

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

EFFECTO FASCIOLICIDA *in vitro* DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE  
*Bocconia frutescens* MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE COLUMNA Y  
CROMATOGRFÍA DE CAPA FINA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**MICHEL ALEJANDRA LANDEROS MARTÍNEZ**

Asesores:

Dra. Yolanda Vera Montenegro

Dr. Froylán Ibarra Velarde



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.

## DEDICATORIA

A mis padres y mis hermanas, que con su amor, cariño y paciencia han hecho todo esto posible.

A mis amigos, Melanie, Daria, David y Omar, que son la familia que he elegido y sin su amor, su alegría y su apoyo, no sería la persona que soy.

A Anthoan porque sin ti ésta etapa de mi vida no estaría completa y no sería tan maravillosa.

A mi tía Fide, por cada momento, por todo y por tanto.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por todo su amor y apoyo incondicional, porque gracias a ellos he podido realizar cada logro de mi vida.

A mis asesores, la Dra. Yolanda Vera y el Dr. Froylán Ibarra que sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

Al Dr. Guillermo Ávila y a la Dra. Ana García por sus colaboraciones y enseñanzas a lo largo de este proyecto.

A mis compañeros de proyecto, José Manuel, Alonso, Gerardo y Vane, por sus enseñanzas, apoyos y bromas que hicieron increíble este trayecto.

A la DGAPA-UNAM por el apoyo de la beca de Licenciatura para la realización de la Tesis a través del Proyecto PAPITT IN220313 y por otorgar el financiamiento de este proyecto.

## CONTENIDO

### RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN	
1.	Situación de la fasciolasis.....	1
2.	Importancia de la fasciolasis.....	2
3.	La fasciolosis como enfermedad.....	4
3.1	Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i> .....	4
3.2.	Semiología y patología.....	7
3.3	Diagnóstico.....	8
3.4	Tratamiento.....	9
3.5	Resistencia.....	9
4.	La medicina herbal.....	11
4.1	Las plantas y los metabolitos secundarios.....	12
4.2	Antecedentes sobre <i>Boconnia frutescens</i> .....	14
II.	JUSTIFICACIÓN.....	16
III.	HIPÓTESIS.....	16
IV.	OBJETIVO.....	16

## CONTENIDO

V.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
VI.	RESULTADOS.....	20
VII.	DISCUSIÓN.....	26
VIII	CONCLUSIÓN.....	26
IX.	REFERENCIAS.....	27

## RESUMEN

LANDEROS MARTÍNEZ MICHEL ALEJANDRA. Efecto fasciolicida *in vitro* de los metabolitos secundarios de *Bocconia frutescens* mediante cromatografía de columna y cromatografía de capa fina. (Bajo la dirección de Dra. Yolanda Vera Montenegro y Dr. Froylán Ibarra Velarde).

En la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento para la fasciolosis, se recurrió a la medicina herbal con la finalidad de encontrar un compuesto con actividad fasciolicida. Se colectaron hojas de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) en el municipio de Tlapacoyan, Veracruz; se obtuvieron tres extractos, metanólico, hexánico y de acetato de etilo y se probaron *in vitro* contra *Fasciola hepatica* recién desenquistadas a concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/L. De los tres extractos el que mostró actividad fasciolicida desde las 24 horas fue el extracto metanólico, el cual se fraccionó mediante una cromatografía de columna comparando sus perfiles cromatográficos mediante cromatografías de capa fina. Se obtuvieron 13 fracciones (A-M) que se probaron contra fasciolas recién desenquistadas a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L, siendo la fracción I la que mostró actividad fasciolicida desde las 24 horas ( $P < 0.05$ ). A esta fracción se le realizó un análisis fitoquímico cualitativo el cuál evidenció fuertemente la presencia de alcaloides, con lo que se concluye que los alcaloides presentes en la fracción I de *Bocconia frutescens* tienen actividad fasciolicida *in vitro*.

# I.- INTRODUCCIÓN

## Revisión de la literatura

### 1. Situación de la Fasciolosis

Dentro de las actividades económicas que se realizan en nuestro país, la actividad pecuaria reviste una gran importancia tanto por su participación en la economía, como por el considerable sector de la población que en ella se desempeña. Así mismo, el elevado porcentaje del territorio nacional dedicado a la actividad ganadera, estimado en 56%, denota claramente el potencial productivo de la nación (Villegas-Durán G., 2001).

En la búsqueda de implementar técnicas que fomenten el crecimiento en la producción animal de manera rentable, económica y sustentable, han surgido diversas problemáticas que interfieren con el desarrollo de éstas técnicas. Entre los problemas que surgen con mayor frecuencia se encuentran las enfermedades y de las cuales sobresalen algunas como las enfermedades parasitarias o también llamadas parasitosis que afectan al ganado, causando diversas alteraciones a la salud, el bienestar y la productividad de los animales.

Los perjuicios a la salud que causan las parasitosis involucran inapetencia, diarrea, anemia y en casos severos, la muerte. Aunado al daño a la salud y al bienestar de los animales, la productividad de los animales se perjudica, lo que resulta en un pobre crecimiento y reproducción (Athanasiadou S. et al, 2004).

La fasciolosis es la enfermedad hepática más importante de los rumiantes a nivel mundial debido a que reviste una gran importancia económica en el ganado doméstico, al afectar particularmente al ganado vacuno y ovino, y también en cuanto a salud pública al afectar ocasionalmente al hombre.

La enfermedad es causada por la acción y presencia de trematodos Digenea del género *Fasciola* que migran en el parénquima hepático y se establecen y desarrollan en los conductos biliares, provocando un proceso inflamatorio generalmente crónico del hígado y los conductos biliares, lo que ocasiona trastornos digestivos y de nutrición (Dalton J. 1991; Shah-Fisher M. et al, 1998; Nuñez-Gómez M et al, 1994).

Aunque el término incluye todas las infecciones causadas por el género *Fasciola*, en nuestro país *Fasciola hepatica* es la más importante (Ibarra-Velarde F., Vera-Montenegro Y., et al, 2011).



## 2. Importancia de la fasciolosis

La importancia de la fasciolosis radica en las cuantiosas pérdidas económicas producidas, las cuales dependen del grado de infestación. De manera directa, las pérdidas consisten esencialmente en las consecuencias de enfermedades agudas que aparecen bruscamente y en las muertes que ocasionan, producidas por la reducción de la función fisiológica del hígado. Éste tipo de pérdidas, muy considerables desde el punto de vista económico, son superadas ampliamente por las indirectas, que contemplan a los animales enfermos que no muestran signos que hagan sospechar de la presencia de la enfermedad, entonces el tratamiento se difiere y los perjuicios aumentan (Borchert A., 1981; Vera-Montenegro Y., 2011).

La fasciolosis en los ovinos puede resultar en una significativa pérdida de sangre que a su vez represente una pérdida de energía metabolizable. Esto, aunado a un desmejorado apetito y una afectada retención de nitrógeno, puede tener efectos adversos en la ganancia de peso. Cargas parasitarias de 346 fasciolas o más, resulta en pérdidas de peso y muerte de corderos; cargas menores a 46 fasciolas resultan en pérdidas del 13.6% de la producción de lana y 5.1% de pérdida en la ganancia de peso. En el ganado vacuno, cargas parasitarias modestas pueden resultar en pérdidas significativas en su rendimiento; Infecciones menores a 54 tremátodos por animal han demostrado reducciones en la ganancia de peso del 8 al 9% aún sin mostrarse signos clínicos de la enfermedad. De igual manera se han demostrado efectos significativos en el rendimiento del ganado para carne y efectos perjudiciales en la calidad de la leche del ganado lechero infectado. Otras pérdidas que se involucran son la disminución en la fertilidad de los animales infectados y las pérdidas por decomisos de hígados en el rastro.

En áreas endémicas, la prevalencia de la infección suele ser muy alta. Incluso si la mayoría de los animales mantienen una infección moderada, los efectos económicos a escala global representan billones de dólares en disminución de la productividad (Dalton J., 1991).

La infección de rumiantes domésticos con *F. hepatica* y *F. gigantica* causa pérdidas económicas significativas estimadas en más de US \$2000 millones por año en el sector agrícola mundial con más de 600 millones de animales infestados (Becerra-Rozo W., 2001).

En países en desarrollo se percibe como una amenaza muy importante para el éxito económico. En México, la enfermedad está presente en 29 estados de la

República y tiene mayor prevalencia en zonas tropicales y templadas (Ibarra-Velarde F., 2010).

Malone y Craig (1990) mencionan que en infecciones leves, donde el conteo es menor a 1 huevo por 2 g de heces, la pérdida económica es imperceptible; en casos moderados con 2 a 10 huevos por 2 g de heces, se aprecia una ligera pérdida económica, y en situaciones con más de 10 huevos por 2 g de heces se observan pérdidas económicas considerables.

Tomando en consideración todos los efectos perjudiciales que se suman incrementando las pérdidas en la producción hace necesaria la implementación de medidas eficientes de control de la enfermedad.

### 3. La Fasciolosis como enfermedad.

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria cosmopolita causada por trematodos de la familia *Fasciolidae* del género *Fasciola*. Las dos especies comúnmente implicadas como agente causal son *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*. *F. hepatica* tiene una distribución mundial pero predomina en zonas templadas, mientras que *F. gigantica* se encuentra en la mayoría de los continentes, principalmente en regiones tropicales (Dalton J. 1991, Hurtrez-Boussés S. et al, 2001).

*F. hepatica* se originó en Europa y fue exitosamente introducida en América, Australia, Nueva Zelanda y África. Al ser introducida, se ha adaptado a nuevos huéspedes definitivos e intermediarios (Hurtrez-Boussés S. et al, 2001).

Los trematodos Digenea son muy selectivos para escoger a su caracol hospedador intermediario, por lo que la distribución geográfica de las especies de trematodos está básicamente determinada por la distribución geográfica de las especies de caracol adecuadas. Por otro lado, los trematodos adultos parecen ser capaces de sobrevivir en un amplio abanico de especies de hospedadores definitivos (Bowman D., 2011).

La infección con *Fasciola* puede resultar en un grado de resistencia adquirida, que varía dependiendo de las especies de huéspedes. En suma, algunos animales muestran algún grado de resistencia innata (Dalton J., 1991).

Los rumiantes son el huésped natural de *Fasciola*; los dromedarios son moderadamente susceptibles y las cabras las menos susceptibles. La mayoría de los rumiantes salvajes, como el búfalo, la jirafa o el antílope, son susceptibles, sin embargo la infección es mayor y más frecuente en el ganado bovino y ovino. Entre otros animales, caballos, lepóridos, ratas, ratones y cuyos pueden ser parasitados; los cerdos muy raramente son infectados cuando tienen menos de 8 semanas de edad. El hombre puede también contraer la enfermedad e incluso con pocos parásitos, es siempre severa (Dalton J., 1991; Núñez-Gómez M et al, 1994).

#### 3.1. Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*

*Fasciola hepatica* es un parásito ovíparo con un ciclo de vida indirecto. Una vez que el huevo abandona el huésped final debe pasar por varias fases de desarrollo antes de que pueda infectar a otro huésped. Estas fases son: miracidio, esporocisto, redia, cercaria y metacercaria.

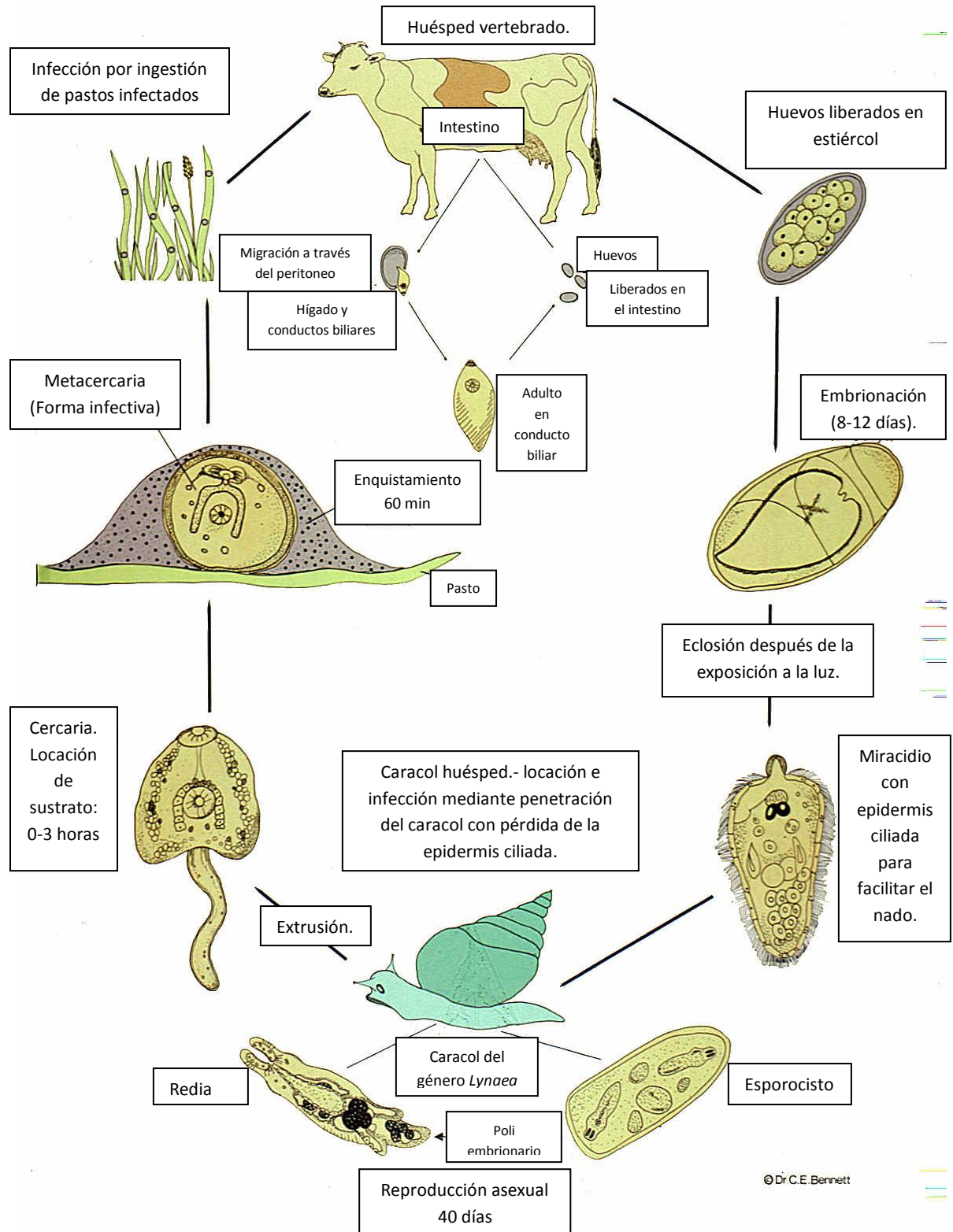
Esencialmente, las fases que componen el ciclo de vida de *Fasciola hepatica* pueden describirse de la siguiente manera:

- I- Salida de los huevos del huésped al medio externo y su subsecuente desarrollo
- II- Salida del miracidio del huevo, búsqueda y penetración del caracol huésped intermediario
- III- Desarrollo y multiplicación de los parásitos dentro del caracol
- IV- Salida de la cercaría del caracol y su posterior enquistamiento
- V- Ingestión de la metacercaria infectiva por el huésped definitivo y su desarrollo en parásitos adultos (Dalton J., 1991).

Una vez dentro del huésped, los periodos mínimos entre las fases parasitarias se pueden resumir:

- Formación del quiste y penetración de la pared intestinal....24 horas
- Periodo errante en la cavidad peritoneal.....3 a 4 semanas
- Periodo errante en el hígado.....6 semanas
- Crecimiento hasta la madurez en los conductos biliares.....4 semanas

Así, el periodo mínimo de latencia es de diez u once semanas. Si a este periodo se le agregan dos semanas de crecimiento del huevo y cinco semanas de la fase durante la cual el miracidio vive dentro del caracol, resulta que el tiempo mínimo para que se lleve a cabo el ciclo desde que la fasciola es huevo hasta que pone sus primeros huevos cuando adulta es de 17 a 18 semanas. Este periodo podría ser menor si el huevo madurara antes (el tiempo mínimo es de 9 semanas), pero es más factible que se alargue debido a las condiciones de temperatura durante su vida dentro del caracol, considerando entonces que el periodo mínimo en campo para que se lleve a cabo un ciclo completo es de cinco meses (Dunn A., 1983).



Ciclo de vida de *F. hepatica*. Citado de University of Southampton [www.southampton.ac.uk](http://www.southampton.ac.uk) (Bennet C., 1999).

### 3.2. Semiología y Patología.

Los signos clínicos en la fasciolosis están relacionados a las dos etapas de la infección; la primera es la fase parenquimal que se da durante la migración de los trematodos inmaduros y la otra, la fase biliar coincide con el desarrollo de los trematodos y su posterior residencia en los conductos biliares. De igual manera, la intensidad de los signos está condicionada por la magnitud de la carga parasitaria. Cargas pesadas causan patologías más severas y terminaciones tempranas en la muerte de las ovejas (Dalton J. 1991; Carrada-Bavo T., 2007).

La fase parenquimal, igualmente considerada fase aguda, es consecuencia del traumatismo ocasionado por los túneles producidos en la superficie hepática por los trematodos jóvenes y su consecuente reacción inflamatoria, lo que provoca un cuadro clínico caracterizado por dolor abdominal e inmovilidad total. En el examen post mortem se observa exudado hemorrágico en la cavidad abdominal, el hígado aumentado de tamaño, friable con depósitos de fibrina y puede obtenerse un gran número de parásitos.

En la fase biliar o fase crónica, se produce una pérdida gradual de la condición corporal, debilidad progresiva, anemia e hipoproteïnemia con la aparición de edemas subcutáneos, principalmente en el espacio intermandibular y en el abdomen. En la necropsia se aprecian los conductos biliares engrosados y distendidos, con abundante presencia de trematodos adultos. En el ganado adulto los conductos fibróticos posteriormente se calcifican. Un conducto biliar que aloja fasciolas es 20 veces más grueso que uno de un animal no infectado. La hiperplasia y la infiltración fibrosa del conducto biliar producen un engrosamiento de la pared del conducto y un aumento del envolvimiento del revestimiento epitelial que rodea el lumen del conducto. El agrandamiento del conducto biliar coincide con la aparición de un enorme incremento en las cantidades de prolina libre en la bilis. La prolina, uno de los principales componentes del colágeno, es un producto excretado por los trematodos y es liberado en grandes cantidades por *Fasciola hepatica*, lo que sugiere que el exceso de prolina inicia la hiperplasia del conducto biliar (Bowman D., 2011; Wolf-Spengler et al, 1983). De igual manera, un experimento en roedores ha demostrado que la excreción de prolina así como de otros ocho aminoácidos por parte de *Fasciola hepatica* en la bilis puede ser responsable de la anemia que se presenta en los animales afectados y no así la hematofagia, como antes se sugería (Isseroff H. et al, 1979; Spengler R. et al, 1981).

### 3.3. Diagnóstico:

El diagnóstico de fasciolosis se orienta principalmente por la presencia de signos clínicos y los antecedentes epidemiológicos de la región. En aquellas áreas endémicas de *Fasciola hepatica* todo proceso crónico debe considerarse sospechoso de fasciolosis.

La metodología de rutina para el diagnóstico de la fasciolosis es el examen coproparasitológico, en específico la prueba de sedimentación, el cual tiene como objetivo la identificación de los huevos grandes y operculados en las heces. Éste examen, tiene el beneficio de un bajo costo, pero tiene baja sensibilidad (72.5 % en ovinos, 76.6% en porcinos y 83.3% en equinos), no sirve para detectar animales infectados en la etapa prepatente de la enfermedad y no es muy eficiente cuando la carga parasitaria es leve. Una parte complementaria de este diagnóstico es la observación de las lesiones características de esta enfermedad a la necropsia, lo que brinda un diagnóstico definitivo.

Las pruebas inmunológicas o métodos serológicos son métodos diagnósticos más eficaces que permiten un diagnóstico aún en la etapa precoz de enfermedad e incluso la detección de infecciones subclínicas. De igual manera tienen la ventaja de permitir el examen de una mayor cantidad de muestras en poco tiempo. El método más empleado es el ELISA indirecta, pero en general los métodos pueden clasificarse de la siguiente manera:

- Reacciones de precipitación: doble inmunodifusión en gel agar (DID) en una o dos dimensiones, inmunoelectroforesis (IE), contrainmunoelectroforesis (CIE).
- Reacciones de aglutinación: aglutinación en látex (AL), floculación con bentonita (FB), hemoagutinación indirecta o pasiva (HA).
- Fijación del complemento.
- Inmunofluorescencia: indirecta (IFI), prueba de anticuerpos fluorescentes con antígeno soluble (SAFA).
- Pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) con antígenos de expresión/secreción (E/S), dot-ELISA o ELISA en mancha, difusión en gel ELISA (dig.ELISA). ELISA directo (D), indirecto (I), doble sándwich de anticuerpos (DAS) y en caso de tener antígenos marcados, ELISA competitivo (C). La prueba Western blot permite identificar moléculas que pueden ser utilizadas para realizar un diagnóstico preciso.
- Detección y cuantificación de coproantígenos de *Fasciola hepatica*: se realiza mediante un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich con el uso de

anticuerpos monoclonales (sándwich ELISA) (Ibarra-Velarde F., 2010; Gorman T. et al, 1998).

Como métodos alternativos de diagnóstico, se han usado también la medición de enzimas séricas hepáticas, como la glutamato deshidrogenasa, liberada por la acción destructiva causada a los hepatocitos por la migración de las jóvenes fasciolas en el parénquima hepático y la enzima glutamiltripsina, liberada debido a las lesiones ocasionadas por las fasciolas adultas en los conductos biliares, pero los resultados no son específicos, ya que un aumento en su actividad puede deberse a cualquier causa de daño hepático agudo (Bowman D. 2011; Fredes F. et al, 2001).

### 3.4. Tratamiento.

El control de la fasciolosis en México así como en el mundo, se basa principalmente en tratamientos quimioterapéuticos para eliminar el parásito, en la reducción de huéspedes intermediarios y la aplicación de prácticas de manejo zootécnico. Las situaciones sociales y económicas prevalentes en muchas regiones hacen que la aplicación de estos tres métodos no sea siempre posible, lo que hace que el uso de fasciolidas sea el método más empleado debido a sus beneficios inmediatos (Quiroz-Romero H., Ibarra-Velarde F. et al, 2001).

Los medicamentos fasciolidas pertenecen a diversos grupos, según su estructura y modo de acción. Pueden dividirse en cinco grupos químicos (Ibarra-Velarde F., 2010).

1. Fenoles halogenados: hexaclorofeno, niclofolan y nitroxinil.
2. Salicilanilidas: closantel, oxiclosanida y rafoxanida.
3. Bencimidazoles: albendazol, mebendazol, triclabendazol y otros.
4. Sulfonamidas: clorsulon.
5. Fenoxialquenos: diamfenetida.

El criterio empleado para la selección de un fasciolida es su eficacia contra estadios adultos e inmaduros, la ausencia de residuos en los tejidos del huésped y que sea económico. En los programas, modelos o esquemas de control es muy importante conocer los periodos de transmisión, que están determinados en las zonas endémicas principalmente por el clima y el manejo zootécnico

### 3.5. Resistencia

El espectro de eficiencia de los fármacos fasciolidas es muy variado. Algunas no son efectivas para estados inmaduros de parásitos menores de ocho semanas y



son justamente aquellos estadios los que constituyen el mayor perjuicio para el hospedero. Al utilizarse fasciolicidas para parásitos adultos se tiene la desventaja de tener que repetir el tratamiento porque las fases juveniles que están migrando por el parénquima hepático no son afectadas y estas darán lugar a parásitos adultos en los conductos biliares en el corto plazo. Esta falta de conocimiento al aplicar un fármaco fasciolicida genera una persistencia del parásito en los animales, generando un mal control de la enfermedad y, al persistir con tratamientos inadecuados, se genera a la larga la selección de parásitos resistentes a los efectos del fármaco. De esa manera, se ha creado resistencia a muchos fasciolicidas, ya sea debido a la subdosificación, la falta de alternancia de fasciolicidas en cada ciclo de desparasitación, a desparasitaciones frecuentes, etc. A la actualidad, se han descrito fenómenos de resistencia frente a fármacos como el clorsulon, el albendazol, el triclabendazol y rafoxanide, los cuales son los fasciolicidas de mayor uso a nivel mundial (Chávez A. et al, 2012).

Los primeros reportes de evidencia de resistencia de trematodos hepáticos a antihelmínticos vienen desde 1967 cuando Dorsman observó una disminución en la eficacia del hexaclorofeno. En un estudio acerca de la resistencia de *Fasciola hepatica* en 1990 Boray observó una eficacia reducida del rafoxanide en conjunto con una resistencia al closantel. En condiciones de laboratorio fue posible seleccionar fasciolas resistentes a luxabendazol y triclabendazol, pero no a clorsulon. En la práctica, Overend y Bowen en 1995 reportaron resistencia a triclabendazol en ovejas en Australia y posteriormente, entre 1998 y 1999 se encontró resistencia de *Fasciola hepatica* a triclabendazol en Holanda (Moll L. et al, 2000).

Una alternativa para atender las necesidades de los animales enfermos, que proporcione un tratamiento efectivo que contrarreste los efectos de la resistencia a los antiparasitarios actuales, es la implementación de productos naturales como la selección de plantas con efecto antiparasitario, método conocido como “Medicina Herbal” (Wynn S. et al, 2007).

#### 4. La medicina herbal.

La medicina herbal es una de las formas más antiguas de tratamiento conocidas y usada por todo tipo de personas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la medicina botánica es usada por un 70% de la población mundial y no es sorpresa que la gente opte por usar las mismas plantas medicinales para sus animales desde hace tanto tiempo como los animales han estado asociados con los humanos (Wynn S. et al, 2007).

Las plantas son fuentes muy importantes en la industria farmacéutica debido a que son capaces de producir varios tipos de entidades químicas y moléculas bioactivas a través del proceso conocido como metabolismo. Muchos de los fármacos medicinales actuales todavía se derivan de la naturaleza, ya sea directamente, como muchos antibióticos o fármacos anticancerígenos, o indirectamente, en eso han servido como compuestos guía para el desarrollo de compuestos sintéticos con cualidades mejoradas. La búsqueda de nuevos compuestos provenientes de la naturaleza es un campo de investigación activo. En la presente era del desarrollo y descubrimiento de más recientes moléculas de fármacos, muchos productos de plantas han sido evaluados con base en sus usos tradicionales (Shilpa K. et al, 2010; Kayser O. et al, 2007; Srivastav S. et al, 2011).

La evaluación de plantas medicinales que han sido aclamadas por tener propiedades antiparasitarias está teniendo atención recientemente. Extractos o aceites esenciales provenientes de plantas pueden ser fuentes alternativas de agentes acaricidas, antihelmínticos e insecticidas por constituir una rica fuente de compuestos bioactivos que son biodegradables en productos no tóxicos y potencialmente aptos para su uso en el control de parásitos (Bagavan A. et al, 2009). Como resultado de algunas de éstas investigaciones, existen varios ejemplos: el efecto antihelmíntico contra *Haemonchus contortus* de las semillas de *Annona squamosa* (Souza M. et al, 2008), el aceite esencial de *Ocimum gratissimum* (Pessoa L. et al, 2002) y el extracto crudo acuoso y extracto metanólico de *Artemisia brevifolia* (Iqbal Z et al, 2004). En lo que respecta a ectoparásitos, Fernandes et al. (2005), evaluaron el efecto larvicida del extracto etanólico crudo de *Sapindus saponaria* contra *Boophilus microplus* y en una segunda ocasión contra *Rhipicephalus sanguineus* (Fernandes F., Leles R. et al, 2007).

Hasta ahora, solo del 5 al 15% de las plantas han sido analizadas químicamente. La ampliación del campo de investigación al respecto, así como la distribución y mayor accesibilidad de nuevas y sofisticadas herramientas analíticas para el

análisis de las mismas, hace posible anticipar que, la cantidad de plantas con efectos medicinales así como el número de metabolitos secundarios responsables de su efecto, incrementará sustancialmente en un futuro cercano (Wink M. 1988).

#### 4.1. Las plantas y los metabolitos secundarios

Un rasgo característico de las plantas superiores es su capacidad de sintetizar una enorme variedad de moléculas orgánicas con una importante función biológica en las rutas tanto de metabolismo primario como secundario. Los metabolitos son pequeñas moléculas producidas como intermediarios o endo productos de todos los procesos metabólicos. Los metabolitos primarios son aquellos producidos e involucrados en los procesos metabólicos primarios como la respiración y la fotosíntesis e incluye pequeñas moléculas ubícuas como son azúcares, aminoácidos, ácidos tricarbóxicos e intermediarios de la ruta del ácido cítrico así como moléculas más complejas como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Los metabolitos secundarios son producidos por rutas derivadas del metabolismo primario, son numerosos y están extensamente distribuidos, principalmente en plantas superiores. Hasta 1985 se habían descrito más de 20, 000 metabolitos y cada año se describen al menos otros 1000 (Wink M 1988, Bhalla R. et al 2005, Seigler D. S. 1998).

Los estudios sobre los metabolitos secundarios de las plantas se han ido incrementando a lo largo de los últimos 50 años y se ha demostrado que son moléculas altamente activas biológicamente involucradas principalmente en la defensa química de la planta contra herbívoros (Insectos, vertebrados) y microorganismos (Hongos bacterias y virus); algunos de éstos metabolitos también cumplen funciones como atrayentes de animales polinizadores y esparcidores de semillas o como protectores contra rayos UV. Las defensas de las plantas son plásticas debido a que un solo genotipo puede producir diversos fenotipos dependiendo del medio en el que se encuentre. Así, el comienzo del metabolismo secundario está ligado a la etapa de desarrollo del organismo, que a su vez está ligado a cambios morfológicos y citológicos. La cantidad de cualquier compuesto secundario en una planta es el resultado de equilibrio entre la síntesis, depósito y degradación de compuestos regulados y limitados por complejos enzimáticos. Por tanto, el grado de prevalencia de cada metabolito a menudo depende de la etapa de desarrollo de la planta y a la variedad de factores circundantes (Seigler D. S. 1998, Bourgaud f. et al. 2001, Wink M. et al. 1993, Karban R. et al. 1999).

Al ser un mecanismo de defensa, los metabolitos secundarios presentes en la plantas tiene la capacidad de limitar los beneficios nutricionales disponibles en las mismas al momento de ser consumida por un herbívoro, es por eso que son parte

de los llamados factores anti-nutricionales de las plantas. Durante la evolución los herbívoros han desarrollado estrategias para superar o incluso utilizar estos mecanismos de defensa de las plantas para otorgarse algún beneficio. En la tabla 1 se muestran algunos de los metabolitos secundarios más comunes así como el efecto que tienen en los animales al ser consumidos (Huffman M. 2003).

**Tabla 1. Metabolitos secundarios comunes y su efecto en los animales**

<b>Clases de compuestos</b>	<b>Efectos</b>
Alcaloides terpenoides	Modulación de canales iónicos (altamente tóxicos)
Alcaloides isoquinolínicos	Intercalación de ADN, interacción con receptores, causa espasmos (Tóxico y amargo)
Alcaloides quinolizidínicos	Unión a receptores de Ach (Tóxico y amargo)
Alcaloides tropánicos	Inhibición de receptores de Ach (Altamente tóxicos)
Alcaloides de pirrolizideno	Mutagénico y carcinogénico (Hepatotóxico)
Glicósidos cianogénicos	Inhibición de la respiración
Glicósidos cardiacos	Inhibición de $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{--ATPasa}$ (Altamente tóxico)
Terpenos	Diurético (Sabor amargo)
Terpenos volátiles	Antibiótico, irritante
Monoterpenos volátiles	Antibiótico (Olor aromático)
Saponinas, aminas	Detergente para biomembranas (Amargo)
Saponinas triterpenoides	Detergente para biomembranas (Tóxico, emético)
Sesquiterpenos, pirrolizidenos	AP son mutagénicos y carcinogénicos, irritantes (Citotóxico, hepatotóxico)
Convalatoxina	Inhibición de $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{--ATPasa}$ (Altamente tóxico y amargo)
Antraquinonas	Purgante (Tóxico)
Fenoles	Astringente, reduce la digestibilidad
Celulosa, hemicelulosa, ligninas y sílica	Indigestible

Ach: Acetilcolina; AP Alcaloides de pirrolizideno. Citado de Huffman M. 2003

La línea entre los efectos perjudiciales y benéficos que se pueden obtener del consumo de plantas ricas en metabolitos secundarios está directamente en relación a la cantidad en que son consumidas, es decir, algunos anti-nutrientes pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud si son consumidos en bajas concentraciones (Gemedé H. et al.2014).

Aunque el uso de plantas y productos animales para controlar enfermedades han sido bien documentados por siglos, las bases bioquímicas para corroborar su eficacia no estuvieron bajo un delicado escrutinio científico hasta los siglos XVII y XIX, particularmente en la primera mitad de 1800 un número importante de productos naturales farmacológicamente activos como los glucósidos cardiacos y una cantidad de alcaloides bioactivos fueron descubiertos, lo que sentó las bases

del estudio y exploraciones bioquímicas del rol de los productos naturales en la farmacología (Clark A. 1996).

Está bien establecido que las mismas especies de una hierba pueden variar ampliamente dependiendo de las prácticas de cultivación. Con base en esto se han logrado avances en los procesos de purificación, el aislamiento y la medición de ciertos fitoquímicos que han hecho posible el establecimiento de estrategias adecuadas para el análisis de la calidad y el proceso de estandarización de hierbas dirigidas a mantener tanto como sea posible la homogeneidad del extracto de la planta (Wynn S. et al 2007).

Recientes avances en microtécnicas químicas permiten el estudio de la composición química de plantas y otros organismos. Ha sido factible examinar patrones de variación dentro y entre poblaciones de organismos de origen natural que previamente no era posible estudiar. Entre las técnicas usadas para separar mezclas complejas de plantas están la cromatografía en papel (PC), la cromatografía de capa fina (TLC), la cromatografía en columna (CC), la cromatografía líquida (HPLC y MPLC) y diversos tipos de cromatografías contracorriente. Las técnicas más nuevas para la identificación y caracterización de compuestos incluyen H<sup>+</sup> y C resonancia magnética nuclear (NMR) (Resonancia de Protones y Carbono), Espectrometría en masa (MS), Espectrometría ultravioleta (US) y espectrometría infrarroja (IS) y cristalografía de Rayos X (Seigler D. 1998).

Los principios activos extraídos de las plantas son equivalentes a los fármacos sintéticos de acuerdo a su eficacia terapéutica, por esa razón son usados en medicina veterinaria principalmente como antibacteriales, antimicóticos, antiparasitarios, desinfectantes e inmunoestimulantes (Rai M. et al 2012).

#### 4.2. Antecedentes sobre *Bocconia frutescens*.

Es un arbusto o árbol nativo cuya distribución abarca matorrales y bosques bajos de México a Perú. Es una planta rica en alcaloides isoquinolínicos como (-) - isocoripalmina, roedina, corisamina, [6] paperrubina, alocriptopina, protopina, queleritrina, sanguinarina, quelirubina, berberina, coptisina, columbamina y (-)- $\alpha$ -canadina (Caballero-George C. et al 2002).

Clasificación taxonómica de *Bocconia frutescens* según The Integrated Taxonomic Information System

Reino: *Plantae*

Subreino: *Viridiplantae*

Infrareino: Streptophyta  
Superdivisión: *Embryophyta*  
División: *Tracheophyta*  
Subdivisión: *Spermathophytina*  
Clase: *Magnoliopsida*  
Superorden: *Ranunculanae*  
Orden: *Ranunculales*  
Familia: *Papaveraceae*  
Género: *Bocconia* L.  
Especie: *Bocconia frutescens* L.

*B. frutescens* forma parte de la medicina tradicional de México y es empleada en diversas regiones para diferentes padecimientos en humanos como en el tratamiento de severos desordenes del tracto genitourinario asociadas a *Trichomonas vaginalis*, en enfermedades respiratorias, en problemas cardiacos para control de la hipertensión arterial, para el tratamiento de úlceras en la piel y en casos de dolor estomacal y disentería (Caballero-George C. et al 2002, Calzada F. et al 2007, Cruz-Vega D. et al 2008, Alanis A. et al 2005).

Con base en estudios más específicos, se ha encontrado que el extracto etanólico de las hojas y hexanico de los tallos de *B. frutescens* presentan fuerte actividad contra *Escherichia coli* y *Streptococcus aureus*, de igual manera, extractos metanólicos y hexánicos de las hojas han mostrado actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*; extractos metanólicos muestran actividad contra *Trichomona vaginalis* y extractos alcoholicos crudos de distintas partes de la planta, ya sea fresca o seca, poseen actividad antimalaria (Yu X. et al 2014). En lo que refiere a medicina veterinaria, Álvarez et al. En el 2015 reportan actividad *in vitro* del extracto metanolico crudo de *B. frutescens* contra *Fasciola hepatica*.

## II- JUSTIFICACIÓN

Tomando en consideración los problemas existentes de resistencia a los quimioterapéuticos actuales empleados en el tratamiento de la fasciolosis de los rumiantes así como el grado de contaminación que se produce condicionado a la eliminación de estos químicos en el medio ambiente, es necesario buscar nuevas alternativas para el control de esta enfermedad.

Una de estas alternativas está representada por la etnoveterinaria en la cual mediante el análisis de plantas empleadas en la medicina tradicional como el Gordolobo (*Bocconia frutescens*) es factible encontrar nuevos compuestos activos (metabolitos secundarios) con posible actividad fasciolicida.

## III- HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios de *Bocconia frutescens* generarán un 90% de eficacia en fasciolas recién desenquistadas bajo condiciones *in vitro*.

## IV- OBJETIVO

Determinar la eficacia fasciolicida *in vitro* de los metabolitos secundarios de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) obtenidos mediante cromatografía de columna y cromatografía de capa fina.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Localización del estudio.

El estudio se realizó en el laboratorio de Quimioterapia Experimental de Helmintos del Departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM. La obtención de los extractos y análisis fitoquímico de los mismos se llevó a cabo en el laboratorio de fitoquímica (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM.

### 5.2 Colecta de material vegetativo y obtención de extractos.-

La planta en estudio Gordolobo (*Bocconia frutescens*), se colectó de la localidad Platanozapan, municipio de Tlapacoyan, Veracruz, México, utilizando la metodología descrita por Álvarez, (2015). Se realizaron dos colectas:

1ª.- 30 de julio del 2013, con un total de 1.998Kg de hoja seca

2ª.- 20 de enero del 2014, con un total de 2.984Kg de hoja seca

Con la finalidad de evaluar la presencia de los metabolitos secundarios del Gordolobo (*Bocconia frutescens*) en distintas épocas del año.

Las hojas de la planta se sometieron a un proceso de secado y molienda en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) de la UNAM.

De las hojas de la planta seca y molida, se obtuvieron los extractos usando solventes de diferente polaridad: Hexano, de menor polaridad, Acetato de Etilo, de polaridad media y Metanol, de alta polaridad, mediante un proceso de macerado en el que a 100g de materia seca de planta se le adiciona 500 ml de solvente y se deja en reposo de 3 a 7 días. Seguidamente, se elimina el contenido de solventes mediante el uso de un rota evaporador Heidolph® bajo las condiciones de temperatura y revoluciones por minuto (RPM) adecuadas para cada solvente que son las siguientes (Heidolph 1998):

- 1) Hexano a 40°C y 50 RPM,
- 2) Acetato de etilo a 65°C y 60 RPM
- 3) Metanol a 60°C y 90 RPM



Se realizaron 3 destilaciones cada 3 días. Posteriormente, los extractos fueron colocados en cajas de petri y almacenados protegidos de la luz hasta su posterior evaluación.

### 5.3 Evaluación fasciolicida *in vitro* de los extractos.

Para evaluar el efecto fasciolicida de cada extracto (Hexano, Acetato de Etilo y Metanol), se utilizaron Fasciolas recién desenquistadas artificialmente de acuerdo a lo descrito por Ibarra y Jenkins (1984).

Cada extracto vegetal fue probado por triplicado en concentraciones de 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L y 500 mg/L. Las fasciolas bajo estudio fueron examinadas los días 1, 2 y 3 posteriores a la aplicación del extracto vegetal utilizando un microscopio invertido con el objetivo de 40X. La actividad de los extractos fue medida por comparación de la sobrevivencia de las fasciolas tratadas con relación a las fasciolas del grupo Testigo.

La eficacia se midió utilizando la siguiente formula (Wood I. et al 1995):

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

El extracto que mostró eficacia *in vitro* superior al 90% se consideró que poseía actividad fasciolicida (Ibarra-Moreno S. et al 2012).

### 5.4 Determinación de fracciones activas del extracto.-

Por medio de una cromatografía de columna se separó el extracto con mayor eficacia fasciolicida, obteniendo alícuotas de 50mL empleando solventes y mezclas de solventes de distintas polaridades con la finalidad de obtener la separación de la mayor cantidad de compuestos afines a las mismas.

- 1) Hexano 100%
- 2) Hexano 80% + Dicloro metano 20%
- 3) Hexano 60% + Dicloro metano 40%
- 4) Hexano 40% + Dicloro metano 60%
- 5) Hexano 20% + Dicloro metano 80%
- 6) Dicloro metano 100%

- 7) Dicloro metano 80% + Metanol 20%
- 8) Dicloro metano 50% + Metanol 50%
- 9) Metanol 100%

Cada alícuota se destiló en el rota evaporador Heidolph®, retirando así el exceso de solvente y reincorporándolo a la columna. De cada alícuota se realizó una cromatografía de capa fina para observar si sus perfiles cromatográficos eran iguales o diferentes entre sí. Todas las alícuotas de compuestos iguales se unieron en una sola fracción. A las fracciones obtenidas se les realizó una cromatografía de capa fina para evaluar sus perfiles cromatográficos, uniendo las fracciones con compuestos iguales.

#### 5.5 Evaluación fasciolicida *in vitro* de las fracciones.

Una vez obtenidas las fracciones, se probaron en fasciolas recién desenquistadas en concentraciones de 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L y 500 mg/L por triplicado, evaluando la eficacia con la metodología y fórmula antes mencionada.

#### 5.6 Análisis fitoquímico de la fracción activa.

A la fracción activa se le realizaron pruebas fitoquímicas para determinar la presencia de ciertas familias de metabolitos secundarios. Las pruebas realizadas fueron (Shukla S. et al 2013):

1. Prueba de Liebermann-Burchard, para la identificación de esteroides.
2. Prueba de Cloruro férrico, para la identificación de taninos, fenilpropanoides y flavonoides.
3. Prueba de Dragendorff, para la identificación de alcaloides.
4. Prueba de Baljet, para la identificación de lactonas sesquiterpénicas.
5. Prueba de Molisch, para la identificación de carbohidratos.
6. Prueba de Luz UV para la identificación de cumarinas.

5.7 Análisis de datos.- Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba de Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 95% para determinar si existían diferencias significativas (Zar J. 1996).

## VI. RESULTADOS

De las plantas recolectadas en ambos muestreos, se separaron únicamente las hojas, de las cuáles, antes de someterse al proceso de secado, se obtuvieron los rendimientos establecidos en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Rendimiento de las hojas de Gordolobo en Base Húmeda (BH).**

No. De colecta	Parte de la planta	GDL BH/Bolsa (g)	Peso bolsa (g)	Peso GDL BH (g)
1	Hoja	2110.60	112.20	1998.40
2	Hoja	3206.20	222.0	2984.20
			Promedio	2491.30

GDL= Gordolobo

Una vez secados en el horno y molidas, de las hojas secas se obtuvieron los rendimientos establecidos en el Cuadro 2.

**Cuadro 2. Rendimiento de las hojas de Gordolobo secas y molidas.**

No. De Colecta	GDL MS / Frasco (g)	Peso frasco (g)	Peso GDL MS (g)
1	351.10	21.10.	330.00
2	599.76	105.90	493.86
		Promedio	411.93

GDL= Gordolobo

Con las hojas secas y molidas se obtuvieron tres extractos con diferentes solventes: Hexano, Acetato de Etilo y Metanol. En el Cuadro 3 se observan los rendimientos de los diferentes solventes.

**Cuadro 3. Rendimiento de los extractos de Gordolobo con solventes de distinta polaridad.**

GDL Molido (g)	Solvente	Cantidad de solvente (mL)	Peso caja Petri (g)	Peso después de destilar (g)	Rendimiento (g)
50	Hexano	100	35.51	36.26	0.75
50	Acetato de etilo	100	35.09	36.04	0.95
50	Metanol	100	36.19	37.04	0.85

GDL= Gordolobo

Para evaluar la presencia de metabolitos en los extractos de los dos muestreos, se realizó una cromatografía en capa fina comparativa del extracto metanólico de la

planta colectada en el mes de julio y del extracto metanólico de la planta colectada en enero en la cual se observan perfiles cromatográficos iguales, lo que indica que no hay cambio significativo en la presencia de metabolitos con respecto a las estaciones del año.

De los tres extractos obtenidos, el extracto metanólico fue el que tuvo mayor actividad fasciolicida *in vitro*, con una efectividad del 100% desde las 24 horas. En el Cuadro 4 se muestran los porcentajes de eficacia de cada extracto en las concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/L, promedio de los tres pozos, a las diferentes horas de lectura.

**Cuadro 4. Porcentaje de eficacia *in vitro* de los extractos obtenidos de *Bocconia frutescens*, con solventes de distinta polaridad y a distinta concentración.**

TIEMPO (Horas)	EXTRACTO/SOLVENTE	CONCENTRACIÓN (mg/L)			
		200	300	400	500
24	Hexánico	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>
	Acetato de etilo	2 <sup>b</sup>	10.5 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup>
	Metanólico	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
48	Hexánico	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>
	Acetato de etilo	2 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	2b <sup>b</sup>
	Metanólico	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
72	Hexánico	0 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>
	Acetato de etilo	2 <sup>b</sup>	13 <sup>b</sup>	19 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>
	Metanólico	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Literales iguales no hay diferencias estadísticas. (P<0.05);

<sup>b</sup>Literales distintas indican diferencias estadísticas significativas. (P<0.05)

El extracto metanólico se separó por medio de una cromatografía de columna de la cual se obtuvieron 215 alícuotas; a cada una se les realizó una cromatografía de capa fina para observar sus perfiles cromatográficos. Las alícuotas con perfiles iguales se unieron en fracciones, obteniendo un total de 13 fracciones que se nombraron de la A a la M.

En el Cuadro 5 se muestran los rendimientos de cada una de las fracciones una vez llevadas a la sequedad.

**Cuadro 5. Rendimiento de fracciones A-M llevadas a la sequedad.**

Fracción	Peso frasco (g)	Peso fracción + frasco (g)	Peso neto fracción (g)
A	72.27	73.73	1.46
B	72.27	76.98	4.71
C	72.27	86.47	14.2
D	72.27	75.30	3.03
E	72.27	76.11	3.84
F	72.27	73.02	0.75
G	72.27	80.02	7.75
H	96.94	98.28	1.34
I	80.97	94.47	13.5
J	72.27	78.45	6.18
K	72.27	78.21	5.94
L	65.77	67.61	1.84
M	80.97	82.53	1.56

En el cuadro 6 se muestran los porcentajes de eficacia de cada una de las fracciones, promedio de tres pozos, siendo la fracción I la que mostró mayor eficacia fasciolicida desde las 24horas. La fracción A no se probó debido a que puede tener gosispol proveniente del algodón de la columna y puede interferir con la lectura.

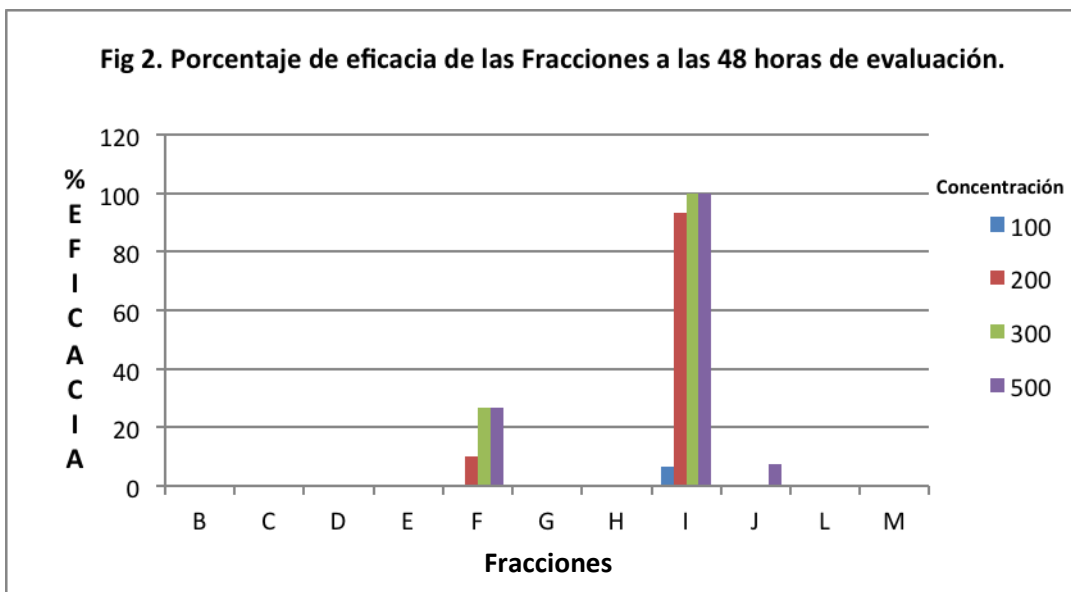
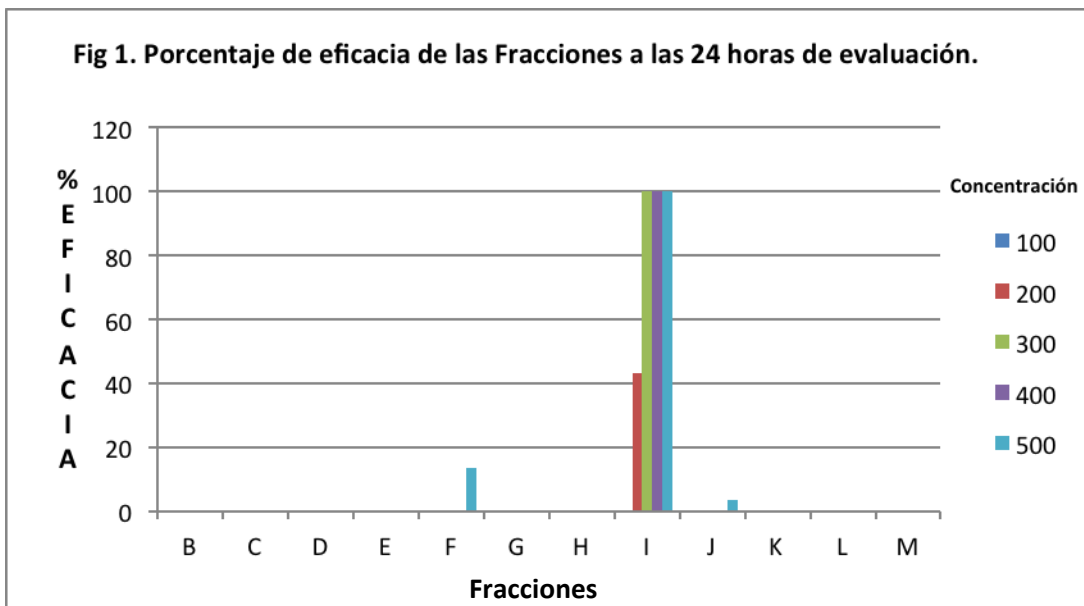
Cuadro 6. Porcentaje de eficacia <i>in vitro</i> de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>Bocconia frutescens</i> a distinta concentración.						
Tiempo (horas)	Fracción	CONCENTRACIÓN (mg/L)				
		100	200	300	400	500
24	B	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	C	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	D	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>
	F	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	13.3±9.4 <sup>b</sup>
	G	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>
	I	0 <sup>a</sup>	43.3±4.7 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
	J	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	3.6±5.2 <sup>b</sup>
	K	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>
M	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	
48	B	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>
	D	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>
	F	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	26.6±4.7 <sup>b</sup>	26.6±4.7 <sup>b</sup>
	G	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>
	I	6.6±9.4 <sup>b</sup>	93.3±4.7 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
	J	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7.4±10.4 <sup>b</sup>
	K	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>
M	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	
72	B	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>
	D	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>
	F	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	26.6±4.7 <sup>b</sup>	26.6±4.7 <sup>b</sup>
	G	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>
	I	6.6±9.4 <sup>b</sup>	93.3±4.7 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
	J	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7.4±10.4 <sup>b</sup>
	K	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>
M	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	

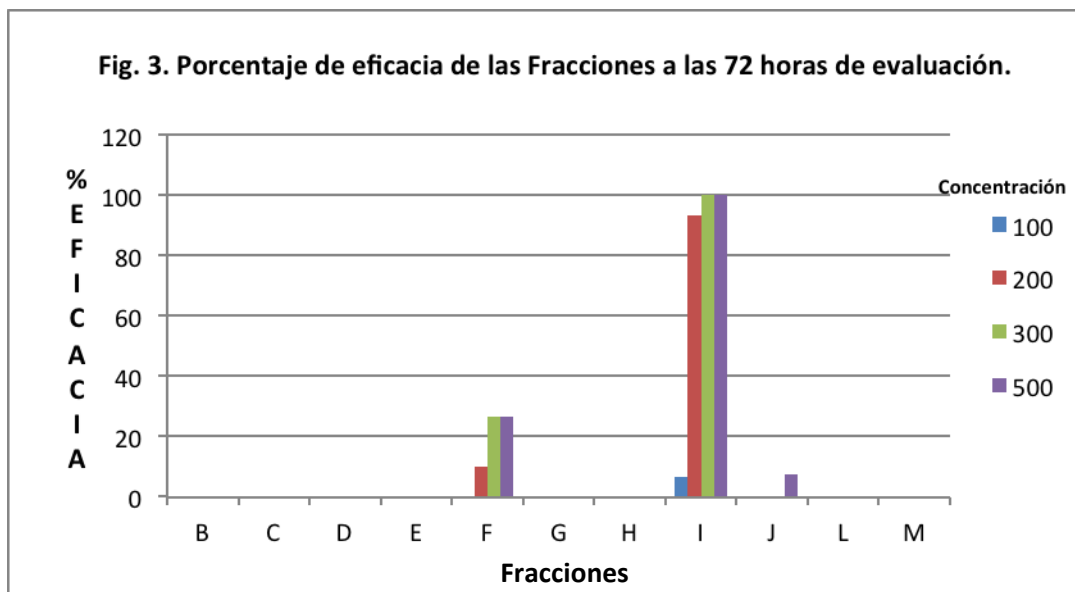
<sup>a</sup>Literales iguales indica que no hay diferencias estadísticas. (P<0.05)

<sup>b</sup> Literales distintas indican diferencias estadísticas significativas. (P<0.05)

± Desviación estándar.

La eficacia fasciolicida de las fracciones medida a las distintas horas de evaluación se puede observar de manera gráfica en las siguientes figuras.





Con base en la eficacia obtenida de la fracción I, se le realizó un análisis fitoquímico para identificar las familias de metabolitos presentes que pudieran ser los responsables de la actividad fasciolicida.

Los resultados de las pruebas fitoquímicas así como los metabolitos que identifican se muestran en el Cuadro 8.

<b>Cuadro 8. Resultados del análisis fitoquímico de la Fracción I para la identificación de los metabolitos secundarios de <i>Bocconia frutescens</i>.</b>						
<b>Pruebas fitoquímicas</b>	Liebermann-Burchard	Cloruro férrico	Dragendroff	Baljet	Molisch	Luz UV
<b>Metabolitos secundarios</b>	Esteroides	Taninos, Flavonoides y Fenil propanoles	Alcaloides	Lactonas sesquiterpénicas	Carbohidratos	Cumarinas
	-	-	+++	++	-	-

Donde (-) negativo. (+) Débilmente positivo. (++) Positivo. (+++) Fuertemente positivo.



## VII. DISCUSIÓN

El uso de plantas para el control de las enfermedades parasitarias es un tema de investigación en crecimiento debido al surgimiento de problemáticas como la resistencia a fármacos antihelmínticos y la contaminación generada por los residuos de fármacos. Los metabolitos secundarios han sido identificados como los responsables de la actividad biológica que ejercen las plantas, éstos se dividen en diversos grupos que se encuentran restringidos a familias de plantas y dependen del entorno en que se desarrolle la misma.

En el análisis realizado al Gordolobo (*Bocconia frutescens*), los metabolitos secundarios encontrados que componen la Fracción activa I, son alcaloides y lactonas sesquiterpénicas, de los cuáles los que muestran mayor respuesta a las pruebas fitoquímicas son los alcaloides, lo que podría indicar que estos son los responsables de la actividad fasciolicida de *Bocconia frutescens*.

En estudios similares, se ha probado la actividad de alcaloides extraídos de una planta de la familia *Papaveraceae*, *Bocconia arborea*, contra cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a quimioterapéuticos, inhibiendo sus crecimiento en un 98% (Camacho–Corona M. et al, 2009). En estudios sobre *B. frutescens*, Caballero-George et al en 2002, a partir del extracto etanólico puro obtenido de las raíces, al fraccionarlo, encontraron que las fracciones ricas en alcaloides tuvieron la capacidad de inhibir la [<sup>3</sup>H] angiotensina II y la unión a sus receptores [<sup>3</sup>H]-BQ-123, realizando eluciones para separar las subfracciones activas de las no activas, con lo que concuerdan que los alcaloides tienen un rol potencial en la bioactividad de la planta.

Con base en los resultados obtenidos se puede inferir en la bioactividad *in vitro* de *B. frutescens*, aun así, se requieren más pruebas que permitan aislar los metabolitos para probar su eficacia por separado, así como realizar pruebas *in vivo* para corroborar su eficacia, pruebas de toxicidad y pruebas farmacológicas, antes de implementarlo como tratamiento.

## VIII. CONCLUSIÓN

Se concluye que los alcaloides encontrados de la Fracción I de *Bocconia frutescens*, mostraron una actividad fasciolicida promisorio *in vitro*.

## IX-REFERENCIAS

1. Alanís A.D., Clazada F., Cervantes J.A., Torres J., Ceballos G.M. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders . *Journal of Ethnopharmacology*. 100:153–157.
2. 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*. 11:45. DOI: 10.1186/s12917-015-0362-4.
3. Athanasiadou S., Kyriazakis I. 2004. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*. 63 (4): 631-639.
4. Bagavan A., Kamaraj C., Elango G., Abdul Zahir A., Abdul Rahuman A. 2009. Adulticidal and larvicidal efficacy of some medicinal plant extracts against tick, fluke and mosquitoes. *Vet Parasitol*. 166: 286–292.
5. Becerra Roza W. M. 2001 Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepática* en Latinoamérica. *Rev Col Cienc Pec*; 14(1): 28-35.
6. Bennet C. 1999 Life cycle of *Fasciola hepatica*. University of Southampton. (Disponibilidad [www.southampton.ac.uk](http://www.southampton.ac.uk)) Fecha de consulta: 10/11/15.
7. Bhalla R., Narasimhan K., Swarup S. 2005. Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant cell reports*. 24(10): 562-571.
8. Borchert A. 1981. Phylum *Platelmintos* (Gusanos aplanados). *Parasitología veterinaria*. Acribia. España; Pp. 39-64.
9. Bourgaud F., Gravot A., Milesi A., Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161(5):839-851.
10. Bowman D. D. 2011. Helminths. *Georgis Parasitología para Veterinarios*. 9na edic. Elsevier, España. Pp.115-124.
11. Caballero-George C., Vanderheyden PM L., Apers S., Van Den Heuvel H., Solis P N., Gupta M. P., Claeys M., Pieters L., Vauquelin G., Vlietink A. J. 2002. Inhibitory activity on binding of specific Ligands to the Human Angiotensin II AT and Endothelin I ET Receptors: Bioactive Benzo [c] phenanthridine Alkaloids from the root of *Bocconia frutescens*. *Planta Med*. 68: 770-775.

12. Calzada F., Yépez-Mulia L., Tapia-Contreras A. 2007. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. *Journal of Ethnopharmacology*. 113: 248–251.
13. Camacho-Corona M., Favela-Hernández JM., González-Santiago O., Garza-González E., Molina-Salinas GM., Said-Fernandez S., Delgado G., Luna-Herrera J. 2009. Evaluation of some plant-derived Secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistance *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mex.Chem.Soc.* 53(2):71-75.
14. Carrada-Bravo T. 2007. Fasciola hepatica: Ciclo biológico y potencial biótico. *Rev Mex Patol Clin.* México. 54 (1); 21-27.
15. Chávez A., Sánchez L., Arana C., Suárez F. 2012. Resistencia a antihelmínticos y prevalencia de Fasciolosis bovina en la ganadería lechera de Jauja, Perú. *Rev Inv Vet Perú.* 23(1): 90-97.
16. Clark, A M. 1996. Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*. 13(8): 1133, 1134.
17. Cruz-Vega D.E., Verde-Star M.J., Salinas-González N., Rosales Hernández B., Estrada-García I., Méndez-Aragón P., Carranza-Rosales P., González-Garza T., Castro-Garza J. 2008. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. *Phytotherapy Research*. 2(4):557-559.
18. Dalton J. P. 1991. Fasciolosis. Cabi publishing. New York. Pp 1-6, 128-131.
19. Dunn A. M. 1983. Helmintología Veterinaria. El manual moderno. México, D. F., Pp. 109-115.
20. Fernandes, FF., Freitas, EPS., Costa, AC., Silva, IG. 2005. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Pesq. Agropec. Bras.* 40 (12):1243–1245.
21. Fernandes, FF., Leles R.N., Silva I.G., Freitas E.P.S. 2007. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) against *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59 (1): 145-149.
22. Fredes F., Sanchez C., Gorman T., Alcaino H. 2001. Purificación de antígenos de *Fasciola hepatica* mediante electroelución y su aplicación inmunodiagnóstica mediante Western Blot en la infección animal. *Parasitol. Día.* 25(1-2).
23. Gemedé H., Ratta N. 2014. Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. *International Journal of Nutrition and Food science.* 3(4):284-289.
24. Gorman T., Sanchez R., Fredes F. 1998. Alcaino H. 1998. Inmunodiagnostico de Fasciolosis bovina mediante ELISA y Western Blot. *Parasitol. Dia.* 22(1-2).

25. Heidolph. 1998. Instruction manual Laborota 4000/4001/digital4002/digital4003 Heidolph. (Disponibilidad [http://www.heidolph-instruments.com/fileadmin/media/3.\\_Support/Betriebsanleitungen/Verdampfer/PDF/BAL\\_Hei-VAP\\_Value\\_Advantage\\_01-005-004-79\\_en.pdf](http://www.heidolph-instruments.com/fileadmin/media/3._Support/Betriebsanleitungen/Verdampfer/PDF/BAL_Hei-VAP_Value_Advantage_01-005-004-79_en.pdf)) [Consultado 20 Ene 15]
26. Huffman M. 2003. Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. *Proceedings of the nutrition society*. 62: 371-381.
27. Hurtrez-Boussès S., Meunier C., Durand P., Renaud F. 2001. Dynamics of host-parasite interactions: The example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes and Infection*. 3: 841-849.
28. Ibarra-Moreno, S, Ibarra-Velarde F, Ávila- Acevedo Jg. 2012. *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 Plant Sci*. 3: 506-511.
29. Ibarra OF, Jenkins DC. 1984. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. *Z Parasitenkd*. 70:655-661
30. Ibarra-Velarde F. 2010. Estudio de la fasciolosis en México de 1879 a 2006. En Quiroz-Romero H., Figueroa-Castillo JA. Quimioterapia estudios terapéuticos sobre fasciolosis en México. FMVZ-UNAM. México. Pp 253-256.
31. Ibarra-Velarde F., Vera-Montenegro Y., Munguía-Xochíhua J. 2011. Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. En Quiroz-Romero H., Figueroa-Castillo JA., Ibarra-Velarde F., López-Arellano ME. Epidemiología de la Fasciolosis animal y humana. México. Capítulo 9. Pp 138. (Disponibilidad [https://www.researchgate.net/profile/Roger\\_Ivan\\_Rodriguez\\_Vivas/publication/268445402\\_Rodriguez\\_Vivas\\_R.I.\\_Ojeda-Chi\\_M.M.\\_Prez-Cogollo\\_L.C.\\_Rosado-Aguilar\\_J.A.\\_2010.\\_Epidemiologia\\_y\\_control\\_de\\_Rhipicephalus\\_%28Boophilus%29\\_microplus\\_en\\_Mxico.\\_Captulo\\_33.\\_En\\_Epidemiologia\\_de\\_enfermedades\\_parasitarias\\_en\\_animales\\_domsticos.\\_Editores\\_Quiroz\\_R.H.\\_Figueroa\\_C.J.A.\\_Lpez\\_A.M.E.\\_Editado\\_por\\_AMPAVE.\\_pp.\\_477-504.\\_ISBN\\_978-607-00-4015-3/links/546b5d2b0cf2f5eb18091aa5.pdf#page=149](https://www.researchgate.net/profile/Roger_Ivan_Rodriguez_Vivas/publication/268445402_Rodriguez_Vivas_R.I._Ojeda-Chi_M.M._Prez-Cogollo_L.C._Rosado-Aguilar_J.A._2010._Epidemiologia_y_control_de_Rhipicephalus_%28Boophilus%29_microplus_en_Mxico._Captulo_33._En_Epidemiologia_de_enfermedades_parasitarias_en_animales_domsticos._Editores_Quiroz_R.H._Figueroa_C.J.A._Lpez_A.M.E._Editado_por_AMPAVE._pp._477-504._ISBN_978-607-00-4015-3/links/546b5d2b0cf2f5eb18091aa5.pdf#page=149)) [Consulta: 10 Ene 2016].
32. Iqbal, Z., Lateef, M., Ashraf, M., Jabbar, A. 2004. Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. *J. Ethnopharmacol*. 93(2-3): 265–268.
33. Isseroff H., Spengler R. N., Charnock D. R. 1979. Fascioliasis: Similarities of the anemia in rats to that produced by infused proline. *J. Parasitol*. 65(5); 709-714.

34. Karban R., Anurag A., Agrawal, Thaler J., Adler L. 1999. Induced plant responses and information content about risk of herbivory. *Trends in ecology and evolution*. 14(11): 443-447.
35. Kayser O., Wim J. 2007. Bioprospecting: The search for Bioactive Lead Structures from Nature. Wink M. *Medicinal plant biotechnology*. Weinheim: Wiley-VCH. Pp.97-116. (Disponibilidad <http://www.uni-heidelberg.de/institute/fak14/ipmb/phazb/pubwink/2007/97.2007.pdf> ) [citado:23 Mar 2015]
36. Malone JB., Craig MT. 1990. Cattle liver flukes: risk assessments and control. *Comp Cont Educ Pract Vet*. 9: 511-518.
37. Moll L., Vellema P. 2000. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet parasitol*. 91:153-158.
38. Núñez Gómez M., Quiroz Romero H. 1994. Efectos de tratamientos sistemáticos con nitroxinil en la reducción de huevos de *Fasciola hepatica* en ganado de lidia. *Vet. Mex*. 25 (4): 341.
39. Pessoa, L.M., Morias, S.M., Bevilaqua, C.M., Luciano, J.H. 2002. Anthelmintic activity of essential oil *Ocimum gratissimum* Linn. and euginol against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol*. 109 (1-2): 59–63.
40. Quiroz-Romero H., Ibarra-Velarde F., Ochoa-Galván P., Manga-González Y., Montenegro-Cristino N., Salcedo-Elisea R. 2001. Evaluación de dos modelos quimioterapéuticos para el control de la fasciolosis bovina en clima cálido-húmedo en México. *Vet Mex*. 32(1):55-61.
41. Rai M., Cordell G. A., Martínez J.L., Marinoff M., Rastrelli L. 2012. Herbal drugs used for domestic animals. *Medicinal plants: Biodiversity and drugs*. New York: CRC press. Pp 334-355
42. Seigler, D. S. 1998 Plant secondary Metabolism. Springer Science. Business media. New York. Pp.1.
43. Shah-Fisher M., Say R. 1998. Manual of tropical Veterinary Parasitology. CAB International. UK. Pp 63.
44. Shilpa K., Varum K., Lakshmi BS. 2010. An Alternate Method of Natural Drug Production: Elciting Secondary Metabolite Production Using Plant Cell Culture. *Journal of plant science*. 5: 222-247.
45. Shukla S., Archana M., Bajpai VK. 2013. Phytochemical screening and anthelmintic and antifungal activities of leaf extracts of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Biologically active Products from Natura*. 3(1): 56-63.
46. Souza, M.M.C., Bevilaqua, CML., Morais, SM., Costa, CTC., Silva, A.R.A., Filho, R.B. 2008. Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. *An Acad Bras Ciens*. 80 (2): 271–277.
47. Spengler R. N., Isseroff H. 1981. Fascioliasis: Is the anemia caused by hematophagia? *J. Parasitol*. 67(6); 886-892.

48. Srivastav S., Singh P., Mishra G., Jha K K., Khosa R L. 2011. *Achyranthes aspera*-An important medicinal plant: A review. *J. Nat. Prod. Plant Resour.* 1 (1): 1-14.
49. Vera-Montenegro, Y. 2011. Fasciolosis. En: Parasitología Veterinaria Vol. II Helminthos. Eds. Ibarra V, F; Figueroa C, JA y Quiroz R, H. Ed. Color, México. Pp. 51-61.
50. Villegas Durán G., Bolaños Medina A., Olgún Prado L. 2001 La ganadería en México. Plaza y Valdes editores. Pp 11. (Disponibilidad [http://books.google.es/books?id=sSStWiHmsy4C&dq=situacion+de+la+ganaderia+en+mexico&lr=&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.es/books?id=sSStWiHmsy4C&dq=situacion+de+la+ganaderia+en+mexico&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s)) [Consulta: 03 Nov 2014].
51. Wink M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor Appl Genet.* 75: 225-233.
52. Wink M., Hofer A., Bilfinger M., Englert E., Martin M., Schneider D. 1993. Geese and dietary allelochemicals - food palatability and geophagy. *Chemoecology.* 4: 93-107
53. Wolf-Spengler, Isseroff H. 1983. Fascioliasis: Bile duct collagen induced by proline from the worm. *J. parasitol.* Abril. 69(2); 290-294.
54. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai J, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM, Vercruysse J. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine and caprine). *Vet. Parasitol.* 58: 181-213.
55. Wynn S. G., Faugère B. J. 2007. Herb Manufacture, Pharmacy, and Dosing. Fougère BJ., Wynn SG. *Veterinary Herbal Medicine.* Mosby Elsevier. China, 2007. Pp221-225.
56. 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(9):13042-13060.
57. Zar JH. 1996 Biostatistical Analysis. 3rd. Ed. NJ: Prentice Hall.