PARMAR VS, JAIN SC, BISHT KS, JAIN R, TANEJA P, JHA A, TYAGI OM, PRASAD AK, WENGEL J, OLSEN CE, BOLL PM. Phytochemistry of the genus piper. *Phytochemistry* 1997; 46:597-673.
48. LISCOMBE DK, MACLEOD BP, LOUKKANINA N, NANDI OI, FACCHINI PJ. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* 2005; 66:1374-1393.
49. SAID FS, RAMOS GMC, MATA CBD, VARGAS VJ, VILLAREAL TL. *In vitro* antiprotozoal activity of leaves of *Artemisia ludoviciana*. *Fitoterapia* 2005; 76:466-468.

