



**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 ESTAFIATE
(*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp. *mexicana*) CON ACTIVIDAD FASCIOLICIDA Y SU
EVALUACIÓN BIOLÓGICA *in vitro*.

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:
ALONSO EZETA MIRANDA

TUTORA PRINCIPAL:
DRA. YOLANDA VERA MONTENEGRO
FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORAL:
JOSÉ LUIS OCAMPO CAMBEROS
FMVZ-UNAM

JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
FES IZTACALA-UNAM



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.

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1.1 MORFOLOGÍA DE <i>FASCIOLA HEPATICA</i> .	3
1.2 CICLO BIOLÓGICO DE <i>FASCIOLA HEPATICA</i> .	3
1.3 PATOGENIA, PATOGENICIDAD Y LESIONES DE LA FASCIOSIS.	6
1.4 DIAGNÓSTICO.	7
1.5 PREVENCIÓN, TRATAMIENTO Y CONTROL.	8
1.6 MEDICINA TRADICIONAL.	10
1.7 ANTECEDENTES.	14
II. JUSTIFICACIÓN	17
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVO	19
4.1 OBJETIVO GENERAL.	19
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.	19
V. MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.	20
5.2 COLECTA Y SECADO DEL MATERIAL VEGETAL.	20
5.3 ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.	21
5.4 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LOS EXTRACTOS CRUDOS.	21
5.5 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO CRUDO.	22
5.6 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS FRACCIONES.	23
5.7 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LAS FRACCIONES.	23
5.8 PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN.	23
5.9 EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS.	23
5.10 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LAS FRACCIONES PURIFICADAS.	24
5.11 ANÁLISIS DE DATOS DE LOS EXTRACTOS, FRACCIONES Y FRACCIONES PURIFICADAS.	24
5.12 PRUEBA DEL ÍNDICE DE TOXICIDAD.	24
5.13 ANÁLISIS DE DATOS DE ÍNDICES DE TOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD.	26
VI. RESULTADOS	27
VII. DISCUSIÓN	48
VII. CONCLUSIONES	51
LITERATURA CITADA	52

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar en condiciones *in vitro* el efecto fasciolicida de estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*), a partir de extractos crudos y fracciones obtenidos con solventes de diferentes polaridades (hexano, metanol y acetato de etilo). Las plantas se recolectaron en el estado de Veracruz, México. La evaluación se llevó a cabo con formas jóvenes de *Fasciola hepatica*, desenquistadas artificialmente. La eficacia se midió en base al porcentaje de mortalidad, comparando la sobrevivencia de las fasciolas tratadas con relación al grupo testigo. Los resultados obtenidos, indicaron que, a partir de las 24 horas, los extractos metanólicos y de acetato de etilo tuvieron una eficacia del 100% ($P < 0.05$), mientras que el extracto hexánico mostró una eficacia del 71%, alcanzando el 100% de eficacia a las 72 horas ($P < 0.05$). Posterior a estos resultados, se realizó una cromatografía en columna rápida, para la obtención de fracciones del extracto de acetato de etilo, se obtuvieron 14 fracciones (A-N), las cuales se evaluaron *in vitro*. Los resultados mostraron que las fracciones C y D obtuvieron el 100% de eficacia a las 48 horas postexposición ($P < 0.05$), mientras que la fracción B obtuvo el 100% a las 72 horas ($p < 0.05$). Posteriormente, se realizó la purificación de la fracción C, preparando nuevamente una columna rápida, se obteniéndose 12 fracciones (I – XII), siendo las fracciones VI, VII y X las que presentaron una eficacia del 100% desde las primeras 24 horas ($P < 0.05$). Se realizó un ensayo de toxicidad del extracto utilizando ratones CD-1, los resultados indican que el extracto crudo no presenta ningún tipo de toxicidad ni de genotoxicidad ($P < 0.05$). Se concluye que los extractos y fracciones de estafiate (*A. ludoviciana*) presentan una eficacia promisoriosa contra *F. hepatica*.

Palabras clave: Estafiate, extractos, fasciolosis, metabolitos secundarios, toxicidad.

I. INTRODUCCIÓN

Una de las parasitosis más importantes a nivel mundial, dentro del campo de la Medicina Veterinaria, es la Fasciolosis, la cual es provocada por el trematodo *Fasciola hepatica*. Es una de las enfermedades hepáticas que genera pérdidas económicas estimadas en millones de dólares, a nivel mundial (PAHO, 2003; FAO, 2003). Este parásito es de ciclo indirecto y se localiza en conductos biliares de rumiantes, suinos, équidos, conejos y ocasionalmente en el hombre, a lo largo del territorio mexicano se han encontrado prevalencias del 2 al 100% (Vera, 2011). Es una zoonosis importante en varios países del mundo como en Irán, Egipto, Cuba, Bolivia y Perú. Se estima que existen entre 2.4 y 17 millones de personas infectadas a nivel mundial, la vía de transmisión entre humanos se da principalmente por el agua y alimentos: al consumir plantas acuáticas y semi-acuáticas con metacercarias adheridas y al beber agua contaminada o lavar utensilios de cocina con esta agua (OMS/WHO, 2007).

Dentro de la economía mundial, los rumiantes domésticos son una parte importante en las industrias cárnica, de lana, peletera, de lácteos y sus derivados. Es por eso que la medicina preventiva para el control de parasitosis se vuelve importante para mantener una buena salud del ganado y evitar la disminución de parámetros importantes como la producción de leche y la adecuada conversión alimenticia (Bowman, 2004). Las pérdidas directas que ocasiona esta parasitosis se deben a la disminución en los parámetros productivos como: ganancia de peso (que puede llegar hasta un 28% de pérdida en bovinos y hasta 350 gramos por semana en ovinos), la conversión alimenticia, producción láctea (bajando entre un 5 y 14% del total de kg de leche producidos por lactación), intervalos entre parto (aumentado hasta en 20 días entre cada uno de ellos) (Bowman, 2004; Quiroz, 2003). Las pérdidas indirectas de esta enfermedad se deben a los incrementos en los costos de alimentación, debido a los trastornos nutricionales causados por la misma y

una pérdida en las ganancias económicas por los decomisos a nivel de rastro de las canales infectadas (Vera, 2011).

Se estiman que aproximadamente 350 millones de bovinos y 250 millones de ovinos a nivel mundial se encuentran infectados por esta enfermedad, ocasionando pérdidas económicas entre 2000 y 3000 millones de dólares (Fernández *et al.*, 2015).

La fasciolosis ha evolucionado con el paso del tiempo debido al crecimiento de la industria ganadera a nivel mundial y al cambio climático que ha permitido la adaptación del huésped intermediario (Dargie, 1987; Rojo, *et al.*, 2012). Durante décadas, el principal método de control de esta enfermedad ha sido la quimioterapia, por desgracia, debido al uso indiscriminado de estos fármacos junto con la mala prevención y diagnóstico ha permitido la generación y aumento de resistencia antihelmíntica a nivel mundial (Moll *et al.*, 2000; Ortiz, *et al.* 2003; Fernández *et al.*, 2015; Kaplan *et al.*, 2012; Olaechea, *et al.*, 2011; Ceballos, *et al.*, 2010;).

1.1 Morfología de *Fasciola hepatica*.

F. hepatica es un trematodo hermafrodita de cuerpo ancho y aplanado, tiene dos ventosas y sus órganos internos (digestivo y reproductor) son ramificados. Cuenta con dos testículos, los cuales ocupan la parte media corporal, tiene un solo ovario y útero, localizados anteriormente a los testículos. El tegumento está cubierto de espinas dirigidas hacia atrás. Los huevos pueden medir entre 130 y 150 micras de largo por 60 a 90 micras de ancho, cuenta con una cáscara delgada y es operculado (Vera, 2011).

1.2 Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.

El ciclo biológico de *F. hepatica* es indirecto. Una vez que el parásito adulto se encuentra en el huésped definitivo (HD), deposita sus huevos y estos son

arrojados en las heces. Estos huevos se desarrollan mientras tengan las condiciones adecuadas de temperatura y humedad (26°C y 80%, respectivamente), y después de 2 o 3 semanas eclosionan las primeras larvas hasta que se encuentren libres en el agua. A partir de aquí comienzan el resto de las fases larvarias de este trematodo, la primera de ellas es el miracidio (presenta dos manchas oculares y cilios), esta fase puede permanecer hasta 24 horas en el agua, hasta localizar al huésped intermediario (HI) principalmente caracoles del género *Lymnaea spp* (*L. humilis*, *L. bulimoides* y *L. cubensis*). Una vez en contacto con los caracoles, entran en ellos a través del mucus gracias a sus receptores quimiotácticos, penetrando en ellos a través de la cavidad respiratoria o del tegumento de la piel (Bowman, 2004; Stuart, 1999; Vera, 2011).

Dentro del caracol, los miracidios se transforman en la segunda fase larvaria una vez que se alojan en la glándula digestiva, el esporocisto, el cual después de pasar un lapso de tiempo de aproximadamente 14 días cada uno de ellos produce y libera de 5 a 8 redias, las cuales se alojan en el hepatopáncreas. A su vez cada redia produce redias hijas y finalmente estas dan origen a la última fase larvaria que parasita al caracol, las cercarias, las cuales abandonan al HI después de 4 o 6 semanas a través de la abertura tocológica y finalmente del aparato respiratorio. Las cercarias requieren de un medio acuático para sobrevivir, de no tener estas condiciones ambientales, son capaces de permanecer en el HI por periodos de tiempo prolongados hasta que se presente las lluvias o se eleve la temperatura ambiental (Bowman, 2004; Stuart, 1999; Vera, 2011).

Una vez en el agua, las cercarias son capaces de adherirse principalmente en las plantas o en la superficie inferior de la película superficial del agua, aquí es donde se forma un quiste de doble pared para formar la fase infectante del parásito, la metacercaria, la cual necesita de 24 horas de maduración. Estas son ingeridas por el HD junto con la pastura o al momento de beber agua (Bowman, 2004; Stuart, 1999; Vera, 2011).

Dentro del HD se presenta el desenquistamiento de las metacercarias en dos fases. La primera de ellas es la activación, la cual se lleva a cabo en el rumen con una atmósfera de anhídrido carbónico concentrado y una temperatura de 39°C. La segunda fase es la de emergencia y esta se lleva a cabo en el duodeno, la bilis provoca la activación enzimática de la metacercaria provocando la apertura del quiste. Una vez que la fasciola joven esta libre, se alimenta de la mucosa intestinal, abriéndose paso hasta el peritoneo, esto ocurre 24 horas después de la ingestión de las mismas. Desde ahí comienzan a migrar hacia el hígado y penetrar la serosa del mismo, 90 horas postingestión, a partir de este momento las fasciolas adquieren forma lanceolada y miden entre 1 y 2 mm (Bowman, 2004; Stuart, 1999; Vera, 2011).

Dentro del parénquima hepático permanecen alrededor de 6 semanas, tiempo en el que se alimentan y crecen. Finalmente, los parásitos se alojan en los conductos biliares del HD para alcanzar su madurez sexual, 40 días después de haber sido ingeridas las metacercarias. Las fasciolas adultas se auto fecundan a partir del día 55 pos infección. Los huevos pasan al duodeno junto con la bilis y de ahí son evacuados en las heces (Bowman, 2004; Stuart, 1999; Vera, 2011).

Es importante recalcar que entre la 5ª y 6ª semana pos infección, comienza a existir un gran crecimiento de formas jóvenes del parásito, los cuales comienzan a generar una extensa hemorragia y fibrosis hepática secundaria. En ocasiones se pueden encontrar fasciolas inmaduras en órganos como los pulmones, páncreas, linfonodos e inclusive en el feto de animales preñados. (Stuart, 1999).

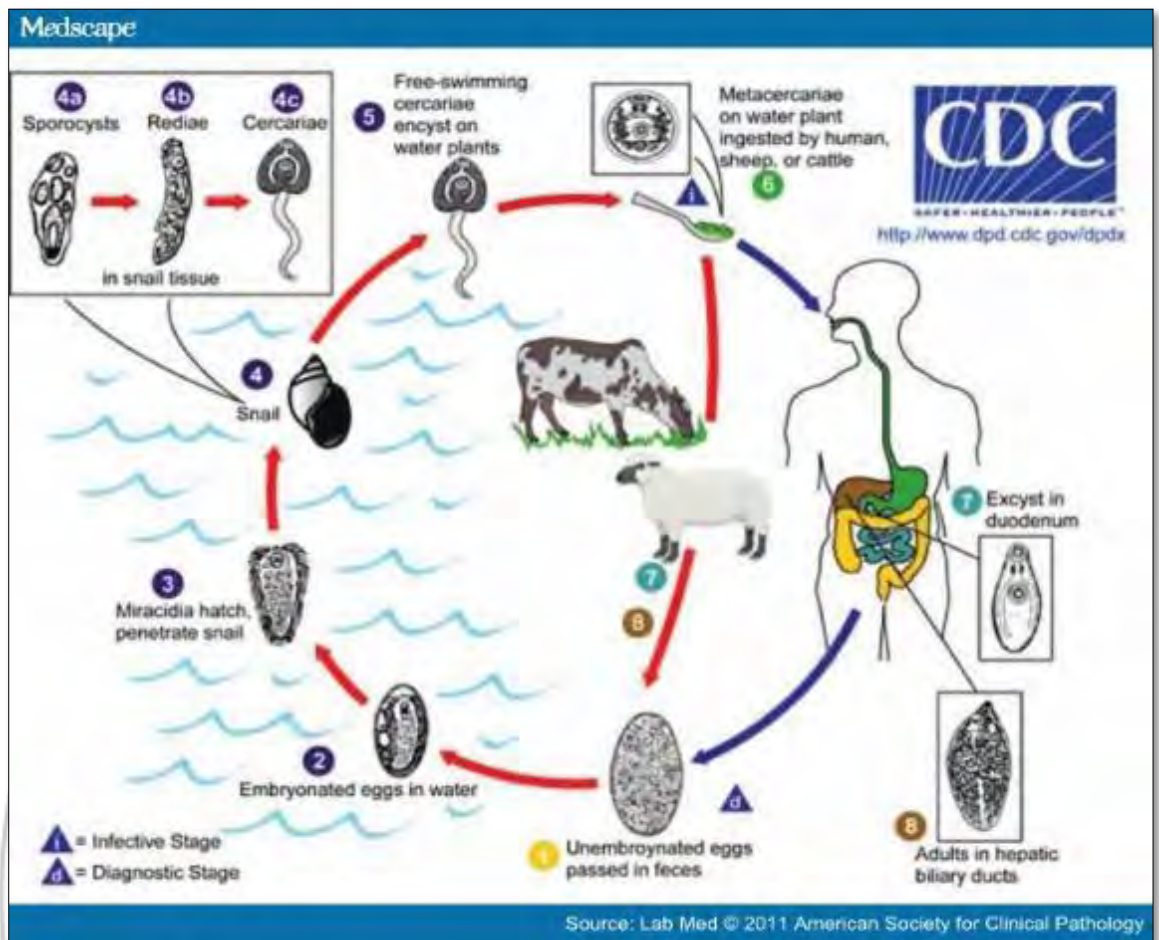


Figura. 1 Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.

Tomado de: http://www.medscape.com/viewarticle/735841_2

1.3 Patogenia, patogenicidad y lesiones de la fasciolosis.

La patogenia depende de la cantidad de metacercarias viables ingeridas y la especie que las albergue como HD. Se pueden ver afectados los humanos, équidos, suinos, bovinos y ovinos, siendo estos últimos los más susceptibles a la infección. Las lesiones más importantes se presentan durante la migración hepática del parásito (Vera, 2011).

La fase aguda de la enfermedad se presenta casi de manera exclusiva en los ovinos, provocada por una infestación masiva de parásitos, los cuales producen un traumatismo severo por acción mecánica e irritativa de las espinas del tegumento y subsecuentemente una respuesta inflamatoria en el hígado,

los hepatocitos son destruidos por acción de productos metabólicos tóxicos de las fasciolas. Algunos ovinos albergan esporas de *Clostridium novyi* en el hígado y puede desencadenarse una hepatitis necrótica infecciosa secundaria. En este tipo de infecciones masivas se puede presentar muerte súbita del animal (Bowman, 2004; Quiroz, 2003; Vera, 2011).

La forma crónica de la enfermedad es la más importante y el daño es variable, siendo los bovinos los más afectados. Se presenta cuando son ingeridas dosis moderadas y constantes de metacercarias, teniendo un efecto acumulativo con el paso de los años. Se genera un síndrome de mala digestión en el HD debido a la obstrucción del conducto colédoco alterando el flujo normal de bilis y por ende los alimentos no pueden digerirse en su totalidad, lo que provoca una pérdida gradual de la condición corporal y debilidad progresiva. Se produce anemia por la acción hematófaga del parásito, diarrea, hipoproteinemia con la aparición de edemas subcutáneos, principalmente en el espacio submandibular y en el abdomen, ascitis, además de una calcificación de los conductos biliares (Bowman, 2004; Quiroz, 2003; Vera, 2011).

Las lesiones producidas por el parásito van desde hemorragias, necrosis isquémica y coagulativa hasta engrosamiento de los conductos biliares, colangitis hiperplásica y fibrosis hepática. Existen fasciolas erráticas, las cuales llegan a otros órganos como pulmón, bazo, útero y músculos entre otros, después de ingresar a venas hepáticas y llegar por circulación pulmonar; en estos casos el organismo las encapsula y mueren (Bowman, 2004; Quiroz, 2003; Stuart, 1999; Soulsby, 1987; Vera, 2011).

1.4 Diagnóstico.

El diagnóstico de la enfermedad se realiza por los hallazgos de las lesiones en la necropsia y la observación de los signos clínicos en animales afectados, tales como diarrea, edema submandibular, anorexia, pérdida de peso, anemia y en ciertos casos abortos (Bowman, 2004; Vera, 2011). En el laboratorio, para

detectar la presencia de *F. hepatica* se utiliza la técnica de sedimentación por su eficiencia y bajo costo, ya que a través de la presencia de huevos se muestra la infección activa (Quiroz, 2003). Las técnicas inmunológicas como la inmunofluorescencia, fijación del complemento, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o difusión en gel (DIG) han sido utilizados como método diagnóstico, sin embargo, estas pruebas no diferencian entre una infección activa y una infección anterior debido a la persistencia de anticuerpos en contra de *F. hepatica* hasta meses después de la infección, por ende los falsos positivos pueden presentarse de manera común (Almazán et al, 2001; Piedrafita, 2010).

Los estudios epidemiológicos sobre fasciolosis en las zonas afectadas son de suma importancia para el diagnóstico integral de la enfermedad, ubicando la presencia de los HI en épocas lluviosas y las condiciones ambientales, con esto obtenemos un registro adecuado sobre el carácter enzoótico de la enfermedad (Vera, 2011).

1.5 Prevención, tratamiento y control.

A través de los años el control y tratamiento de la fasciolosis ha sido en base a diferentes fármacos:

- Benzimidazoles:
 - Carbamatos: El Albendazol produce deficiencia de energía en el parásito y subsecuentemente la muerte, y el Mebendazol inhibe el paso de glucosa al parásito.
 - Halogenados: El Triclabendazol bloquea el paso de glucosa.
 - Probenzimidazoles: La Netobimina es un fármaco que sufre dos transformaciones dentro del organismo del HD, una de ellas genera la formación de albendazol en el hígado y da el efecto fasciolicida.

- Fenoles halogenados: El Bitionol altera el equilibrio digestivo e interfiere en la embriogénesis, el Hexaclorofenol se metaboliza y elimina por la bilis del HD, llegando directamente a los parásitos adultos, el Niclofolán es un desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial del parásito y el Nitroxinil inhibe la contracción muscular del mismo.
- Fenoxialcanos: La Dianfenetidina actúa sobre el tegumento del parásito haciéndolo susceptible a sistemas enzimáticos.
- Salicidas: La Rafoxanida inhibe la formación de ATP y ADP del parásito e interfiere en su fosforilación oxidativa mitocondrial y el Closantel bloquea las rutas metabólicas del parásito, daña la cutícula y produce atrofia reproductiva.
- Sulfonamidas: El Clorsulón inhibe el metabolismo energético de las fasciolas.

De todos estos, los más utilizados a nivel mundial han sido los benzimidazoles, siendo el Triclabendazol el de mayor eficacia clínica, ya que actúa contra todas las fases del parásito (Olaechea, 2011; Torgerson y Claxton, 1999; Vera, 2005).

Por desgracia, debido al uso indiscriminado de estos medicamentos junto con la mala prevención y diagnóstico ha permitido la generación y aumento de resistencia antihelmíntica a estos fármacos en diferentes partes del mundo como Estados Unidos, Australia, Brasil (Kaplan et al., 2012), Argentina (Olaechea et al., 2011), Perú (Ortiz et al., 2013) y en diversos países de Europa (Moll et al., 2000; Rojo et al., 2012).

Es importante recalcar que para que exista un adecuado control del parásito, debemos tomar en cuenta tres puntos importantes:

1. Eliminar a los parásitos adultos de todos los HD infectados.
2. Control y reducción de los HI.

3. Una adecuada rotación de pastoreo y un correcto drenado de terrenos inundados.

Por lo tanto, es de suma importancia tener un diagnóstico oportuno sobre la enfermedad y mantener una profilaxis integral (Vera, 2011).

1.6 Medicina tradicional.

Una alternativa a esta problemática, es la medicina herbal o el uso de extractos de plantas con efecto parasiticida. Desde hace siglos la humanidad ha tenido el conocimiento sobre el uso de plantas medicinales y varían de una región a otra debido a la influencia de factores culturales e históricos. La medicina tradicional se define como la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, sean explicables o no, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades físicas y mentales (OMS, 2002).

Desde tiempos remotos ha existido un beneficio en los animales y los seres humanos al consumir plantas, esto ha generado un gran acervo de información sobre el uso de estas como tratamientos a diversas afecciones. En muchos de estos casos ha sido gracias a la observación sobre los animales, ya que es sabido que algunos de ellos ingieren ciertas plantas en vida silvestre cuando se sienten afectados por alguna patología (Evans, 2012).

El uso terapéutico de las plantas ha experimentado grandes variaciones a lo largo de la historia, pero su eficacia como agentes terapéuticos está demostrada. Podemos encontrarlas en la medicina ayurvédica hindú y en la china, junto con la acupuntura y otras técnicas; también desempeñan un papel muy importante en la terapia ecológica espiritual de los indios norteamericanos y sus constituyentes son la base para la fabricación de medicamentos utilizados en medicina "ortodoxa". En realidad, la medicina se fundamenta en el

uso de plantas medicinales. Hasta hace unos 50 años, la mayoría de los medicamentos que figuraban en las farmacopeas se fabricaban a partir de plantas. Desde el momento en que empezaron a desarrollarse las técnicas de síntesis química, se inició un descenso aparente en el uso de plantas, si bien la mayoría de las drogas seguían teniendo un origen vegetal. Hoy en día la popularidad de las plantas medicinales va en aumento (Evans y Hoffman, 2012).

Todos los efectos que proporcionan las plantas como alternativa medicinal, son ocasionados por moléculas sintetizadas como intermediarios o como productos de procesos metabólicos de las plantas. Los metabolitos primarios son aquellos que se sintetizan a partir de reacciones que se inician con el CO₂ y la fotosíntesis, obteniendo principalmente aminoácidos, azúcares, proteínas, polisacáridos, lípidos, entre otros, los cuales ayudan a la fisiología de la planta. Los metabolitos secundarios son los que se derivan de las rutas primarias, tales como los alcaloides, glicósidos, saponinas, taninos, entre otros y básicamente son utilizados para las interacciones bióticas, defensa y preservación de las plantas (Bhalla *et al.* 2005; Wink, 1988).

Los metabolitos secundarios presentan una alta actividad biológica debido a las funciones defensivas en contra de bacterias, hongos, parásitos, depredadores, etc. Aunque estos metabolitos también tienen 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. Los efectos de estos varían de acuerdo a la familia de metabolitos presentes, algunos de estos pueden proporcionar un efecto benéfico para problemas de salud en función de ingerir concentraciones bajas y otros pueden ser tóxicos (Huffman, 2003; Gemede *et al.*, 2014).

A continuación, se muestra un cuadro con las familias de metabolitos secundarios más comunes y su efecto directo en animales:

Cuadro 1. Metabolitos secundarios y su efecto en animales.

Clases de compuestos	Efectos
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 Acetilcolina (Tóxico y amargo)
Alcaloides tropánicos	Inhibición de receptores de Acetilcolina (Altamente tóxicos)
Alcaloides de pirrolizideno (AP)	Mutagénico y carcinogénico (Hepatotóxico)
Glicósidos cianogénicos	Inhibición de la respiración
Glicósidos cardiogénicos	Inhibición de Na ⁺ /K ⁺ –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 Na ⁺ /K ⁺ –ATPasa (Altamente tóxico y amargo)
Antraquinonas	Purgante (Tóxico)
Fenoles	Astringente, reduce la digestibilidad
Celulosa	
Hemicelulosa	Indigestibles
Ligninas	

*Adaptado de Huffman, 2003.

Estas biomoléculas activas extraídas de las plantas presentan eficacia terapéutica muy similar a los fármacos sintéticos, por lo cual son usados en diversas ramas de la medicina ya sea como antibacteriales, antimicóticos, inmunoestimulantes, antiparasitarios, etc. (Rai *et al.*, 2012).

Sin embargo, antes de utilizar o hacer uso de cualquier planta como una opción viable de tratamiento, se necesita conocer la toxicidad de estas. Por lo que es necesario realizar pruebas de toxicidad con experimentos *in vitro* e *in vivo*, importante de recalcar que ambos son complementarios y se realizan de manera secuencial (Cameán y Repetto, 2006). Una de las pruebas más útiles son los ensayos de toxicidad aguda, ya que a través de estas se puede obtener información del grado de toxicidad y efectos de la sustancia a estudiar (Córdoba, 2006). Una de las especies animales utilizadas para estas pruebas son los ratones, debido a su facilidad de manejo y costos de mantenimiento (Shayne, 2007).

Dentro de estas pruebas *in vivo*, una de las más útiles es la Prueba de Micronúcleos (MN), ya que la presencia de estos en cualquier estirpe celular indica una pérdida de material genético. Los MN son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina, separados del núcleo principal y formados por la clastogenesis de cromosomas acéntricos o bien por aquellos cromosomas que sufren un rezago anafásico, lo que conlleva a la aparición de un pequeño núcleo en algunas células anucleadas como los eritrocitos o bien en el citoplasma de células nucleadas como linfocitos o espermatozonias (Mavournin *et al.*, 1990).

Entre las ventajas que posee la prueba de MN se puede mencionar el hecho de que no es necesario conocer el cariotipo del modelo biológico, es de un manejo simple y rápido, además de que se puede realizar en una gran variedad de especies (roedores, lagomorfos, humanos, etc.) así como de una gran variedad de tejidos (eritrocitos, células germinales, cultivo de linfocitos de sangre periférica, células de la mucosa bucal, entre otros) ya que la condición esencial

es que el recambio celular este en constante proliferación (Hayashi, *et al.*, 2001). La sangre periférica es una de las opciones más fáciles ya que permite ver una curva de tiempo-respuesta, evaluar los sistemas de reparación del organismo y poder realizar estudios crónicos e inclusive llevarlos a siguientes generaciones (Hayashi *et al.*, 2000).

1.7 Antecedentes.

Se han llevado a cabo diversos estudios con respecto a la eficacia de diferentes extractos de plantas contra distintas especies de parásitos, en donde se ha demostrado eficacia parasiticida *in vitro*, por ejemplo, se han logrado inhibiciones de hasta un 91.2% de larvas L3 de *Haemonchus contortus*, utilizando extractos de Huizache (*Acacia pennatula*), Leucaena (*Leucaena leucocephala*) y Tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) (Alonso, *et al.* 2008a); reducciones del conteo de huevos en heces de hasta un 40.2% de *Haemonchus spp.* y *Trichostrongylus colubriformis*, utilizando aceite esencial de Orégano (*Lippia sidoides*) (Alonso, *et al.* 2008b); se ha demostrado un efecto antihelmíntico *in vitro* con parásitos adultos de *Paramphistomum explanatum*, con un extracto metanólico de Machiguá (*Dregea volubilis*) a diferentes concentraciones, provocando la parálisis del parásito hasta en 8.83 minutos y la muerte del mismo hasta en 10.67 minutos (Hossain, *et al.* 2011); se han logrado mortalidades *in vitro* de hasta el 100% de parásitos adultos de *Paramphistomum cervi*, de diferentes extractos obtenidos a partir de las hojas de *Euphorbia hirta*, Guayaba (*Psidium guajava*), *Ricinus communis*, *Solanum trilobatum* y *Tridax procumbens* (Zahir, *et al.* 2012), entre otros estudios.

Por otro lado, estudios *in vitro* recientes han demostrado un efecto fasciolicida de extractos crudos de distintas plantas como *Tilia mexicana*, Café (*Coffea arabica*), *Ternstroemia pringlei*, *Eribotrya japonica*, entre otras, mostraron eficacias entre 95 y 100% en concentraciones de 50 a 500 mg/L (Vera, *et al.*, 2008). En otros estudios, extractos de Guayaba (*Psidium guajava*), *Casimiora edulis* y *Vernonanthura patens*, alcanzaron eficacias del 100%, en

concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L, siendo *V. patens* la más efectiva de las tres plantas (Francisco, 2015).

Con respecto a los trabajos relacionados con extractos crudos con diferentes solventes, se tiene a *Artemisia absinthium* y *Artemisia annua* quienes presentaron 100% de actividad fasciolicida en formas adultas del parásito a las 70 y 23 horas post-exposición respectivamente, a una concentración de 2 mg/mL (Ferreira, *et al.*, 2011). En otro trabajo extractos realizados con hexano a partir de hojas y flores de *Achillea millefolium*, Menta (*Mentha piperita*), *Lippia graveolens*, *Chenopodium graveolens*, *Justicia spicigera*, *Populus alba*, estafiate (*Artemisia mexicana*), entre otras, demostraron tener 100% de eficacia desde las primeras 24 post-exposición a una concentración de 500 mg/L (Ibarra, *et al.*, 2012^a). En otra investigación, con solventes de distinta polaridad de *Artemisia mexicana*, *Bocconia frutescens*, *Cajanus cajan*, Lantana (*Lantana cámara*), y *Piper auritum* mostraron efecto antihelmíntico en concentraciones de 125 mg/L hasta 500 mg/L (Álvarez *et al.*, 2015).

El estafiate es una planta erguida de la familia Asteraceae, género *Artemisia* que puede alcanzar alturas de 1 a 1.5 m, sus hojas se dividen en tres y pueden llegar a medir 15 cm de largo, cuando son jóvenes las hojas son de un color blanquecino-grisáceo y verde oscuro al madurar, la época de floración se presenta entre septiembre y noviembre, las flores son de un tono amarillento y al momento de triturarse despiden un aroma característico. Crece en climas cálidos, semisecos y templados, se localiza desde Canadá hasta Guatemala, se puede encontrar en altitudes de hasta 3900 m, dentro del territorio nacional es común hallarla en diferentes estados del norte y el centro, principalmente en las zonas del altiplano, es una planta capaz de adaptarse a una gran variedad de terrenos, ya sean bosques tropicales o terrenos de cultivos abandonados, debido a que cuenta con un ciclo de vida continuo y es fácil encontrarla con la maleza o la “mala hierba” de los cultivos, por lo cual es catalogada como ruderal debido a su crecimiento en zonas alteradas por los seres humanos (CONABIO, 2009; UNAM, 2009) (Fig.2).



Fig. 2 Estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp. *mexicana*).

El uso del estafiate es principalmente medicinal para tratar afecciones gastrointestinales, problemas respiratorios, antiespasmódico y como desparasitante en humanos, por lo cual es catalogada como medicinal (Aguilar, et al. 1994; Cano, 1997; Rzedowsky et al, 2013).

II. JUSTIFICACIÓN

La problemática surgida por la resistencia antihelmíntica y contaminación ambiental a nivel mundial, ha motivado el desarrollo de nuevas estrategias para el control de la fasciolosis. Una de éstas ha sido el uso de diversas especies de plantas, de las cuales se puedan obtener efectos fasciolicidas derivados de los metabolitos secundarios de estas, los cuales podrían posiblemente generar una nueva alternativa de control para esta enfermedad.



III. HIPÓTESIS

Los extractos crudos y metabolitos secundarios de estafiate (*A. ludoviciana* Nutt. *mexicana*) presentarán efecto fasciolicida *in vitro* mayor a 90%.



IV. OBJETIVO

4.1 Objetivo general.

Determinar y evaluar la actividad fasciolicida *in vitro* de los extractos crudos y los metabolitos secundarios de estafiate (*A. ludoviciana* Nutt. *mexicana*).

4.2 Objetivos particulares.

- Preparar los extractos crudos de estafiate con solventes orgánicos de distinta polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol) a partir de las hojas de la planta.
- Evaluar la eficacia fasciolicida *in vitro* de los extractos crudos.
- Fraccionar el extracto crudo que presente mayor eficacia fasciolicida *in vitro*.
- Evaluación *in vitro* de las fracciones obtenidas a partir del extracto crudo con mayor eficacia en contra de estadios inmaduros de *F. hepatica*.
- Identificar los metabolitos secundarios responsables del efecto fasciolicida *in vitro*, de la fracción con mayor actividad fasciolicida, por medio de un análisis fitoquímico con pruebas cualitativas.
- Evaluar la toxicidad y genotoxicidad de las fracciones que resulten con mayor eficacia fasciolicida en ratones CD1, mediante la prueba de micronúcleos.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Localización del estudio.

La colecta del material vegetal (hojas) de estafiate (*A. ludoviciana*) se llevó a cabo en el municipio de Tlapacoyan, en el estado de Veracruz, México. El secado de las hojas se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en Martínez de la Torre – Tlapacoyan, municipio de Tlapacoyan, Veracruz, México.

La obtención de los extractos crudos y fraccionamiento de la planta, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad Biológica de Prototipos (UBIPRO), de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala – UNAM, Tlalnepantla, Estado de México. La identificación taxonómica de la planta se realizó en las instalaciones del herbario de FES-Iztacala, obteniendo el registro 2156 IZTA (Fig. 2).

Todas las evaluaciones *in vitro* de la actividad fasciolicida, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Quimioterapia Experimental de Helminthos, del Depto. de Parasitología de la FMVZ – UNAM, Ciudad de México.

Los ensayos de toxicidad y genotoxicidad se realizaron en las instalaciones del Bioterio de la FES – Iztacala UNAM.

5.2 Colecta y secado del material vegetal.

Se recolectaron solo hojas sanas de estafiate (*A. ludoviciana*), las cuales fueron colocadas en un horno por tres días a una temperatura constante de 60°C, hasta que se secaron por completo de acuerdo a la metodología descrita por Monroy et al. (2007) y Rodríguez et al. (2009). Una vez secas, se molieron

y almacenaron en recipientes de plástico correctamente identificados para transportarlas, se obtuvieron aproximadamente 5 kg de materia seca en total.

5.3 Elaboración de los extractos crudos.

De la materia seca obtenida, se obtuvieron los extractos crudos por maceración utilizando solventes orgánicos de distinta polaridad (hexano, acetato de etilo y metanol) en una proporción de 100 grs de hoja seca por 500 mL. de solvente (1:5) y se dejó macerar durante 7 días. Pasado este periodo, se realizaron destilaciones de cada uno de los solventes cada semana durante un mes, utilizando un rotoevaporador Heidolph® a baja presión. Los extractos obtenidos se almacenaron en envases de vidrio a una temperatura de 4°C, hasta la evaluación *in vitro* (Harnborne, 1970).

5.4 Evaluación *in vitro* de los extractos crudos.

Para el bioensayo de eficacia fasciolicida, de cada uno de los extractos crudos obtenidos, se utilizaron fasciolas desenquistadas artificialmente. Las metacercarias se expusieron a ditionato de sodio como medio de activación durante hora y media bajo incubación de 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez pasado este período, se colocaron en un medio de emergencia formado por solución de Hank y bilis de bovino durante dos horas y medio bajo las mismas condiciones de incubación, finalmente las fasciolas desenquistadas fueron suspendidas en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640® y suero de bovino, procedimiento descrito por Ibarra y Jenkins (1984).

Para reconstituir el extracto crudo seco y obtener las diferentes concentraciones a trabajar, se utilizaron 0.0125 gramos de extracto al que se adicione como máximo 0.1 mL de solvente del cual fueron obtenidos para disolverlos y posteriormente aforar con 10 mL de agua destilada y realizar diluciones dobles para obtener las concentraciones correspondientes. Las fasciolas fueron expuestas por triplicado a las concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L de cada uno de los extractos, incorporando los

correspondientes testigos de cada solvente para corroborar que por sí solo no afecta al parásito y los controles negativos en donde no se colocó ningún tratamiento. Adicionalmente, como fármaco de referencia se utilizó Triclabendazol a las concentraciones de 10 y 50 mg; este procedimiento se realizó en cajas de cultivo celular NUNC® de 24 pozos. En cada pozo se colocó 1.6 mL de medio RPMI, 0.2 ml de extracto solubilizado y 0.2 mL conteniendo 10 fasciolas. Las lecturas de la prueba se llevaron a cabo a las 24, 48 y 72h postexposición, utilizando un microscopio invertido a 40x. Durante este periodo de prueba las cajas se mantenían en incubación de 37°C y 5% de CO₂. Todos los procedimientos descritos fueron realizados bajo condiciones asépticas utilizando una campana de flujo laminar.

La eficacia anti-fasciola se midió comparando la sobrevivencia del grupo tratado con relación al grupo testigo (Wood, *et al.*, 1995):

$$\text{Eficacia (\%)} = \frac{\text{No. Fasciolas gpo. testigo} - \text{No. Fasciolas gpo. tratado}}{\text{No. Fasciolas gpo. testigo}} \times 100$$

Los extractos que presentaron una eficacia mayor del 90%, fueron sometidos a una reevaluación *in vitro* para confirmar resultados.

5.5 Fraccionamiento del extracto crudo.

Al extracto que presentó una eficacia superior al 90%, se fraccionó por un sistema de cromatografía de columna abierta, usando como fase móvil una mezcla de solventes orgánicos en distinta proporción (diclorometano:metanol, metanol, metanol:agua y agua) y una fase estacionaria formada por silica gel 60 Å.

Las alícuotas obtenidas durante el desarrollo de la cromatografía, fueron evaluadas a través de un sistema de cromatografía de capa fina. Las cromatoplasmas se revelaron con una lámpara de luz UV (254 y 366nm), para así organizarlas de acuerdo a su patrón cromatográfico. Aquella(s) alícuotas

con un patrón cromatográfico similar se reunieron en fracciones (Wagner y Bladt, 1998; Stahl, 1969).

5.6 Evaluación *in vitro* de las fracciones.

Las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento del extracto crudo, se evaluaron *in vitro*, con el mismo procedimiento descrito anteriormente para los extractos crudos, con la excepción de las concentraciones usadas. En este caso se trabajaron 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L; para lo cual se realizaron diluciones decuples. A las fracciones que presentaron una eficacia mayor al 90%, se les realizó una reevaluación para confirmar resultados.

5.7 Análisis fitoquímico de las fracciones.

Aquella(s) fracción(es) que presentaron eficacias iguales o superiores al 90%, se les realizó un análisis fitoquímico cualitativo (reacción para alcaloides, antraquinonas, esteroides, flavonoides, glicósidos, lactonas sesquiterpénicas, saponinas y fenoles), para determinar el perfil fitoquímico general y poder señalar algunas de las familias de metabolitos secundarios presentes en la fracción y que son responsables del efecto fasciolicida (Shukla et al, 2013).

5.8 Purificación de la fracción.

La(s) fracción(es) seleccionadas, se purificaron preparando un sistema de cromatografía de columna abierta, utilizando distintas proporciones y mezclas de solventes de distinta polaridad (diclorometano, metanol y agua). A su vez, se llevó a cabo la misma evaluación del patrón cromatográfico de las mismas para agruparlas de acuerdo a su afinidad de compuestos.

5.9 Evaluación *in vitro* de las fracciones purificadas.

Las fracciones purificadas fueron evaluadas *in vitro* como sus antecesoras, en las concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L. Las fracciones purificadas que presentaron una eficacia mayor al 90%, se les realizó un reevaluación para confirmar resultados.

5.10 Análisis fitoquímico de las fracciones purificadas.

Aquella(s) fracción(es) purificada(s) que presentaron eficacias superiores al 90%, se les realizó un análisis fitoquímico cualitativo (reacción para alcaloides, glicósidos, lactonas sesquiterpénicas y fenoles), para determinar las familias de metabolitos secundarios presentes después de la purificación realizada con anterioridad.

5.11 Análisis de datos de los extractos, fracciones y fracciones purificadas.

Los datos obtenidos en las pruebas *in vitro* de la eficacia fasciolicida, se analizaron por medio de la prueba de Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 95% para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (Systat Software V12, 2008).

5.12 Prueba del índice de toxicidad.

Se utilizaron 20 ratones CD-1 (10 hembras y 10 machos) de 8 semanas de edad y con un peso entre los 25 y 30 gramos. Se formaron 5 grupos de ratones machos y 5 grupos de hembras, con 2 ratones por grupo, los cuales se asignaron como se muestra en el cuadro 2:

Cuadro 2. Diseño experimental de la Prueba de micronúcleos en sangre periférica en ratones CD-1, a diferentes concentraciones con el extracto hexánico de estafiate.

	GRUPOS	TRATAMIENTO	DOSIS
HEMBRAS	1	Control negativo	Sin tratamiento
	2	Control positivo*	60 mg/Kg
	3	Extracto estafiate	125 mg/L
	4		375 mg/L
	5		500 mg/L
MACHOS	1	Control negativo	Sin tratamiento
	2	Control positivo*	60 mg/Kg
	3	Extracto estafiate	125 mg/L
	4		375 mg/L
	5		500 mg/L

*Fármaco de referencia, Ifosfamida.

A partir de las 0 horas se efectuó la única administración del fármaco para el control positivo. De igual manera, a los grupos con extracto hexánico de estafiate se les administró la primera dosis, llevando a cabo el mismo procedimiento cada 24 horas hasta cumplir un máximo de tres dosis, la vía de administración fue intraperitoneal. Para este fin, se preparó una solución madre a una concentración de 700 mg de extracto en 20 mL de agua destilada, la cantidad de solución que se administró a los tres primeros grupos se obtuvo en base al peso de los ratones.

A partir del primer día se realizó el sangrado de los ratones de la vena caudal, cada 24 horas, durante 5 días continuos para la obtención de frotis (tres de cada ratón), los cuales fueron teñidos con hematoxilina/eosina por 10 minutos y posteriormente efectuar el conteo celular para obtener los índices de toxicidad y genotoxicidad. Para ello se contabilizaron las células presentes en la sangre periférica, células normocromáticas (CN), policromáticas (CP) y la presencia de

micronúcleos (MCN), mediante un microscopio óptico, se contaron un total de 2000 células por ratón por día.

Los porcentajes de toxicidad y genotoxicidad se obtuvieron de las siguientes fórmulas (Cottelle et al., 2012; Hayashi et al., 2000; Hamada et al., 2001; Krishna y Hayashi, 2000; Remigio et al., 2007; Wakata et al. 1998.):

$$\text{Toxicidad (\%)} = \frac{\text{No. de CP}}{\text{No. de CN}} \times 100$$

$$\text{Genotoxicidad (\%)} = \frac{\text{No. de MCN en CP}}{2000 \text{ (Cél. Tot.)}} \times 100$$

Todos los procedimientos de manejo realizados en los ratones se llevaron a cabo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

5.13 Análisis de datos de índices de toxicidad y genotoxicidad.

Para analizar los resultados de los índices de toxicidad y genotoxicidad, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple Dunnett ($P < 0.05$), para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos.

VI. RESULTADOS

En todos los experimentos realizados *in vitro* se incluyó un control positivo (Triclabendazol) el cual mostro un 100% de eficacia a partir de las 24 horas, en sus dos concentraciones (10 y 50 mg), razón por la cual no se ven reflejados en los cuadros de resultados.

Los resultados obtenidos de los porcentajes de eficacia *in vitro* de los extractos crudos de estafiate, con solventes de distinta polaridad, mostraron que a partir de las 24 horas postexposición, los extractos metanólico y de acetato de etilo tuvieron una eficacia del 100% en todas sus concentraciones, mientras que el extracto hexánico mostró el 100% de eficacia hasta las 72 horas postexposición ($P < 0.05$) (cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de eficacia *in vitro* de extractos de *A. ludoviciana*, con solventes de distinta polaridad y concentración.

TIEMPO (horas)	EXTRACTO/SOLVENTE	CONCENTRACION (mg/L)			
		125	250	375	500
24	Metanólico	100	100	100	100
	Acetato de etilo	100	100	100	100
	Hexánico	71 ± 0.072*	100	100	100
	Testigo	0	0	0	0
48	Metanólico	100	100	100	100
	Acetato de etilo	100	100	100	100
	Hexánico	83 ± 0.068*	100	100	100
	Testigo	0	0	0	0
72	Metanólico	100	100	100	100
	Acetato de etilo	100	100	100	100
	Hexánico	100	100	100	100
	Testigo	0	0	0	0

El extracto crudo de acetato de etilo se seleccionó para fraccionarse, debido a la actividad fasciolicida presentada y por su rendimiento total (96.90 gramos). Para este fin se preparó un sistema de cromatografía de columna abierta, con

el objetivo de separar y/o aislar los metabolitos secundarios responsables del efecto parasiticida.

Se obtuvieron 85 alícuotas, las cuales se agruparon en un total de 14 fracciones (A - N) de acuerdo a su patrón cromatográfico en capa fina (Fig. 3).

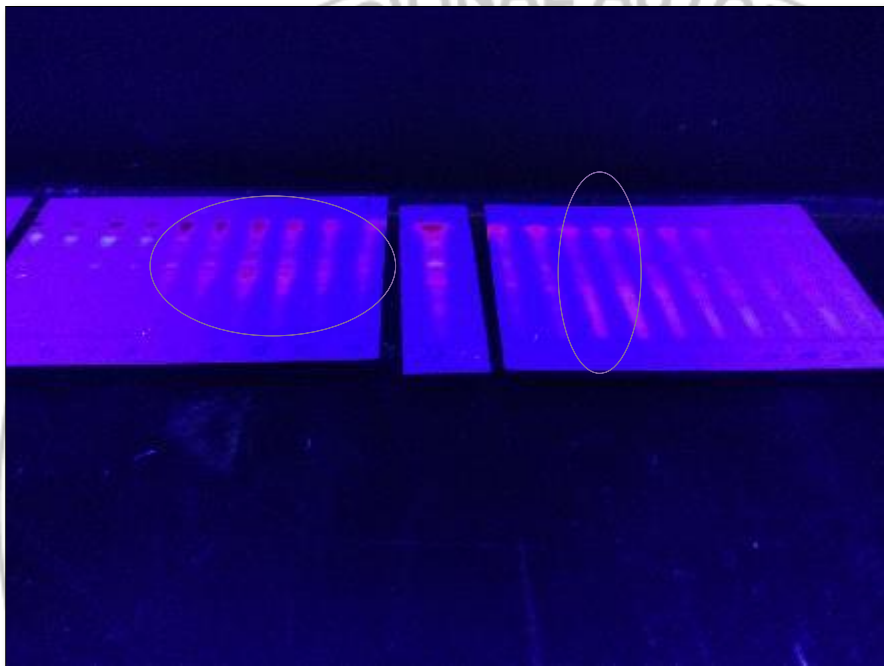


Fig. 3 Patrón cromatográfico de alícuotas obtenidas durante el proceso de fraccionamiento del extracto crudo de estafiate de acetato de etilo.

En los resultados de la evaluación de la actividad fasciolicida de las fracciones del extracto de acetato de etilo, se observa que las fracciones C y D obtuvieron el 100% de eficacia *in vitro* a las 48 horas postexposición en las cinco diferentes concentraciones, mientras que la fracción B obtuvo el 100% a las 72 horas ($P < 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de eficacia *in vitro* de fracciones de *A. ludoviciana*, obtenidas a partir de extracto crudo de acetato de etilo.

TIEMPO (horas)	FRACCIÓN	CONCENTRACIÓN (mg/L)				
		100	200	300	400	500
24	Testigo	0	0	0	0	0
	B	0	0	0	0	100
	C	92 ± 0.072*	100	100	100	100
	D	96 ± 0.072*	87.5 ± 0.125*	100	100	100
	E	0	0	0	62.5 ± 0.544*	100
	F	0	0	0	0	12.5 ± 0.216*
	G	0	4 ± 0.072*	8 ± 0.072*	33 ± 0.072*	42 ± 0.190*
	H - K	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	0	4 ± 0.072*
	M	0	0	0	29 ± 0.260*	29 ± 0.505*
48	Testigo	0	0	0	0	0
	B	21 ± 0.072*	100	100	100	100
	C	100	100	100	100	100
	D	100	100	100	100	100
	E	0	0	0	67 ± 0.473*	100
	F	0	0	0	4 ± 0.072*	50 ± 0.125*
	G	0	4 ± 0.072*	8 ± 0.072*	54 ± 0.401*	100
	H - K	0	0	0	0	0
	L	0	0	0	75	100
	M	0	0	4 ± 0.072*	46 ± 0.072*	58 ± 0.260*
72	Testigo	0	0	0	0	0
	B	100	100	100	100	100
	C	100	100	100	100	100
	D	100	100	100	100	100
	E	0	0	0	88 ± 0.216*	100
	F	0	4 ± 0.072*	8 ± 0.072*	67 ± 0.072*	100
	G	0	4 ± 0.072*	8 ± 0.072*	54 ± 0.401*	100
	H - K	0	0	0	0	0
	L	25 ± 0.125*	21 ± 0.072*	100	100	100
	M	0	0	13 ± 0.125*	92 ± 0.144*	92 ± 0.144*
N	0	0	0	0	0	

La fracción "A" no fue evaluada debido a que al ser la primera que se obtuvo en la cromatografía de columna, sólo se recuperaron ceras.

Al realizar el análisis estadístico de las fracciones evaluadas, se encontraron diferencias significativas entre estas ($P < 0.05$), la fracción "C" mostró ser la de mayor eficacia (Fig. 4).

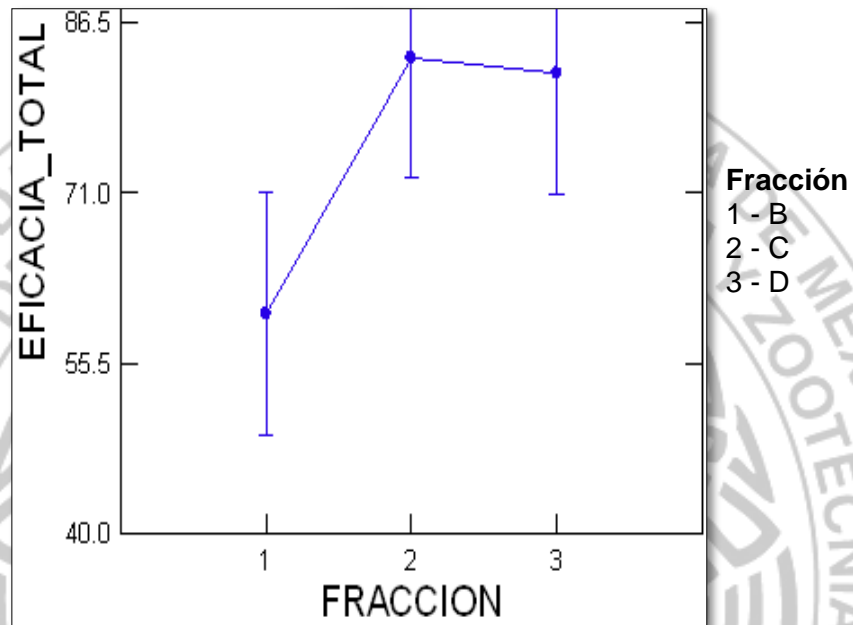


Figura 4. Comparación de la eficacia total *in vitro* de fracciones de *A. ludoviciana*, obtenidas a partir de extracto crudo de acetato de etilo ($P < 0.05$).

En cuanto al efecto de la concentración de las fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo, el grupo testigo difirió de todos los demás ($P < 0.05$), mientras que en resto de los grupos tratados no se registraron diferencias significativas. Sin embargo, en la concentración de 500mg/L se registraron los valores más altos de eficacia (Fig. 5).

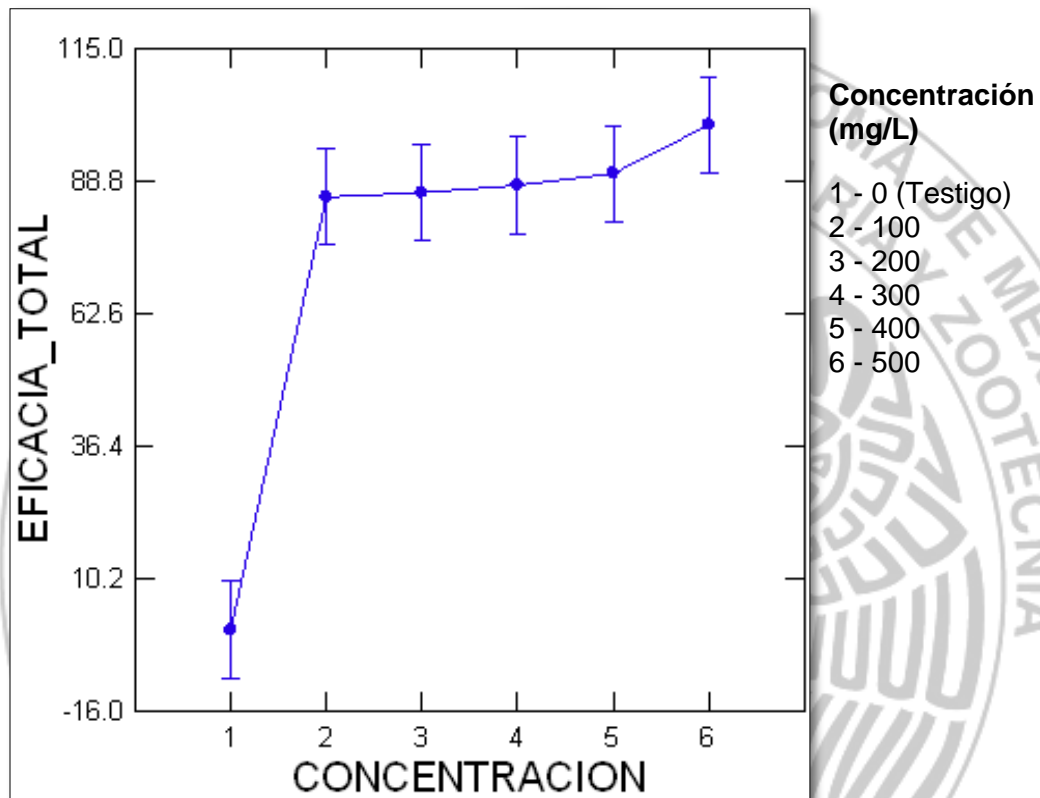


Figura 5. Comparación de la eficacia *in vitro* de las diferentes concentraciones de fracciones de *A. ludoviciana*, obtenidas a partir de extracto crudo de acetato de etilo.

Al analizar los intervalos de tiempo en la eficacia total de las fracciones, se observó que a las 48 horas se presenta un aumento considerable de la misma, aumentando ligeramente hasta las 72 horas ($P < 0.05$) (Fig. 6).

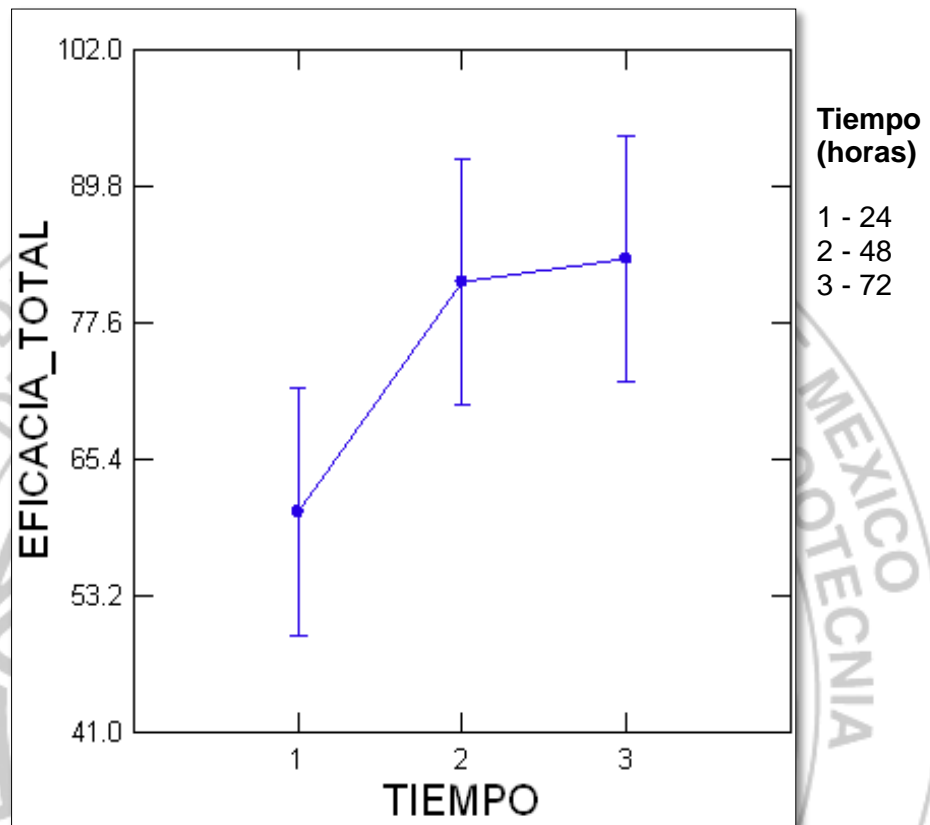


Figura 6. Comparación de la eficacia *in vitro* en los diferentes tiempos de las fracciones de *A. ludoviciana*, obtenidas a partir de extracto crudo de acetato de etilo ($P < 0.05$).

Para determinar los metabolitos secundarios que ocasionaban el efecto fasciolicida de la fracción “C”, se realizó un análisis fitoquímico (cuadro 5). En donde se encontraron alcaloides, glicósidos, glicósidos cardiogénicos, lactonas sesquiterpénicas y taninos.

Cuadro 5. Análisis fitoquímico de la fracción “C”, obtenida a partir de extracto crudo de acetato de etilo de *A. ludoviciana*.

PRUEBA	METABOLITO	RESULTADO
Dragendroff´s	Alcaloides	+
Cumarinas	Antraquinonas	-
Liebermann - Burchard	Esteroides	-
Acetato de plomo	Flavonoides	-
Molisch´s	Glicósidos	+
Keller Kiliani´s	Glicósidos Cardiogénicos	+
Baljet	Lactonas Sesquiterpénicas	+
Formación espuma	Saponinas	-
Cloruro férrico	Fenoles	+

Debido a la actividad fasciolicida que presentó la fracción “C” y al rendimiento obtenido (21.10 gramos), se seleccionó para llevar a cabo su purificación, realizando un segundo sistema de cromatografía de columna abierta, llevando a cabo los mismos criterios de evaluación y organización de acuerdo a su patrón cromatográfico. Se obtuvieron un total de 131 alícuotas, las cuales fueron organizadas en 12 fracciones purificadas (I a XII).

De igual manera que en las pruebas anteriores, éstas se evaluaron *in vitro* de acuerdo al procedimiento descrito con anterioridad. Las eficacias totales de las fracciones purificadas, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en cuanto a los testigos. Las fracciones VI, VII y X fueron las únicas que presentaron el 100% de eficacia fasciolicida desde las 24 horas postexposición en todas las concentraciones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de eficacia *in vitro* de fracciones purificadas de *A. ludoviciana*, obtenidas a partir de la fracción C del extracto crudo de acetato de etilo a las 24 horas post exposición.

TIEMPO (horas)	FRACCIÓN "C"	CONCENTRACIÓN (mg/L)				
		100	200	300	400	500
24	Testigo	0	0	0	0	0
	I	4 ± 0.072*	4 ± 0.072*	12 ± 0.125*	17 ± 0.072*	33 ± 0.072*
	II	4 ± 0.072*	12 ± 0.125*	12 ± 0.125*	37 ± 0.125*	67 ± 0.314*
	III	50 ± 0.125*	54 ± 0.144*	92 ± 0.144*	100	100
	IV	67 ± 0.190*	96 ± 0.072*	100	100	100
	V	96 ± 0.072*	100	100	100	100
	VI	100	100	100	100	100
	VII	100	100	100	100	100
	VIII	67 ± 0.381*	75 ± 0.25*	83 ± 0.288*	83 ± 0.144*	100
	IX	75 ± 0.216*	83 ± 0.19*	83 ± 0.144*	87 ± 0.125*	100
	X	100	100	100	100	100
	XI	17 ± 0.19*	42 ± 0.072*	62 ± 0.125*	71 ± 0.721*	100
XII	25 ± 0.125*	58 ± 0.36*	79 ± 0.072*	87 ± 0.125*	100	

Las fracciones IV, V, VIII y XI completaron el 100% de eficacia en todas las concentraciones a las 48 horas ($P < 0.05$) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de eficacia *in vitro* de fracciones purificadas de *A. ludoviciana*, obtenidas a partir de la fracción C del extracto crudo de acetato de etilo a las 48 horas post exposición.

TIEMPO (horas)	FRACCIÓN "C"	CONCENTRACION (mg/L)				
		100	200	300	400	500
48	Testigo	0	0	0	0	0
	I	$4 \pm 0.072^*$	$4 \pm 0.072^*$	$58 \pm 0.072^*$	$83 \pm 0.19^*$	$96 \pm 0.072^*$
	II	$83 \pm 0.19^*$	100	100	100	100
	III	$79 \pm 0.19^*$	$79 \pm 0.26^*$	$92 \pm 0.144^*$	100	100
	IV	100	100	100	100	100
	V	100	100	100	100	100
	VI	100	100	100	100	100
	VII	100	100	100	100	100
	VIII	100	100	100	100	100
	IX	$95 \pm 0.072^*$	$92 \pm 0.072^*$	100	100	100
	X	100	100	100	100	100
	XI	100	100	100	100	100
	XII	$92 \pm 0.144^*$	100	100	100	100

Finalmente, a las 72 horas, las fracciones II, III y XII completaron el 100% de eficacia en todas sus concentraciones. En todos los tiempos de evaluación, los testigos no presentaron ningún cambio ($P < 0.05$) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de eficacia *in vitro* de fracciones purificadas de *A. ludoviciana*, obtenidas a partir de la fracción C del extracto crudo de acetato de etilo a las 72 horas post exposición.

TIEMPO (horas)	FRACCIÓN "C"	CONCENTRACION (mg/L)				
		100	200	300	400	500
72	Testigo	0	0	0	0	0
	I	$4 \pm 0.072^*$	$4 \pm 0.072^*$	100	100	100
	II	100	100	100	100	100
	III	100	100	100	100	100
	IV	100	100	100	100	100
	V	100	100	100	100	100
	VI	100	100	100	100	100
	VII	100	100	100	100	100
	VIII	100	100	100	100	100
	IX	$95 \pm 0.072^*$	100	100	100	100
	X	100	100	100	100	100
	XI	100	100	100	100	100
	XII	100	100	100	100	100

En la siguiente figura, se muestra el análisis estadístico de las eficacias acumulativas de las fracciones purificadas, en la cual se observa que la fracción X fue ligeramente superior al resto ($P < 0.05$) (Fig. 7).

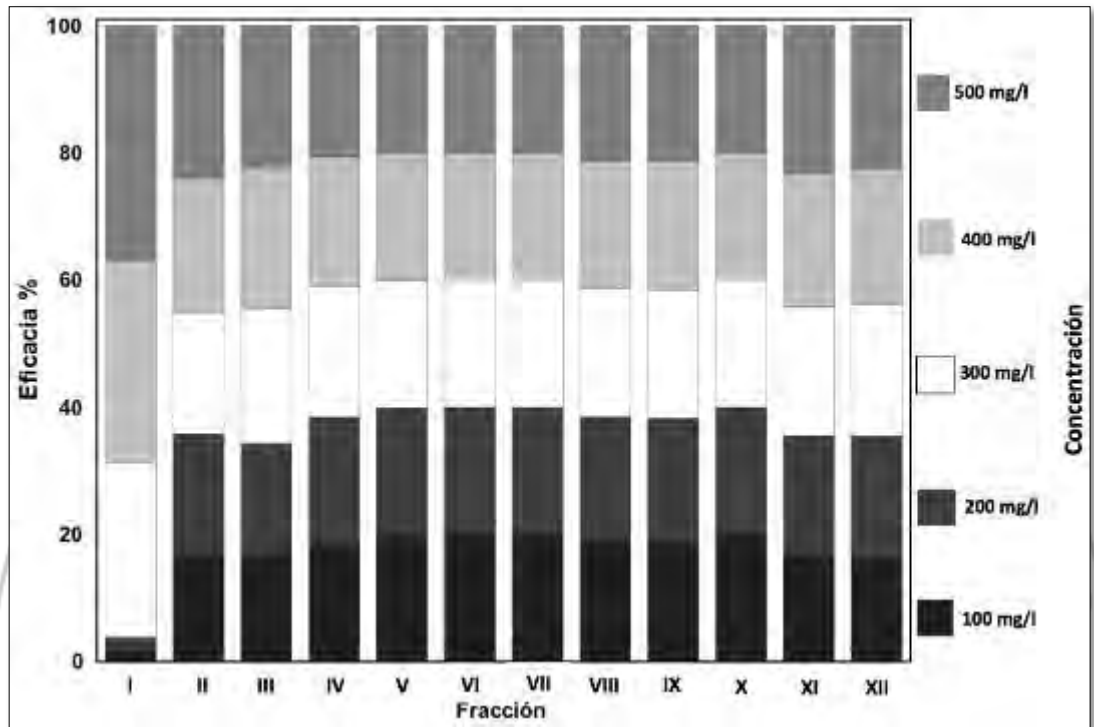


Figura 7. Eficacia fasciolicida *in vitro* por concentración *in vitro* de fracciones purificadas, a partir de la fracción "C", del extracto crudo de acetato de etilo.

1853

Al analizar la eficacia fasciolicida *in vitro* con respecto al tiempo de acción, se observó que las fracciones purificadas VI, VII y X tienen una eficacia del 100% desde las primeras 24 horas y los mayores incrementos se dieron a partir de las 48 horas post-tratamiento en el resto de las fracciones ($P < 0.05$) (Fig. 8).

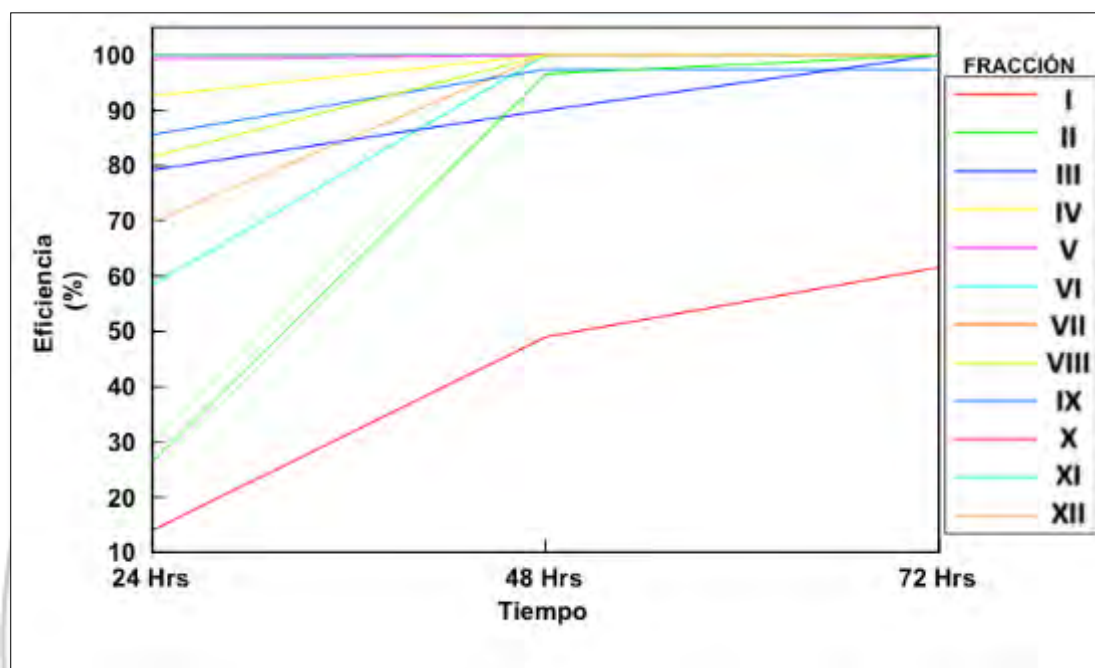


Figura 8. Eficacias *in vitro* con respecto al tiempo de acción de las fracciones purificadas, a partir de la fracción “C”, del extracto crudo de acetato de etilo.

Para determinar las familias de metabolitos secundarios persistentes tras el proceso de purificación, se realizó un segundo análisis fitoquímico de la fracción estadísticamente superior (X), en donde se encontraron alcaloides y lactonas sesquiterpénicas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis fitoquímico de la fracción “C” X, obtenida a partir de extracto crudo de acetato de etilo de *A. ludoviciana*.

PRUEBA	METABOLITO	RESULTADO
Dragendroff´s	Alcaloides	+
Molisch´s	Glicósidos	-
Keller Kiliani´s	Glicósidos Cardiogénicos	-
Baljet	Lactonas Sesquiterpénicas	+
Cloruro férrico	Fenoles	-

Concerniente a los resultados de los ensayos de toxicidad, se muestra en el siguiente cuadro que los valores promedios de los tratamientos no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre sí en relación al índice de toxicidad. Además de que ninguna concentración del extracto rebasa los porcentajes generados por el testigo positivo.

Cuadro 10. Porcentajes del índice de toxicidad del extracto hexánico de estafiate por grupo, de acuerdo a las horas de análisis.

GRUPOS HORAS	CONTROL*		EXTRACTO ESTAFIATE (mg/L)		
	Negativo	Positivo	125	375	500
0	12.86	12.53	12.58	13.45	12.56
24	8.48	16.43	12.31	13.84	14.91
48	9.84	17.55	6.48	7.01	7.24
72	8.95	16.33	7.24	7.56	6.08
96	10.32	16.87	9.31	10.25	7.48

*Negativo - s/Tx; Positivo - Ifosfamida, 60 mg/Kg.

En comparación con el control positivo, no se encontraron datos que indiquen que el extracto de estafiate sea tóxico, comparándolo con la ifosfamida en ratones ($P < 0.05$). El porcentaje de toxicidad analizado por horas, mostró que en el caso de las tres concentraciones del extracto de estafiate la mayor actividad tóxica se presentó a las 24 horas post-administración, reduciéndose este efecto a partir de las 48 horas (Fig. 10).

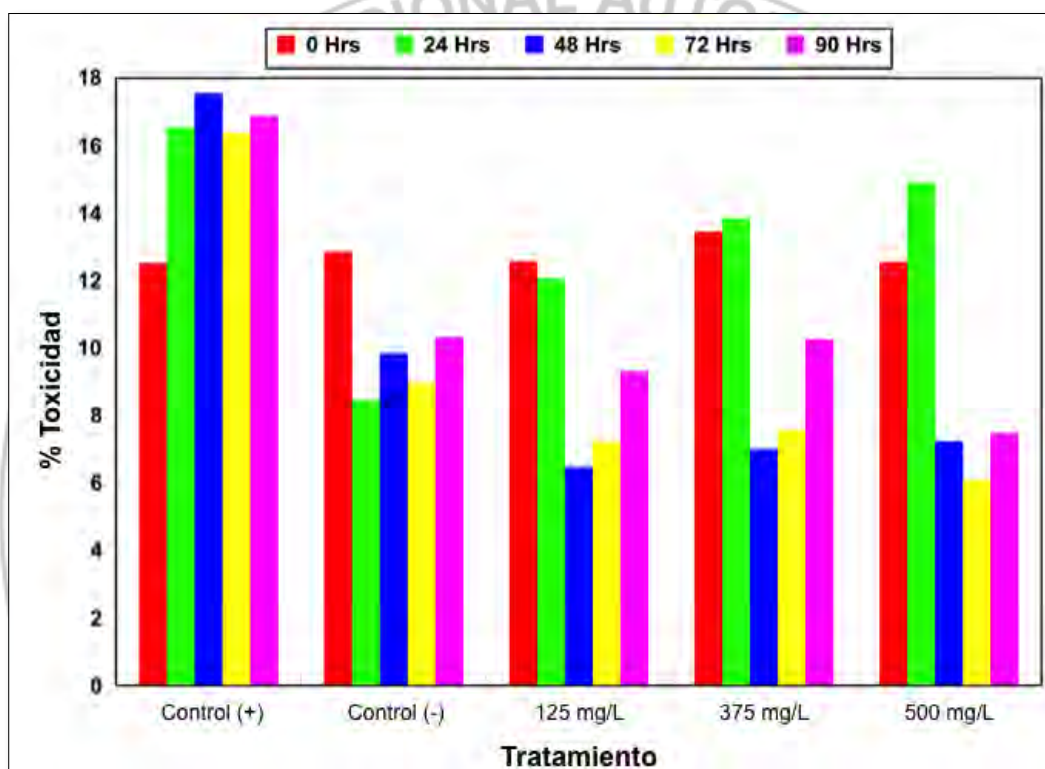


Figura 10. Porcentaje de toxicidad de los diferentes grupos postadministración.

El índice de genotoxicidad presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al de toxicidad. En todas las horas de evaluación, el porcentaje de genotoxicidad mantiene un valor constante desde las 24 hasta las 90 horas, permaneciendo por niveles muy por debajo del de toxicidad, como se aprecia en la siguiente figura.

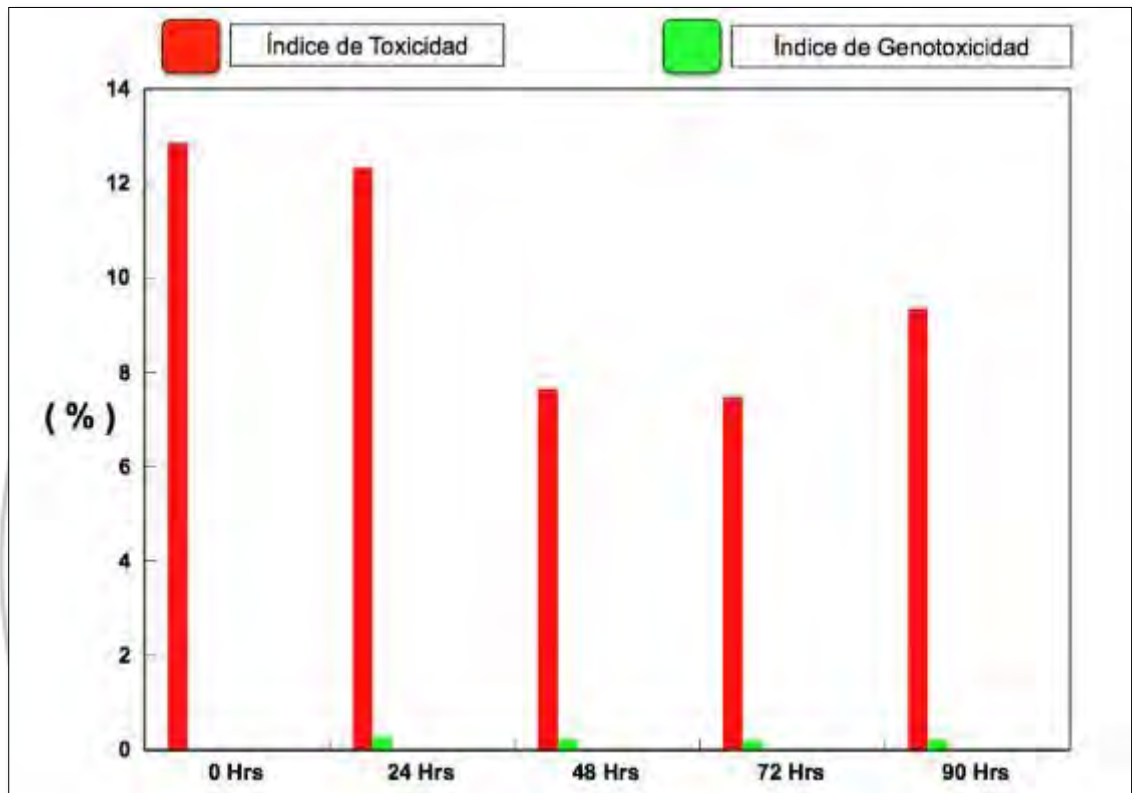


Figura 11. Índices de toxicidad y genotoxicidad de los diferentes grupos, por hora de aplicación

1853

En la figura 12 se muestra que no existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en el porcentaje de toxicidad de acuerdo al sexo, sin embargo, en la concentración de 125 mg/L se aprecia un mayor efecto en las hembras.

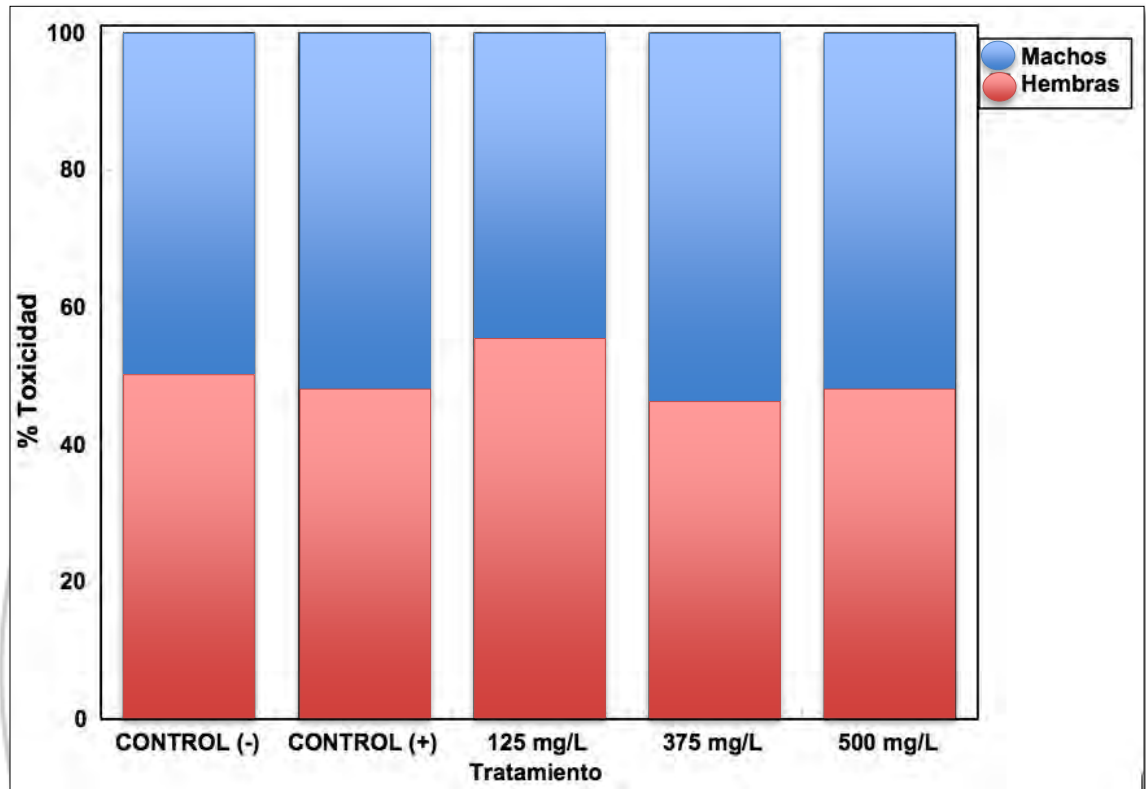


Figura 12. Porcentaje de toxicidad de los diferentes grupos tratados, de acuerdo al sexo.

Desde los primeros resultados de las pruebas *in vivo*, se observó un efecto que aparentemente produce daño sobre el tegumento de las fasciolas jóvenes, expuestas a los extractos de acetato de etilo (Fig. 13), metanólico (Fig. 14) y hexánico (Fig. 15), en comparación con los grupos testigos (Fig. 16), desde las primeras horas post-exposición.

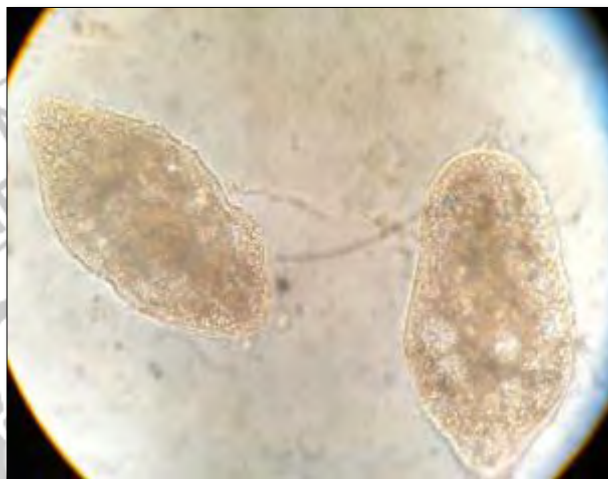


Figura 13. *Fasciola hepatica*, 24 horas post-tratamiento con extracto de acetato de etilo, a partir de hojas de estafiate.



Figura 14. *Fasciola hepatica*, 24 horas post-tratamiento con extracto metanólico, a partir de hojas de estafiate.

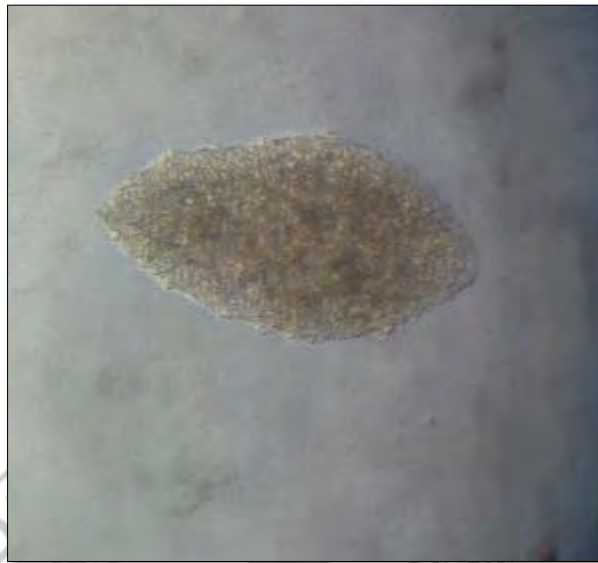


Figura 15. *Fasciola hepatica*, 72 horas post-tratamiento con extracto hexánico, a partir de hojas de estafiate.



Figura 16. *Fasciola hepatica*, 24 horas. Testigo negativo (s/Tx) *in vitro*.

Este efecto se mantenía aún después del fraccionamiento, como en el caso de la fracción C, obtenida a partir del extracto de acetato de etilo (Fig. 17).



Figura 17. *Fasciola hepatica*, 24 horas post-tratamiento con la fracción “C”, a partir del extracto de acetato de etilo.

A continuación, se muestran los rendimientos totales de los extractos crudos, fracciones y fracciones purificadas con eficacias fasciolicidas *in vitro* superiores al 90%. Inicialmente se tenía un aproximado de 5 Kg de materia seca obtenida de la colecta de las hojas, teniendo los siguientes rendimientos de cada uno de los extractos.

Cuadro 11. Rendimientos totales de los extractos crudos, obtenidos con solventes de distinta polaridad.

EXTRACTO CRUDO	RENDIMIENTO TOTAL (GRAMOS)
Metanólico	24.74
Acetato de etilo	96.90
Hexánico	16.59

De los 96.90 gramos del extracto de acetato de etilo, se obtuvieron los siguientes rendimientos tras el fraccionamiento.

Cuadro 12. Rendimientos totales de fracciones con eficacia fasciolicida superior al 90%, obtenida a partir de extracto crudo de acetato de etilo.

FRACCIÓN	RENDIMIENTO TOTAL (GRAMOS)
B	8.35
C	21.10
D	13.62

De los 21.10 gramos obtenidos de la fracción "C", se obtuvieron los siguientes rendimientos de las fracciones purificadas con mayor eficacia *in vitro*.

Cuadro 13. Rendimientos totales de fracciones purificadas con eficacia fasciolicida superior al 90%.

FRACCIÓN PURIFICADA (C)	RENDIMIENTO TOTAL (GRAMOS)
VI	7.16
VII	4.47
X	6.80

VII. DISCUSIÓN

El uso de plantas medicinales con fines terapéuticos dentro de la medicina veterinaria se ha convertido en una alternativa para el tratamiento y prevención de enfermedades, sin embargo, aún es un campo que requiere más investigaciones para demostrar su verdadero potencial, inocuidad y viabilidad para su uso rutinario en animales ya sea de compañía y/o de producción.

Dentro de este estudio se demostró que los extractos crudos de acetato de etilo, metanol y hexano obtenidos a partir de estafiate (*A. ludoviciana*), presentan una eficacia fasciolicida *in vitro* del 100% a partir de las 24 horas post-exposición para los dos primero y a las 72 horas para el último. Esto indica que la planta en general produce metabolitos secundarios que provocan este efecto.

Al realizar análisis fitoquímicos a las fracciones obtenidas a partir del extracto de acetato de etilo, con mayor eficacia fasciolicida, los resultados de las pruebas indican que las posibles familias de metabolitos secundarios implicadas en el efecto parasiticida son alcaloides y lactonas sesquiterpénicas. Es importante recalcar que se requieren pruebas específicas para la identificación exacta de estos.

Los alcaloides son compuestos con una alta actividad biológica y tienen una distribución limitada en la naturaleza, ya que ciertos grupos de ellos sólo se encuentran en ciertas familias de plantas. Se menciona que los alcaloides contenidos en los extractos crudos presentan una mejor actividad que los alcaloides aislados (Yarnell, 2007). En estudios previos, se ha observado que los alcaloides pueden tener una actividad fasciolicida *in vitro* superior al 90%, al demostrar que extractos y fracciones realizadas a partir de hojas de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) presentan una acción presumiblemente sobre el tegumento de *F. hepatica* (Álvarez, 2016), atribuido a que ciertos alcaloides

presentes en esta planta afectan la permeabilidad de las membranas y la síntesis proteica (Schmeller *et al.*, 1997).

Las lactonas sesquiterpénicas son una subclase de sesquiterpenoides con un bajo peso molecular, los cuales han demostrado una eficacia antineoplásica y antimalaria, siendo la Artemisina la más importante dentro de este rubro (Yarnell, 2007). La artemisina es un metabolito constante dentro de la familia *Artemisia spp* y a través de los años se ha utilizado para combatir al parásito *Plasmodium falciparum*, agente etiológico de la malaria. El mecanismo de acción de este metabolito se debe a que cuenta con un puente peróxido, el cual reduce el hierro del grupo hemo en la sangre generado por la degradación de la hemoglobina por parte del parásito, lo cual provoca una serie de radicales libres que lo afectan directamente y ocasionan su muerte; además se menciona que provoca una interferencia con el retículo endoplásmico del parásito y sus funciones mitocondriales (Ferreira *et al.*, 2011; Keiser y Utzinger, 2007).

Dentro de los últimos años se han realizado investigaciones en contra de trematodos utilizando derivados semisintéticos de la artemisina, el artesunato y el artemeter demostraron disminuir la carga de fasciolas jóvenes en ratones infectados en un 46% y un 82%, respectivamente, con una dosis vía oral de 200 mg/Kg (Keiser y Utzinger, 2007). El artesunato y el artemeter han demostrado generar un daño sobre el saco vitelino de fasciolas recuperadas de ratas infectadas artificialmente y dosificadas vía oral con estos derivados, además el artemeter generó una disminución en la producción de huevos dentro del mismo estudio, estos efectos se deben a la producción de radicales libres que dañan el potencial de la membrana mitocondrial inhibiendo la fosforilación oxidativa (O'Neill *et al.*, 2015).

En un estudio realizado con formas adultas de *Fasciola gigantica*, recuperadas de conductos biliares de búfalos, el artemeter demostró causar un daño directo al tegumento del parásito utilizando concentraciones de 10, 20 y 30 µg/ml a

partir de las 24 horas post-exposición, sugiriendo que el daño es ocasionado por la presencia del puente de peróxido en este derivado (Shalaby *et al.*, 2009).

En otro estudio con formas adultas de *F. hepatica* resistentes al triclabendazol, recuperadas de conductos biliares de ratones machos previamente infectados, el artemeter administrado a una dosis de 200 mg/Kg vía oral, demostró daños progresivos en estructuras internas y en menor medida en el tegumento de las mismas, principalmente a las 72 horas post-tratamiento, sugiriendo que la droga en cuestión genera estos daños al ser consumida por el parásito (O'Neill *et al.*, 2009).

Lo anterior, puede explicar el efecto observado por los extractos y fracciones obtenidas a partir de hojas de estafiate dentro de este estudio, un daño probable sobre el tegumento de fasciolas jóvenes (Figs. 13 a 17), siendo este un órgano de suma importancia para la sobrevivencia del mismo debido a las funciones de osmoregulación, percepción sensorial, inmunoprotección, entre otras. Sin embargo, aún se necesita indagar más al respecto y llevar a cabo estudios de microscopía para corroborar o rechazar esta teoría y evaluar el verdadero potencial de estas familias de metabolitos secundarios en contra de este parásito.

En cuanto a la prueba de MN realizada dentro de este estudio, no se encontraron datos que indiquen que el extracto de estafiate presenta algún tipo de toxicidad o de genotoxicidad sobre eritrocitos de sangre periférica de ratones CD-1. En una investigación anterior, se demostró que el extracto de Estafiate (*Artemisia mexicana*) no tuvo ningún tipo de toxicidad en tejido hepático o renal de ratones CD-1 (Ibarra *et al.*, 2012^b).

VII. CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos y de acetato de etilo de Estafiate (*A. ludoviciana*), presentan una eficacia promisorio *in vitro* contra fasciolas recién desenquistadas. Las fracciones obtenidas y purificadas a partir del extracto crudo de acetato de etilo demuestran la presencia de alcaloides y lactonas sesquiterpénicas, como los posibles metabolitos secundarios con efecto fasciolicida.

En el estudio de toxicidad y genotoxicidad por prueba de MN realizado en ratones CD-1, se demostró una inocuidad previa para considerar a esta planta como una opción viable para el control de *F. hepatica*. Es importante recalcar que se requieren estudios de toxicidad aguda y crónica complementarios, para determinar la verdadera inocuidad de la planta y su efecto terapéutico.

Aún se requieren estudios complementarios para la identificación exacta del metabolito(s) secundario(s) inmiscuidos en este efecto, además se requiere una evaluación en rumiantes para la identificación de dosis efectivas y demostrar su potencial real en contra de esta importante parasitosis.

LITERATURA CITADA

1. Aguilar C. A., Camacho J. R., Chino S., Jacquez P., López M. E. 1994. Plantas Medicinales del Herbario del IMSS; Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. IMSS Editorial. México, D.F.
2. Almazán C., Ávila G., Quiroz H., Ibarra F., Ochoa P. 2001. Effect of parasite burden in the detection of *Fasciola hepatica* antigens in serum and feces of experimentally infected sheep. *Veterinary Parasitology*; 91:101-112.
3. Alonso D. M. A., Torres A. J. F. J., Sandoval C. C. A., Capetillo L. C., Brunet S., Hoste H. 2008. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology*; 153 (1-2):187- 192.^a
4. Alonso D. M.A., Torres A. J. F. J., Sandoval C. C. A., Aguilar C. A. J., Hoste H. 2008. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*; 153 (3-4):313-319.^b
5. Álvarez J. M. 2016. Determinación de metabolitos secundarios de gordolobo (*Bocconia frutescens*) con actividad fasciolicida y su evaluación biológica *in vitro* (Tesis de Maestría). Ciudad de México, México. UNAM.
6. Álvarez J. M., Ibarra F., Alonso M. A., Vera Y., Ávila J. G., García A. M. 2015. In vitro antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. *BMC Veterinary Research*; 11:45.
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. Bowman D. D. 2004. Parasitología para veterinarios. 8ª Ed. Elsevier. España.
9. Biblioteca digital de la medicina tradicional (BDMTM). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (APMTM). Estafiate 2009. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En línea:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Artemisia%20ludoviciana&id=7823>

10. Cameán A., Repetto M. 2006. Toxicología alimentaria. Ediciones Díaz de Santos. España. P. 77-94.
11. Cano A. L. M. 1997. Flora medicinal de Veracruz; I. Inventario Etnobotánico. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México.
12. Ceballos L., Moreno L., Alvarez L., Shaw L., Fairweather I., Lanusse C. 2010. Unchanged triclabendazole kinetics after co-administration with ivermectin and methimazole: failure of its therapeutic activity against triclabendazole-resistant liver fluke. *Veterinary Res*; 6:1-8.
13. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Ficha Informativa, *Artemisia ludoviciana* Nutt. 2009. En línea:
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.html>
14. Córdoba D. 2006. Toxicología. Manual Moderno, 5ª Edición. Bogotá. P. 105-109.
15. Cotellet S., Testolin R. C., Foltete A. S., Rissardi G. B., Silveira R. A. y Radetski C. M. 2012. Genotoxicity potential of a new natural formicide. *Environmental Science and Pollution Research*; 19:628-635.
16. Dargie J. D. 1987. The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *International Journal of Parasitology*; 17:453-463.
17. Evans S., Hoffman R. 2012. Plantas de los dioses. Orígenes y uso de los alucinógenos. 2ª Ed. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
18. Fernández V., Estein S., Ortiz P., Luchessi P., Solano V., Solana H. A. 2015. A single amino acid substitution in isozyme GSTmu in Triclabendazole resistant *Fasciola hepatica* (sligo strain) can substantially influence the manifestation of anthelmintic resistance. *Experimental parasitology* 159:274-279.
19. Ferreira J. F. S., Peadar P., Keiser J. 2011. In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina*

- triloba*, and *Fumaria officinalis*. Trematocidal plant alcoholic extracts. *Parasitology Research*; 109:1585-1592.
20. Francisco G. 2015. Actividad fasciolicida *in vitro* de extractos de plantas provenientes de Amixtlán, Puebla (Tesis de licenciatura). Ciudad de México. UNAM.
21. Gemedede 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.
22. Harnborne J. B. 1970. Phytochemical phylogeny; proceedings of the Phytochemical Society Symposium. London Academic. London.
23. Hayashi M., Hamada S., Sizuyo M., Takeshi W., Akihiro A., Shougo H., Satoko O., Shigenari K., Koji K., Madoka S., Hiroyasu O., Koji K., Yasushi A., Norihide S., Sei-ichi T., Hironobu Y., Nobuhiro R., Marshall C., Moore D., Blakey L., Schechtman J., Weaver D., Torous R., Proflock S., Itto C., Namiki Y. 2001. Evaluation of the Rodent Micronucleus Assay by a 28-Day Treatment Protocol: Summary of the 13th Collaborative Study by The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) /Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 37:93-110.
24. Hayashi M. J. T., Mac Gregor J. T., Gatehouse G. D., Adler I. D., Blakey D. H., Dertinger S. D., Krishna G., Morita T., Russo A. y Sutou S. 2000. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*; 35(3): 234-252.
25. Hossain E., Chandra G., Nandy A.P., Mandal S.C., Gupta J.K. 2012. Anthelmintic effect of a metanol extract of leaves of *Dregea volubilis* on *Paramphistomum explanatum*. *Parasitology Research*; 110:809-814.
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. Ibarra, O. F. y Jenkins, D. C. 1984. An in vitro screen for new fasciolicidal agents. *Zeitschrift für Parasitenkunde*; 70:655-661.
28. Ibarra M. S., Ibarra V. F., Ávila A. J. G. 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 of Plant Sci*; 3:506-511^a.
29. Ibarra M. S., Ibarra V. F., Ávila A. J. G. 2012. Obtaining the minimum lethal dose against *Fasciola hepatica* in vitro using plant extract hexanes with fasciolicide activity and toxicity evaluation on CD1 male mice. *Am J Plant Sci*.; 3:899-903^b.
30. Kaplan R. M., Vidyashankar A. N. 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*; 186:70-78.
31. Keiser J., Utzinger J. 2007. Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. *Trends in Parasitology*. 23(11):555-562.
32. Krishna G. y Hayashi M. 2000. In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*; 455:155-166.
33. Moll L., Gaasenbeek C.P.H., Vellema P., Borgsteede F.H.M. 2000. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*; 91:153-158.
34. Monroy O. C. y Castillo, E. P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. CONABIO. México.
35. Olaechea F., Lovera V., Larroza M., Raffo F., Cabrera R. 2011. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary Parasitology*; 178:364–366.
36. O'Neill J. F., Johnston R. C., Halferty L., Hanna R. E. B., Brennan G. P., Fairweather I. 2015. A comparative study on the impact of two artemisinin derivatives, artemether and artesunate, on the female reproductive system of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*; 211:182-194.

37. O'Neill J. F., Johnston R. C., Halferty L., Brennan G. P., Keiser J., Fairweather I. 2009. Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: morphological changes in the tegument and gut following *in vivo* treatment with artemether in the rat model. *Journal of Helminthology*; 83:151-163.
38. Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2003. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Organización para la Alimentación y la Agricultura; 157:35-37.
39. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. 81 pp.
En línea: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4930s/s4930s.pdf>.
40. Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO). 2007. Report of the WHO. Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. WHO Headquarters, Geneva, Switzerland. October, 2006. 33 pp.
En línea: http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/WHO_CDS_NTD_PCT_2007.1.pdf.
41. Organización Panamericana de la Salud (PAHO). 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización panamericana de la salud; 580:132-141.
42. Ortiz P., Scarcella S., Cerna C., Rosales C., Cabrera M., Guzmán M., Lamenza P., Solana H. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Cajamarca (Perú): a clinical trial and an *in vitro* efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*; 195:118-121.
43. Piedrafita D., Sphithill T. W., Smith R. E., Raadsma H. W. 2010. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. *Parasitology Immunol*; 572-581.
44. Quiroz R. H. 2003. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa. México D.F. p. 232-239.

45. 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. P. 334-355.
46. Remigio M.A.C., Ferrer J. P., Hurtado Y. V., Ferrala C. R. y Carballo C. 2007. Evaluación genotóxica del extracto hidroalcohólico de *Tamarindus indica* L. empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. Revista Cubana de Plantas Medicinales; 12(2).
47. Rodríguez, A.M.; Coombes, A.J. y Jimenez, R.J. 2009. Plantas silvestres de Puebla herbario y jardín botánico BUAP. México: Herbario BUAP.
48. Rojo V. F. A., Meana A., Valcárcel F., Martínez V. M. 2012. Update on trematode infections in sheep. Veterinary Parasitology; 189:15-38.
49. Rzedowsky G. C., Rzedowsky J. 1997. Compositae: Tribu *Anthemideae*. Flora del bajo y regiones adyacentes: Instituto de Ecología Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. Fascículo 60.
50. 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.
51. Shalaby H. A., El Namaky A. H., Kamel R. O. A. 2009. *In vitro* effect of artemether and triclabendazole on adult *Fasciola gigantica*. Veterinary Parasitology; 160:76-82.
52. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria (SENASICA). 1999. Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. [En línea]. Diario Oficial de la Federación. México.
En línea: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=743>
53. Shayne C. G. 2007. Animal models in toxicology. 2ª Ed. Taylor & Francis Group. USA. P. 48-71.

54. Shukla S., Mehta A., y Bajpai V. K. 2013. Phytochemical screening and anthelmintic and antifungal activities of leaf extracts of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 3:1, 56-63.
55. Soulsby E. J. L. 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Editorial Interamericana. México.
56. Stahl E. 1969. *Thin layer chromatography: A laboratory handbook*. Berlin: Springer.
57. Stuart J. A. 1999. The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: *Fasciolosis*. Ed. Dalton J. P. (1999). CAB International. United Kingdom. Pag. 1-29.
58. Systat Software, Inc. 2008. Systat (Computer program) versión 12(32-bits) EUA. <http://www.systat.com>.
59. Torgerson P., Claxton J. 1999. Epidemiology and control. En: *Fasciolosis*. Ed. Dalton J. P. (1999). CAB International. United Kingdom. Pag. 113-149.
60. Vera M. Y. 2005. Evaluación biológica y toxicológica de un fasciolicida experimental en bovinos. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.
61. Vera M. Y., Ibarra V. F., Ramirez A. G., Munguía X. I. 2008. In vitro fasciolicide activity of some plant extracts against newly excysted flukes. *Ann. N.Y. Acad. Sci*; 1149:180-182.
62. Vera M.Y. 2011. Fasciolosis. En: *Parasitología Veterinaria, Vol II. Helmintos*. Eds: Ibarra V. F.; Figueroa C.J.A. y Quiroz R.H. 1ª. Edición. Ed. Color. México, D.F.
63. Wagner H., Bladt S. 1998. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer. Alemania.
64. Wakata A., Miyamae Y., Sato S., Suzuki T., Morita T., Asano N., Awogi T., Kondo K. y Hayashi M. 1998. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. *Environmental and Molecular Mutagenesis*; 32: 84–100.

65. Wink M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor. Appl. Genet.* 75: 225-233.
66. Wood I. B., Amaral N. K., Bairden K., Duncan J. L., Kassai T., Malone J. B. Jr., Pankavic J. A., Reinecke R. K., Slocombe O., Taylor S. M., 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, caprine). *Veterinary Parasitology*; 58:181-213.
67. 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.
68. Zahir A.A., Rahuman A.A., Bagavan A., Geetha K., Kamaraj C., Elango G. 2012. Evaluation of medicinal plant extracts and isolated compound epicatechin from *Ricinus communis* against *Paramphistomum cervi*. *Parasitology Research*; 111:1629-1635.