



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE GORDOLOBO  
(*Bocconia frutescens*) CON ACTIVIDAD FASCIOLICIDA Y SU EVALUACIÓN  
BIOLÓGICA *in vitro***

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA:  
**JOSÉ MANUEL ALVAREZ MERCADO**

Tutora Principal

Dra. Yolanda Vera Montenegro. FMVZ-UNAM.

Comité Tutorial:

Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz. CEIEGT-FMVZ-UNAM.

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo. UBIPRO-FES Iztacala-UNAM.

México, D.F.

Febrero 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN.</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Impacto de <i>Fasciola hepatica</i> en la ganadería.</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Ciclo Biológico de <i>Fasciola hepatica</i>.</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Patogenia y patogenicidad de <i>Fasciola hepatica</i>.</b>	<b>7</b>
1.3.1 Lesiones causadas por <i>Fasciola hepatica</i> .	9
<b>1.4 Diagnóstico.</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Métodos de prevención y control.</b>	<b>11</b>
1.5.1 Antihelmínticos que actúan contra <i>Fasciola hepatica</i> .	11
<b>II. ANTECEDENTES.</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Fitoterapia veterinaria y el rol de los metabolitos secundarios.</b>	<b>15</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.</b>	<b>17</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.</b>	<b>18</b>
<b>V. OBJETIVO.</b>	<b>19</b>
<b>5.1 Objetivo General.</b>	<b>19</b>
<b>5.2 Objetivos particulares.</b>	<b>19</b>
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>20</b>
<b>6.1. Localización del estudio.</b>	<b>20</b>
<b>6.2. Colecta del material.</b>	<b>20</b>
<b>6.3 Preparación de los extractos.</b>	<b>20</b>
<b>6.4 Partición del extracto.</b>	<b>21</b>
<b>6.5 Obtención, determinación y purificación de Fracciones de <i>B. frutescens</i>.</b>	<b>21</b>
<b>6.6 Preparación de extractos y fracciones para su evaluación <i>in vitro</i>.</b>	<b>22</b>
<b>6.7 Bioensayo.</b>	<b>22</b>
<b>6.8 Análisis fitoquímico.</b>	<b>23</b>
<b>6.9 Interpretación de la Prueba.</b>	<b>23</b>

<b>6.10 Medición de la eficacia.</b>	<b>23</b>
<b>6.11 Análisis de datos.</b>	<b>23</b>
<b>VII. RESULTADOS.</b>	<b>24</b>
<b>7.1 Eficacia <i>in vitro</i> de extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico.</b>	<b>24</b>
7.1.1 Perfil fitoquímico del extracto metanólico de Gordolobo ( <i>B. frutescens</i> ).	26
<b>7.2 Eficacia de particiones metanólica hexánica, y metanólica pura.</b>	<b>27</b>
<b>7.3 Fraccionamiento del extracto metanólico partición hexánica.</b>	<b>29</b>
7.3.1 Eficacia de fracciones de Gordolobo ( <i>Bocconia frutescens</i> ).	29
7.3.2 Perfil fitoquímico de la fracción “ i ”.	33
<b>7.4 Purificación de la Fracción “ i ”.</b>	<b>34</b>
7.4.1 Evaluación de fracciones “ i 1 ” a “ i 9 ”.	34
7.4.2. Perfil fitoquímico de la Fracción.	38
<b>VIII. DISCUSIÓN.</b>	<b>39</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN.</b>	<b>42</b>
<b>X. REFERENCIAS.</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

ALVAREZ MERCADO JOSÉ MANUEL. **Determinación de metabolitos secundarios de gordolobo (*Bocconia frutescens*) con actividad fasciolicida y su evaluación biológica *in vitro*.** (Bajo la dirección de la Dra. Yolanda Vera Montenegro).

El objetivo del presente estudio, fue evaluar bajo condiciones *in vitro* el efecto anti-*Fasciola hepatica* de extractos de diferente polaridad de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) así como de sus fracciones. 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 CO<sub>2</sub> al 5%. Estas fueron expuestas por triplicado a concentraciones de 100 – 500 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. Los resultados indicaron que el extracto metanólico de Gordolobo (*Bocconia frutescens*), tuvo eficacia anti-fasciola *in vitro* a partir de las 24 hrs en todas las dosis probadas, (P < 0.01). Al particionar el extracto metanólico, se obtuvieron dos particiones una metanólica pura y otra hexánica obteniendo eficacias del 100% y del 90% respectivamente a partir de las 24 hrs (P < 0.05). Tras fraccionar el extracto se obtuvieron 13 fracciones de las cuales solo una, la fracción “i” tuvo eficacia anti-fasciola *in vitro* a las 24, 48 y 72 hs, (P < 0.01). El posterior fraccionamiento de esta dio como resultado 9 fracciones más en donde se obtuvieron eficacias a partir de las 24 hrs (P < 0.05). El análisis fitoquímico cualitativo realizado a cada una de estos (extractos y fracciones), muestra la constante presencia de alcaloides. Se concluye que los alcaloides de gordolobo (*B. frutescens*) mostraron una eficacia fasciolicida promisorio *in vitro*, se deben realizar estudios continuos, tendientes a demostrar la no toxicidad y eficacia fasciolicida *in vivo* en rumiantes.



## I. INTRODUCCIÓN.

Dentro de las enfermedades parasitarias más importantes en el área veterinaria destaca la Fasciolosis ocasionada por el trematodo *Fasciola hepatica*. Esta enfermedad se considera la enfermedad hepática más importante a nivel mundial la cual afecta tanto a rumiantes domésticos como al hombre. (FAO, 2003). En México se han realizado diferentes estudios epidemiológicos en donde se han observado prevalencias del 2% hasta el 100% a lo largo del país (Vera-Montenegro, 2011). Por otro lado Rana y Misra-Bhattacharya (2013) mencionan que solo en los Estados Unidos de Norte América (EUA) las pérdidas económicas causadas por infecciones parasitarias se han estimado en billones de dólares. El mayor impacto de estas se debe a los decomisos de hígados, así como muertes directas, además de la disminución de los parámetros productivos (ganancia de leche y/o carne), reproductivos (abortos, intervalos entre partos más largos y baja en eficiencia reproductiva), sin mencionar los costos en alimento y tratamiento (Dargie, 1987; Coles, 2001).

Durante décadas la quimioterapia ha sido el método de elección para el control de *F. hepatica* a nivel mundial, a través del tiempo se han desarrollado un considerable número de productos fasciolicidas, la mayoría se encuentra incluidos dentro de los grupos químicos de las salicilanilidas, benzimidazoles, sulfonamidas, fenoxialcanos y fenoles halogenados.

Pero el número de reportes de resistencia por parte del parásito a uno o más de estos grupos químicos va aumentando día a día, siendo esto consecuencia del uso indiscriminado de estos productos (mal uso y/o dosificación incorrecta), provocando una menor eficacia (Moll *et al.*, 2000; Ceballos *et al.*, 2010 y Olaechea *et al.*, 2011).



En respuesta a esto es necesario buscar alternativas a la quimioterapia convencional. Una de estas alternativas es la fitoterapia, a través de la etnoveterinaria que estudia e interpreta la historia y el uso de las diversas plantas a través del tiempo por grupos étnicos de sociedades antiguas y contemporáneas y la manera en la que eran usadas para curar diversos males, llevándonos a descubrir o redescubrir el potencial parasiticida de algunas de estas especies. (Cheeke y Shull, 1998; Sánchez-Peralta, 2015).

### **1.1 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 de los ingresos 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 *F. hepatica* (Piedrafita *et al.*, 2010).

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 (OPS, 2003; FAO, 2003).

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 30-350 gr/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 (Quiroz, 1984; Bowman, 2004; Vera-Montenegro, 2011).

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 (Vera-Montenegro, 2011).

### **1.2 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 da origen a redias hijas o de segunda generación y estas a las cercarías. La cercaría 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.

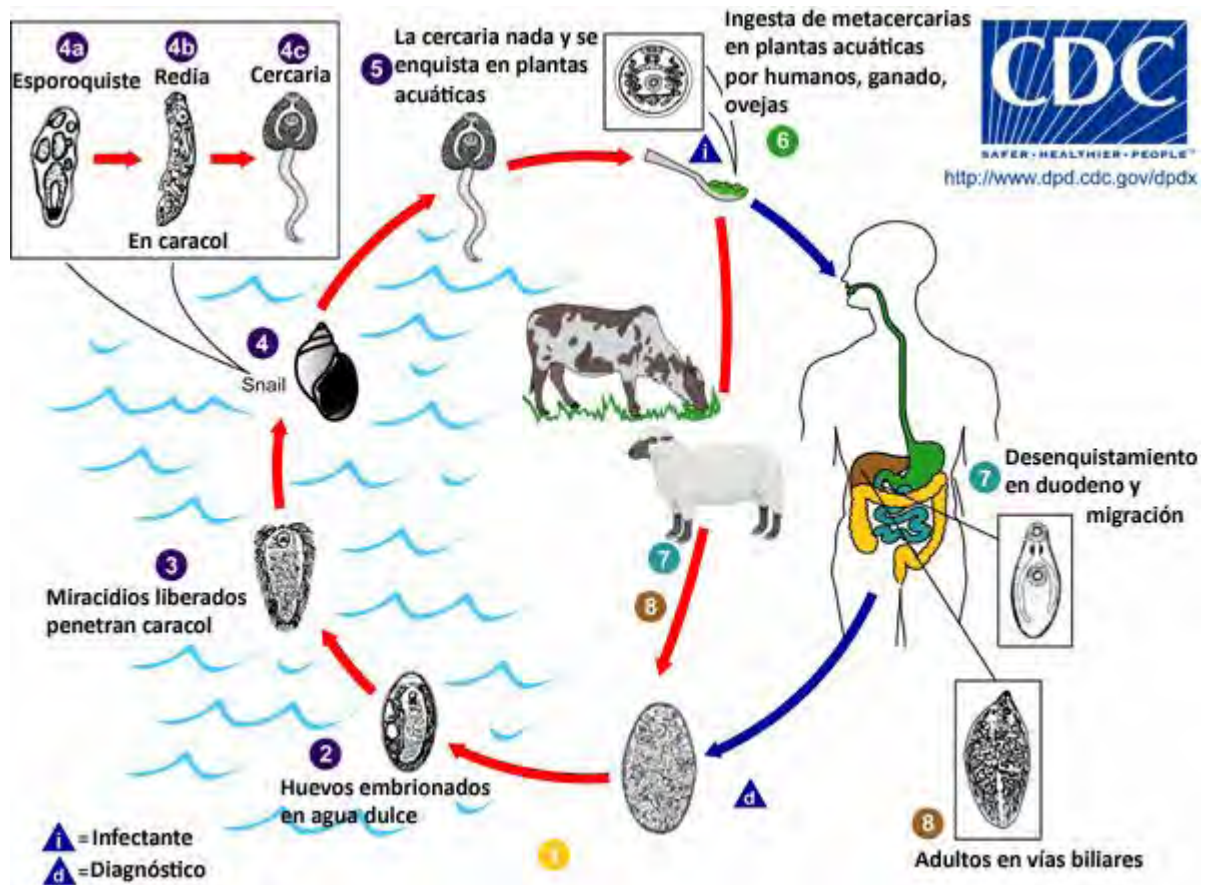
En el agua, las cercarias se adhieren a objetos, especialmente plantas o a la superficie inferior de la película superficial del agua; una vez adheridas pierden su cola y segregan a su alrededor un quiste de doble pared convirtiéndose así en una metacercaria. La metacercaria constituye la fase infectante del parásito, 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 (Vera-Montenegro, 2011).

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 metarcecarias (Quiroz, 1984; Soulsby, 1987; Bowman, 2004; Vera-Montenegro, 2011).



### 1.3 Patogenia y patogenicidad de *Fasciola hepatica*.

Durante el paso a través de la pared intestinal o la cavidad abdominal, *F. 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 (Soulsby, 1987; Vera-Montenegro, 2011).

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 bacterifera, 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 (Quiroz, 1984; Soulsby, 1987; Bowman, 2004; Vera-Montenegro, 2011).

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 (Vera-Montenegro, 2011).

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 (Quiroz, 1984; Soulsby, 1987; OPS, 2003; Vera-Montenegro, 2011).



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.

### **1.3.1 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 (Soulsby, 1987; Bowman, 2004; Vera-Montenegro, 2011).

### **1.4 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. (Soulsby, 1987; Bowman, 2004; Piedrafita *et al.*, 2010; Vera-Montenegro, 2011).

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 (Quiroz, 1984).

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 *F. hepatica*.

Desafortunadamente este tipo de diagnóstico no diferencia entre infecciones activas e infecciones anteriores ya que los anticuerpos contra *F. 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 (Almazán *et al.*, 2001; Mezo *et al.*, 2010; Piedrafita *et al.*, 2010).



## 1.5 Métodos de prevención y control.

Vera-Montenegro en el 2011 menciona que la profilaxis comprende 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.

### 1.5.1 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 eficacias de mayor o menor grado contra las diferentes estados evolutivos del trematodo.

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, el nitroxinil, closantel, rafoxanida, albendazol y triclabendazol (Dalton, 1999; Vera-Montenegro, 2011). Sin embargo el creciente número de reportes de resistencia hacia el triclabendazol, ha motivado a los investigadores a encontrar nuevas alternativas para el control de la fasciolosis.



## II. ANTECEDENTES.

Las plantas han sido usadas con propósitos medicinales desde que la raza humana existe, se tienen registros escritos acerca del uso de plantas desde hace 5000 años en la cultura sumeria. El estudio de estas comenzó observando a grupos de monos, caballos, y carnívoros en los que se reportaba el consumo de plantas para aliviar enfermedades parasitarias e intestinales (Smith-Shalkwijk, M.J, 1999).

Durante el curso de la historia para la humanidad, el uso de plantas como fuente 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 (Raskin *et al.*, 2002).

Las plantas están constantemente expuestas y amenazadas por una gran variedad de patógenos presentes en su medio ambiente, por lo cual generan componentes de defensa los cuales son conocidos como metabolitos secundarios.

Algunas plantas expresan de manera constante estos compuestos y otros se activan al ser dañadas algunas de sus estructuras celulares o también son producidos por señalización exógena, sin embargo muchos de estos han sido usados como remedios para dolores de cabeza e infecciones de origen bacteriano, micótico, viral y parasitocida, 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 (Verpoorte, 1999; Shukla, *et al.*, 2013).

Entre los metabolitos que han demostrado actividad contra una amplia gama de parásitos se encuentran: polisacáridos, esteroides, compuestos aromáticos (aceites esenciales, alcoholes y cetonas), glicosidos, alcaloides, saponinas, skimmiaepinas A y C, taninos o flavonoides, terpenos (mono, di y triterpenos) y xantonas (Smith-Shalkwijk, 1999; Anthony *et al.*, 2005).



Estos compuestos actúan de diversas maneras, algunos, como los taninos actúan como inmuno-moduladores 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 (Hoste *et al.*, 2006; Elango *et al.*, 2011; Von Son *et al.*, 2012).

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 (Anthony *et al.*, 2005).

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 metabolitos secundarios, los de mayor importancia en cuanto al desarrollo de nuevas alternativas para el control de las parasitosis.

## **2.1 Fitoterapia veterinaria y el rol de los metabolitos secundarios.**

Estudios recientes han demostrado que los extractos de plantas poseen componentes con potencial antiparasitario, algunos investigadores han usado extractos de plantas en contra de diversos parásitos: Alvarez-Mercado (2013) e Ibarra-Moreno *et al.* (2012) trabajaron in vitro con extractos de plantas mexicanas, obteniendo eficacias anti *F. hepatica* del 80% - 100% ( $p < 0.05$ ) en diferentes concentraciones con Estafiate (*Artemisia mexicana*), Gordolobo (*Bocconia frutescens*), Lantana (*Lantana camara*), Hierba santa (*Piper auritum*), Guandúl (*Cajanus cajan*); Chaparro amargo (*Castela tortuosa*), Plumajillo (*Achillea millefolium*), Tomillo (*Thymus vulgaris*), Muicle (*Justicia spicigera*), Cedron (*Limpia critridora*), Alamo (*Populus alba*), Menta (*Mentha piperita*), Epazote de zorrillo (*Chenopodium graveolens*), Orégano (*Lippia graveolens*) y Ajenjo (*Artemisia absinthium*).



Por otro lado Fernández-Salas *et al.* (2011) obtienen con *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*) un 88.14% ( $p < 0.01$ ) de mortalidad en contra de larvas de *Rhipicephalus microplus*.

Con respecto a nematodos gastrointestinales Camurça-Vasconcelos *et al.*, (2008) usando el aceite esencial de Orégano (*Lippia sidoides*) redujo entre un 30% y un 40.2% ( $p > 0.05$ ) el conteo de huevos en heces de *Haemonchus spp.* y *Trichostrongylus spp.*

Alonso-Díaz y colaboradores en el 2008 utilizando extractos liofilizados de *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*), Huizache (*Acacia pennatula*) y Tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) obtuvieron eficacias entre 45.5% y 91.2% ( $p < 0.01$ ) al inhibir la migración de L3 de *Haemonchus spp.*

En el 2013 Sangian, utilizó hierba Cañamera (*Althea officinalis* L.), Mirto (*Myrtus communis* Linn), Planta del llantén (*Plantago major*) y Regaliz (*Glycyrrhiza glabra* L.) contra *Plasmodium spp.*, obteniendo 56.52% y un 65.57% de inhibición del parásito.

En relación al protozoario *Plasmodium spp.*, Sangian en el (2013), utilizó hierba Cañamera (*Althea officinalis* L.), Mirto (*Myrtus communis* Linn), Planta del llantén (*Plantago major*) y Regaliz (*Glycyrrhiza glabra* L.) obteniendo 56.52% y un 65.57% de inhibición del parásito.



### III. JUSTIFICACIÓN.

Los continuos reportes de resistencia parasitaria alrededor del mundo dan pauta al desarrollo de nuevas estrategias o alternativas para el control de *Fasciola hepatica*, dentro de estas, existe la fitoterapia, dada la gran diversidad de especies vegetales en el mundo y la gran cantidad de compuestos químicos que se pueden obtener a partir de estas, representa un amplio abanico de posibilidades poco estudiado para el control de la fasciolosis.



#### IV. HIPÓTESIS

El extracto de Gordolobo (*Bocconia frutescens*), sus fracciones y metabolitos secundarios presentarán un 90% de eficacia contra *Fasciola hepatica* bajo condiciones *in vitro*.



## V. OBJETIVO

### 5.1 Objetivo General.

Evaluar y determinar *in vitro* el efecto anti-fasciola del extracto de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) y sus metabolitos secundarios.

### 5.2 Objetivos particulares.

- Determinar e identificar la(s) fracciones y lo(s) metabolitos secundarios responsables del efecto anti-fasciola *in vitro*.



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Localización del estudio.

Las colectas de Gordolobo (*B. frutescens*) se realizaron en el municipio de Tlapacoyan Veracruz, México.

La obtención de los extractos y fracciones se realizó en el laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala-UNAM.

Las evaluaciones *in vitro* se llevaron a cabo en el laboratorio de quimioterapia experimental de helmintos del Depto. de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ)-UNAM.

### 6.2. Colecta del material.

Se colectaron aproximadamente dos kilogramos de Gordolobo (*B. frutescens*) en la localidad antes mencionada, las cuales fueron transportadas a las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) donde se secaron en un horno por 3 días a 60°C utilizando la metodología descrita por Monroy-Ortíz y Castillo, (2007); Rodríguez *et al.*, (2009).

### 6.3 Preparación de los extractos.

Para la elaboración de extractos se usaron las hojas de la planta, haciendo uso de solventes de diferente polaridad (Hexano, Acetato de Etilo y Metanol) en una proporción 1:5 (hojas:solvente). Después de macerar la planta, se llevó a sequedad, eliminando el contenido de solventes mediante el uso de un rota evaporador Heidolph® a baja presión usando las siguientes condiciones de temperatura y revoluciones por minuto (RPM) (Harnborne, 1970 y Trease, 1987):

- a) Hexano.- 40°C y 50 RPM.
- b) Acetato de etilo 65°C y 60 RPM.
- c) Metanol 60°C y 90 RPM.





Se realizó una destilación por semana durante un mes. Posteriormente, los extractos fueron colocados en envases de cristal y almacenados en refrigeración a (4°C) hasta su posterior evaluación *in vitro*.

#### **6.4 Partición del extracto.**

Una vez procesadas los extractos se observó que de acuerdo a las características fisicoquímicas de estos, presentaban problemas para fraccionarse por lo que se decidió realizar una partición, mediante la siguiente técnica:

1. Reconstituir el extracto usando el solvente correspondiente.
2. Usando una parrilla con agitador, calentarlo sin llevarlo al punto de ebullición.
3. Adicionar un solvente de menor polaridad, el cual nos permita “desengrasar el extracto”, con lo cual las moléculas afines a este solvente compitan y se unan a él.
4. Una vez aumentada la temperatura del extracto, se le adicionado el segundo solvente, la mezcla se deposita en un embudo de separación.
5. En este se forman dos fases una más polar que se depositó en la parte inferior del embudo y una menos polar que se encontró el parte superior del embudo.

#### **6.5 Obtención, determinación y purificación de Fracciones de *B. frutescens*.**

Todas las fracciones o particiones del extracto, que obtuvieron eficacias mayores al 90%, se procedieron a fraccionar a través de cromatografía de columna abierta usando como sistema de elusión hexano: diclorometano, diclorometano: metanol (como fase móvil) y silica gel 60 Å como fase estacionaria.

En donde se obtuvieron alicuotas para observar el desarrollo de la cromatografía de columna verificandose por medio de una cromatografía líquida de capa fina (CLCF). Las cromatoplasmas se revelaron con una lámpara de luz ultravioleta (UV) (254 y 366nm), para así organizarlas por su patrón cromatográfico.



La(s) alícuotas con un patrón cromatográfico similar se reunieron en fracciones a las cuales se les realizaron las pruebas de actividad biológica correspondiente para seleccionar la fracción activa(s) de *B. frutescens* (Stahl, 1969; Wagner y Bladt, 1998).

### **6.6 Preparación de extractos y fracciones para su evaluación *in vitro*.**

Para la evaluación se usaron 500 mg de extracto o fracción (Hexánico, Acetato de etilo y Metanólico) el cual fue puesto en tubos eppendorf y se le añadieron 0.1 ml del solvente correspondiente, para aforar a 10 ml. Se realizaron diluciones decuples con agua destilada para así evaluarlos en concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg / L.

### **6.7 Bioensayo.**

Para evaluar el efecto anti-fasciola de cada extracto, se utilizaron fasciolas recién desenquistadas artificialmente, de acuerdo a la técnica descrita por Ibarra y Jenkins, (1984).

Se usaron cajas de cultivo marca NUNC® de 24 pozos, en cada pozo se depositó 1.6 ml de medio completo (RPMI®-1640 con glutamina y suero bovino), 0.2 ml del extracto solubilizado y 0.2 ml conteniendo 10 fasciolas.

Por cada placa, se usaron 4 pozos testigo, 3 de ellos sólo contenían medio de cultivo y fasciolas (Testigo negativo), mientras que el último pozo únicamente el medio RPMI®, fasciolas y 0.1 ml del solvente correspondiente para comprobar la no toxicidad de este. Adicionalmente 4 pozos más conteniendo triclabendazol (SOFOREN®, Novartis) en dosis de 10 y 50 mg/l (Testigo positivo).

Cada extracto y fracción fue probado por triplicado y aquel o aquellos que mostraron mayor actividad fueron evaluados nuevamente por triplicado a fin de tener seguridad de la eficacia en los resultados obtenidos. Cada prueba permaneció en incubación a 37°C durante 4 días bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.



### 6.8 Análisis fitoquímico.

A los extractos o fracciones que presentaron eficacias mayores o iguales al 90%, se les realizó un análisis fitoquímico cualitativo, para determinar el perfil fitoquímico (Shukla *et al*, 2013), el cual nos permitió reconocer los metabolitos secundarios presentes en los extractos y fracciones de *B. frutescens*.

### 6.9 Interpretación de la Prueba.

Las fasciolas bajo estudio fueron examinadas cuidadosamente a las 24, 48 y 72h utilizando un microscopio invertido a 40 x. La actividad anti-fasciola fué medida por comparación de la sobrevivencia del grupo tratado en relación al grupo Testigo.

Todos los procedimientos fueron realizados bajo condiciones asépticas utilizando una campana de flujo laminar.

### 6.10 Medición de la eficacia.

La eficacia fué medida utilizando la siguiente formula:

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

Cuando se mostró eficacia superior al 90% se consideró que poseía actividad fasciolicida (Marchiondo, *et al.*, 2007).

### 6.11 Análisis de datos.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico usando la prueba de Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 99% para determinar diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones, tiempos y tratamientos (extractos / fracciones) (Systat Software V12, 2008).



## VII. RESULTADOS.

Cabe mencionar que durante todos los bioensayos los controles positivos mostraron una eficacia del 100% a partir de las 24 hrs, razón por la cual no se ven reportados en los cuadros de resultados.

### 7.1 Eficacia *in vitro* de extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico.

Los resultados mostraron que el extracto hexánico a las 24 y 48 h obtuvo eficacias entre el 4 y 8% en las dosis altas, mostrando una eficacia similar del 4% a las 72 h en la concentración de 300 mg/L. Con respecto al extracto de acetato de etilo mostró eficacias de 4% a partir de las 24 hrs a 200 mg /L, manteniéndose constante en todos los tiempos, observándose un incremento a 21% de eficacia a partir de la concentración de 400 mg. El extracto metanólico reportó eficacia anti-fasciola del 100% en todas las concentraciones, a partir de las 24 h de exposición ( $P < 0.01$ ). (Cuadro 1).

Al realizar la prueba de Kruskal-Wallis se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las eficacias obtenidas de los extractos de diferente polaridad, entre las medias de las concentraciones, así como entre los tratamientos ( $P < 0.01$ ). Sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de exposición ( $P > 0.05$ ).



**Cuadro 1. Eficacia fasciolicida *in vitro*, de extractos de diferente polaridad de Gordolobo (*Bocconia frutescens*).**

Tiempo (hrs)	Extracto	Control Negativo	Eficacia (%)*				
			Concentración (mg / L)				
			100	200	300	400	500
24	Hexánico	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	4 ± 0.07 <sup>c</sup>	8 ± 0.14 <sup>d</sup>
	Acetato de Etilo	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4 ± 0.07 <sup>b</sup>	8 ± 0.14 <sup>c</sup>	21 ± 0.07 <sup>d</sup>	21 ± 0.07 <sup>e</sup>
	Metanólico	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
48	Hexánico	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	8 ± 0.07 <sup>b</sup>	8 ± 0.14 <sup>c</sup>
	Acetato de Etilo	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4 ± 0.07 <sup>b</sup>	13 ± 0.13 <sup>c</sup>	21 ± 0.07 <sup>d</sup>	21 ± 0.07 <sup>e</sup>
	Metanólico	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
72	Hexánico	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4 ± 0.07 <sup>b</sup>	8 ± 0.07 <sup>c</sup>	8 ± 0.14 <sup>d</sup>
	Acetato de Etilo	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4 ± 0.07 <sup>b</sup>	13 ± 0.13 <sup>c</sup>	21 ± 0.07 <sup>d</sup>	21 ± 0.07 <sup>e</sup>
	Metanólico	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. (P<0.01).

\* valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.

Dado que los resultados obtenidos con el extracto metanólico mostraron eficacias del 100% en todos los tiempos y en todas las concentraciones del estudio *in vitro*, se realizó una nueva evaluación obteniéndose los siguientes resultados que se muestran en el cuadro 2, en donde los resultados mostraron eficacias del 100% (P< 0.01).

**Cuadro 2. Segunda evaluación del extracto metanólico de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) con eficacia anti-fasciola.**

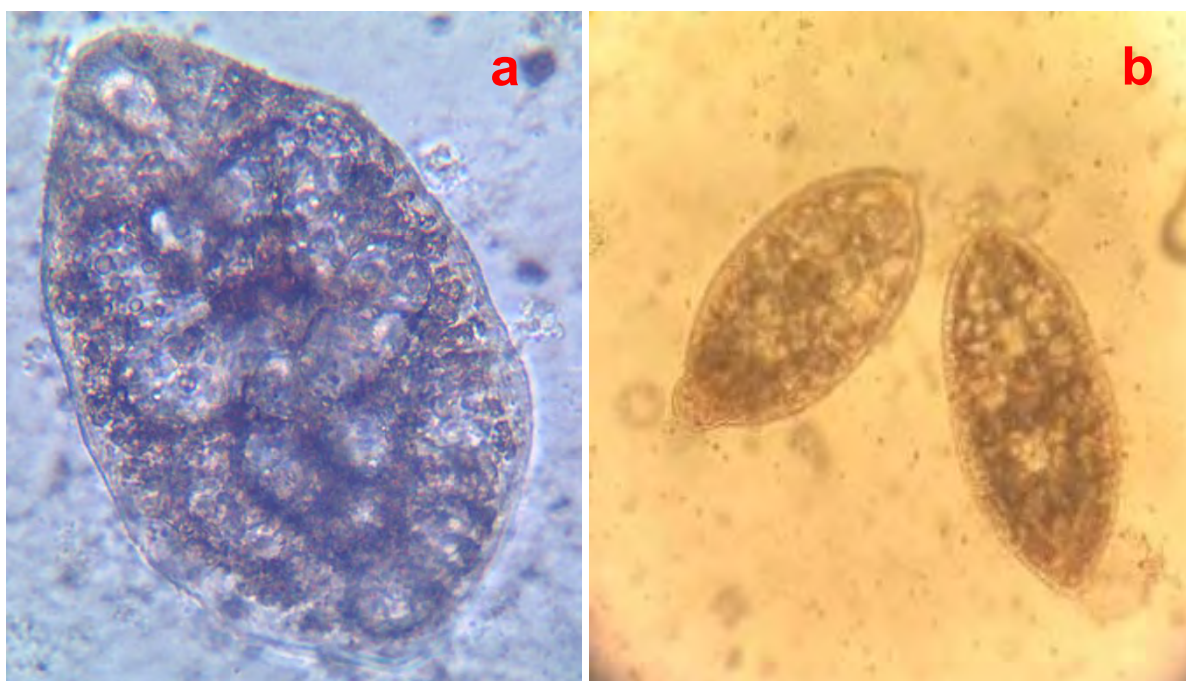
Tiempo (hrs)	Extracto	Control Negativo	(% Eficacia *				
			Concentración (mg / L)				
			100	200	300	400	500
24	Metanólico	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. (P<0.01).

\* valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.



En la figura 1a se muestra una fasciola sana (testigo sin tratamiento) en la cual no se observan cambios físicos aparentes. En la figura 1b muestra cambios de coloración en el aparato digestivo y pérdida de motilidad generados por el extracto metanólico.



**Figura 1. Fasciolas recién desenquistadas sin Tx (a) y tratadas con el extracto metanólico de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) (b) a las 24 hrs.**

#### **7.1.1 Perfil fitoquímico del extracto metanólico de Gordolobo (*B. frutescens*).**

Los datos obtenidos del extracto metanólico de *B. frutescens* mostraron eficacias del 100% ( $P < 0.01$ ) a las 24 h y en todas sus concentraciones, por lo que se decidió seleccionarlo para su fraccionamiento mediante cromatografía de columna y determinar los metabolitos secundarios presentes.



En el cuadro 3 se observa principalmente la presencia de compuestos fenólicos, cumarinas, alcaloides, esteroides y triterpenos, mediante el uso de pruebas colorimétricas cualitativas.

**Cuadro 3. Análisis fitoquímico del extracto metanólico de Gordolobo (*B. frutescens*).**

	Reacción colorimétrica	Resultado
Compuestos fenólicos	(FeCl <sub>3</sub> )	+
Cumarinas	(UV)	++
Flavonas	(NH <sub>3</sub> )	--
Flavonoides	(Shinoda)	--
Lactonas sesquiterpénicas	(Baljet)	--
Alcaloides	(Meyer)	+++
Alcaloides	(Dragendorff)	+++
Esteroides y triterpenos	(Lieberman, Burchard)	++
Glucosidos	( $\alpha$ -naphthol)	--

Simbología: -- negativo, + débilmente positivo, ++ positivo, +++ fuertemente positivo.

## 7.2 Eficacia de particiones metanólica hexánica, y metanólica.

Debido a las características físico-químicas del extracto, el fraccionamiento a través de cromatografía de columna no fue posible de realizar, por lo que se realizó una partición de este. Obteniéndose así dos particiones, una metanólica y metanólica hexánica las cuales se evaluaron con el mismo procedimiento para conocer si había diferencia entre sus eficacias y poder así aislar los metabolitos secundarios responsables de la actividad fasciolicida. Obteniéndose los siguientes resultados.

En el cuadro 4 se puede observar que la partición metanólica mostró una eficacia del 100% ( $P < 0.05$ ) a partir de las 24 hrs en todas las concentraciones con excepción de la de 100 mg / L, donde se obtuvo una eficacia del 57% ( $P < 0.05$ ). A las 48 hrs aumentó la eficacia a 80% en la concentración de 100 mg / L ( $P < 0.05$ ) y finalmente a las 72 h post-exposición mostró una actividad de 83% ( $P < 0.05$ ).



Mientras que la partición metanólica hexánica (Cuadro 5), obtuvo eficacias de entre el 47 y 87% ( $P < 0.05$ ), en las dosis probadas a las 24 hrs. Finalmente a las 48 h la partición hexánica, presentó un 100% de eficacia en todas las concentraciones ( $P < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos de las evaluaciones de las particiones mostraron que ambos extractos tuvieron eficacia anti-fasciola. La prueba de Kruskal-Wallis indico diferencias significativas entre las medias de las eficacias de los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 4. Porcentajes de Eficacia *in vitro* de la partición metanólica de Gordolobo (*Bocconia frutescens*).**

Tiempo (hrs)	Control Negativo	Eficacia (%)*				
		Concentración (mg /L)				
	0	100	200	300	400	500
24	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
48	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>

Distinta literal entre filas indica diferencias estadísticamente significativas. ( $P < 0.05$ ).

\* valor promedio de tres replicas  $\pm$  Desviación Estándar.

**Cuadro 5. Porcentajes de Eficacia *in vitro* de la partición metanólica hexánica de Gordolobo (*Bocconia frutescens*).**

Tiempo (hrs)	Control Negativo	Eficacia (%)*				
		Concentración (mg /L)				
	0	100	200	300	400	500
24	0 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>	90 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	93 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
48	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>

Distinta literal entre filas indica diferencias estadísticamente significativas. ( $P < 0.05$ ).

\* valor promedio de tres replicas  $\pm$  Desviación Estándar.





### 7.3 Fraccionamiento de la partición hexánica.

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió que la partición hexánica se purificara por medio de un sistema de cromatografía de columna abierta dado que las características de esta partición permiten una separación adecuada de sus elementos para obtener el compuesto o compuestos responsables de la eficacia anti-fasciola. Para realizar esta columna se hizo uso de un sistema de elusión hexano: diclorometano, diclorometano: metanol.

Tras fraccionar la partición, se obtuvieron 13 fracciones (Fracciones “ a “ – “ m ”) de estas se descartó la primera de estas (Fracción “ a ”), el criterio para realizar este descarte radica en posibilidad de contaminación con el gospol propio del algodón utilizado en la técnica de cromatografía de columna. El resto de las fracciones, de la “ b ” a la “ m ” fueron evaluadas bajo la misma técnica.

#### 7.3.1 Eficacia de fracciones de Gordolobo (*Bocconia frutescens*).

Los resultados mostraron que la fracción “i” generó una eficacia del 100% a partir de la concentración de 300 mg/L a las 24 h. y de 97% a 200/mg/L a las 48 hrs. ( $P < 0.01$ ). Finalmente a las 72 h, la concentración de 200 mg / L produjo una eficacia del 100% ( $P < 0.01$ ).

El análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre las medias de la eficacia y de las concentraciones de los tratamientos ( $P < 0.01$ ). (Cuadro 6).

La fracción “ f ” obtuvo eficacia del 13% ( $P < 0.01$ ) a concentración de 500 a las 24 h. Mientras que a las 48 hrs registró un aumento a un 27% ( $P < 0.01$ ). A las 72 hrs no se observó cambio alguno en la eficacia (Cuadro 6).



**Cuadro 6. Porcentajes de Eficacia fasciolicida *in vitro* de las fracciones b-m de Gordolobo (*Bocconia frutescens*).**

Tiempo	Fracción	Control Negativo	Eficacia (%)* Concentración (mg / L)				
			100	200	300	400	500
24 h	b	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	c	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	d	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	e	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	f	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7 ± 0.06 <sup>b</sup>	13 ± 0.12 <sup>c</sup>
	g	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	h	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	i	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	57 ± 0.06 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>
	j	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	k	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	l	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	m	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
48 h	b	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	c	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	d	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	e	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	f	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	27 ± 0.06 <sup>c</sup>	27 ± 0.06 <sup>d</sup>
	g	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	h	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	i	0 <sup>a</sup>	7 ± 0.12 <sup>b</sup>	97 ± 0.06 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
	j	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	k	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	l	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	m	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
72 h	b	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	c	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	d	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	e	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	f	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	27 ± 0.06 <sup>c</sup>	27 ± 0.06 <sup>d</sup>
	g	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	h	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	i	0 <sup>a</sup>	7 ± 0.12 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
	j	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	k	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	l	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	m	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. (P<0.01).

\* valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.



Los resultados de eficacia de la evaluación confirmatoria de las fracciones i mostraron similitudes con la primera evaluación. (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Evaluación confirmatoria de las eficacias de la fracción i de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) contra *F. hepatica in vitro*.**

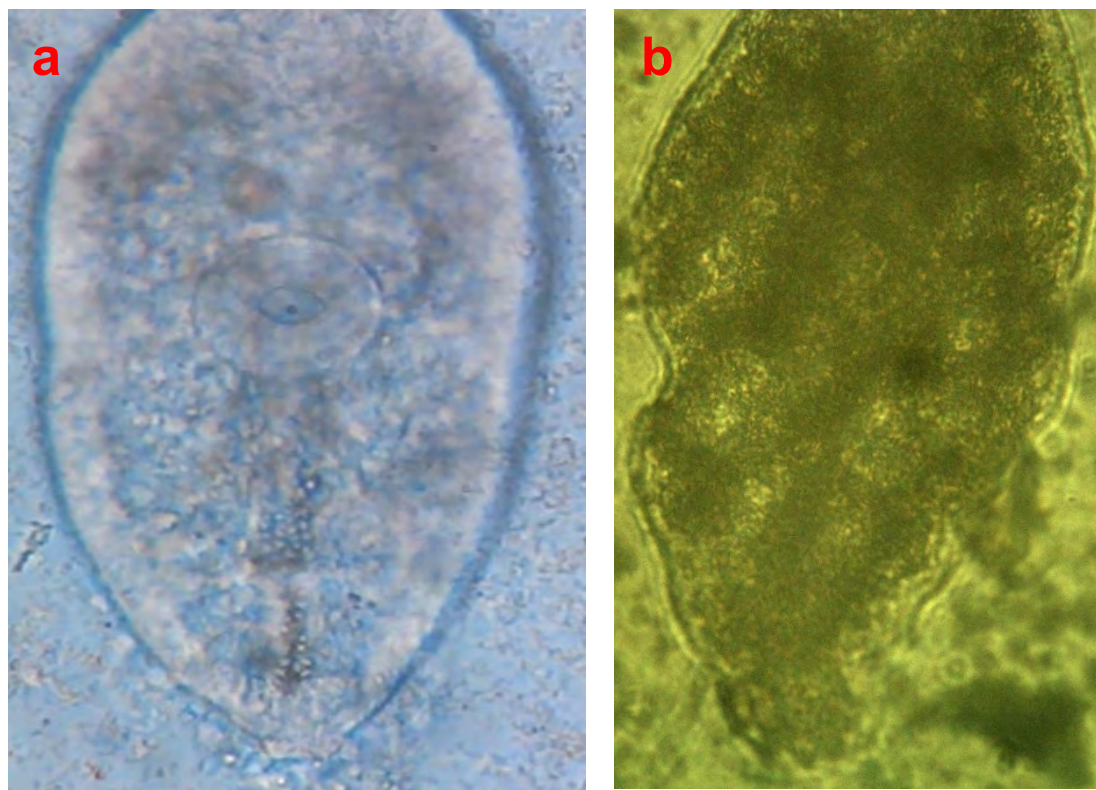
Tiempo	Control Negativo	Eficacia (%) <sup>a</sup>				
		Concentración (mg / L)				
		0	100	200	300	400
24 h	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	77 ± 0.06 <sup>b</sup>	87 ± 0.06 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>
48 h	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	97 ± 0.06 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
72 h	0 <sup>a</sup>	33 ± 0.29 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>

Distinta literal entre columnas indica diferencias estadísticamente significativas. (P<0.01).

<sup>a</sup> valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.

En la figura 2a se observa una fasciola del grupo testigo sin tratamiento. En la figura 2b se aprecia un cambio radical en la estructura física de la fasciola tratada con la fracción “i”, así como un cambio conformacional radical al perder por completo su estructura interna y por su parte en el tegumento se puede observar pérdida de forma e incluso la ruptura de este.





**Figura 2. Fasciola del grupo testigo(a) y fasciola tratada con la fracción i (b) de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) a las 24 hrs.**

### **7.3.2 Perfil fitoquímico de la fracción “ i ”.**

Se procedió a realizar el análisis fitoquímico de la fracción “i” por medio de diferentes pruebas, obteniéndose reacciones positivas a Alcaloides y Lactonas sesquiterpénicas (Cuadro 8).



**Cuadro 8. Análisis fitoquímico de la Fracción “ i ” de Gordolobo (*B. frutescens*).**

Metabolito	Prueba	Resultado
Alcaloides	(Dragendorff)	+++
Cumarinas	(UV)	-
Esteroides	(Lieberman-Burchard)	-
Taninos, Flavonoides y fenil propanoles	(Cloruro férrico)	-
Glucósidos	(Molisch)	-
Lactonas sesquiterpénicas	(Baljet)	+

Simbología: -- negativo, + débilmente positivo, ++ positivo, +++ fuertemente positivo.

### 7.4 Purificación de la Fracción “ i ”.

Para purificar la fracción “ i ” se usó una cromatografía de columna abierta en donde se utilizó un sistema de elusión diclorometano : metanol, metanol : agua. Obteniéndose 9 fracciones (Fracciones “ i 1 “ – “ i 9 ”) siendo evaluadas bajo el mismo procedimiento.

#### 7.4.1 Evaluación de fracciones “ i 1 ” a “ i 9 ”.

Los cuadros 9, 10 y 11 muestran los resultados de las eficacias, a las 24, 48 y 72 horas respectivamente. La fracción “i 4 ” fue la que presentó el 100% de eficacia a partir de la concentración más baja, a las 24 h ( $P < 0.05$ ), en cuanto a las demás fracciones estas no superaron el 80% ( $P < 0.05$ ).

Al comparar las fracciones, el análisis estadístico mostró diferencias estadísticamente significativas entre “ i 1 ”, “ i 4 ” e “ i 7 ” siendo la primera de estas la menos eficaz diferente del resto de las fracciones. Mientras que “ i 4 ” mostró mayor eficacia que el resto.

Al interrelacionar las variables fracciones y concentración se determinó que estas están relacionadas en la eficacia total.



**Cuadro 9. Porcentajes de Eficacia fasciolicida de las fracciones “i 1 ” a “i 9 ” a las 24 hrs.**

Fracción	Control Negativo	Eficacia (%)*				
		100 mg / L	200 mg / L	300 mg / L	400 mg / L	500 mg / L
i1	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
i2	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
i3	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	17 ± 0.06 <sup>b</sup>	20 ± 0.17 <sup>c</sup>	53 ± 0.15 <sup>d</sup>
i4	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
i5	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	17 ± 0.15 <sup>b</sup>	17 ± 0.15 <sup>c</sup>	40 ± 0.20 <sup>d</sup>	40 ± 0.20 <sup>e</sup>
i6	0 <sup>a</sup>	17 ± 0.15 <sup>b</sup>	17 ± 0.15 <sup>c</sup>	37 ± 0.11 <sup>d</sup>	40 ± 0.20 <sup>e</sup>	47 ± 0.11 <sup>f</sup>
i7	0 <sup>a</sup>	37 ± 0.11 <sup>b</sup>	63 ± 0.06 <sup>c</sup>	73 ± 0.21 <sup>d</sup>	80 <sup>e</sup>	80 <sup>f</sup>
i8	0 <sup>a</sup>	3 ± 0.06 <sup>b</sup>	10 ± 0.10 <sup>c</sup>	23 ± 0.06 <sup>d</sup>	57 ± 0.06 <sup>e</sup>	57 ± 0.31 <sup>f</sup>
i9	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	13 ± 0.06 <sup>b</sup>	13 ± 0.11 <sup>c</sup>	17 ± 0.11 <sup>d</sup>	20 ± 0.10 <sup>e</sup>

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

\* valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.

**Cuadro 10. Porcentajes de Eficacia fasciolicida de las fracciones “i 1 ” a “i 9 ” a las 48 hrs.**

Fracción	Control Negativo	Eficacia (%)*				
		100 mg / L	200 mg / L	300 mg / L	400 mg / L	500 mg / L
i1	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
i2	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7 ± 0.06 <sup>b</sup>	7 ± 0.11 <sup>c</sup>	10 ± 0.10 <sup>d</sup>	20 ± 0.26 <sup>e</sup>
i3	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	23 ± 0.11 <sup>b</sup>	30 ± 0.17 <sup>c</sup>	77 ± 0.21 <sup>d</sup>
i4	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
i5	0 <sup>a</sup>	3 ± 0.06 <sup>b</sup>	23 ± 0.15 <sup>c</sup>	23 ± 0.06 <sup>d</sup>	43 ± 0.21 <sup>e</sup>	70 ± 0.26 <sup>f</sup>
i6	0 <sup>a</sup>	20 ± 0.20 <sup>b</sup>	33 ± 0.15 <sup>c</sup>	40 ± 0.10 <sup>d</sup>	40 ± 0.20 <sup>e</sup>	60 ± 0.10 <sup>f</sup>
i7	0 <sup>a</sup>	47 ± 0.15 <sup>b</sup>	73 ± 0.06 <sup>c</sup>	70 ± 0.25 <sup>d</sup>	80 <sup>e</sup>	87 ± 0.11 <sup>f</sup>
i8	0 <sup>a</sup>	3 ± 0.06 <sup>b</sup>	13 ± 0.06 <sup>c</sup>	27 ± 0.06 <sup>d</sup>	60 <sup>e</sup>	63 ± 0.32 <sup>f</sup>
i9	0 <sup>a</sup>	7 ± 0.06 <sup>b</sup>	17 ± 0.11 <sup>c</sup>	17 ± 0.06 <sup>d</sup>	20 ± 0.10 <sup>e</sup>	27 ± 0.06 <sup>f</sup>

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

\* valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.



**Cuadro 11. Porcentajes de Eficacia fasciolicida de las fracciones “i 1 ” a “i 9 ” a las 72 hrs.**

Fracción	Control Negativo	Eficacia (%)*				
		100 mg / L	200 mg / L	300 mg / L	400 mg / L	500 mg / L
i1	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
i2	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7 ± 0.06 <sup>b</sup>	10 ± 0.10 <sup>c</sup>	13 ± 0.06 <sup>d</sup>	23 ± 0.23 <sup>e</sup>
i3	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	37 ± 0.06 <sup>b</sup>	40 ± 0.10 <sup>c</sup>	77 ± 0.21 <sup>d</sup>
i4	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
i5	0 <sup>a</sup>	3 ± 0.06 <sup>b</sup>	30 ± 0.17 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>	47 ± 0.15 <sup>e</sup>	73 ± 0.25 <sup>f</sup>
i6	0 <sup>a</sup>	23 ± 0.15 <sup>b</sup>	33 ± 0.15 <sup>c</sup>	40 ± 0.10 <sup>d</sup>	40 ± 0.20 <sup>e</sup>	60 ± 0.10 <sup>f</sup>
i7	0 <sup>a</sup>	50 ± 0.10 <sup>b</sup>	77 ± 0.06 <sup>c</sup>	80 ± 0.26 <sup>d</sup>	83 ± 0.06 <sup>e</sup>	87 ± 0.11 <sup>f</sup>
i8	0 <sup>a</sup>	3 ± 0.06 <sup>b</sup>	13 ± 0.06 <sup>c</sup>	30 <sup>d</sup>	67 ± 0.11 <sup>e</sup>	67 ± 0.29 <sup>f</sup>
i9	0 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	17 ± 0.11 <sup>c</sup>	17 ± 0.06 <sup>d</sup>	27 ± 0.06 <sup>e</sup>	33 ± 0.06 <sup>f</sup>

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

\* valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.

Los datos confirmatorios de la fracción i4 (Cuadro 12), mostraron resultados similares a la primera evaluación, obteniéndose eficacias de entre 93 y 100 % (P<0.05).

**Cuadro 12. Segunda evaluación de fracción “i 4 ”.**

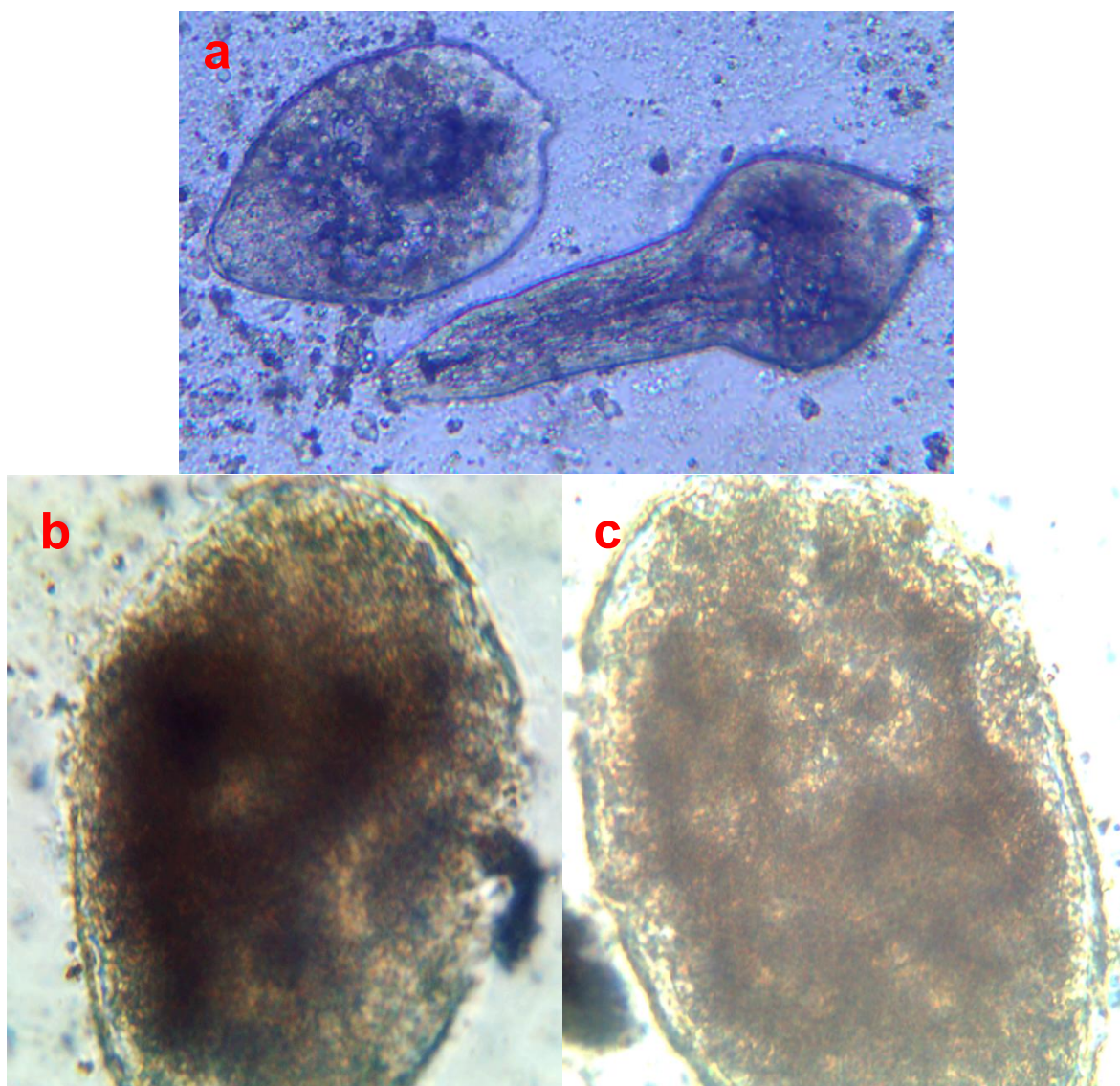
Fracción i4	Negativo 0 mg / L	Eficacia (%)*				
		100 mg / L	200 mg / L	300 mg / L	400 mg / L	500 mg / L
24 h	0 <sup>a</sup>	93 ± 0.06 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>
48h	0 <sup>a</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>d</sup>	100 <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>

Distinta literal entre filas indica diferencias estadísticamente significativas. (P<0.05).

\* valor promedio de tres replicas ± Desviación Estándar.



Los efectos causados por la fracción “i 4” se muestran en la figura 3 en donde comparamos una fasciola normal (a) con respecto a un par de fasciolas afectadas (b y c) las fasciolas afectadas al igual que en el caso de la fracción “i” se observa un cambio en los órganos internos de fasciola así como un efecto más marcado en el tegumento perdiéndose la continuidad de este en más de un lugar.



**Figura 3. Fasciola del grupo testigo(a) y fasciolas tratadas con la fracción i4 (b y c) de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) a las 24 hrs.**





### 7.4.2. Perfil fitoquímico de la Fracción.

La evaluación de las fracciones i, mostraron a la fracción 4 como la más activa, por lo que se decidió realizarle el perfil fitoquímico cualitativo, en donde se obtuvieron reacciones colorimétricas que dieron positivo a alcaloides y a glucósidos cardiogénicos (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Perfil fitoquímico de la Fracción.**

Metabolito	Prueba	Resultado
Alcaloides	(Dragendorff)	+++
Cumarinas	(UV)	-
Esteroides	(Lieberman-Burchard)	-
Flavonoides	(Cloruro férrico)	-
Glucósidos	(Molisch)	-
Glucósidos Cardiogénicos	(Keller kiliani)	+
Lactonas sesquiterpenicas	(Baljet)	-
Saponinas	(Espuma)	-
Taninos	(Acetato de plomo)	-

Simbología: -- negativo, + débilmente positivo, ++ positivo, +++ fuertemente positivo.



## VIII. DISCUSIÓN.

La fitoterapia aplicada a la medicina veterinaria es un campo de amplios conocimientos la mayoría de los cuales es aún desconocido, lo cual manifiesta la necesidad de desarrollar nuevas investigaciones y por lo consiguiente nuevas tecnologías que tiendan a develar el real potencial anti-fasciola de los extractos de plantas. El género *Bocconia spp* pertenece a la familia *Papaveraceae*. Esta familia es bien conocidas por su uso medicinal que es directamente asociado con la alta producción de alcaloides que poseen estructuras novedosas y una significativa bio actividad. Algunos ejemplos de la gran variedad de alcaloides que podemos encontrar en esta familia son la morfina y la codeína. En décadas pasadas, se realizaron investigaciones referente a los metabolitos secundarios y su farmacología incluyendo la identificación y aislamiento de estos, encontrándose a los alcaloides como los más bioactivos y con diversas funciones en contra de virus, bacterias, hongos y parásitos.

En el presente estudio se analizaron extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de Gorbolobo (*B. frutescens*), en donde este último obtuvo eficacias del 100% a partir de una concentración de 100 mg / L ( $P < 0.01$ ).

En estudios similares realizados por Sánchez-Peralta y Alvarez-Mercado en el 2015 evaluaron un extracto crudo de *B. Frutescens* obteniendo eficacias del 88 y 100% ( $P < 0.05$ ) respectivamente, a una concentración de 500 mg/L, estos trabajos corroboran la existencia de una actividad fasciolicida por parte de esta planta.



De acuerdo a los resultados obtenidos de los estudios fitoquímicos realizados a los extractos y a las fracciones, se demostró que los metabolitos que permanecían de manera constante fueron los alcaloides, con respecto a estos resultados Yu *et. al.* en el 2011 realizaron una revisión con relación a los principales alcaloides presentes en el género *Bocconia*, encontrando más de 75 alcaloides diferentes contenidas en las diversas especies de este género, encontrándose en diferentes lugares de la planta, siendo las partes más comunes: tallos, raíces, frutos semillas, corteza y hojas.

En el caso de *B. frutescens* se menciona que contiene: Queleritrina, Sanguinarina, Berberina, Coptisina, Columbamina, Canadina y Protopina en las raíces, tallos y hojas; Isocoripalmina y Escolerina en las raíces y hojas ; Rodeina en las hojas y tallos; Methylcanadinium y Chelidonina de las raíces; Dihidroceleritrina, 6-Acetonildihidrocheleritrina, 6-Acetonildihidrosanguinarina y Corisamina en las hojas. Caballero-George *et. al.* (2002) encontraron por medio de una cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC por sus siglas en inglés los alcaloides contenidos en el extracto etanólico de la raíz de *B. frutescens* observándose que este contenía: Sanguinarina, Celeritrina, Celirubina, Macarpina, Celidonina, Berberina, Allocriptopina, Protopina, Isocoripalmina, Coptisina, Escolerina, Methylcanadinium y Candésartan.

Con respecto a la berberina, y sanguinarina Schmeller *et. al.* (1997) concluyen que algunas de las actividades bioquímicas de estos están relacionados con la defensa en contra de microorganismos y virus. Menciona por una parte que estos alcaloides tienen propiedades anti fúngicas, anti bacteriales y anti virales. Y también que la sanguinarina afecta la permeabilidad de las membranas y la berberina la síntesis de proteínas, estas propiedades podrían ser las causantes de los daños observados en las fasciolas que fueron sujetas a los diferentes tratamientos.



A partir del fraccionamiento de la partición metanólica hexánica se obtuvieron 14 fracciones de las cuales solo una presentó actividad fasciolicida y a su vez esta se trató de purificar dando como resultado 9 fracciones de las cuales también solo una demostró eficacia, el perfil fitoquímico dio como positivo a alcaloides y a glucósidos cardiogénicos.

En el caso de los glucósidos cardiogénicos Yarnell en 2007 menciona que sin importar la estructura química que estos poseen, inhiben la sodio / potasio ATPasa ( $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPasa}$ ) limitando la salida de potasio y la entrada de calcio a las células, provocando una deficiencia de sodio, así mismo la bomba de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (ligada a la  $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPasa}$ ) no posee el suficiente sodio para mover calcio fuera de la célula aumentando el potencial de contractilidad de la célula además de tener una leve tendencia a reducir la reabsorción de sodio en los riñones y un efecto vasoconstrictor. Fairweather y colaboradores en 1999, menciona que entre los constituyentes de la estructura del tegumento de fasciola se encuentra la  $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPasa}$ , lo cual podría ayudar a explicar el efecto que poseen las fracciones al ser aplicadas a fasciolas recién desenquistadas.

Después de una exhaustiva revisión bibliográfica no se ha encontrado ningún estudio en donde se fraccione o purifique esta planta, se tienen datos acerca de diversas actividades en contra de diversos microorganismos y algunos parásitos pero no se tiene información acerca de estudios de actividad anti-fasciola.

Realizar la separación y determinación de los componentes activos de las plantas medicinales son aspectos considerados como críticos para modernizar y estandarizar estos procesos. Por lo tanto el desarrollo de métodos efectivos de separación con el objetivo de brindar un control de calidad a los productos obtenidos es absolutamente importante.



## IX. CONCLUSIÓN.

Se concluye que los alcaloides y glucosidos cardiogénicos encontrados en la Fracción “ i4 ” de gordolobo (*B. frutescens*) mostraron una eficacia fasciolicida promisorio *in vitro*, se deben realizar estudios continuos, tendientes a demostrar la no toxicidad y eficacia fasciolicida *in vivo* en rumiantes.



## X. REFERENCIAS.

1. Almazán C, Ávila G, Quiroz H, Ibarra F, Ochoa P. 2001. Effect of parasite burden in the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep. *Veterinary Parasitology*, 91: 101-112.
2. Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Hoste H. 2008. In vitro larval migration and kinetics of excystment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4): 313-319.
3. Alvarez-Mercado JM. 2013. *Valoración in vitro de la eficacia anti-fasciola de extractos de plantas de Veracruz, México*. [Tesis de Licenciatura]. México, D.F: FMVZ-UNAM.
4. Alvarez-Mercado JM, Ibarra-Velarde F, Alonso-Díaz MA, Vera-Montenegro Y, Ávila-Acevedo JG, García-Bores AM. 2015. In vitro antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. *BMC Veterinary Research*, 11(1): 1-6.
5. Anthony JP, Fyfe L, Smith H. Plant active components – A resource for antiparasitic agents? 2005. *Trends in Parasitology*, 21: 462-468.
6. Caballero-George C, Vanderheyden PML, Apers S, Van den Heuvel H, Solis PN, Gupta MP, Claeys M, Pieters L, Vauquelin G, Vlietinck AJ. 2002. Inhibitory activity on binding of specific ligands to the human angiotensin II AT(1) and endothelin 1 ET(A) receptors: bioactive benzo[c]phenanthridine alkaloids from the root of *Bocconia frutescens*. *Planta Medica*, 68(9) : 770-5
7. Camurça-Vasconcelos ALF, Bevilaqua CML, Morais SM, Maciel MV, Costa CTC, Macedo ITF, Oliveira LMB, Braga RR, Silva RA, Vieira LS, Navarro AMC. 2008. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 154: 167-170.
8. 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. 2010. *Veterinary Research*, 6: 1-8.



9. Cheeke PR, Shull LR. 1985. *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants*. Connecticut, E.U.A: The avi publishing company, inc.
10. Coles GC. 2001. The future of veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*, 98: 31-39.
11. Dalton JP. 1999. *Fasciolosis*. United kingdom: Wallingford.
12. Dargie JD. 1987. The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *International Journal for Parasitology*, 17: 453-463.
13. Elango G, Rahuman AA. 2011. Evaluation of medicinal plant extracts against ticks and fluke. *Parasitology Research*, 108: 513–519.
14. Fairweather I, Threadgold LT, Hanna REB. 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the mammalian host. En Dalton J.P. (ed). *Fasciolosis*. UK: University Press, Cambridge, pp 47-62.
15. FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (Ed.) (2003). *Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina*. Italia: FAO.
16. Fernández-Salas A, Alonso-Díaz MA, Acosta-Rodríguez R, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Rodríguez-Vivas RI. 2011. In vitro acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 175: 113-118.
17. Harnborne JB. 1970. *Phytochemical phylogeny; proceedings of the phytochemical society symposium*. London: academic.
18. Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 6: 253-261.



19. Ibarra-Moreno S, Ibarra-Velarde F, Ávila-Acevedo JG. 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. 2012. *American Journal of Plant Sciences*, 3: 506-511.
20. Ibarra OF, Jenkins DC. 1984. An in vitro screen for new fasciolicidal agents. *Parasitology research*, 70: 655-661.
21. Marchiondo AA; Holdsworth PA, Green P, Blagburn BL, Jacobs DE. 2007. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestation on dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, 145: 3-4.
22. Mezo M, Gonzales MW, Castro JAH, Muiño L, Ubeira FM. 2010. Field evaluation of the MM3-sero elisa for detection of anti-fasciola IgG antibodies in milk samples from individual cows and bulk milk tanks. *Parasitology International*, 59: 610-615.
23. Moll, L.; Gaasenbeek C.P.H.; Vellema P. y Borgsteede F.H. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. 2000. *Veterinary Parasitology*, 91: 153-158.
24. Monroy-Ortíz, C. y Castillo, E. P. 2007. *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos*. Mexico: Conabio.
25. Olaechea, F.; Lovera, V.; Larroza, M.; Raffo F y Cabrera R. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). 2011. *Veterinary Parasitology*, 178(3-4): 364–366.
26. Organización panamericana de la salud. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *Organización panamericana de la salud*; 580: 132-141.
27. Piedrafita D, Spithill TW, Smith RE, Raadsma HW. 2010. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasite Immunology*, 32:572-581.





28. Quiroz RH. 1984. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México: Limusa.
29. Rana AK y Misra-Bhattacharya S. 2013. Current drug targets for helminthic diseases. *Parasitology Research*, 112: 1819-1831.
30. 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. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in biotechnology*, 20: 522-531.
31. Rodríguez, A.M.; Coombes, A.J. y Jimenez, R.J. 2009. *Plantas silvestres de puebla herbario y jardín botánico BUAP*. México: Herbario BUAP.
32. Sanchez-Peralta C. K. 2015. Evaluación de la eficacia fasciolicida in vitro de 14 extractos de plantas mexicanas [tesis de licenciatura]. México, D.F; FMVZ-UNAM.
33. Sangian, H.; Faramazi, H.; Yazdinezhad, A.; Mousavi, S. J.; Zamani, Z.; Noubarani, M. y Ramazani, A. 2013. Antiplasmodial activity of ethanolic extracts of some selected medicinal plants from the northwest of Iran. *Parasitology Research*; 112(11): 3697-3701.
34. Smith-Schalkwijk, MJ. 1999. Veterinary phytotherapy: An overview. *Canadian Veterinary Journal*, 40: 891-892.
35. Soulsby E.J.L. 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. México: interamericana.
36. Shukla S, Metha A, Bajpai VK. 2013. Phytochemical screening and anthelmintic and antifungal activities of leaf extracts of *Stevia rebaudiana*. *Journal of biologically active products form nature*, 3(1): 56-63.
37. Stahl, E. 1969. *Thin layer chromatography: A laboratory handbook*. Berlin: Springer.
38. Schmeller T, Latz-Brüning B, Wink M. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*, 44(2): 257-266.



39. Systat Software, Inc. (2011). Systat (Computer program) versión 12(32-bits) EUA.
40. Trease ge. 1987. *Tratado de farmacognosis*. México: interamericana.
41. Vera-Montenegro, Y. 2011. Fasciolosis En: Ibarra-Velarde, F.; Figueroa-Castillo, J.A. y Quiroz-Romero, H (eds). *Parasitología Veterinaria Vol II: Helminths*. México; Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 57 – 71.
42. Verpoorte R. 1999. Chemodiversity and the biological role of secondary metabolites, some thoughts for selecting plant material for drug development. En: Bohlin, L y Bruhn J, G (eds). *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development*. London; Kluwer Academic Publishers.
43. Von Son DFE, Alonso-Díaz MA, Valles-De la Mora B, Capetillo LCM. 2012. In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental parasitology*, 131: 413-418.
44. Wagner, H. y Bladt, S. 1998. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Alemania: Springer.
45. Yarnell E. 2007. Plant chemistry in veterinary medicine: medicinal constituents. En: Wynn SG, Fougère BJ (eds). *Veterinary herbal medicine*. Sydney, Australia: Elsevier, pp. 159-182.
46. Yu X, Gao X, Zhu Z, Cao Y, Zhang Q, Tu P, Chai X. 2014. Alkaloids from the tribe bocconieae (papaveraceae): a chemical and biological review. *Molecules*, 19: 13042-13060.

