



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Efecto antihelmíntico del extracto etanólico de *Artemisia cina* sobre  
*Haemonchus contortus***

**TESIS**

Que para optar por el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

Presenta:

**ROSA ISABEL HIGUERA PIEDRAHITA**

Tutora principal:

Dra. María Eugenia López Arellano

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Comité Tutoral:

Dra. Raquel López Arellano

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Dr. Pedro Mendoza De Gives

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Cuautitlán Izcalli, Estado de México agosto 2020



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.

---

## Agradecimientos

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) quien apoyó el experimento mediante la beca de manutención No. 556932.

Al proyecto PAPIIT IN226217: “Efecto antihelmíntico del extracto etanólico de *Artemisia cina*, semilla de papaya (*Carica papaya*) y taninos condensados sobre *Haemonchus contortus*”, que financió y apoyo esta investigación.

A la Dra. María Eugenia López Arellano, directora de este proyecto y apoyo constante para obtener los resultados. Ha sido la guía para crecer como persona, como investigadora y sin duda un ejemplo a seguir.

Al Dr. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz quien ha apoyado este trabajo desde el inicio y ha sido un mentor en todos los aspectos desde que comenzó la aventura en México.

A los doctores que han apoyado este trabajo desde los distintos puntos de vista académico no sólo con conocimiento sino con equipo y material:

Dra. Raquel López Arellano: Siempre su laboratorio ha sido de puertas abiertas y gracias a su apoyo se han conseguido buenos logros. Gracias por el apoyo académico y personal.

Dra. Brígida del Carmen Camacho Enríquez quien con su conocimiento y capacidad iniciamos la extracción de las fracciones para evaluar.

Dr. Pedro Mendoza de Gives quien siempre ha estado en total disposición para evaluar y mejorar el proyecto de forma que su resultado sea lo mejor posible, gracias por los conocimientos dados.

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez y Dr. Manasés González quienes con su incondicional apoyo han nutrido y mejorado este trabajo para la dilucidación de los compuestos responsables del efecto antihelmíntico.

Dr. Ever Ble ya que con su apoyo se obtuvieron los experimentos de resonancia magnética para identificar los metabolitos responsables de la actividad antihelmíntica.

Dra. Mariana Dolores Hernández quien apoyó este trabajo con su conocimiento químico y los espectros de masas para identificar el compuesto.

Dra. Liliana Aguilar Marcelino quien con su conocimiento encaminó este proyecto y apoyó en la consecución de la colonia de jerbos para realizar los experimentos.

Dr. Agustín Olmedo Juárez por su apoyo en la parte estadística.

A los jurados del examen de candidatura ya que sus valiosas observaciones que enriquecieron este trabajo: Dra. Raquel López Arellano, Dra. Yazmín Alcalá Cantó, Dra. Guadalupe Prado Ochoa, Dr. Agustín Olmedo Juárez, Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez.

A los jurados quienes enriquecieron este trabajo con sus observaciones para su examinación: Dra. María Eugenia López Arellano, Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez, Dra. Raquel López Arellano, Dr. Jorge Tórtora Pérez, Dra. Yazmín Alcalá Canto.

---

## Dedicatorias

---

A mi querida familia, porque sin su apoyo no habría llegado lejos, gracias por dejar extender mis alas.

A la razón de seguir adelante: baby eres mi mayor orgullo

Héctor: eres lo mejor que me ha sucedido

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| Índice de abreviaturas  | 12 |
| Resumen   | 14 |
| Abstract  | 16 |
| CAPÍTULO I  | 18 |
| 1    Introducción   | 18 |
| 1.1    Generalidades de <i>Haemonchus contortus</i>                                   | 18 |
| 1.2    Patogénesis de la infección por <i>Haemonchus contortus</i>                    | 22 |
| 1.3    Mecanismo de respuesta no específica ante la infección por <i>H. contortus</i> | 24 |
| 1.4    Evasión de <i>Haemonchus</i> spp. al sistema inmunológico del hospedador       | 25 |
| 1.5    Estrategias de control de <i>Haemonchus contortus</i>                          | 25 |
| 1.5.1    Quimioterapia  | 26 |
| 1.5.2    Nuevas alternativas para el control integrado                                | 28 |
| 1.6    El género <i>Artemisia</i>   | 33 |
| 1.7    Fitoquímica de <i>Artemisia</i> spp.   | 35 |
| 1.8    Sesquiterpenos   | 36 |
| 1.9    Flavonoides  | 37 |
| 1.10    Cumarinas   | 38 |
| 1.11    Aceites esenciales  | 39 |
| 1.12    Lignanos  | 40 |
| 1.13    Otros compuestos  | 41 |
| 1.14    Artemisinina  | 41 |
| 1.15 <i>Artemisia cina</i>  | 43 |
| CAPÍTULO II   | 47 |
| 2    Justificación  | 47 |
| CAPÍTULO III  | 49 |
| 3    Hipótesis  | 49 |
| CAPÍTULO IV   | 50 |
| 4    Objetivo.  | 50 |
| 4.1    Objetivos específicos:   | 50 |
| CAPÍTULO V  | 51 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5     | Resultados obtenidos de esta investigación   | 51 |
|       | CAPÍTULO VI  | 52 |
| 6     | Actividad letal de las fracciones hexánica, acetato de etilo y metanólica de <i>A. cina</i> sobre huevos y larvas infectante de <i>H. contortus in vitro</i> | 52 |
| 6.1   | Resumen  | 52 |
| 6.2   | Materiales y métodos   | 53 |
| 6.2.1 | Ubicación  | 53 |
| 6.2.2 | Diseño experimental  | 53 |
| 6.3   | Resultados   | 56 |
| 6.3.1 | Rendimiento de los extractos de <i>A. cina</i>   | 56 |
| 6.3.2 | Análisis fitoquímico de <i>A. cina</i>   | 57 |
| 6.3.3 | Ensayos <i>in vitro</i>  | 57 |
| 6.4   | Discusión  | 59 |
| 6.5   | Conclusión   | 61 |
|       | CAPÍTULO VII   | 62 |
| 7     | Metabolitos responsables de la actividad antihelmíntica de la fracción hexánica de <i>A. cina</i> mediante ensayos biodirigidos                              | 62 |
| 7.1   | Resumen  | 62 |
| 7.2   | Materiales y métodos   | 63 |
| 7.2.1 | Ubicación  | 63 |
| 7.3   | Diseño experimental  | 63 |
| 7.3.1 | Obtención de la fracción hexánica de <i>Artemisia cina</i>   | 63 |
| 7.3.2 | Separación de la fracción hexánica por medio de cromatografía al vacío en columna- Columna 1   | 64 |
| 7.3.3 | Evaluación de las reuniones obtenidas de la columna 1  | 64 |
| 7.3.4 | Obtención de material biológico (L <sub>3</sub> ) de <i>H. contortus</i>   | 64 |
| 7.3.5 | Separación de las reuniones efectivas- Columna 2   | 64 |
| 7.3.6 | Identificación de los metabolitos con actividad antihelmíntica   | 65 |
| 7.4   | Análisis de resultados   | 65 |
| 7.5   | Resultados   | 66 |
| 7.5.1 | Evaluación de las reuniones obtenidas a partir de la Columna 1   | 66 |
| 7.5.2 | Evaluación <i>in vitro</i> de la reunión C1F76-89 sobre L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i>  | 68 |

|               |   |     |
|---------------|---|-----|
| 7.5.3         | Identificación de los metabolitos con actividad antihelmíntica sobre <i>H. contortus</i>                                | 71  |
| 7.6           | Discusión   | 86  |
| 7.7           | Conclusión  | 89  |
| CAPÍTULO VIII |   | 90  |
| 8             | Experimento 4: Evaluar la fracción más activa de <i>A. cina</i> en cabras con infección natural de <i>H. contortus</i>  | 90  |
| 8.1           | Resumen   | 90  |
| 8.2           | Materiales y métodos  | 91  |
| 8.2.1         | Ubicación   | 91  |
| 8.2.2         | Cabras  | 91  |
| 8.2.3         | Diseño experimental   | 91  |
| 8.2.4         | Análisis estadístico  | 92  |
| 8.3           | Resultados  | 92  |
| 8.4           | Discusión   | 95  |
| 8.5           | Conclusión  | 97  |
| CAPÍTULO IX   |   | 98  |
| 9             | Artículo científico enviado a la revista Acta Parasitológica  | 98  |
| CAPÍTULO X    |   | 119 |
| 10            | Artículo publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias   | 119 |
| CAPÍTULO XI   |   | 132 |
| 11            | Discusión general   | 132 |
| 12            | Perspectivas  | 133 |
| CAPÍTULO XII  |   | 134 |
| 13            | Conclusiones  | 134 |
| CAPÍTULO XIV  |   | 135 |
| 14            | Referencias   | 135 |
| ANEXO I       |   | 153 |
| 15            | Cromatografía en capa fina  | 153 |
| ANEXO II      |   | 155 |
| 16            | Separación de compuestos de la fracción hexánica de <i>A. cina</i> a través de cromatografía líquida de alta resolución | 155 |



|   |     |
|---|-----|
| ANEXO III   | 156 |
| 17 . Cromatografía de la columna 1  | 156 |
| ANEXO IV  | 157 |
| 18 Técnica de Corticelli-Lai (1963)   | 157 |
| ANEXO V   | 158 |
| 19 Fracciones colectadas a partir de la columna 2   | 158 |
| 20 Datos espectrales de <sup>1</sup> H-NMR (600 MHz) y <sup>13</sup> C-NMR (150 MHz) de los compuestos 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacina y norisoguaiacina. | 159 |
| ANEXO VII   | 161 |
| 21 Identificación de <i>Artemisia cina</i>  | 161 |

---

## Índice de cuadros

---

|   |     |
|---|-----|
| Cuadro 1. Lista de antihelmínticos presentes en el mercado con las dosis terapéuticas recomendadas en ovinos.....   | 26  |
| Cuadro 2. Reportes de antihelmínticos con resistencia a <i>Haemonchus contortus</i> en diferentes países.....   | 27  |
| Cuadro 3. Técnica de disco para evaluar diarrea en corderos .....   | 31  |
| Cuadro 4. Especies de <i>Artemisia</i> spp. y su uso en la medicina tradicional. ....   | 34  |
| Cuadro 5. Distribución de grupos para evaluación de inhibición de la eclosión de huevos, efecto letal sobre L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .....   | 55  |
| Cuadro 6. Rendimiento obtenido de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de <i>A. cina</i> .....   | 57  |
| Cuadro 7. Efecto (%) de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de <i>A. cina</i> sobre huevos y L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .....  | 58  |
| Cuadro 8. Concentración letal de la fracción hexánica de <i>A. cina</i> sobre L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> .....   | 59  |
| Cuadro 9. Porcentaje de letalidad sobre L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> y CL <sub>50-90</sub> de las reuniones obtenidas en la columna 1 a partir de la fracción hexánica de <i>A. cina</i> .....   | 66  |
| Cuadro 10. Efecto letal (%) sobre L <sub>3</sub> de <i>H. contortus</i> , distancia recorrida por el compuesto y el frente de la fase móvil (Rf), peso (mg), concentración a evaluar y CL <sub>50-90</sub> de las reuniones obtenidas en la columna 2 a partir de la reunión C1F76-89. .... | 68  |
| Cuadro 11. Sistema utilizado en cromatografía líquida para el análisis de muestras de la fracción hexánica y reuniones obtenidas a partir de <i>A. cina</i> .....   | 155 |
| Cuadro 12. Condiciones de la columna cromatográfica al vacío en sílice. ....  | 156 |
| Cuadro 13. Fracciones y pesos obtenidos a partir de la columna 2 de cromatografía el vacío en sílice.....   | 158 |
| Cuadro 14. Datos espectrales de <sup>1</sup> H-NMR (600 MHz) y <sup>13</sup> C-NMR (150 MHz) 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacina (1) y norisoguaiacina (2) in CD <sub>3</sub> OD. ....  | 159 |

---

## Índice de Figuras

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Parásitos <i>Haemonchus contortus</i> macho y hembra copulando   | 20 |
| Figura 2. Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i> .   | 21 |
| Figura 3. Larva 4 de <i>Haemonchus contortus</i>   | 22 |
| Figura 4. Signos clínicos de infección por <i>Haemonchus contortus</i> : Baja condición corporal, mucosas pálidas  | 24 |
| Figura 5. Estrategias más comunes para el control integrado de parásitos (CIP)   | 28 |
| Figura 6. Taxonomía del género <i>Artemisia</i>  | 34 |
| Figura 7. Estructura de yomogina extraída a partir de <i>Artemisia asiática</i> la cual es responsable de la inhibición del óxido nítrico en los macrófagos activados por lipopolisacáridos. | 37 |
| Figura 8. Estructura química de eupafolina   | 38 |
| Figura 9. Estructura molecular de la esculetina con actividad termiticida  | 39 |
| Figura 10. Estructura química del compuesto borneol  | 40 |
| Figura 11. Estructura química del lignano sesamina   | 41 |
| Figura 12. Estructura química de estigmasterol   | 41 |
| Figura 13. Estructura de artemisinina y sus derivados.   | 43 |
| Figura 14. Estructura química de las santoninas, molécula responsable del efecto antiparasitario en niños.   | 44 |
| Figura 15. Moniezia expansa con scolex corrugado después de la exposición al extracto acuoso de <i>Artemisia cina</i>  | 45 |
| Figura 16. Espectro de cromatografía líquida de la fracción hexánica de <i>A. cina</i>   | 73 |
| Figura 17. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.   | 76 |
| Figura 18. Espectro de $^{13}\text{C}$ de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.   | 77 |
| Figura 19. Espectro $^{13}\text{C}$ de DEPT de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.  | 78 |
| Figura 20. Espectro de RMN de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.   | 79 |
| Figura 21. Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.  | 80 |
| Figura 22. Espectro de RMN de HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.  | 81 |
| Figura 23. Espectrometría de masas de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.   | 82 |
| Figura 24. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de norisoguaiacina  | 83 |
| Figura 25. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de norisoguaiacina   | 84 |
| Figura 26. Espectrometría de masas de norisoguaiacina  | 85 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 27. Huevos por gramo eliminados en cabras tratadas con la fracción hexánica de <i>A. cina</i> sobre la infección natural por nemátodos gastroentéricos | 93  |
| Figura 28. Dinámica de FAMACHA© de las cabras tratadas con fracción hexánica de <i>A. cina</i> y testigo en infección natural por nemátodos gastroentéricos   | 94  |
| Figura 29. Condición corporal en cabras tratadas con la fracción hexánica de <i>A. cina</i> en infección natural por nematodos gastroentéricos                | 95  |
| Figura 30. Fracción hexánica de <i>Artemisia cina</i> y artemisinina en placas de cromatografía en capa fina fase normal.                                     | 154 |
| Figura 31. Estructura molecular de 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacina (1) y norisoguaiacina (2).   | 160 |

---

## Índice de abreviaturas

---

- A. abrotanum*- *Artemisia abrotanum*
- A. absinthium*- *Artemisia absinthium*
- A. afra*- *Artemisia afra*
- A. annua*- *Artemisia annua*
- A. arborescens*- *Artemisia arborescens*
- A. argyi*- *Artemisia argyi*
- A. asiática*- *Artemisia asiática*
- A. asiática*- *Artemisia asiática*
- A. capillaris*- *Artemisia capillaris*
- A. cina* – *Artemisia cina*
- A. diffusa*- *Artemisia diffusa*
- A. douglasiana*- *Artemisia douglasiana*
- A. douglasiana*- *Artemisia douglasiana*
- A. dracunculus*- *Artemisia dracunculus*
- A. giraldii*- *Artemisia giraldii*
- A. Judaica*- *Artemisia Judaica*
- A. maritima*- *Artemisia maritima*
- A. monosperma*- *Artemisia monosperma*
- A. nilagirica*- *Artemisia nilagirica*
- A. parviflora*- *Artemisia parviflora*
- A. princeps*- *Artemisia princeps*
- A. santonica* – *Artemisia santonica*
- A. scoparia*- *Artemisia scoparia*
- A. sieversiana*- *Artemisia sieversiana*
- A. sieversiana*- *Artemisia sieversiana*
- A. tripartite*- *Artemisia tripartite*
- A. velorum*- *Artemisia velorum*

*A. vestita*- *Artemisia vestita*

*A. vulgaris*- *Artemisia vulgaris*

FAMACHA- FAffa MAlan CHArt

*H. contortus* – *Haemonchus contortus*

L<sub>3</sub>- Larva 3

L<sub>4</sub>- Larva 4

*M. unguiculatus*- *Meriones unguiculatus*

*T. circumcincta*- *Teladorsagia circumcincta*

---

## Resumen

---

*Haemonchus contortus* es el nematodo gastroentérico más importante dados sus hábitos hematófagos en la producción de pequeños rumiantes, aunado a lo anterior, las malas prácticas del uso en desparasitantes inducen a cambios genéticos asociados a la resistencia a los antiparasitarios, reduciendo alternativas de control de fármacos sintéticos sobre los animales parasitados. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antihelmíntico del extracto etanólico de la planta *Artemisia cina* sobre estadios de vida libre *in vitro* y endoparásitos del nematodo hematófago *H. contortus* en animales de laboratorio y en cabras parasitadas bajo condiciones de pastoreo. El estudio se dividió en tres ensayos experimentales: En la primera fase del estudio se establecieron dos objetivos, el primero fue determinar la actividad letal de las fracciones de *A. cina* obtenidas a partir de la fracción hexánica sobre larva infectante (L<sub>3</sub>) y primer estadio endoparásito (L<sub>4</sub>) e identificar los metabolitos de la fracción de *A. cina* seleccionada con mayor efecto letal en contra de huevo, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> de *H. contortus*. El efecto letal por extracto se determinó por ensayos biodirigidos utilizando *H. contortus* huevo, L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> para 76.7% de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) a las 48 h, 80% y 70 de efecto letal sobre L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> a las 24 h con la fracción hexánica. Los compuestos responsables del efecto son lignanos denominados 3-Demetoxi-isoguaiacina y norisoguaiacina. El segundo ensayo buscó determinar el efecto antihelmíntico *in vivo* de los extractos de *A. cina* sobre jerbos infectados con *H. contortus* determinando el porcentaje de reducción, el cual fue de 100%, 5.22 y 5.9 con las fracciones hexánicas, acetato de etilo y metanólica 5.9%, respectivamente. El tercer y último ensayo evaluó la fracción hexánica de *A. cina* en cabras con infección natural a *H. contortus*, en el cual, se utilizaron 200 cabras con infección natural de nematodos gastroentéricos, al día siete se realizó el tratamiento vía oral con fracción hexánica a dosis de 4mg/kg de peso y el segundo grupo se identificó como control. Se realizaron monitoreos postratamiento al día 14, 30, 100, 130 y 160 para cuantificar el número de hpg y

FAMACHA. El resultado del tratamiento con la fracción hexánica mostró reducción de hpg del 77% al día 14 postratamiento y el parámetro FAMACHA mejoró de forma notable a 2.3 hasta el día 30 postratamiento. Se concluye que los metabolitos obtenidos a partir de *A. cina* poseen actividad antihelmíntica y se consideran para continuar su estudio como prometedores antihelmínticos.



---

## Abstract

---

*Haemonchus contortus* is the most important gastroenteric nematode given its blood-sucking habits in the production of small ruminants, in addition to the above, the bad practices of deworming use induce genetic changes associated with resistance to antiparasitic drugs, reducing alternatives for the control of synthetic drugs on parasitized animals. The objective of the present study was to determine the anthelmintic effect of the ethanolic extract of the *Artemisia cina* plant on in vitro free life stages and endoparasites of the hematophage nematode *H. contortus* in laboratory animals and in parasitized goats under grazing conditions. The study was divided into three experimental trials:

In the first phase of the study two objectives were established, the first was to determine the lethal activity of the *A. cina* fractions obtained from the hexane extract on infecting larva (L<sub>3</sub>) and first endoparasitic stage (L<sub>4</sub>) and to identify the metabolites of the Selected *A. cina* fraction with the highest lethal effect against egg, L<sub>3</sub> and L<sub>4</sub> of *H. contortus*. The lethal effect per extract was determined by bio-directed tests using *H. contortus* egg, L<sub>3</sub> and L<sub>4</sub> for 76.7% inhibition of egg hatching (IEH) at 48 h, 80% and 70 of lethal effect on L<sub>3</sub> and L<sub>4</sub> at 24 h with the hexanic extract. The compounds responsible for the effect are lignans called 3-Demethoxy. -isoguaiacine and norisoguaiacine. The second trial sought to determine the in vivo anthelmintic effect of extracts of *A. cina* on gerbils infected with *H. contortus* by determining the reduction percentage, which was 100%, 5.22 and 5.9 with the hexane, ethyl acetate and methanolic fractions. 5.9%, respectively. The third and last trial evaluated the hexane fraction of *A. cina* in goats with natural infection to *H. contortus*, in which 200 goats with natural infection of gastroenteric nematodes were used. On day seven, oral treatment with hexane fraction was performed. at a dose of 4mg / kg of weight and the second group was identified as a control. Post-treatment monitoring was performed on day 14, 30, 100, 130 and 160 to quantify the number of hpg and FAMACHA. The result of treatment with the hexane fraction showed a 77% reduction

in hpg on day 14 post-treatment and the FAMACHA parameter improved markedly to 2.3 until day 30 post-treatment. It is concluded that the metabolites obtained from *A. cina* possess anthelmintic activity and are promising anthelmintic for further study.

---

## CAPÍTULO I

---

### 1 Introducción

Los ovinos son una de las especies más ampliamente distribuida en México y otros países, y se caracterizan por tener una alta calidad en la carne y en la leche, por lo cual se consideran como alternativa que ayuda a disminuir el hambre en el mundo debido a su facilidad en la producción y menor consumo de alimento respecto a otros rumiantes (Achi *et al.*, 2003). Además de ello, su prolificidad y rusticidad permiten que estén adaptados a diferentes medios y que se acomoden a los requerimientos ofertados en la pradera (San Primitivo y de La Fuente, 2000). Sin embargo, cuando la proteína y energía ofertados son menores a los requerimientos comienza un estado crónico de subnutrición que determina que las defensas del organismo disminuyan, permitiendo el ingreso de parásitos, bacterias y virus que afectan el estado clínico del animal (Fernández, 2015). El género *Haemonchus contortus* es el nemátodo-parásito hematófago más agresivo en la producción ovinas bajo condiciones de trópico. La infección se produce por el consumo de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) en las praderas con un alto porcentaje de prevalencia (80%). Los signos agudos causan problemas de anemia, mala digestión y que pueden causar la muerte en los jóvenes, y en adultos provocan problemas de inflamación crónica, pérdida de peso y diarreas continuas (Carvalho, 2017). A la fecha, el control de la hemoncosis es a través de fármacos que han sido aplicados por décadas, generando resistencia antihelmíntica múltiple, problema que se ha extendido a nivel mundial.

#### 1.1 Generalidades de *Haemonchus contortus*

La descripción taxonómica del parásito muestra que es del reino: Animal, Filum: Nematelminto, Clase: Secementea, Orden: Strongylida, Suborden: Trichostrongylina, Superfamilia: Trichostrongyloidea, familia: Haemonchidae,

subfamilia: Haemonchinae, género: *Haemonchus*, especie: *H. contortus* (Gou *et al.*, 2001).

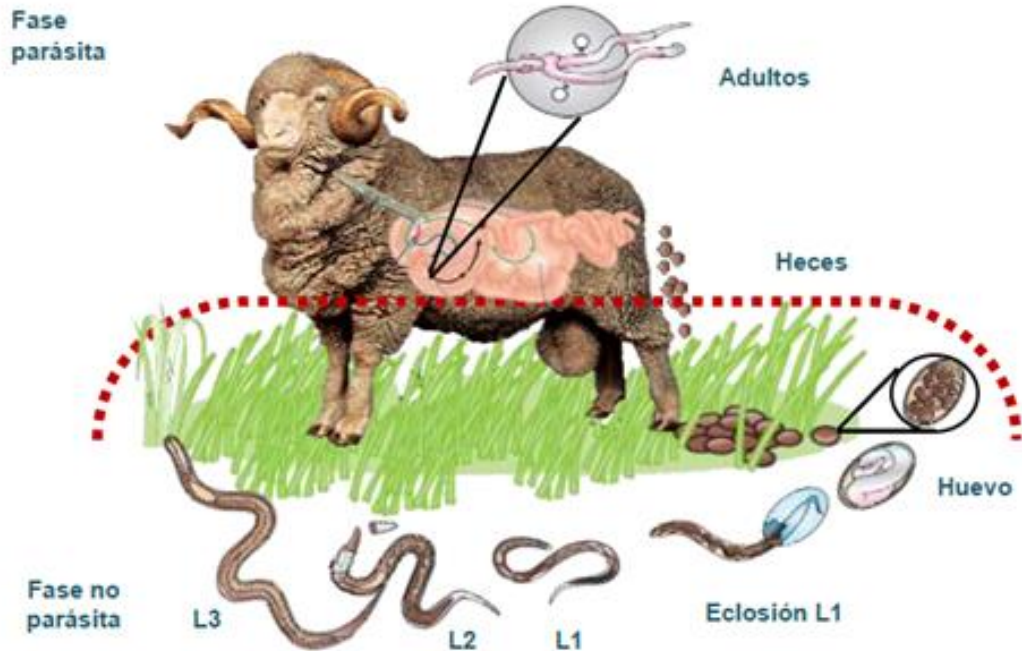
Aparentemente el género *Haemonchus* se originó en África, en antílopes y posteriormente se diversificó y adaptó en otros rumiantes salvajes, pero por la migración de los seres humanos y el transporte de rumiantes domésticos infectados se pudo esparcir la infección a otros continentes, *H. contortus* se adaptó más a la especie ovina (Sangster, 1995). El género *Haemonchus* presenta una lanceta en la cavidad oral que utiliza para perforar la mucosa gástrica durante la invasión y desarrollo, así como para adquirir los nutrientes necesarios del hospedero. Por su hematofagia, los estadios endoparásitos de *Haemonchus* adquieren una coloración rojiza en intestino que los caracteriza y en el caso de las hembras, el intestino rodea al útero de coloración blanca por lo cual el parásito se ha denominado palo de barbería (Quiroz, 2003). Los machos muestran la bolsa copulatríz en la parte posterior con tres lóbulos dorsales asimétricos, conteniendo dos espículas, cuya función es unirse a la hembra en la reproducción (Figura 1). Los machos miden alrededor de 1310  $\mu\text{m}$  y las hembras alrededor de 3000  $\mu\text{m}$ . Las hembras son extremadamente prolíficas y pueden llegar a ovipositar hasta 5000 hpg/día/hembra (Allonby y Dargie, 1975). Los huevos pueden llegar a medir hasta 70-45 $\mu\text{m}$  y son eliminados junto con las heces en fase de mórula las cuales contienen de 8 a 16 células (Rojas *et al.*, 2012).

Figura 1. Parásitos *Haemonchus contortus* macho y hembra copulando



Otra particularidad de *H. contortus* es su ciclo de vida directo, que ocurre en un solo hospedero. El ciclo presenta dos fases, externa o exógena, donde se desarrolla de huevo a L<sub>3</sub>. Bajo óptimas condiciones de humedad y temperatura el desarrollo de huevo a L<sub>3</sub> se lleva a cabo entre 6 y 7 días (Dash, 1985). Las L<sub>3</sub> muestran características importantes, son hidrotrópicas positivas, fototrópicas negativas, lo que limita su presencia en el forraje de forma continua y crea un comportamiento muy activo con la luz del sol tenue y la humedad del forraje en la mañana, mientras tienen poca actividad en las horas más altas de luz solar y cuando se reduce la humedad, por lo cual la larva tiende a esconderse evitando la desecación (Onyiah y Arslan, 2005) (Figura 1)

Figura 2. Ciclo de vida de *Haemonchus contortus*.

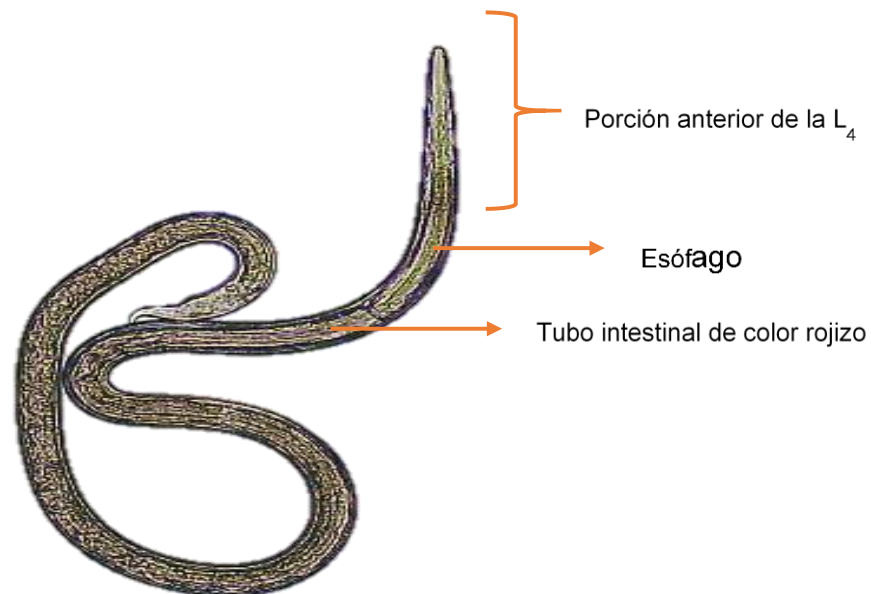


Tomado de: Bautista, 2015

La segunda fase se denomina endógena e inicia cuando las ovejas consumen el forraje contaminado con L<sub>3</sub>, se dirigen a los cuatro compartimentos digestivos para desarrollarse en el estómago u abomaso. Durante el trayecto, el pH, enzimas, temperatura y CO<sub>2</sub> contribuyen a la eliminación de la vaina o cubierta de queratina que protegía a la L<sub>3</sub>, favoreciendo de esta forma el desarrollo y alimentación a través de la invasión a tejido para convertirse en larva 4 (L<sub>4</sub>), primer estadio hematófago. La L<sub>4</sub> tiene quimiotactismos para percibir condiciones ambientales adversas en el abomaso (ej. cambios en pH y temperatura) y disminuir su metabolismo al mínimo; quedando como larva en hipobiosis por diferentes periodos de tiempo. Al percibir condiciones favorables, la L<sub>4</sub> continúa su desarrollo a larva cinco (L<sub>5</sub>) y adulto. Una de las condiciones para la hipobiosis son los mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero, y sobrevivir (Cox *et al.*, 1989). Al disminuir su metabolismo,

la L<sub>4</sub> preserva la continuidad de la especie, ya que este fenómeno ocurre principalmente en invierno, en áreas donde la temperatura es extrema y durante épocas muy secas, (Figura 2) (Torres-Acosta *et al.*, 1995). El período de prepatencia se describe de 15 a 18 días en condiciones normales (Muchiut *et al.*, 2019).

Figura 3. Larva 4 de *Haemonchus contortus*



### 1.2 Patogénesis de la infección por *Haemonchus contortus*

Dentro de los factores más importantes a considerar para la patogénesis del parásito se encuentra la virulencia de *Haemonchus* y la respuesta del hospedador. El mecanismo de patogenicidad induce gastritis por daño inmune, dirigido contra antígenos de secreción-excreción y cuticulares, la gastritis determina la actividad de mediadores de saciedad (anorexia) y la mal digestión-absorción de proteínas que induce hipoproteinemia (Rowe *et al.*, 1988). Dichos efectos causan cambios morfofuncionales, principalmente en el abomaso, como inflamación por la ruptura de mucosa y continuidad de la misma y pérdida de sangre a través de pequeños

vasos capilares. Los signos que se presentan son: anemia, edema, diarrea, desnutrición, éste último causado por el síndrome de mala absorción (Eysker y Ploeger, 2000). Los parásitos adultos pueden llegar a ingerir hasta 0.05mL de sangre/parásito/día causando una notable reducción del volumen celular aglomerado (VCA), utilizado como marcador de virulencia y estimación indirecta de la hemoncrosis (Allonby y Dargie, 1975). La reducción del VCA se observa por el hábito de hematofagia de los tres estadios endoparásitos (Hunter y Mackenzie, 1982).

Los factores hemolíticos excretados por los helmintos inducen la liberación de hemoglobina y proteínas y por consiguiente el descenso de los valores de VCA (Peña *et al.*, 2004). Además, la ruptura de uniones intercelulares e incremento en la permeabilidad, pérdida de células epiteliales, reparación tisular, incremento en la producción de moco y aumento en la demanda de síntesis de proteínas por el sistema inmunológico causa la reducción de las concentraciones del plasma sanguíneo (Khan *et al.*, 1988). Los animales infectados tienen bajo consumo de alimento dada la anemia, la reducción de la liberación de gastrina por el daño en las glándulas gástricas, incremento del pH abomasal que inhibe la síntesis de pepsina y reduce la degradación de proteína y, por ende, la absorción de aminoácidos, con aumento de pepsinógeno (Simpson, 2000). Aunado a esto se presenta el denominado síndrome de anorexia-caquexia donde se incrementa el consumo energético en reposo de la célula debido a la acción de algunas citocinas (IL-6, IL-1 y TNF) las cuales modifican los niveles de péptidos como la leptina, hormona liberada del tejido graso y neuropéptido Y los cuales son responsables del estímulo del apetito a nivel del hipotálamo (Alberola, 2006).

La patogenicidad del parásito induce daño crónico tan severo que afecta la salud del hospedador y permite que se observen signos indirectos como la baja condición corporal (Figura 4), disminución del apetito, pérdida de proteína, gastritis hemorrágica, incremento en la permeabilidad de la mucosa y consecuentes



edemas, letargia, reducción en el potencial productivo de leche, lana o carne, mucosas pálidas (Figura 4) e incremento de los eosinófilos circulantes en la sangre periférica. En los casos más severos la emaciación y la muerte (Angulo-Cubillán *et al.*, 2007).

Figura 4. Signos clínicos de infección por *Haemonchus contortus*: Baja condición corporal, mucosas pálidas



### 1.3 Mecanismo de respuesta no específica ante la infección por *H. contortus*

La infección por *Haemonchus* induce la modificación de condiciones microambientales del abomaso y lo expulsan, los helmintos en general activan la vía alterna del complemento y permiten la unión de opsoninas en la superficie, lo cual induce la generación de péptidos vasoactivos y quimio activos (C3a y C5a) que movilizan eosinófilos, además el mismo *Haemonchus* secreta quimio atrayentes de eosinófilos y neutrófilos que refuerzan la respuesta inflamatoria. La expulsión inmediata de larvas ocurre cuando las L3 son atacadas por células de mast y leucocitos globulares antes de que la larva entre en las glándulas abomasales, a esto se le suma la hipermotilidad, hipersecreción gástrica e hiperplasia de células caliciformes, lo que subsecuentemente incrementa la producción de moco.

Aunado a lo anterior la expulsión del parásito se asocia con la liberación de histamina y leucotrienos en el moco del abomaso donde inhibe la motilidad de la larva, compuestos producidos por las células de mast y los leucocitos globulares. La expulsión retardada de las larvas sucede por los linfocitos T CD4, anticuerpos IgA e IgE, citotoxicidad de eosinófilos y la vía clásica del complemento (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013).

#### 1.4 Evasión de *Haemonchus* spp. al sistema inmunológico del hospedador

*Haemonchus* spp. está conformado por proteínas denominadas cistatinas que inhiben proteasas relacionadas con procesos de presentación de antígeno, disminución de la respuesta de los linfocitos T. El parásito modula además citocinas que reducen la expresión de antígenos en las células presentadoras disminuyendo la migración de células y la respuesta inflamatoria. Adicionalmente, la lectina C inhibe la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales compitiendo con la selectina, reduciendo de esta forma la inflamación (Gómez-Samblás, 2017). Existe otra proteína de importancia denominada calreticulina que inhibe la unión de los glóbulos rojos facilitando la hematofagia (Suchitra y Paritosh *et al.*, 2005).

#### 1.5 Estrategias de control de *Haemonchus contortus*

El término “control sustentable” de las parasitosis, propone no eliminar totalmente las poblaciones de parásitos y mantener el equilibrio de la población en refugio para que persistan cepas susceptibles (Torres-Acosta *et al.*, 2004). En contraste, el control tradicional pretende erradicar las poblaciones de parásitos altamente patógenos. En la primera premisa, el control incrementa la producción a largo plazo, ya que busca armonizar al parásito con el hospedador y el clima (triada perfecta), para minimizar la presentación de resistencia antihelmíntica al aplicar estrategias amigables con el ambiente; mientras que en la segunda premisa se considera la erradicación, pero también impacta e incrementa la presión sobre los nematodos y genera resistencia antihelmíntica, es decir, selección de poblaciones resistentes (Getachew *et al.*, 2007; Cuéllar-Ordaz, 2009).

### 1.5.1 Quimioterapia

Los compuestos antihelmínticos son ampliamente usados y disponibles en el mercado y tienen uso con fines preventivos, pero también curativos, en la mayoría de los esquemas se desparasita a la totalidad del hato considerando la epidemiología del parásito. Los programas de desparasitación muchas veces dependen de la aparición de casos clínicos y temporada climática y puede aplicarse en intervalos de 15 días a seis meses (Bowman, 1999). En el mercado existen varios medicamentos que alcanzan hasta el 100% de eficacia, pero por su uso continuo, su eficacia ha disminuido. Los antihelmínticos más comunes se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Lista de antihelmínticos presentes en el mercado con las dosis terapéuticas recomendadas en ovinos.

| Grupo químico             | Antihelmínticos | Dosis prescrita                      |
|---------------------------|-----------------|--------------------------------------|
| Imidazotiazoles           | Levamisol       | 7.5mg/Kg (Andrews, 2000)             |
| Bencimidazoles            | Albendazol      | 5mg/Kg                               |
|                           | Fenbendazol     | 5mg/Kg                               |
|                           | Oxfendazol      | 5mg/Kg (McKenna y Watson, 1987)      |
| Lactonas<br>macrocíclicas | Ivermectina     | 0.2mg/Kg                             |
|                           | Moxidectina     | 0.2mg/Kg                             |
| Salicilanilidas           | Closantel       | 10mg/Kg (Uppal <i>et al.</i> , 1993) |

Tomado de: Bowman, 1999.

El desarrollo de resistencia generalmente se produce por la aplicación continua y repetida de el mismo principio activo, en los peores casos es multirresistente, es decir, no sólo a un fármaco, pero también en otros. La resistencia a levamisol y bencimidazol ha sido notificada como un gen autosómico recesivo (Sangster *et al.*, 1998), y al parecer dos loci genéticos de  $\beta$ -tubulina (Beech *et al.*, 1994).

Cuadro 2. Reportes de antihelmínticos con resistencia a *Haemonchus contortus* en diferentes países.

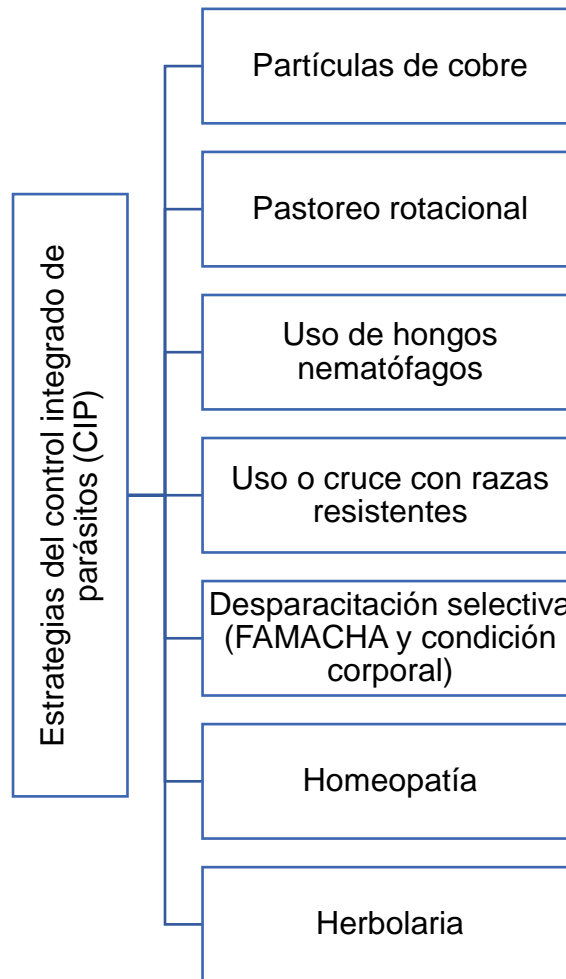
| <b>País</b> | <b>Ciudad</b> | <b>Antihelmíntico</b>                                  | <b>Autor</b>   |
|-------------|---------------|--|--|
| África      | Etiopía       | Albendazol,<br>Tetramizol,<br>Ivermectina              | Sissay <i>et al.</i> , 2006  |
|             | Sur África    | Todos los grupos                                       | Van Wyk <i>et al.</i> , 1997   |
| Europa      | Francia       | Bencimidazol,<br>Levamisol                             | Chartier <i>et al.</i> , 1998  |
|             | Gran Bretaña  | Bencimidazol   | Coles, 1998  |
| Asia        | Malasia       | Bencimidazol,<br>Levamisol, Closantel<br>Ivermectina   | Chandrawathani <i>et al.</i><br>1999                                 |
| Sur América | Argentina     | Bencimidazol,<br>Levamisol,<br>ivermectina             | Eddi <i>et al.</i> , 1996  |
|             | Uruguay       | Bencimidazol,<br>levamisol, Ivermectina<br>Ivermectina | Nari <i>et al.</i> , 1996<br>Mederos, 2002                           |
|             | México        | Ivermectina,<br>Bencimidazol                           | Encalada Mena <i>et al.</i> ,<br>2008                                |
|             | Paraguay      | Ivermectina,<br>Albendazol<br>Levamisol                | Torres-Acosta <i>et al.</i> ,<br>2007<br>Maciel <i>et al.</i> , 1996 |
|             | Cuba          | Levamisol e  | Arece <i>et al.</i> , 2004   |
|             | Nicaragua     | Ivermectina  | Rimbaud <i>et al.</i> , 2005   |
|             | Costa Rica    | Benzimidazol<br>Ivermectina                            | Maroto <i>et al.</i> , 2009  |
|             | Australia     | Australia  | Bencimidazol,<br>Avermectinas  |

Modificado de: Getachew *et al.*, 2007

### 1.5.2 Nuevas alternativas para el control integrado

El control integrado de parásitos contempla reducir la carga parasitaria de forma tal que no cause problemas clínicos en los animales y que además los hospederos se infecten y puedan generar respuestas inmunes específicas (Fonte-Galindo *et al.*, 2016). Las estrategias que se utilizan se describen en la figura 5.

Figura 5. Estrategias más comunes para el control integrado de parásitos (CIP)



#### 1.5.2.1 Uso de partículas de cobre

Las partículas de cobre ( $\text{Cu}^+$ ) quedan retenidas en el abomaso después de la administración ruminal, el  $\text{Cu}^+$  es liberado de forma lenta por varias semanas y la dosis recomendada es de 2.5 a 5 g de óxido de  $\text{Cu}^+$  o también de 0.1g/Kg de peso

vivo (Bautista, 2015). La frecuencia de administración se considera cada seis meses o incluso cada año dependiendo de la carga parasitaria (Galindo *et al.*, 2011). Las partículas de  $\text{Cu}^+$  contribuyen a reducir el hpg y disminuir las fases adultas en abomaso. El mecanismo de acción propuesto menciona que los iones de  $\text{Cu}^+$  liberados en el ambiente ácido del abomaso dañan la cutícula del parásito, causando la muerte. Aunado a lo anterior, el  $\text{Cu}^+$  induce el descenso de pH favoreciendo la transición de pepsina a pepsinógeno, permitiendo la digestión de proteínas consumidas en la dieta (Knox, 2002).

#### 1.5.2.2 Estrategias de pastoreo

La concentración de  $L_3$  de nematodos incrementa en la pradera después de una semana de pastoreo; las  $L_3$  pueden permanecer activas hasta nueve semanas (Banks y col., 1990). Por lo anterior, el sistema rotacional reduce el conteo de hpg y la cantidad de antihelmíntico utilizado al año, ya que el consumo de  $L_3$  es significativamente menor. El pastoreo mixto de ovinos y bovinos permite reducir la carga en la pradera, generando el efecto aspirador, que también puede ser llevado a cabo con equinos en donde el consumo de  $L_3$  en hospederos no definitivos reduce la dosis infectante para los definitivos (Barger, 1997).

#### 1.5.2.3 Control biológico con hongos nematófagos

Este método tiene efecto sobre la fase exógena de los nematodos, es decir sobre larvas, donde se aprovechan las propiedades depredadoras de los hongos. Los hongos se administran en forma de espora, vía oral, con la alimentación y se eliminan en las heces en la pradera donde se desarrollan formando anillos/hifas que atrapan a las larvas y se alimentan de ellas. Los hongos más representativos de este grupo son los hongos hifomicetos depredadores y los más utilizados son *Arthrobotrys oligospora* contra larvas de *H. contortus*. Gruner *et al.* (1985) demostraron que hongos como *Dactylaria candida*, *Candelabrella musiformis* y *Arthrobotrys tortor* tuvieron efecto letal sobre *H. contortus* y *Teladorsagia*

*circumcincta*. Mendoza de Gives *et al.* (1998) reportó el uso de 11,350.000 clamidosporas del hongo *Duddingtonia flagrans* aislada en México, las cuales redujeron 88% las L<sub>3</sub> encontradas en las heces de ovinos. González-Garduño *et al.*, (2005) demostraron la capacidad depredadora de *D. flagrans* sobre L<sub>3</sub> en ovinos de pelo, donde el hongo desarrolló estructuras especializadas para capturar e inmovilizar las larvas y posteriormente alimentarse del contenido, su efecto se demostró sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus* y *Cooperia punctata* (nematodo parásito de rumiantes).

#### 1.5.2.4 Uso de razas resistentes

La resistencia de algunas razas de ovinos a los parásitos depende de mecanismos inmunes no específicos para llevar a cabo la expulsión de larvas. Entre estos mecanismos se ha descrito el incremento en el número de células tipo mastocito y leucocitos globulares, previo a la invasión de larvas a la mucosa del abomaso. Además, se observa hipermotilidad, secreción gástrica, hiperplasia de células caliciformes e incremento de la producción de moco, que a su vez impide la motilidad de larvas (Cuéllar, 2019). La resistencia y susceptibilidad a nematodos depende del nivel y tipo en la expresión de genes asociados a la respuesta inmune, donde las razas resistentes disminuyen la expresión de genes asociados con la coagulación sanguínea, reparación y regeneración del tejido, migración celular en el abomaso y nódulos linfoides abomasales, al mismo tiempo, se incrementa la motilidad intestinal, respuesta inflamatoria, diferenciación celular, proliferación y reducción de apoptosis (Alba-Hurtado y Muñoz-Guzmán, 2013).

#### 1.5.2.5 Desparasitación selectiva en ovinos

Entre 70% y el 80% de los animales muestran cargas bajas de nematodos gastroentéricos y solo un pequeño porcentaje tiene alto número de parásitos, y son los que contaminan la pradera (Van Wyk *et al.*, 2006). Estos animales son los que muestran en el hato signos clínicos agudos como diarrea, anemia, baja de peso y de producción (leche o carne), presentan altas cargas parasitarias y son los

hospederos para tratar. Las técnicas de desparasitación selectiva se agrupan en dos tipos: 1) los que se basan en identificar a los animales con mayor cantidad de parásitos, y 2) los que podrían ser los animales con mayor riesgo de infectarse, para identificarlos se debe correlacionar y analizar el número de hpg, FAMACHA, condición corporal y diarrea de disco. Para determinar el hpg se utiliza la técnica de McMaster modificada, para la condición corporal se lleva a cabo mediante la determinación visual y táctil de la acumulación de tejido adiposo subcutáneo (grasa) en algunos puntos corporales del animal, FAMACHA mediante la determinación cualitativa de la coloración de la mucosa conjuntival y la diarrea de disco por observación cualitativa como se describe en el cuadro 3.

Cuadro 3. Técnica de disco para evaluar diarrea en corderos

| Disco | Característica                                      |
|-------|---|
| 1     | Heces normales en bolita ó 40% de materia seca      |
| 2     | Heces en pasta ó 26% de materia seca                |
| 3     | Heces semi-líquidas o diarrea ó 16% de materia seca |

Tomado de: Torres-Acosta *et al.*, 2004.

Además de lo anterior, el otro criterio a tener en cuenta para la desparasitación selectiva es utilizando la tarjeta FAMACHA, donde se compara el color de la mucosa ocular para detectar el grado de anemia como indicador de los efectos de la infección por *H. contortus* en el desbalance nutricional, por ello, este sistema debe ser acompañado de pruebas parasitológicas como medio para identificar animales resistentes, resilientes y susceptibles. La clasificación según FAMACHA se lleva a cabo en 5 categorías donde 1 es rojo y 5 es blanco. La ventaja del sistema permite escoger a los animales que tienen cargas altas, pero no desarrollan anemia, permitiendo seleccionar a los animales resilientes y descartar animales que continuamente son desparasitados y al mismo tiempo reducir la infección de la pradera (MAlan y Van Wyk, 2001).



A las metodologías citadas anteriormente se puede evaluar la condición corporal, asociada a la infección con otros parásitos no hematófagos como *Trichostrongylus* spp. (Van Wyk *et al.*, 2006).

Al utilizar las tres estrategias de desparasitación se puede sumar la carga parasitaria y determinar el límite que puede tener un hato, es decir, hasta qué cantidad de hpg en los animales se afectan los parámetros productivos más evidentes como el peso, producción de leche o lana (Torres-Acosta *et al.*, 2004).

#### 1.5.2.6 Homeopatía

La homeopatía ha tenido utilidad en el campo de salud pública, animal, en estudios etológicos y ambientales, además se considera una alternativa que genera cero residuos por sus características químicas. Los productos homeopáticos son elaborados con sustancias minerales, vegetales y animales, se preparan en concentraciones por debajo del número de Avogadro y en general se considera que actúan estimulando el sistema inmunológico. Las concentraciones más utilizadas se refieren a la 30CH y 200CH, además de ello, las formas de maceración y extracción son las reportadas en la farmacopea homeopática mexicana (Higuera-Piedrahita, 2016).

#### 1.5.2.7 Herbolaria

La fitomedicina es una actividad humana milenaria, donde se han identificado plantas que mejoran la condición y estado de salud de los animales (Pochettino *et al.*, 2003). Tanto los extractos hidroalcohólicos como etanólicos han mostrado eficacias considerables en el control de nematodos, no sólo en los animales, sino inclusive en los humanos. Uno de los principales retos que enfrenta el uso de plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades es que mucho de los compuestos activos no han sido totalmente identificados, y además de ello, las concentraciones de sustancias activas usadas *in vitro* no siempre corresponden a

la disponibilidad en la planta y a la que se logra en animales vivos (Pérez y Argurcia, 2008).

Los fitofármacos han sido evaluados principalmente in vitro y mediante técnicas químicas se ha determinado la actividad de ciertas familias de compuestos como los flavonoides entre ellos derivados de galaoil y flavanonas como ácido gálico, methyl galato, etil galato, naringina, glucósido de galaoil y naringenina los cuales se adhieren al huevo y a la cutícula externa de la larva de *H. contortus* causando daño y muerte (Zarza-Albarrán et al., 2020). Davuluri et al. (2020) reporta la presencia de otros compuestos responsables de la actividad antihelmíntica sobre *H. contortus* (huevo y larva) como alcaloides, taninos, saponinas y aminoácidos. González-Cortázar et al (2018) reportan actividad antihelmíntica sobre larva y huevo de *H. contortus* considerando a los flavonoides rutina y miricitrina y que además pueden actuar sobre ovinos infectados alcanzando el 66.2% de reducción de huevos en el grupo tratado con rutina.

#### 1.6 El género *Artemisia*

*Artemisia* pertenece a la familia Asteraceae, es un género amplio de plantas que contiene alrededor de 200 a 400 especies que se ubican principalmente en zonas de Asia, Europa y Norte América. Las especies de *Artemisia* tienden a ser perennes, anuales o bianuales y de olor fuerte, poco palatable. La taxonomía se muestra en la figura 6.

Figura 6. Taxonomía del género *Artemisia*



Reino: Plantae  
 Subreino: Tracheobionta  
 División: Angiospermae  
 Clase: Magnoliopsida  
 Orden: Asterales  
 Familia: Asteraceae  
 Género: *Artemisia*

Las hojas generalmente están divididas, algunas pueden formar racimos (Bora y Sharma, 2011). El género *Artemisia* ha mostrado diferentes usos que pueden apreciarse en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Especies de *Artemisia spp.* y su uso en la medicina tradicional.

| Especies de <i>Artemisia</i> | Usos en la medicina tradicional  | Referencia                     |
|------------------------------|--|--------------------------------|
| <i>A. Annuua</i>             | Antimalárico, antioxidante   | Ho <i>et al.</i> , 2014        |
| <i>A. Absinthium</i>         | Antioxidante, citotóxico, antiespasmódico, antihelmíntico, neuroprotector. | Wegiera <i>et al.</i> , 2012   |
| <i>A. afra</i>               | Malaria, antibacterial   | Thring <i>et al.</i> , 2006    |
| <i>A. asiatica</i>           | Antiinflamatorio, anticancerosa  | Wang <i>et al.</i> , 2007      |
| <i>A. douglasiana</i>        | Reduce el síndrome premenstrual  | García y Adams, 2005           |
| <i>A. dracunculus</i>        | Antimicrobial, anticoagulante  | Al Baytar <i>et al.</i> , 1992 |

|                       |  |                                |
|-----------------------|--|--------------------------------|
| <i>A. vulgaris</i>    | Insecticida, larvicida y anticanceroso | Saleh <i>et al.</i> , 2014     |
| <i>A. abrotanum</i>   | Antimicrobial                          | Ghasani <i>et al.</i> , 1990   |
| <i>A. vestita</i>     | Antiinflamatoria                       | Lv <i>et al.</i> , 2008        |
| <i>A. judaica</i>     | Insecticida, antifúngico               | Calderone <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>A. verlotorum</i>  | Antimicótico                           | Saddi <i>et al.</i> , 2007     |
| <i>A. arborescens</i> | Antiviral                              | Tanaka, 1981                   |
| <i>A. capillaris</i>  | Anticanceroso, antiinflamatorio        | Aniya <i>et al.</i> , 2000     |
| <i>A. giraldii</i>    | Antibiótico                            | Tan <i>et al.</i> , 1999       |
| <i>A. maritima</i>    | Hepatoprotectiva                       | Janbaz <i>et al.</i> , 1995    |
| <i>A. monosperma</i>  | Insecticida                            | Tan <i>et al.</i> , 1998       |
| <i>A. nilagirica</i>  | Antibacterial                          | Ahameethunisa y Hopper, 2010   |
| <i>A. scoparia</i>    | Antioxidante, insecticida              | Singh <i>et al.</i> , 2008     |
| <i>A. sieversiana</i> | Antiinflamatoria                       | Saratikov <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>A. tripartita</i>  | Antifúngica                            | Tan <i>et al.</i> , 1999       |
| <i>A. argyi</i>       | Anticancerosa                          | Khan <i>et al.</i> , 2011      |

Modificado de: Taleghani *et al.*, 2020.

### 1.7 Fitoquímica de *Artemisia* spp.

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas pequeñas que se producen bajo condiciones medio- ambientales específicas para la planta, y su condición genética. Éstos incrementan la posibilidad de supervivencia de la planta al evitar su consumo por parte de herbívoros, ya que es muy poco palatable. Existen tres clases de metabolitos secundarios: terpenos (conformados por hidrógeno-H<sup>+</sup> y carbono-C), fenoles (conformados por azúcares simples, oxígeno, O, H<sup>+</sup> y grupos benceno) y compuestos nitrogenados con diversas estructuras. En este sentido, el color, olor y sabor depende de la cantidad de metabolitos secundarios que posea la planta y la sinergia que exista entre ellos (Wilcox, 2009).

El género *Artemisia* incluye plantas medicinales con actividad biológica probada en sus aceites esenciales y metabolitos secundarios. Dentro de los principales

componentes encontrados están los sesquiterpenos, di terpenos, flavonoides, cumarinas, isofenilcumarina, ácido cafeoilquínico, esteroides, fenoxycromenos, fenilpropanos, acetilenos (Turi *et al.*, 2014).

### 1.8 Sesquiterpenos

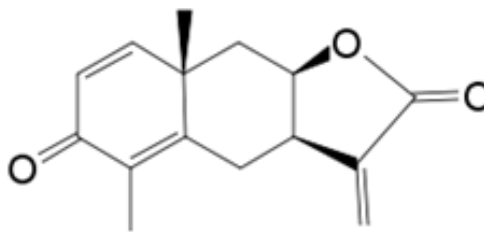
Los sesquiterpenos son moléculas derivadas de los terpenos y se clasifican de acuerdo al número de isoprenos (moléculas formadas por cinco carbonos) que se pueden encontrar en forma de hemiterpenos (un isopreno), monoterpenos (dos isoprenos), sesquiterpenos (3 isoprenos), diterpenoides (cuatro unidades de isopreno), sesterterpenoides (cinco unidades de isopreno), triterpenoides (seis unidades de isopreno), tetraterpenoides (ocho unidades de isopreno) y politerpenoides (con más unidades de isopreno). Los terpenos son utilizados por la planta para su protección ante el ambiente abiótico y biótico, crecimiento y desarrollo. Entre los más importantes se encuentra la síntesis, liberación de fragancias utilizada en perfumería y aromaterapia y muchos otros toman su importancia en el campo de la comida como aditivos naturales. Los terpenos también cobran importancia en el campo de la medicina humana y animal, actúan contra células cancerígenas, anti-hiperglucémicos, antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, antivirales y como antiinflamatorios (Ramawat y Mérillon, 2013).

Los sesquiterpenos son moléculas incoloras y amargas, considerados como los principales componentes del género *Artemisia*. En este sentido, la planta más estudiada es *A. annua* de donde se extrajo la molécula deoxiartemisina, ácido artemisínico, arteannuin -B y artemisitenol. Además, se han sintetizado dímeros, trímeros, derivados galactosilados, fluoroderivados y dihidro-artemisininas con actividad biológica (Dandan *et al.*, 2009).

Otro de los terpenos aislados de *A. princeps*, *Pamp*, *A. asiática* y *A. douglasiana* para obtener yomogina (Figura 4), novanina, carlaolides B, 15-dihidro-3-como posibles inhibidores de la producción de óxido nítrico en macrófagos activados por

lipopolisacáridos (Ryu *et al.*, 1998) e incluso inhiben la degranulación de los mastocitos (Ryu *et al.* 2000).

Figura 7. Estructura de yomogina extraída a partir de *Artemisia asiática* la cual es responsable de la inhibición del óxido nítrico en los macrófagos activados por lipopolisacáridos.



Tomado de: Kitson *et al.*, 2011

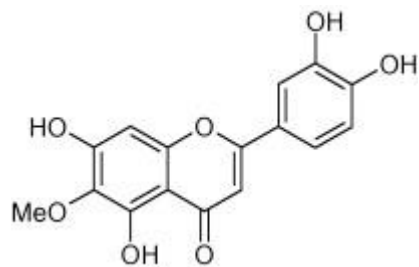
Dentro de los diterpenos aislados de *A. rupestris* antiquorina posee actividad anticancerígena (Xie *et al.*, 2013) al igual que la friedelina obtenida a partir de *A. annua* (Liu *et al.*, 2013).

### 1.9 Flavonoides

Los flavonoides son una clase de metabolitos secundarios con estructuras fenólicas variables que químicamente tienen un esqueleto de 15 carbonos, los cuales consisten en dos anillos fenil y un anillo heterocíclico. Se clasifican a su vez en subgrupos de antocianinas, antoxantinas, flavanones, flavanonoles, flavanos e isoflavonoides. Los flavonoides tienen dentro de sus funciones la atracción de animales polinizadores produciendo pigmentos rojos o amarillos, reguladores fisiológicos, inhibidores de ciclos celulares y actividad inhibitoria sobre organismos que causan enfermedad en las plantas. Además, tienen amplias funciones

biológicas que incluyen propiedades contra células del cáncer, alergias, inflamación, oxidantes, microbianas, fúngicas y diarreas. En el género *Artemisia*, se han identificado diez flavonoides y sus derivados como flavonas y chalconas (Ramawat y Meérillon, 2013; Taleghani y Tayarani, 2018). Dentro de los más importantes se encuentra eupafolina (Figura 8) obtenido a partir de *A. princeps* la cual induce la apoptosis en células humanas en adenocarcinoma (Chung *et al.*, 2010).

Figura 8. Estructura química de eupafolina

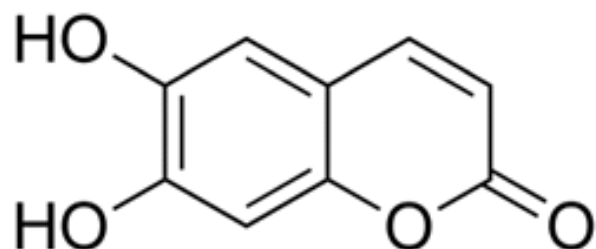


Tomado de: Herrerias *et al.*, 2008

### 1.10 Cumarinas

Las cumarinas son las sustancias naturales más importantes de la clase de las benzopironas, las cuales se conocen como anti-auxinas y juegan un papel muy importante en el crecimiento de las plantas, al igual que en su defensa. Tienen propiedades biológicas contra bacterias, células cancerígenas, diabetes, virus, son antioxidantes, procesos inflamatorios e inhibidores de actividad enzimática. El género *Artemisia* es rico en compuestos parecidos a las cumarinas, entre los más importantes se encuentra la esculetina con actividad termiticida (figura 6), escoparona, dracumerina purificadas de *A. capillaris* y *A. dracunculus* (Hong *et al.*, 2015; Masuda *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016).

Figura 9. Estructura molecular de la esculetina con actividad termiticida



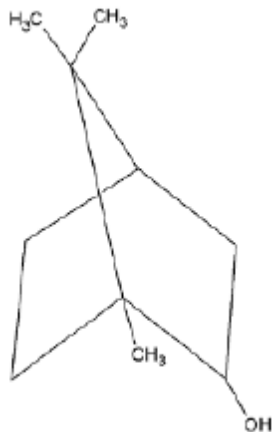
Tomado de: <https://uniiquim.iquimica.unam.mx/compuesto-item/esculetina-920/>

### 1.11 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos volátiles, naturales y complejos que contienen gran variedad de moléculas como terpenos y aromáticos, derivados de compuestos alifáticos y fenólicos. En la naturaleza, se consideran compuestos de importancia para la planta ya que actúan contra virus, bacterias, hongos, insectos o incluso atrayentes de insectos que permitan la dispersión de semillas y polen o para repeler otros insectos que puedan causar daño. Tienen además gran aplicación en el campo de la cosmética y en la industria porque actúan en contra de virus, células del cáncer, bacterias y coadyuvan en enfermedades psicológicas. Los componentes más importantes son borneol (potente insecticida, inhibidor de acetilcolina) el cual se muestra en la figura 10, camfor, terpineol (efecto sobre bacterias que causan caries y enfermedad periodontal), eucaliptol (acaricida),  $\beta$ -tujona (alucinógeno) extraídos principalmente de *A. diffusa* (Passos *et al.*, 2009; Taherkhani, 2015; Almahdawy *et al.*, 2017).



Figura 10. Estructura química del compuesto borneol

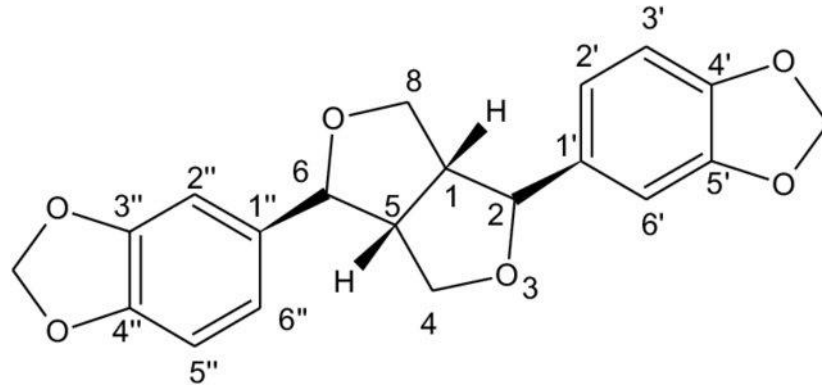


Tomado de: Al-Farhan et al, 2010

### 1.12 Lignanos

Los lignanos son dímeros fenil-propanoides, y forman parte de la mayoría de los alimentos vegetales en frutas, vegetales, legumbres, semillas y algunos granos. La lignina junto con la celulosa forma las paredes fuertes de las plantas y poseen actividad biológica antitumoral y antiviral. Se encuentran dentro del grupo de polifenoles y dentro de los representantes más importantes se encuentra la sesamina (Figura 6) obtenida a partir de *Artemisia gorgonum* y se considera como un potente inductor la actividad de las enzimas responsables de la oxidación de los ácidos grasos como palmitoiltransferasa, acil-CoA deshidrogenasa, acil-CoA oxidasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, enoil-CoA hidratasa y 3-cetoacil-CoA tiolasa. Además de ello las dietas suplementadas con sesamina incrementa la actividad de 2,4-dienoil-CoA reductasa y  $\Delta^3, \Delta^2$  enoil-CoA isomerasa las cuales son enzimas en la vía auxiliar de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos insaturados (Sharma *et al.*, 2020).

Figura 11. Estructura química del lignano sesamina

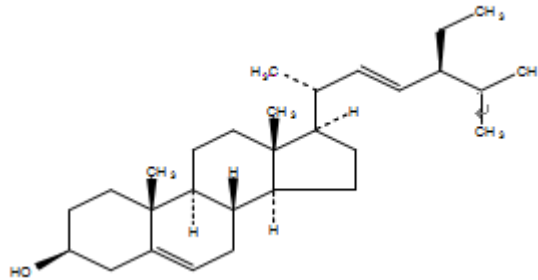


Tomado de: Sharma *et al.*, 2020

### 1.13 Otros compuestos

A partir de *A. annua* se han separado otros compuestos como los derivados de cumarato como el estigmasterol (figura 12), un fitoesterol con efecto fotoprotector sobre los rayos ultravioleta (Ferreira, 2014).

Figura 12. Estructura química de estigmasterol



Tomado de: Manufacturas, proveedores y productos de China

### 1.14 Artemisinina

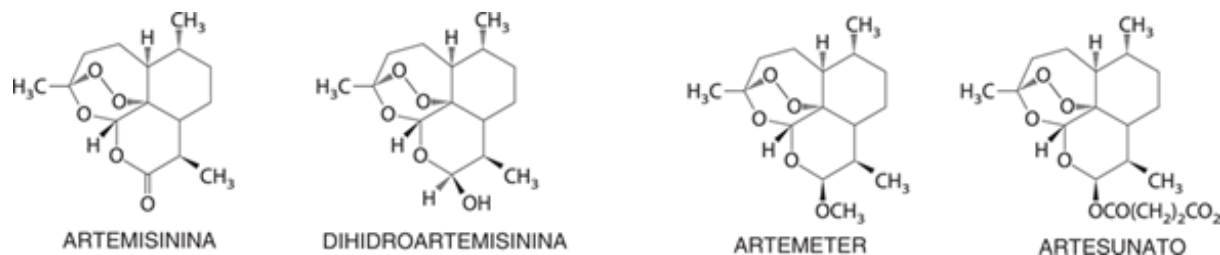
*Artemisia annua* fue usada en la medicina tradicional china como infusión para la fiebre y para soldados con malaria, durante años de investigación se demostró que existía un compuesto responsable del efecto denominado artemisinina, un

sesquiterpeno que actualmente es la alternativa más utilizada para el tratamiento de malaria con bajas posibilidades de obtener resistencia (Rodríguez *et al.*, 2006).

La artemisinina es una lactona sesquiterpena (Figura 8) que posee enlace con un grupo endoperóxido. Desde su aislamiento, varios otros derivados han sido sintetizados de *A. annua* generando sustancias más o menos activas como artemisinina. Dentro de los derivados más comunes está dihidroartemisinina, arteméter, artemisiteno y artesunato sódico los cuales contienen el grupo peróxido (Balint, 2001). Son además denominados endoperóxidos de primera generación y se utilizan principalmente como tratamiento para malaria. Aquellos compuestos como la deoxiartemisinina que no poseen el grupo peróxido son totalmente inactivos (Klayman, 1985).

La artemisinina presenta baja disponibilidad para formulaciones de uso oral y acción limitada en las fases eritrocíticas de la malaria, por lo cual, se desarrollaron fármacos sintéticos denominados endoperóxidos de segunda generación, pero con estructuras más simples (Klayman, 1985). Los endoperóxidos poseen algunas ventajas sobre los demás fármacos antimaláricos como poca o nula resistencia cruzada con otros fármacos, eficacia mayor en el tratamiento y dentro de las desventajas están: tiempo de vida más corto, biodisponibilidad para formulaciones en uso oral y evidencias de neurotoxicidad en estudios preclínicos (Meshnick *et al.*, 1996). La dihidroartemisinina es la molécula con mayor actividad antimalárica, metabolizada a través del sistema enzimático CYP2A6, al mismo tiempo que el artesunato.

Figura 13. Estructura de artemisinina y sus derivados.



Tomado de: Lu *et al.*, 2018

El mecanismo de acción atribuido a artemisinina es el de perturbar la homeóstasis por mecanismos de óxido reducción, de forma tal, que el hierro del hemo reduce el enlace peróxido en el artesunato, generando especies de hierro oxidado lo que desencadena una cascada de reacciones que liberan radicales de oxígeno reactivo que daña el parásito y lo llevan a la muerte (Zhang, 2020).

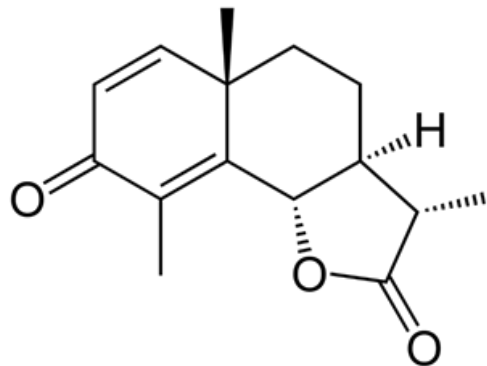
### 1.15 *Artemisia cina*

*Artemisia cina* es un arbusto perteneciente a la familia Asteraceae nativa del este del mar Caspio en Afganistán, con olor aromático de 40 a 60 cm, con tallos erectos y algodonosos; las hojas son pequeñas, peciolas cortos y sésiles en las hojas superiores. Crece en el semidesierto con temperaturas extremas y prefiere el suelo salino. Ha sido conocida vulgarmente como cina o ajeno marino y se ha utilizado en la medicina tradicional como antiparasitaria (Woerdenbag, 2017).

En los años 1950 y 1970 se utilizaban formulaciones de plantas a base de *A. cina* para desparasitar niños en colegios y jardines, el ingrediente activo relacionado se denomina santonina. Las santoninas (Figura 9) fueron inicialmente preparadas en tableta y posteriormente como un dulce con saborizante ya que su objetivo fueron niños en donde la ascariasis tiene mayor prevalencia (Zhang *et al.*, 2019). Sin embargo, su uso se discontinuó debido a la toxicidad acumulada causada entre 60mg en niños y 200mg en adultos.

Saitaeva y Sidyakin (1971) reportaron la presencia de artemisinina en las hojas de *A. cina*, molécula a la cual le atribuyeron el efecto antimalárico y por lo cual se utilizó durante muchos años como alternativa a *A. annua*.

Figura 14. Estructura química de las santoninas, molécula responsable del efecto antiparasitario en niños.



Tomado de: Saitbaeva *et al.*, 1971

Se han probado extractos etanólicos de *A. cina* para determinar el efecto antihelmíntico, logrando un efecto de hasta el 80% sobre larvas de *H. contortus* (Van Agtmael *et al.*, 1999). *A. cina* o también llamada “matadora de lombriz” debe su efecto a las partes aéreas de la planta y su efecto se ha demostrado en infecciones causadas por el protozooario *Giardia* en cerdos, tal como lo reporta Lans *et al.*, (2007). Sin embargo, su uso continuo puede causar intoxicación por santoninas.

Por otro lado, Lyengar (2009) utilizó *A. cina* en compuesto homeopático a 200CH (Centesimal hannemaniana) y extracto crudo, mostrando alta eficacia sobre la enfermedad del nudo de raíz de la morera (*Morus alba*). Respecto al extracto crudo la molécula responsable del efecto se reportó como santonina. Bashtar *et al.*, (2011) realizaron extractos acuosos con *A. cina* desafiándolos *in vitro* sobre el cestodo de rumiantes, *Moniezia expansa* utilizando 24g de extracto crudo, además de obtener resultados de parálisis del adulto a dosis dependiente. De esta forma el cestodo

alcanzó la muerte a las 14 horas post-exposición utilizando 10 g/L. Por microscopía electrónica se observó daño ultraestructural en el scolex del parásito viéndose corrugado y encogido.

Figura 15. *Moniezia expansa* con scolex corrugado después de la exposición al extracto acuoso de *Artemisia cina*



Tomado de: Bashtar *et al.* (2011). SC: scolex corrugado.

Chetan *et al.*, (2012) demostraron que los extractos obtenidos por polaridad a partir de *A. cina* tiene efecto antibacterial sobretodo en microorganismos que presentan resistencia a los antibióticos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a concentraciones inhibitorias de 100µg/µL. Los extractos también fueron probados para determinar si existe protección al ADN por medio de la técnica de fragmentación de ADN por radicales hidroxilos, demostrando actividad antioxidante (Chetan *et al.*, 2012). Herawati *et al.*, (2015) manipularon genéticamente *A. cina* para inducir la expresión del gen que sintetiza artemisinina permitiendo la sobreexpresión del compuesto bioactivo considerado bactericida, antitumoral y antifúngico

Higuera-Piedrahita (2016) demostró el efecto antihelmíntico de *A. cina* en infecciones naturales e inducidas de *H. contortus* en ovinos, utilizando extractos hidroalcohólicos y etanólicos donde se observó reducción de la infección parasitaria

de 7 a 14 días postratamiento, vía oral en corderos naturalmente y artificialmente infectados. Además, la autora notificó el efecto letal sobre huevos y L<sub>3</sub> de *H. contortus* a concentraciones menores (2 y 1 mg/mL) a las notificadas para otros extractos. Higuera-Piedrahita *et al.*, (2015), mostraron que el extracto etanólico y las artemisininas extraídas del extracto no afectaron la acción de L<sub>3</sub> en explantes abomasales, al no inhibir la invasión de la larva al tejido, sin embargo, los resultados mostraron disminución de la infección y mejora de otros parámetros clínicos como el índice FAMACHA, condición corporal y ganancia de peso.

---

## CAPÍTULO II

---

### 2 Justificación

Una de las principales limitantes para los sistemas de producción ovina en pastoreo son los nematodos gastroentéricos (NGE), especialmente *Haemonchus contortus* y el principal método de control ha sido el uso de antihelmínticos. Desafortunadamente su uso inadecuado e indiscriminado ha favorecido la selección de cepas de parásitos con resistencia a los medicamentos. En México la RA ha sido notificada por diversos investigadores y lamentablemente esta cifra va en aumento. Esta problemática ha motivado al desarrollo de nuevas opciones para el control de los NGE, el conjunto de esas estrategias se conoce como Control Integral de Parásitos (CIP), orientado básicamente a *H. contortus*, que por sus hábitos hematófagos se considera uno de los más virulentos y se trabaja como modelo biológico. El CIP contempla, entre otras opciones, el manejo del pastoreo, uso de razas resistentes, el control biológico a través de hongos nematófagos y nematodos de vida libre como depredadores, la desparasitación selectiva empleando el índice FAMACHA®, la administración de partículas de cobre, herbolaria y la homeopatía, que si bien de manera individual no tienen un mayor impacto que los fármacos, el uso de dos o más opciones en conjunto muestran efectos positivos sobre la disminución en la eliminación de huevos del parásito.

La fitomedicina es una actividad humana milenaria, que ha logrado ir identificado plantas que mejoran la condición y estado de salud de sus animales. Muchos principios activos actuales se han aislado o purificado de las plantas. No obstante, lo anterior, se crea la necesidad de generar trabajos científicos para validar la dosis, la acción y los efectos adversos de los compuestos elaborados a partir de plantas sobre los animales. La mayoría de los datos disponibles se refieren a trabajos *in vitro*, faltando conocer la biodisponibilidad en animales parasitados. En general, en



los trabajos *in vivo*, los compuestos vegetales han mostrado una baja eficacia y difícilmente igualan a los antihelmínticos disponibles, razón por la cual, el estudio debe ser encaminado a la identificación de la(s) moléculas responsables del efecto, y con éstas, realizar los ensayos *in vitro* e *in vivo*, incluso utilizando modelos murinos que permitan ayudar a predecir el comportamiento del fármaco. El género *Artemisia* ha mostrado muy prometedora actividad antihelmíntica por los compuestos que poseen las plantas; sin embargo, no están totalmente estudiadas, además en los últimos 20 años se ha puesto mayor atención a un sesquiterpeno extraído a partir de *A. annua* con actividad antiprotozoaria, mientras que otras plantas como *A. cina* han sido pobremente estudiadas.

---

## CAPÍTULO III

---

### 3 Hipótesis

El extracto etanólico de *Artemisia cina*, así como las moléculas derivadas del mismo poseen actividad antihelmíntica contra *Haemonchus contortus*.

---

## CAPÍTULO IV

---

### 4 Objetivo.

Determinar el posible efecto antihelmíntico del extracto etanólico de *Artemisia cina* *in vitro* sobre estadios de vida libre y endoparásito en jerbos y en cabras infectadas con el nematodo *Haemonchus contortus*.

#### 4.1 Objetivos específicos:

- Establecer la posible actividad letal de la fracción hexánica, acetato de etilo y metanólica sobre L<sub>3</sub> y L<sub>4</sub> de *H. contortus in vitro*.
- Identificar y dilucidar los metabolitos de la fracción más activa de *A. cina* utilizando ensayos biodirigidos.
- Determinar el posible efecto de las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de *A. cina* en jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados con *H. contortus*.
- Evaluar la fracción más activa de *A. cina* en cabras con infección natural con *H. contortus*.

---

## CAPÍTULO V

---

### 5 Resultados obtenidos de esta investigación

El cumplimiento de los objetivos planteados tiene como resultados la presentación de los siguientes productos:

**Capítulo VI:** Actividad letal de las fracciones hexánica, acetato de etilo y metanólica de *A. cina* sobre huevo y larva infectante de *H. contortus in vitro* por medio de resumen, materiales y métodos, resultados y discusión.

**Capítulo VII:** Metodología y resultados para la identificación de los metabolitos responsables de la actividad antihelmíntica de la fracción hexánica de *A. cina* mediante ensayos biodirigidos en el resumen, materiales y métodos, resultados y discusión.

**Capítulo VIII:** Evaluación *in vivo* de la fracción hexánica de *A. cina* en cabras con infección natural de *H. contortus* en resumen, materiales y métodos, resultados y discusión. Los resultados permitieron la elaboración y envío de un artículo científico, el cual se encuentra en revisión por parte de la revista Parasite (Factor de impacto: 2.050).

**Capítulo IX:** Elaboración, traducción y envío de un artículo científico a la Revista Acta Parasitológica, la cual posee un factor de impacto de 1.019. El artículo está en espera de respuesta por parte del comité científico editorial de la revista indizada. Se presenta el artículo complete enviado, así como la respuesta del editor.

**Capítulo X:** Elaboración, traducción, envío y publicación del artículo científico en la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. El artículo está en el estatus de publicado. La revista tiene IF de 0.884.

---

## CAPÍTULO VI

---

### 6 Actividad letal de las fracciones hexánica, acetato de etilo y metanólica de *A. cina* sobre huevos y larvas infectante de *H. contortus in vitro*

#### 6.1 Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar la actividad letal de las fracciones hexánica, acetato de etilo y metanólica de *Artemisia cina* sobre huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. El material biológico se colectó a partir de ovino donador con la técnica de Corticelli-Lai. La planta *A. cina* fue colectada y secada por cinco días. Se utilizaron cinco kilos de planta para realizar los extractos hexánico, acetato de etilo y metanol, procesados para su extracción en solvente durante dos días, seguido de liofilización. Se evaluó el efecto letal sobre L<sub>3</sub> e inhibición de la eclosión de huevo por triplicado, a concentraciones de 4 y 2 mg/mL. Los controles utilizados fueron albendazol y artemisinina, grado reactivo. Al extracto con mayor eficacia se le determinó la concentración letal 50 y 90 (CL<sub>50-90</sub>). Se utilizó el programa estadístico Statgraphics (Centurion XV®) con un ANOVA para obtener diferencias significativas con prueba de LSD para comparación de medias. La estimación de CL<sub>50-90</sub> se realizó con el programa SAS (Versión 9, 2004; SAS Institute Inc., Cary, NC). La fracción hexánica mostró 76.6±9.3% de inhibición de la eclosión de huevos y 80±9% de efecto letal sobre L<sub>3</sub>; las fracciones en acetato de etilo y metanólico mostraron efecto letal menor al 60% para larva e inhibición de la eclosión de huevos. El análisis PROBIT mostró que la CL<sub>50</sub> para la fracción hexánica fue de 0.5mg/mL y 1mg/mL para la CL<sub>90</sub>. La fracción hexánica de *A. cina* resultó un potencial antihelmíntico, con eficacia sobre las fases exógenas del ciclo de vida de *H. contortus*.

## 6.2 Materiales y métodos

### 6.2.1 Ubicación

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. Se utilizó un ovino donador en los corrales de la Unidad de Posgrado de la misma entidad. La obtención y cultivo de L<sub>4</sub> se llevó a cabo en el laboratorio de Helmintos del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Jiutepec, Morelos, México.

### 6.2.2 Diseño experimental

#### 6.2.2.1 Obtención de material vegetal e identificación de *Artemisia cina*

Se obtuvieron 5 kilogramos de planta de Lab. Millenium®, México, quienes producen la planta de forma comercial en las siguientes condiciones: humedad de 24.6%, pH 8.7 y salinidad de 1.6%. La planta se envió para su identificación en Lab. Hunab®, México (Anexo VII).

#### 6.2.2.2 Obtención de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *A. cina*

Se tomaron 5 kilogramos de *A. cina* fresca para su deshidratación a 60°C en estufa. El material ya seco se maceró en 5 litros con n-hexano durante 24 horas a temperatura ambiente (24°C) (Jiang *et al.*, 2016). El extracto contenido en el solvente se concentró en rota evaporador (Heidolph Laborota 4000, Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania) a presión reducida a 60°C y se liofilizó. El proceso se repitió utilizando acetato de etilo para obtener la fracción de mediana polaridad y finalmente se obtuvo la fracción metanólica.

#### 6.2.2.3 Formulación de los extractos de *A. cina*

Los extractos se mezclaron con polivinilpirrolidona (K-30) en relación 1g de extracto y 1g de K-30 obteniendo dispersiones y se mantuvieron a -4°C hasta su uso.

#### 6.2.2.4 Análisis cromatográfico de *A. cina*

Los extractos de *A. cina* se identificaron por cromatografía en capa fina utilizando sulfato sérico, ácido fosfomolibdico, flavonoides, 4-hidroxiparaformaldehído como agentes reveladores. Se utilizó artemisinina comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA), como control para confirmar la presencia de esta molécula en cada uno de los tres extractos.

#### 6.2.2.5 Colección de huevos y larvas de *H. contortus*

Se recolectaron heces de un ovino donador, infectado por vía oral con 5,000 L<sub>3</sub> de *H. contortus*. Las heces positivas se transportaron en refrigeración desde su colecta hasta laboratorio, se homogenizaron con solución salina saturada y se limpiaron por centrifugación con agua destilada (Coles et al. 1992).

Para la obtención de larvas contenidas en muestras de heces frescas fueron procesadas por coprocultivos en placa de Petri, siguiendo la técnica de Corticelli-Lai (1963) por siete días. Las larvas se identificaron mediante lo descrito por Van Wyk y Mayhew (2013), se mantuvieron a 4 °C durante siete días hasta su uso.

#### 6.2.2.6 Ensayos *in vitro* sobre huevos de *H. contortus*

La prueba de inhibición de la eclosión de huevos fue realizada en placas de micro titulación de 96 pozos. Se utilizaron 200 huevos por pozo y los desafíos con cada extracto se repitieron por triplicado. Los tratamientos que se utilizaron fueron fracción hexánica, acetato de etilo y metanólica de *A. cina* a concentración de 2 y 1 mg/mL. Los huevos fueron expuestos por 48 horas y se evaluó la inhibición de la eclosión como lo describe Coles et al. (1992). Como controles se utilizó albendazol, polivinilpirrolidona y artemisinina grado reactivo (Sigma-Aldrich).

#### 6.2.2.7 Ensayos *in vitro* de L<sub>3</sub> de *H. contortus*

El efecto letal de los extractos sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus* se observó utilizando placas de ELISA de 96 pozos a 24° C durante 24 horas. Las larvas se lavaron con agua destilada, se centrifugaron a 100 rpm/5 min, cuantificaron y utilizaron alrededor de 200 L<sub>3</sub> por pozo. Los ensayos de letalidad se realizaron por triplicado. Los grupos que se utilizaron se muestran en el cuadro 5. Las larvas se activaron exponiéndolas a la luz por 5 minutos a temperatura ambiente antes de la exposición (Van Wyk et al., 2013).

Cuadro 5. Distribución de grupos para evaluación de inhibición de la eclosión de huevos, efecto letal sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus*.

| Tratamiento                                 | Concentración (mg/mL) |
|---|-----------------------|
| Artemisinina                                | 4- 2                  |
| Fracción hexánica de <i>A. cina</i>         | 4- 2                  |
| Fracción acetato de etilo de <i>A. cina</i> | 4-2                   |
| Fracción metanólica de <i>A. cina</i>       | 4-2                   |
| Albendazol                                  | 7.5                   |
| Polivinilpirrolidona (K-30)                 | 4                     |

#### 6.2.2.8 Determinación de CL<sub>50-90</sub> de la fracción hexánica de *A. cina*

Se identificó la fracción con mayor actividad y se realizó un análisis PROBIT utilizando concentraciones de 4, 2, 1, 0.5, 0.025 y 0.125 mg/mL para determinar la CL<sub>50-90</sub> sobre las L<sub>3</sub> a las 24 horas de exposición.



#### 6.2.2.9 Análisis de resultados

Los resultados obtenidos del efecto letal en huevo y L<sub>3</sub> de *H. contortus* fueron sometidos al programa Statgraphics y se realizó un ANOVA para obtener diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La estimación de la CL<sub>50-90</sub> se utilizó el programa SAS (Versión 9, 2004; SAS Institute Inc., Cary, NC).

Utilizando el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6 + \epsilon_{ij}$$

Donde:  $Y_{ij}$ : Es la observación de la  $j$ -ésima unidad experimental del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\mu_1$ : Es la media del tratamiento con artemisinina

$\mu_2$ : Es la media del tratamiento con fracción hexánica de *A. cina*

$\mu_3$ : Es la media del tratamiento con fracción de acetato de etilo de *A. cina*

$\mu_4$ : Es la media del tratamiento con fracción metanólica de *A. cina*

$\mu_5$ : Es la media del tratamiento con albendazol

$\mu_6$ : Es la media del tratamiento con polivinilpirrolidona K-30

$\epsilon_{ij}$ : Es el error experimental de la unidad  $ij$ .

### 6.3 Resultados

#### 6.3.1 Rendimiento de los extractos de *A. cina*

El rendimiento obtenido de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico se muestra en el cuadro 6. El extracto en acetato de etilo mostró mayor rendimiento a partir de 5 kg de planta seca.

Cuadro 6. Rendimiento obtenido de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico de *A. cina*

| Fracción                            | Rendimiento (gr) |
|-------------------------------------|------------------|
| Fracción hexánica de <i>A. cina</i> | 4.3              |
| Fracción acetato de etilo           | 4.8              |
| Fracción metanólica                 | 3.2              |

### 6.3.2 Análisis fitoquímico de *A. cina*

La identificación de compuestos a través de cromatografía en capa fina permitió conocer el sistema de separación, en donde la fase móvil fue hexano: acetato de etilo 90:10, la metodología para la evaluación de compuestos por cromatografía en capa fina se muestra en el anexo I.

### 6.3.3 Ensayos *in vitro*

El extracto etanólico de *A. cina* mostró 60% de inhibición de la eclosión de huevos, mientras que la fracción hexánica mostró 76% de inhibición, además de ello, esta última fracción mostró eficacia alta sobre L<sub>3</sub> con 80% de efecto letal. La fracción hexánica también mostró el efecto-dependiente de la concentración, ya que el efecto disminuyó a medida que bajó la concentración, sin embargo, se observaron resultados superiores al 60% que se consideran admisibles para un antihelmíntico según la Asociación Mundial para el Avance en la Parasitología Veterinaria. (WAAVP). Los resultados del extracto en acetato de etilo y metanólico se muestran en el cuadro 7. El extracto metanólico tuvo menor actividad letal en la inhibición de la eclosión de huevos y en el efecto letal de L<sub>3</sub>. Así mismo, el vehículo utilizado para la dispersión de los extractos, K-30, no mostró efecto letal en ninguna de las fases expuestas. El albendazol, control positivo, mostró 100% de inhibición y efecto letal, lo que confirma que la cepa de *H.* utilizada es susceptible a este fármaco. La

artemisinina comercial fue diluida con K-30 y se desafió a los estadios larvarios sin encontrar efecto alguno.

Cuadro 7. Efecto (%) de las fracciones obtenidas del extracto etanólico de *A. cina* sobre huevos y L<sub>3</sub> de *H. contortus*

| Tratamiento de <i>A. cina</i> (extracto) | Concentración (mg/mL) | Inhibición de huevos | Efecto letal L <sub>3</sub> |
|--|-----------------------|----------------------|-----------------------------|
| Etanólico                                | 4                     | 60±2*                | 0                           |
|  | 2                     | 0                    | 0                           |
| Hexánico                                 | 4                     | 76.6±9.3*            | 80±9*                       |
|  | 2                     | 63.6±5.9*            | 68±7*                       |
| Acetato de etilo                         | 4                     | 61.1±3.4**           | 45±5**                      |
|  | 2                     | 56.8±9.3**           | 20±2**                      |
| Metanólico                               | 4                     | 39.6±1.2***          | 30±3***                     |
|  | 2                     | 10.4±3***            | 10±1***                     |
| Albendazol                               | 7.5                   | 100±3****            | 100±0****                   |
| K-30                                     | 4                     | 2±0.6                | 2±0.3                       |
| Artemisinina                             | 4                     | 0                    | 0                           |
|  | 2                     | 0                    | 0                           |

\* , \*\* , \*\*\* , \*\*\*\* Diferencia significativa entre grupos (p<0.05).

El extracto que mayor actividad mostró fue el hexánico, por lo cual se evaluaron diferentes concentraciones para la CL<sub>50-90</sub>. Los resultados obtenidos se indican en el cuadro 8. La CL<sub>50</sub> se observó a 0.5mg/mL y la CL<sub>90</sub> a 1mg/mL. Se confirmó que el efecto letal sobre L<sub>3</sub> de la fracción hexánica es dependiente de la concentración, para lo cual a 1mg/mL según el estadístico PROBIT (SAS) se obtendrá el 90% de la mortalidad de larvas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Concentración letal de la fracción hexánica de *A. cina* sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus*

| Fracción hexánica (mg/mL) | Efecto letal sobre L <sub>3</sub> | Concentración letal |
|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 4                         | 100±0.2*                          |                     |
| 2                         | 96±0.6*                           |                     |
| 1                         | 75±3**                            | 90                  |
| 0.5                       | 25±6***                           | 50                  |
| 0.25                      | 10±5****                          |                     |
| 0.125                     | 0*****                            |                     |

\* , \*\* , \*\*\* , \*\*\*\* , \*\*\*\*\* Diferencia significativa (p<0.05)

#### 6.4 Discusión

Generalmente, la fracción hexánica de una planta contiene aceites, terpenos, flavonoides y taninos, que pueden ser responsables del efecto antihelmíntico, entre de los principales sesquiterpenos que posee la planta se encuentra la artemisinina, que ha mostrado eficacia alta contra protozoarios como *Plasmodium* spp. Al parecer este efecto es inducido por radicales oxidativos que causan la muerte y por ello se ha convertido en uno de los fármacos de preferencia en el control de malaria. En los resultados encontrados en este estudio, se observó que la artemisinina no tiene efecto directo sobre las fases de vida libre de *H. contortus*, lo que sugiere que el metabolito debe ser estudiado desde otra perspectiva, ya que una vez que artemisinina ingresa en el metabolismo del organismo sintetiza tres profármacos importantes que potencian la acción parasiticida (Klayman, 1985). La fracción hexánica mostró efectos letales por encima del 70% a baja concentración de 4mg/mL, un resultado importante considerando que con poca concentración se consiguen efectos deseables.

Borges *et al.* (2020) demostraron que el efecto ovicida de la mayoría de las plantas evaluadas ocurre con concentraciones de 10 a 100mg/mL, resultados distintos a los de este estudio con CL<sub>90</sub> a 1mg/mL, sugiriendo su importancia como potencial antihelmíntico. Además, Borges *et al.*, (2020) demostraron que en la mayoría de las plantas de la familia Asteraceae están presentes compuestos potencialmente antihelmínticos como iridoides, fenilpropanoides, taninos hidrolizables, flavonoides, saponinas, triterpenos y brevipolidos. Algunos de los metabolitos presentes en la fracción hexánica han sido relacionados con actividad nematocida, como por ejemplo los flavonoides (flavonas, flavanonas y flavonoles) y sus derivados agliconas y glicosídicos que tienen efecto sobre fases de vida libre y parásita de *H. contortus*. Dentro de los más importantes, la quercetina y apigenina extraída de *Artemisia campestris* han sido las responsables del efecto ovicida, larvicida y contra adultos de *H. contortus*. Los flavonoides, en general, han sido asociados a la inhibición del desarrollo de la larva, además impide que la L<sub>3</sub> elimine la cubierta de queratina o segunda muda, inhibiendo así la continuidad de su desarrollo. Entre los productos más relevantes se encuentra la naringenina agliconas, caempferol, miricetina, luteolina y quercetina. Se sugiere que el mecanismo de acción permite que al momento en que los flavonoides entran en contacto con la larva, se generan metabolitos secundarios que actúan como adyuvantes para dañar a la larva, formando películas con propiedades surfactantes o causando efecto oxidante sobre el parásito. Klongsiriwet *et al.*, (2015) demostraron que existe efecto sinérgico entre flavonoides y taninos para interactuar con las uniones hidrofóbicas de proteínas no covalentes que inducen la ruptura e inhibición de segundos mensajeros.

Labruzzo *et al.*, (2018) notificaron la presencia de lignanos fitotóxicos de *Artemisia arborescens* obtenidos a partir del extracto metanólico, conocidos como sesamina y ashantina, que inhiben el crecimiento de larvas en el mosquito *Aedes aegypti* a concentración de 125 mg/mL en exposición por 24 horas; el efecto en este estudio se demostró en mayor medida con la fracción hexánica de *A. cina* sobre L<sub>3</sub>.

Irum *et al.*, (2017) determinaron la actividad antihelmíntica *in vitro* e *in vivo* de *Artemisia parviflora* y *Artemisia sieversiana* en extractos metanólicos utilizando ensayos de inhibición de la eclosión de huevos, motilidad larval y efecto letal sobre L<sub>3</sub>, donde *A. sieversiana* mostró 90% de actividad letal contra L<sub>3</sub> y *A. parviflora* disminuyó la motilidad de larvas en 89% por lo que el género *Artemisia* demostró actividad nematicida sobre *H. contortus* similar a la del presente estudio.

Sprenger *et al.*, (2016) demostraron el efecto de *A. annua* sobre fases exógenas de *H. contortus*, a concentraciones entre 0.78 hasta 50 mg/mL obteniendo efecto letal de 93.22% en los ensayos de inhibición de la eclosión de huevos y 90.33% para actividad letal sobre L<sub>3</sub> a concentración de 50mg/mL, similares resultados con los encontrados en este estudio, ya que *A. cina* ha sido utilizada en vez de *A. annua* en la medicina tradicional china, sin embargo, los resultados del efecto letal está por encima del 60%, pero a diferencia de *A. annua*, las concentraciones para tales resultados son mucho menores (1mg/mL).

## 6.5 Conclusión

Se considera que el género *Artemisia* tiene potencial antihelmíntico sobre *H. contortus* y según la bibliografía encontrada, tendría actividad oxidante sobre las larvas no solo del parásito, sino de las larvas de mosquitos, lo cual plantea el efecto sinérgico de las moléculas que componen el extracto, las cuales deben ser identificadas.

---

## CAPÍTULO VII

---

### 7 Metabolitos responsables de la actividad antihelmíntica de la fracción hexánica de *A. cina* mediante ensayos biodirigidos

#### 7.1 Resumen

El objetivo de este experimento fueron establecer la actividad letal de las fracciones obtenidas a partir de la fracción hexánica de *A. cina* sobre L<sub>3</sub> *in vitro* e identificar los metabolitos responsables del efecto larvicida. Se tomaron 5 kilos de *A. cina*, colectados en prefloración en el Lab. Millenium®, México. El material vegetal se secó, maceró para obtener la fracción hexánica que fue concentrado y liofilizado. Posteriormente, se fraccionó por cromatografía en columna con sílice y se identificaron compuestos en cromatografía de capa fina y líquida. La fase móvil que se utilizó fue hexano: acetato de etilo y los compuestos con características químicas parecidas se reunieron en 187 fracciones (C1F1-C1F187), para liofilizar y evaluar su efecto letal contra L<sub>3</sub> de *H. contortus* por 24 horas. La reunión C1F76-89 mostró 100% de efecto letal sobre L<sub>3</sub>, por lo que se procesó la columna cromatográfica en fase reversa con fase móvil agua: acetonitrilo. De la columna 2 se obtuvieron 50 reuniones (C2F1-C2F50), evaluadas con L<sub>3</sub> por 24 horas. La reunión C2F21-30 y C2F31-40 mostraron 100% y 76% respectivamente de efecto letal. La CL<sub>50-90</sub> de la reunión C2F21-30 se obtuvo con 0.3 y 0.7 mg/mL, respectivamente. La identificación del compuesto responsable de la actividad antihelmíntica de la reunión C2F21-30 se analizó por resonancia magnética de protón (<sup>1</sup>H), resonancia magnética de carbono (<sup>13</sup>C), coherencia cuántica única heteronuclear (HSQC) y conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa MestRenova® (14.1.1-24571-Unión Europea) y la estructura química del compuesto mediante el programa Chemdraw- Professional 19®. El peso molecular estimado se verificó mediante espectrometría de masas. Finalmente, se realizó la búsqueda del compuesto con base en los datos SciFinder®

(CAS solution). La reunión C2F21-30 mostró ser una mezcla de dos compuestos denominados 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin en 63% y norisoguaiacina en 36%. El peso molecular es de 309 y 315m/z respectivamente. Se plantean a los lignanos 3'-demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin y norisoguaiacina como compuestos antihelmínticos con actividad probada sobre fases de vida libre de *H. contortus*.

## 7.2 Materiales y métodos

### 7.2.1 Ubicación

Los análisis fitoquímicos se realizaron en Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano de Seguros Social (CIBIS-IMSS) en Xochitepec, Mor., México, con apoyo del Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez y Dr. Manasés González Cortázar.

La separación de fracciones del extracto etanólico de *A. cina* se llevó a cabo en el laboratorio de fitoquímica de campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM con apoyo de la M en C Brígida del Carmen Camacho-Enríquez.

Los experimentos para identificar los metabolitos se llevaron a cabo en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por el Dr. Ever Arquímedes Ble González.

## 7.3 Diseño experimental

### 7.3.1 Obtención de la fracción hexánica de *Artemisia cina*

Se tomaron 2.5 Kg de *A. cina* y se realizó la extracción en solvente con 8 L de hexano, por 24 horas y se repitió el proceso tres veces. Posteriormente, se concentró en rota-evaporador industrial (Heidolph Laborota 4000, Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania) con las siguientes condiciones: 363 mbar, 100 rev/min y 37.4°C; se dejó en campana hasta deshidratarlo por 24 horas. Los



compuestos del extracto se identificaron por cromatografía en capa fina y líquida (las condiciones de la cromatografía líquida se pueden ver en el Anexo II).

### 7.3.2 Separación de la fracción hexánica por medio de cromatografía al vacío en columna- Columna 1

La fracción hexánica se empacó en columna con sílica en proporción 1:10 y se utilizó el sistema hexano: acetato de etilo en forma decreciente para el hexano hasta llegar a 100% acetato de etilo, se realizó un lavado final con metanol (Anexo II). Las fracciones recuperadas se reunieron según sus características químicas, se liofilizaron, pesaron y etiquetaron.

### 7.3.3 Evaluación de las reuniones obtenidas de la columna 1

Las reuniones obtenidas en el paso anterior se evaluaron contra L<sub>3</sub> de *H. contortus* a cuatro concentraciones: 2, 1, 0.5 y 0.25 mg/mL para determinar efecto letal y CL<sub>50-90</sub>. Las reuniones para los bioensayos fueron disueltas en agua destilada.

### 7.3.4 Obtención de material biológico (L<sub>3</sub>) de *H. contortus*

Las larvas se obtuvieron de un animal donador previamente infectado con 5,000 L<sub>3</sub> de *H. contortus* mediante la técnica de Corticelli-Lai (1963) (Anexo IV).

### 7.3.5 Separación de las reuniones efectivas- Columna 2

La reunión con mayor efecto letal se liofilizó y se empacó en una columna (Columna 2) con sílica, utilizando 500mg de sílica fase normal y 500mg de sílica fase reversa, la columna 2 se empacó junto con la muestra y se utilizó una fase móvil de agua: acetonitrilo. Los metabolitos obtenidos fueron evaluados *in vitro* sobre L<sub>3</sub> utilizando concentraciones de 1, 0.5, 0.25 y 0.125mg/mL (Anexo V).

### 7.3.6 Identificación de los metabolitos con actividad antihelmíntica

Para la identificación, se realizó el proceso de extracción y fraccionamiento a partir de 2.5 Kg de planta en fracción hexánica como se describió anteriormente, obteniendo así, la columna 3 (fase normal) y columna 4 (fase reversa). Los metabolitos recuperados a partir de la columna 4 se compararon por cromatografía líquida con los obtenidos en la columna 2, se liofilizaron, pesaron, y enviaron a resonancia magnética de protón ( $^1\text{H}$ ), resonancia magnética de carbono ( $^{13}\text{C}$ ), coherencia cuántica única heteronuclear (HSQC) y conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC).

### 7.4 Análisis de resultados

Los resultados de los ensayos biodirigidos se analizaron con el programa SAS (Versión 9, 2004; SAS Institute Inc., Cary, NC), utilizando la herramienta PROBIT. El resultado obtenido del efecto letal en  $L_3$  se analizó con el programa Statgraphics (Centurion XV) y ANOVA multifactorial con prueba de LSD para comparación de medias.

Utilizando el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6 + \mu_7 + \mu_8 + \epsilon_{ij}$$

Donde:  $Y_{ij}$ : Es la observación de la  $j$ -ésima unidad experimental del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\mu_1-8$ : Es la media del tratamiento de las reuniones obtenidas a partir de la fracción hexánica de *A. cina*

$\epsilon_{ij}$ : Es el error experimental de la unidad  $ij$ .

El análisis de los experimentos de resonancia magnética de protón ( $^1\text{H}$ ), resonancia magnética de carbono ( $^{13}\text{C}$ ), coherencia cuántica única heteronuclear (HSQC) y conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (HMBC) se realizó con el programa MestRenova® (14.1.1-24571) y la estructura química del compuesto y su masa

aproximada se realizó con el programa Chemdraw- Professional 19®. La búsqueda del compuesto se llevó a cabo mediante la base de datos denominada SciFinder®.

## 7.5 Resultados

### 7.5.1 Evaluación de las reuniones obtenidas a partir de la Columna 1

La reunión C1F76-89 mostró 100% de efecto letal sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus*, además se observó que su efecto fue concentración dependiente, para CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> fueron de 0.63 mg/mL y 1.5 mg/mL respectivamente. La reunión C1F93-116 mostró efecto letal sobre L<sub>3</sub> de 69.4±5.7 con CL<sub>50-90</sub> de 0.6 y 5.5 mg/mL, respectivamente. Los resultados de la concentración utilizada, efecto letal sobre L<sub>3</sub>, CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> de las otras reuniones se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Porcentaje de letalidad sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus* y CL<sub>50-90</sub> de las reuniones obtenidas en la columna 1 a partir de la fracción hexánica de *A. cina*

| Reuniones<br>(diluciones) | Concentración<br>mg/MI | % del Efecto<br>letal sobre L <sub>3</sub> * | CL <sub>50-90</sub> |
|---------------------------|------------------------|--|---------------------|
| <b>C1F20</b>              |                        |  |                     |
| 1                         | 2                      | 0  | -                   |
| 2                         | 1                      | 0  | -                   |
| 3                         | 0.5                    | 0  | -                   |
| 4                         | 0.25                   | 0  | -                   |
| <b>C1F21-34</b>           |                        |  |                     |
| 1                         | 2                      | 0  | -                   |
| 2                         | 1                      | 0  | -                   |
| 3                         | 0.5                    | 0  | -                   |

|                   |      |                         |               |
|-------------------|------|-------------------------|---------------|
| 4                 | 0.25 | 0                       | -             |
| <b>C1F43-52</b>   |      |                         |               |
| 1                 | 2    | 0                       | 0.4 - 0.2     |
| 2                 | 1    | 9.11±8.8 <sup>d</sup>   | -             |
| 3                 | 0.5  | 11.24±20 <sup>d</sup>   | -             |
| 4                 | 0.25 | 0                       | -             |
| <b>C1F53-64</b>   |      |                         |               |
| 1                 | 2    | 9.09±0.8 <sup>d</sup>   | 0.01 – 0.0002 |
| 2                 | 1    | 0                       | -             |
| 3                 | 0.5  | 0                       | -             |
| 4                 | 0.25 | 3.8±1.2 <sup>e</sup>    | -             |
| <b>C1F76-89</b>   |      |                         |               |
| 1                 | 2    | 100 <sup>a</sup>        | 0.63          |
| 2                 | 1    | 94.97±5 <sup>b</sup>    | -             |
| 3                 | 0.5  | 35.87±14 <sup>c</sup>   | -             |
| 4                 | 0.25 | 9.43±3.7 <sup>d</sup>   | -             |
| <b>C1F93-116</b>  |      |                         |               |
| 1                 | 2    | 69.46±5.7 <sup>b</sup>  | 0.6 – 5.5     |
| 2                 | 1    | 67.44±15.8 <sup>b</sup> | -             |
| 3                 | 0.5  | 36.84±3.6 <sup>c</sup>  | -             |
| 4                 | 0.25 | 26.69±4.1 <sup>c</sup>  | -             |
| <b>C1F129-187</b> |      |                         |               |
| 1                 | 2    | 8.51±0.5 <sup>d</sup>   | 4.15 – 14.9   |
| 2                 | 1    | 8.81±4.9 <sup>d</sup>   | -             |

|                                     |      |                        |             |
|-------------------------------------|------|------------------------|-------------|
| 3                                   | 0.5  | 1.92±1.6 <sup>e</sup>  | -           |
| 4                                   | 0.25 | 4.13±0.3 <sup>e</sup>  | -           |
| <b>Fracción de acetato de etilo</b> |      |                        |             |
| 1                                   | 2    | 32.77±1.2 <sup>c</sup> | 2.15 – 2.49 |
| 2                                   | 1    | 5.62±2 <sup>e</sup>    | -           |
| 3                                   | 0.5  | 3.88±0.5 <sup>e</sup>  | -           |
| 4                                   | 0.25 | 7.27±1.2 <sup>e</sup>  | -           |
| Agua destilada                      | 0    | 0                      | -           |

NOTA: Los ensayos se realizaron con un mínimo de 100 L<sub>3</sub> de *H. contortus* en placas de ELISA de 96 pozos y tres réplicas. <sup>a, b, c, d, e</sup> Diferencia significativa entre grupos (p<0.05).

#### 7.5.2 Evaluación *in vitro* de la reunión C1F76-89 sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus*

La reunión C2F29-30 mostró 100% de letalidad a 1mg/mL con CL<sub>50</sub> de 0.39 y CL<sub>90</sub> de 0.7mg/mL, al mismo tiempo la reunión C2F71-76 mostró 100% de efecto letal sobre L<sub>3</sub> a 1 y 0.5 mg/mL con CL<sub>50-90</sub> de 0.25 y 0.65 mg/mL, respectivamente. Además, la reunión C2F32 mostró 90% de efecto letal a 1mg/mL por lo que se demuestra que el efecto antihelmíntico que posee la fracción hexánica depende de tres reuniones que tienen características polares dadas las condiciones de separación. Los resultados de estas y demás reuniones se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Efecto letal (%) sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus*, distancia recorrida por el compuesto y el frente de la fase móvil (Rf), peso (mg), concentración a evaluar y CL<sub>50-90</sub> de las reuniones obtenidas en la columna 2 a partir de la reunión C1F76-89.

| Reunión         | Peso (mg) | Rf del analito* | [mg/mL] | %Letalidad* | CL <sub>50-90</sub> |
|-----------------|-----------|-----------------|---------|-------------|---------------------|
| <b>C2F25-28</b> |           |                 |         |             |                     |

|                 |     |      |       |                         |            |
|-----------------|-----|------|-------|-------------------------|------------|
| 1               | 5.5 | 0.22 | 1     | 96±3.6                  | -          |
| 2               | -   |      | 0.5   | 93.3±1.5                | -          |
| 3               | -   |      | 0.25  | 91.67±1.5               | -          |
| 4               | -   |      | 0.125 | 77.67±1                 | -          |
| <b>C2F29-30</b> |     |      |       |                         |            |
| 1               | 8.4 | 0.24 | 1     | 100 <sup>a</sup>        | 0.39 – 0.7 |
| 2               | -   |      | 0.5   | 96.7±1.52 <sup>a</sup>  | -          |
| 3               | -   |      | 0.25  | 86.33±9.29 <sup>b</sup> | -          |
| 4               | -   |      | 0.125 | 71.67±2 <sup>c</sup>    | -          |
| <b>C2F31</b>    |     |      |       |                         |            |
| 1               | 8.7 | 0.2  | 1     | 0                       | -          |
| 2               | -   |      | 0.5   | 0                       | -          |
| 3               | -   |      | 0.25  | -                       | -          |
| 4               | -   |      | 0.125 | -                       | -          |
| <b>C2F32</b>    |     |      |       |                         |            |
| 1               | 2.7 | 0.17 | 1     | 90±3 <sup>a</sup>       | -          |
| 2               | -   |      | 0.5   | 36.3±4.04 <sup>e</sup>  | -          |
| 3               | -   |      | 0.25  | 12.33±2.5 <sup>f</sup>  | -          |
| 4               | -   |      | 0.125 | 3.33±3 <sup>g</sup>     | -          |
| <b>C2F40</b>    |     |      |       |                         |            |
| 1               | 2   | 0.1  | 1     | 45±4.3 <sup>e</sup>     | -          |
| 2               | -   |      | 0.5   | 10.7±1.1 <sup>f</sup>   | -          |
| 3               | -   |      | 0.25  | -                       | -          |
| 4               | -   |      | 0.125 | -                       | -          |

| <b>C2F44-46</b> |     |      |       |                        |   |
|-----------------|-----|------|-------|------------------------|---|
| 1               | 3   | 0.13 | 1     | 81.3±1.5 <sup>b</sup>  | - |
| 2               | -   |      | 0.5   | 61.7±1.5 <sup>c</sup>  | - |
| 3               | -   |      | 0.25  | 37±3 <sup>e</sup>      | - |
| 4               | -   |      | 0.125 | 14±2 <sup>f</sup>      | - |
| <b>C2F49-50</b> |     |      |       |                        |   |
| 1               | 3.3 | 0.1  | 1     | 18.3±2.8 <sup>f</sup>  | - |
| 2               | -   |      | 0.5   | 12.3±1.1 <sup>f</sup>  | - |
| 3               | -   |      | 0.25  | -                      | - |
| 4               | -   |      | 0.125 | -                      | - |
| <b>C2F51-52</b> |     |      |       |                        |   |
| 1               | 4.2 | 0.2  | 1     | 18.3±1.5 <sup>f</sup>  | - |
| 2               | -   |      | 0.5   | 10.3±1.5 <sup>f</sup>  | - |
| 3               | -   |      | 0.25  | -                      | - |
| 4               | -   |      | 0.125 | -                      | - |
| <b>C2F60-61</b> |     |      |       |                        |   |
| 1               | 2.5 | 0.08 | 1     | 46±3.6 <sup>e</sup>    | - |
| 2               | -   |      | 0.5   | 15±5 <sup>f</sup>      | - |
| 3               | -   |      | 0.25  | -                      | - |
| 4               | -   |      | 0.125 | -                      | - |
| <b>C2F69-70</b> |     |      |       |                        |   |
| 1               | 2.6 | 0.78 | 1     | 23.3±9.8 <sup>f</sup>  | - |
| 2               | -   |      | 0.5   | 14.3±4.04 <sup>f</sup> | - |
| 3               | -   |      | 0.25  | -                      | - |

|                 |     |      |       |                        |                |
|-----------------|-----|------|-------|------------------------|----------------|
| 4               | -   |      | 0.125 | -                      | -              |
| <b>C2F71-76</b> |     |      |       |                        |                |
| 1               | 2.9 | 0.6  | 1     | 100 <sup>a</sup>       | 0.25 –<br>0.65 |
| 2               | -   |      | 0.5   | 100 <sup>a</sup>       | -              |
| 3               | -   |      | 0.25  | 98.33±1.5 <sup>a</sup> | -              |
| 4               | -   |      | 0.125 | 87±1.2 <sup>b</sup>    | -              |
| <b>C2F79-80</b> |     |      |       |                        |                |
| 1               | 3.1 | 0.78 | 1     | 91.7±1.5 <sup>a</sup>  | -              |
| 2               | -   |      | 0.5   | 91±1 <sup>a</sup>      | -              |
| 3               | -   |      | 0.25  | 53.67±3 <sup>d</sup>   | -              |
| 4               | -   |      | 0.125 | 10 <sup>f</sup>        | -              |
| Agua            | -   |      | -     | 0                      | -              |

NOTA: Los ensayos se realizaron con un mínimo de 100 L<sub>3</sub> de *H. contortus* en placas de ELISA de 96 pozos y tres réplicas. a, b, c, d, e, f, g Diferencia significativa entre grupos (p<0.05).

La reunión C2F29-30 tuvo el mayor rendimiento respecto a las demás reuniones, además de los resultados favorables sobre la L<sub>3</sub>, por lo que se procedió a identificar los compuestos que la conforman.

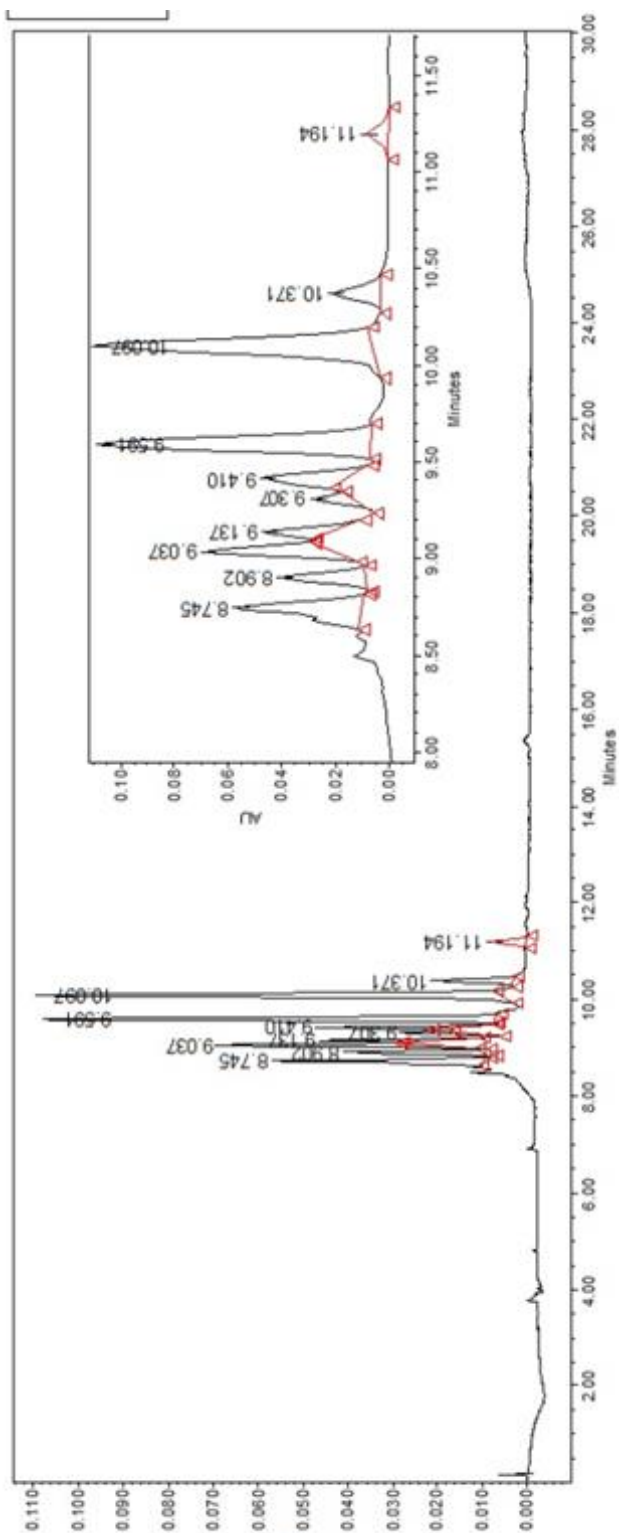
### 7.5.3 Identificación de los metabolitos con actividad antihelmíntica sobre *H. contortus*

La fracción hexánica mostró varias familias de compuestos, entre ellas flavonas, flavonoles, flavonoides, terpenos, como se muestra en la figura 11. La mayoría de los compuestos en la fracción hexánica de *A. cina* se encontraron en el intervalo de a tiempos de retención de 8.50 a 11.50. En el cromatograma de la figura 11 se



observa un compuesto fenólico a 8.168 minutos y dos flavonoles a 9.590 y 10.098 minutos de inyección (Figura 11).

Figura 16. Espectro de cromatografía líquida de la fracción hexánica de *A. cina*



En la figura 12 se observa el espectro de resonancia magnética de protón ( $^1\text{H}$ ), donde se muestra la molécula identificada denominada 3'-demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin con las constantes de acoplamiento en azul. El número de insaturaciones que posee el compuesto, la presencia de singuletes, dobletes o tripletes se encuentra en el cuadro 13 del Anexo VI, y las estructuras moleculares propuestas se observan en la figura 20 (Anexo VI). El análisis del espectro de RMN  $^1\text{H}$  se inició observando cada señal, identificando los desplazamientos químicos, el área bajo la curva y la intensidad. En el espectro se identificaron 13 señales para los 13 hidrógenos del compuesto. Las señales denominadas 1' a 6' corresponden a los hidrógenos del anillo bencénico.

En la figura 13 se observa el espectro de resonancia magnética de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) en el cual se deduce la estructura del esqueleto carbonado observando entornos magnéticos de los átomos de carbono. Se observaron 18 señales correspondientes de campo alto a campo bajo a desplazamientos químicos  $\delta(\text{ppm})$ : 51.3, 42.3, 30.7, 36.1, 116.2, 144.5, 144.3, 118.1, 130.9, 128.9, 16.3, 16.3, 139.9, 131.14, 115.8, 156.3, 115.8, 131.14. La identificación de los tipos de carbono CH,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  y C se realizó con el experimento DEPT que se muestra en la figura 14. En el experimento DEPT se identificaron 17 señales de carbonos adyacentes, CH,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$  (Figura 14).

La asignación de los núcleos de hidrógeno y de carbono realizada con los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y el experimento DEPT se corroboró por medio de los espectros bidimensionales HSQC y HMBC. En el espectro HSQC (figura 16) se determinaron los hidrógenos de la molécula que están unidos directamente a un núcleo de carbono, por medio de señales de correlación entre una señal del espectro de RMN  $^1\text{H}$  con la señal correspondiente del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . En este espectro se observan 13 señales de correlación, de forma tal que las señales de  $\delta(\text{ppm})$ : 6.67 (1H, d, 8.4) correlaciona con el carbono en  $\delta$  115.8 y corresponden a los CH equivalentes C3' y C5' del anillo fenilo. Las señales a  $\delta(\text{ppm})$ : 6.82 (1H, d, 8.4) correlaciona con el carbono en d 131.14 y corresponde al C2' y C6'. La señal en  $\delta$

(ppm): 1.86 (m) correlaciona con el carbono en  $\delta$ 42.3, que corresponde al CH equivalente del C2. Además, la señal en  $\delta$  (ppm): a) 2.8 (1H, dd, 5.1, 16.1) y b) 2.3 (1H, dd, 6.6, 16.1) correlaciona con el carbono en  $\delta$ 36.1, que corresponde al CH equivalente del C4a y C4b.

En el espectro bidimensional HMBC se obtuvieron señales que representan las conectividades entre  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en un rango más amplio, hasta tres enlaces. El espectro que se obtuvo se muestra en la figura 17. En este espectro se identificaron 11 señales que proporcionan información sobre la conectividad entre hidrógenos y carbonos unidos por uno, dos y tres enlaces.

La masa estimada del compuesto denominado 3'-demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin es de 284.14m/z, se evaluó por medio de espectrometría de masas la cual se muestra el espectro en la figura 18, el espectro que se observa es  $[\text{M}+\text{Na}+2\text{H}^+]=309$  m/z. La fórmula condensada del compuesto se contempla como  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3$ .

Figura 17. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.

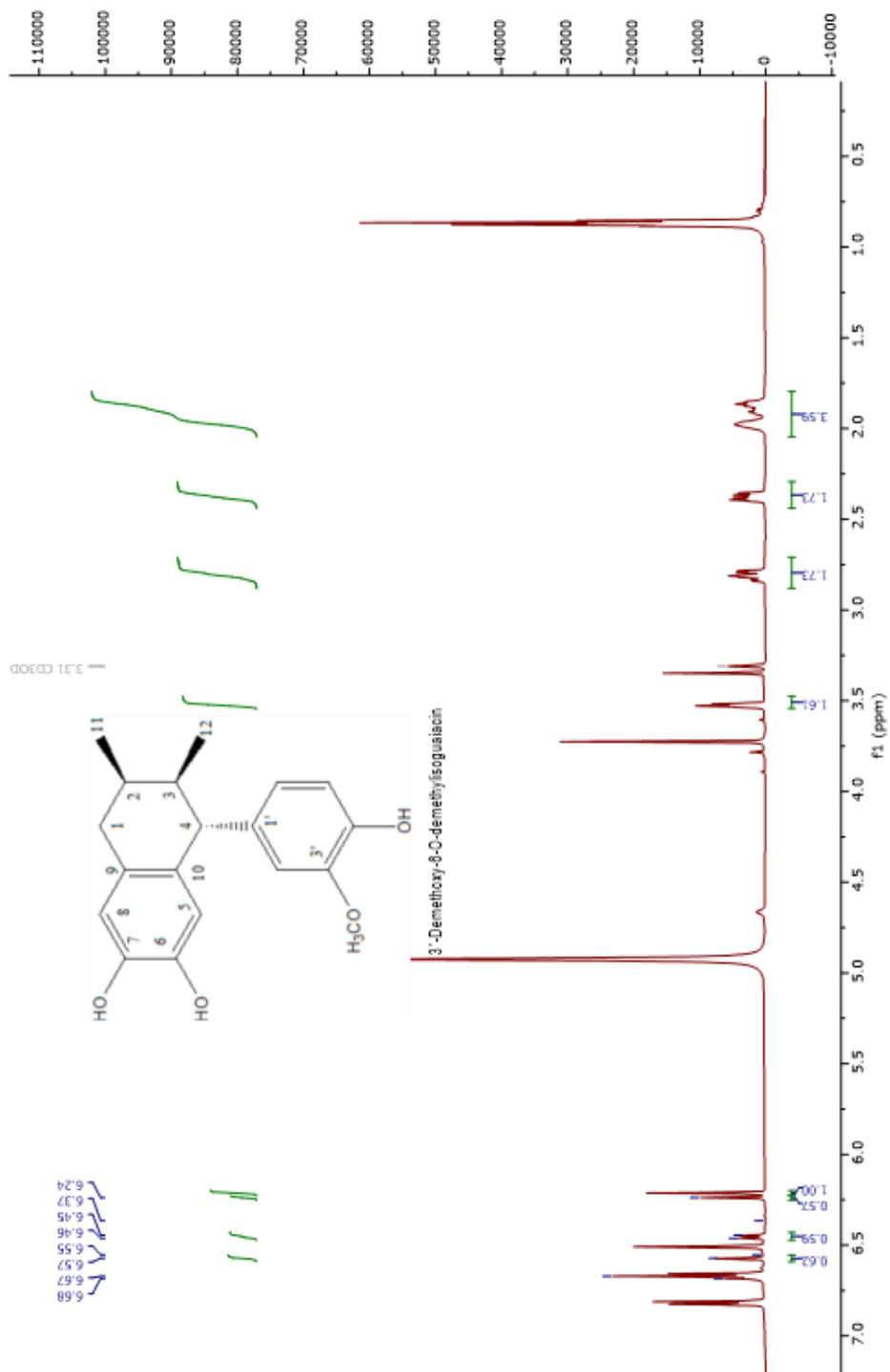


Figura 18. Espectro de  $^{13}\text{C}$  de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.

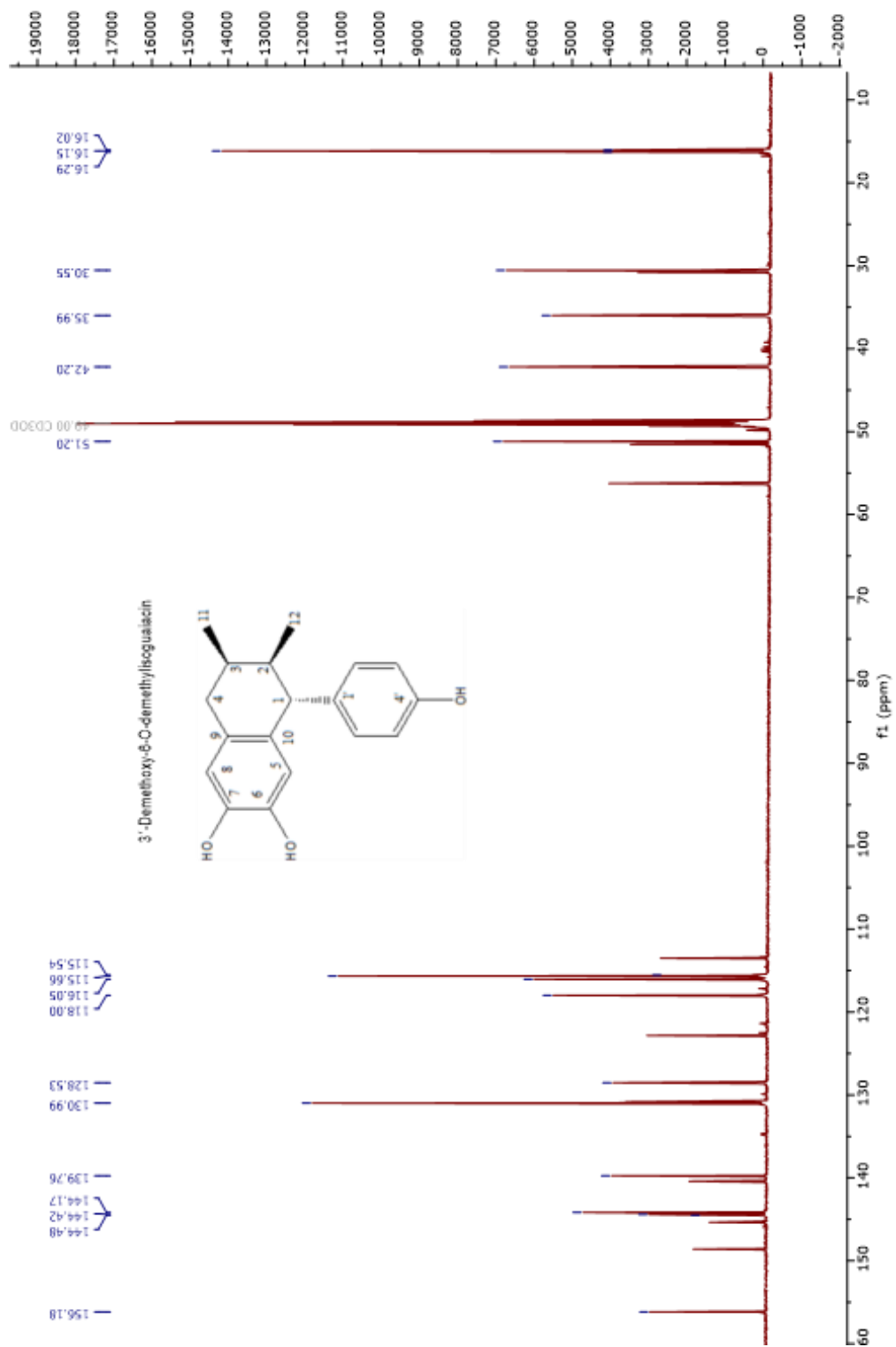


Figura 19. Espectro  $^{13}\text{C}$  de DEPT de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.

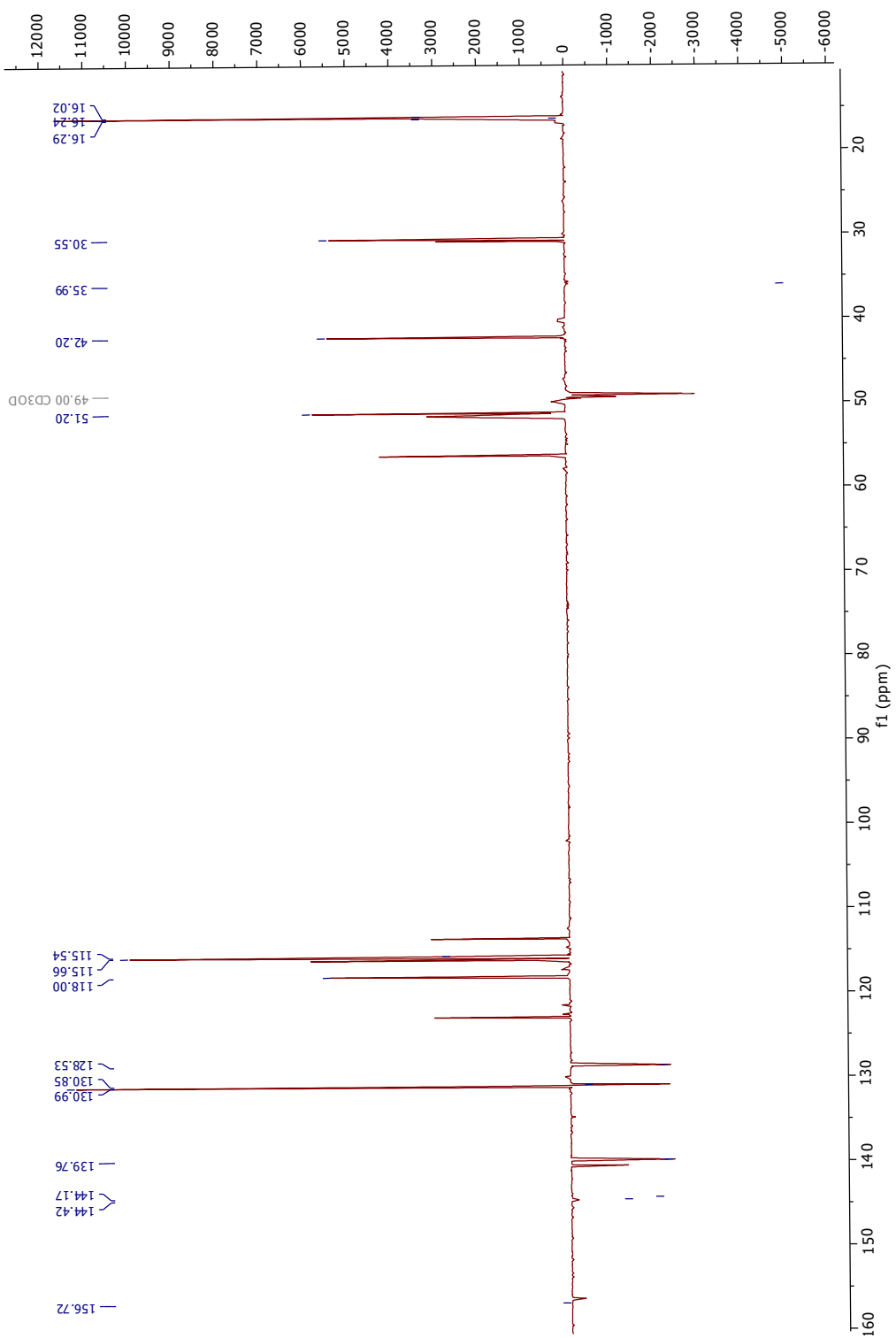


Figura 20. Espectro de RMN de COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.

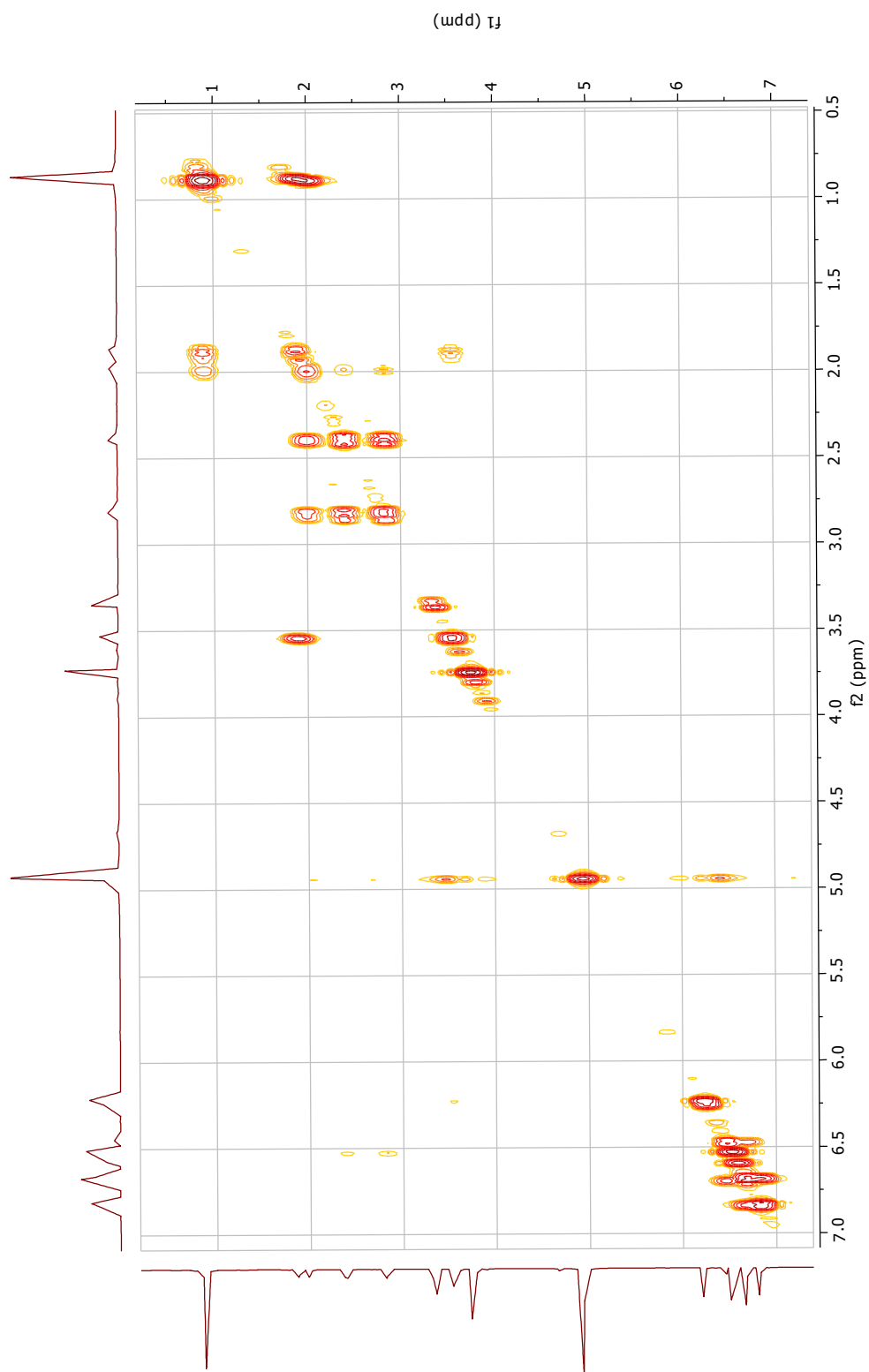




Figura 21. Espectro de RMN de HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.

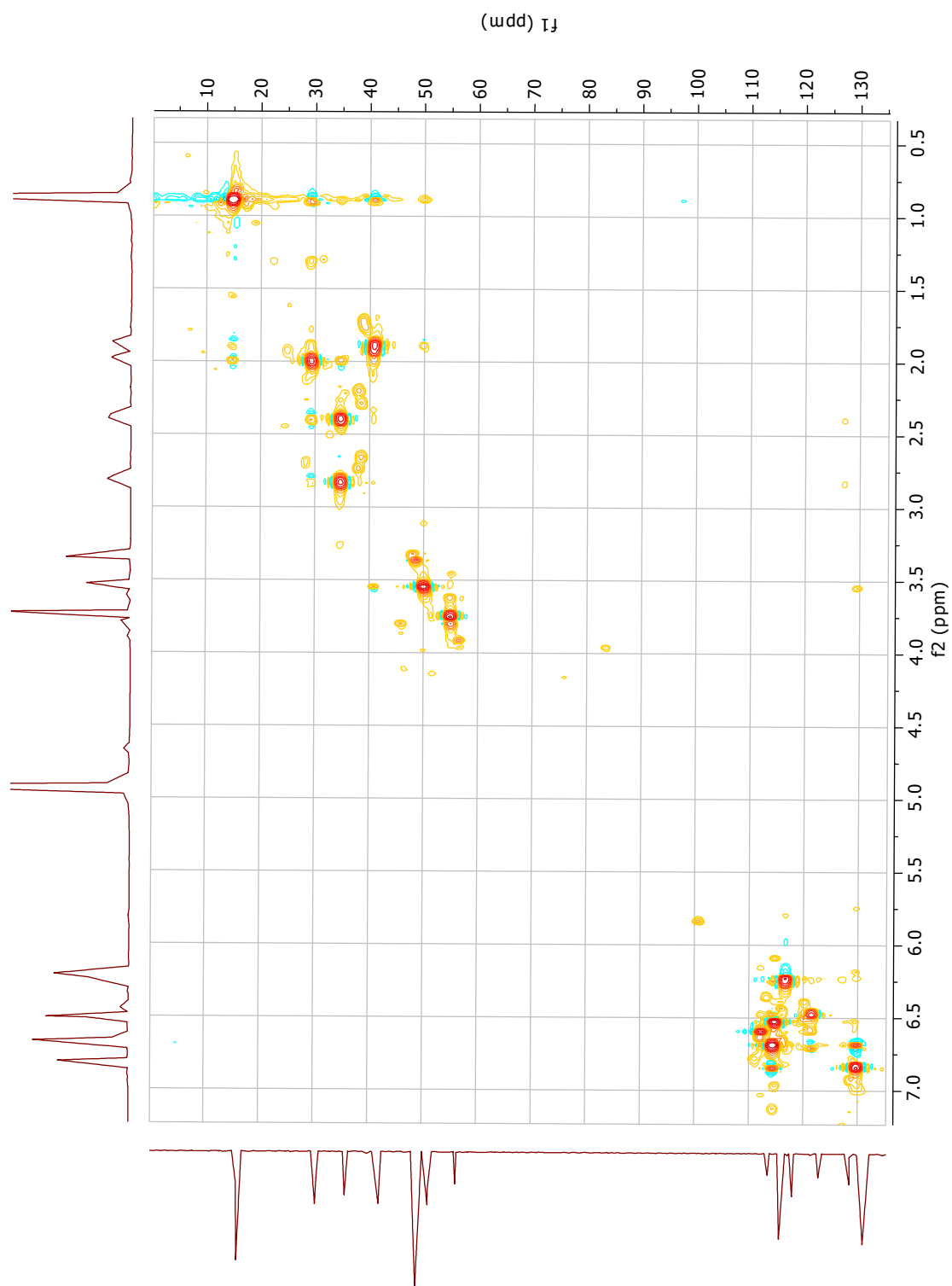


Figura 22. Espectro de RMN de HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de 2,3-naphthalenediol, 5,6,7,8-tetrahydro-5-(4-hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.

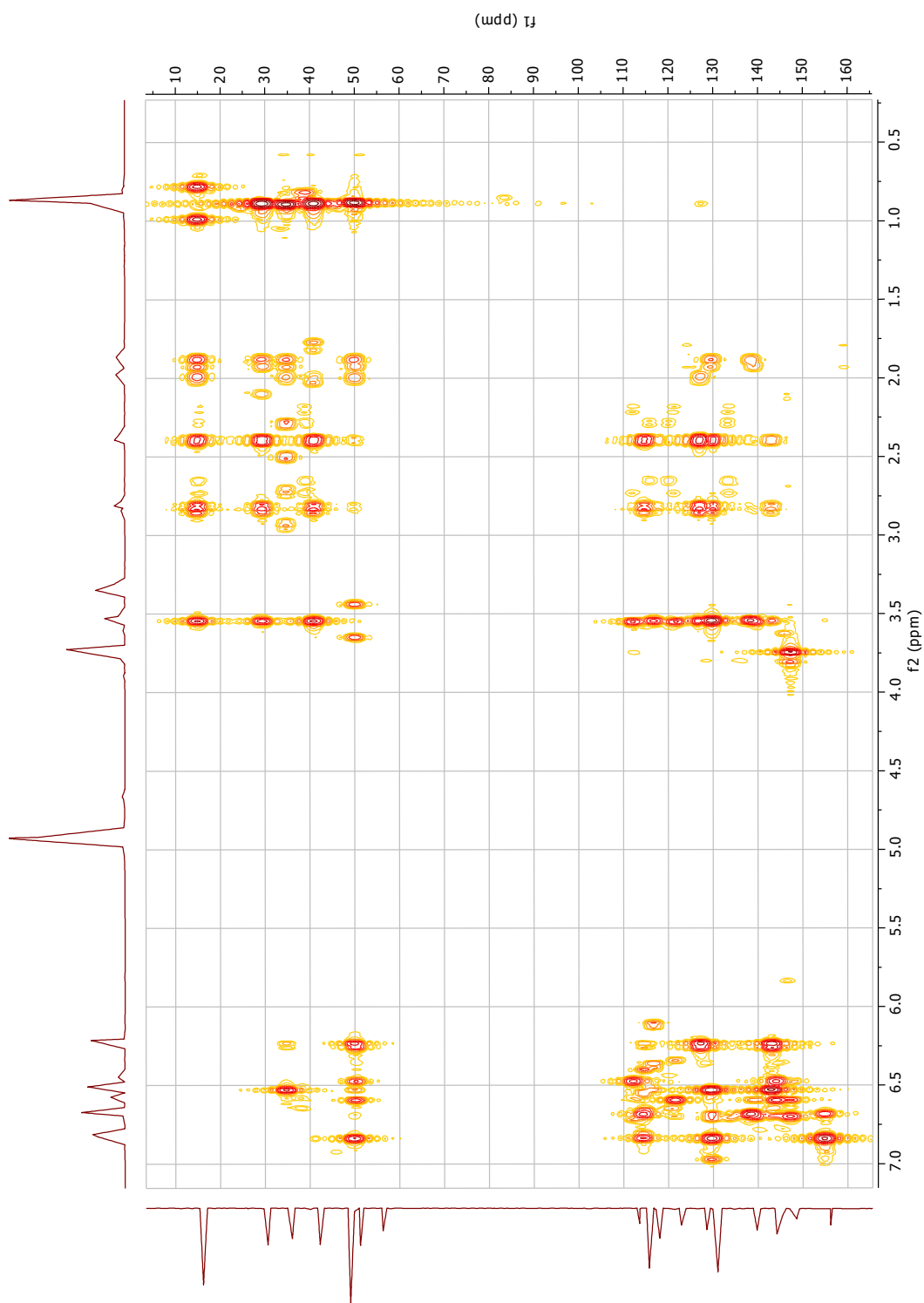


Figura 23. Espectrometría de masas de 2,3-naphthalenediol, 5, 6,7,8-tetrahydro-5-(4—hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl.

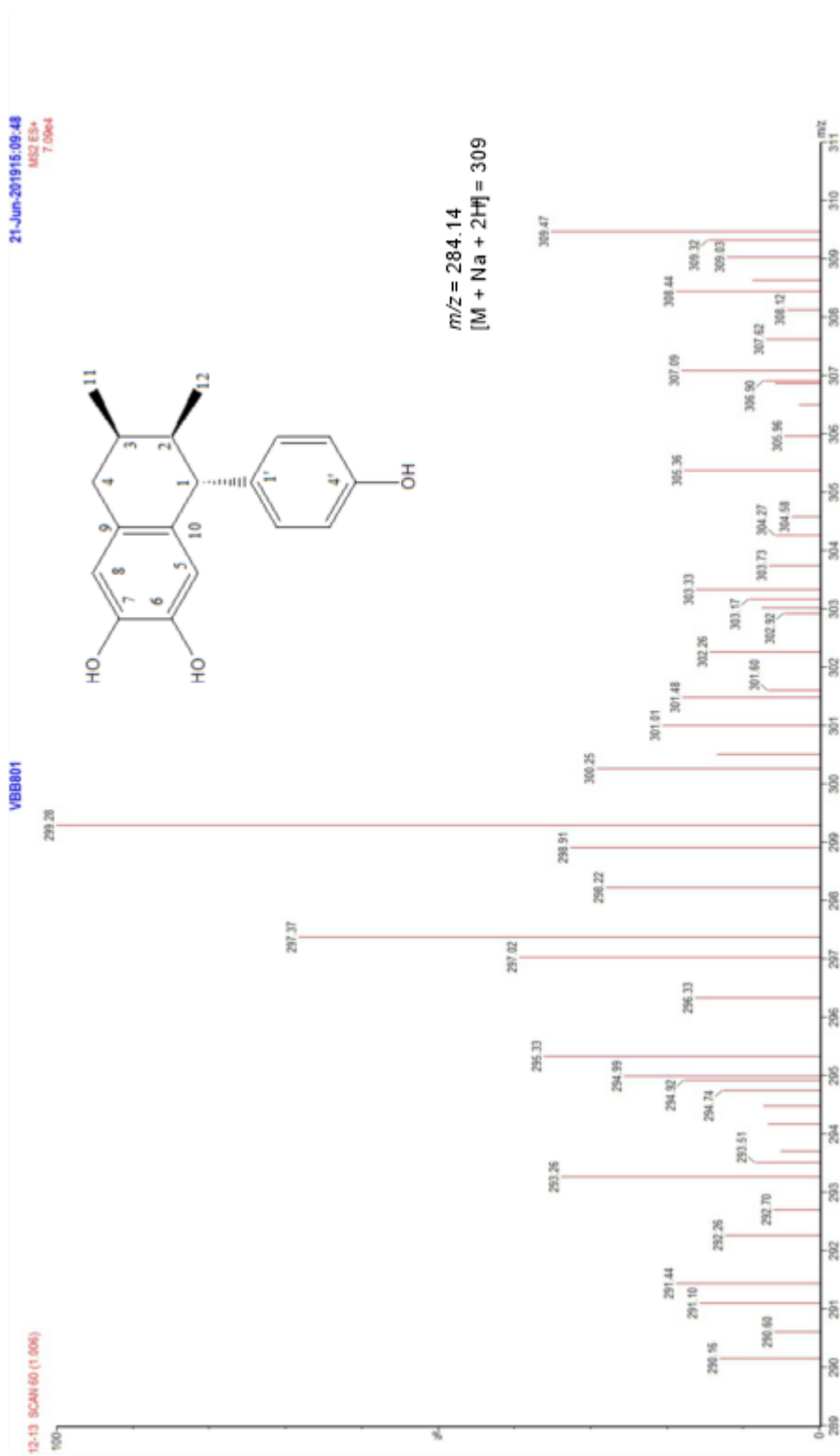


Figura 24. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de norisoguaiacina

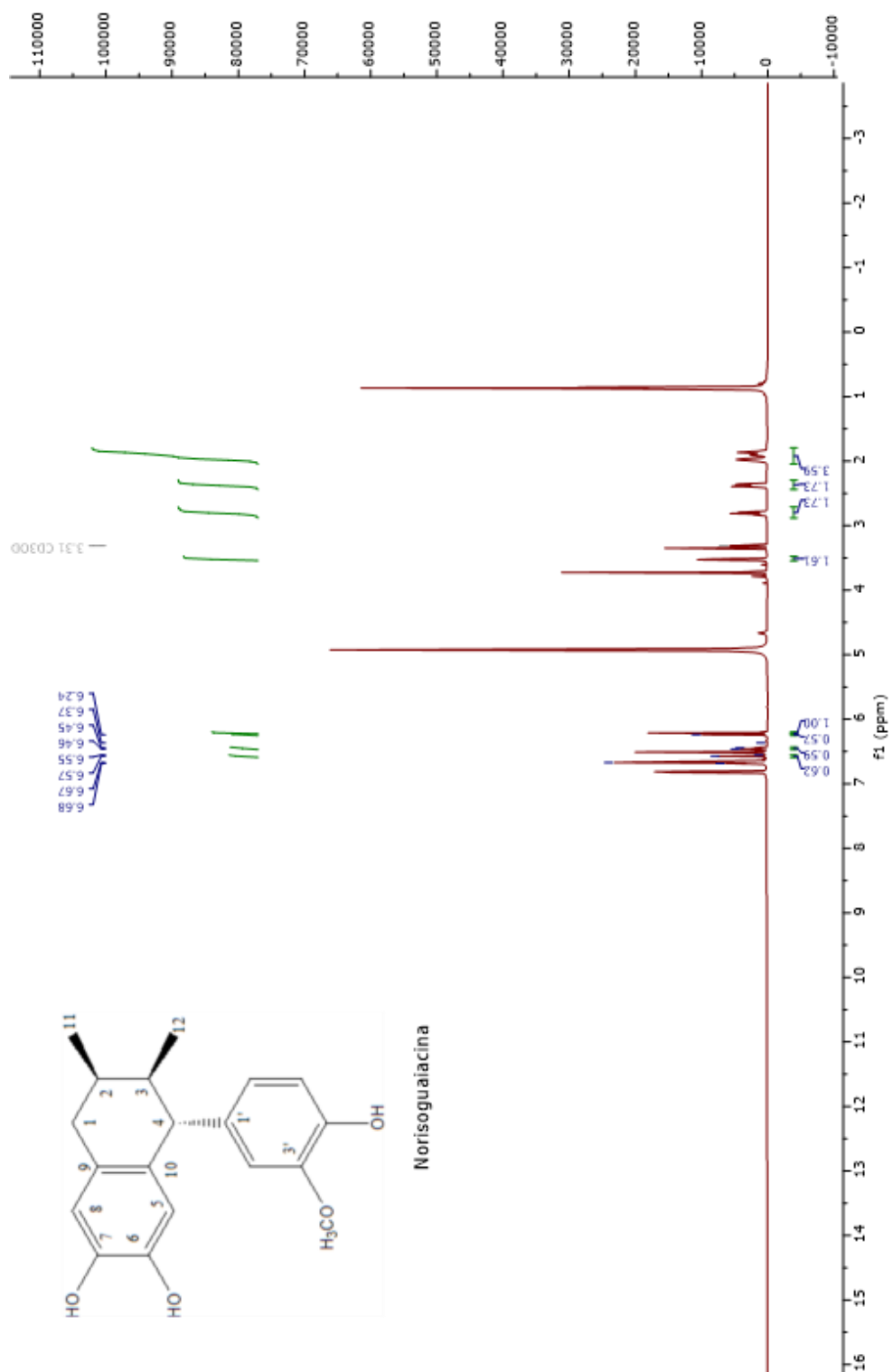


Figura 25. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de norisoguaiacina

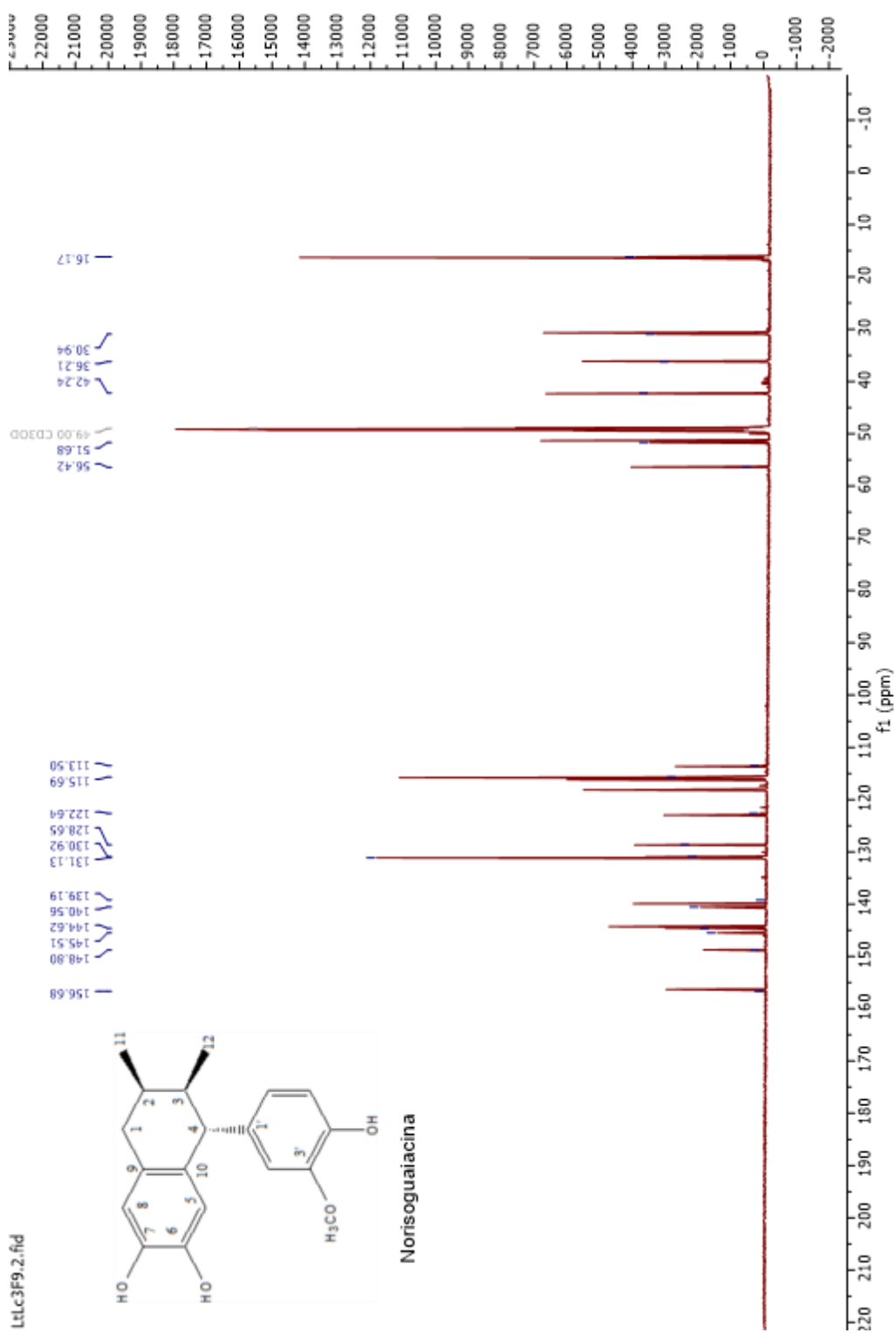
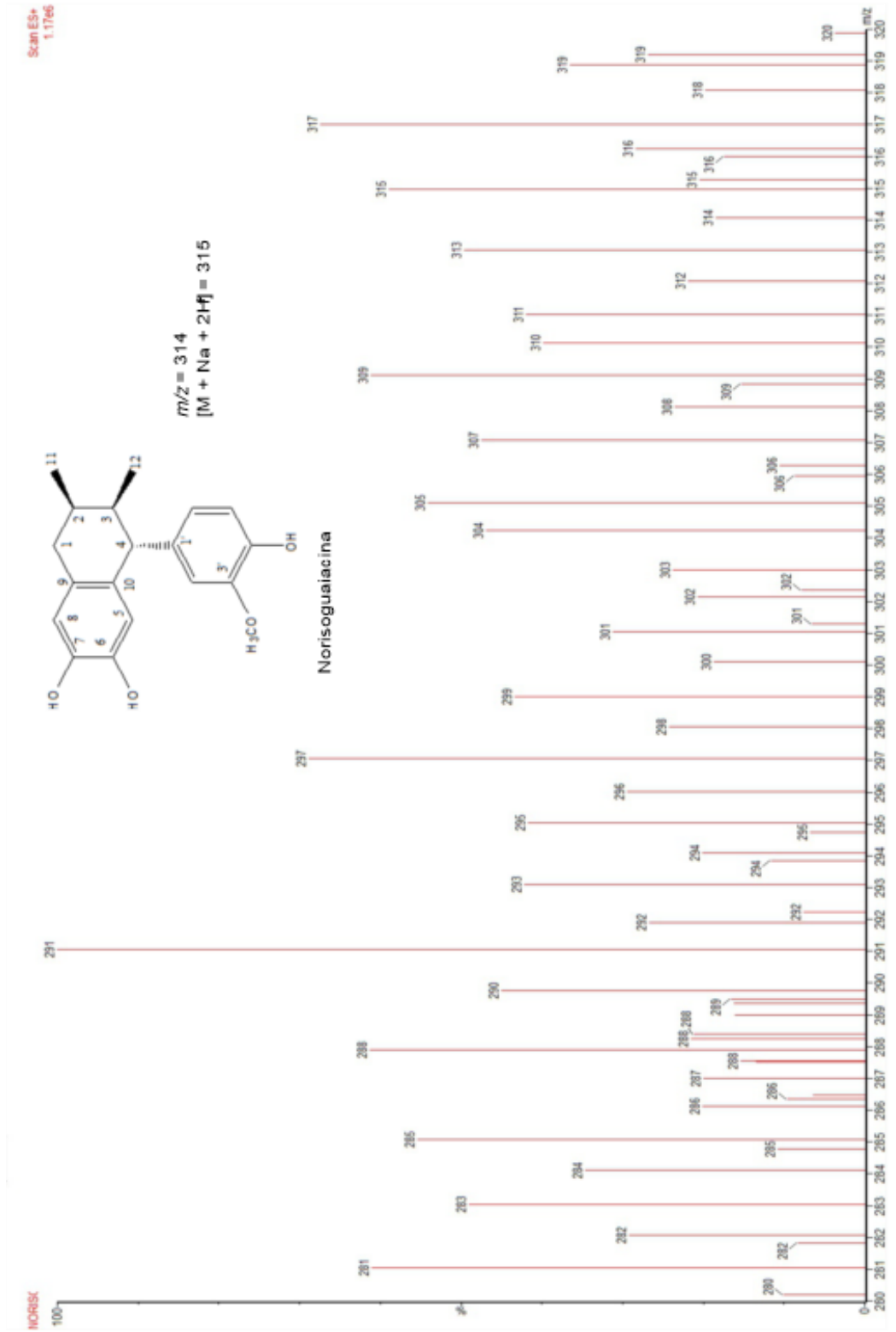


Figura 26. Espectrometría de masas de norisoguaiacina



## 7.6 Discusión

El compuesto descrito como 2,3-Naphthalenediol, 5,6,7,8-tetrahydro-5-(4-hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl-, [5R-(5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ )]-, es también llamado (5R,6R,7R)-5,6,7,8-Tetrahydro-5-(4-hydroxyphenyl)-6,7-dimethyl-2,3-naphthalenediol y su nombre común es 3'-demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin, el cual se encontró en una proporción de 66% en la mezcla, dicho compuesto fue patentado en 1989 con el número CAS:71113-16-1. Konno *et al* (1989) encontró dicho lignano a partir del análisis fitoquímico de la planta *Larrea tridentata*, es hasta 1990 donde se describe la estructura química del compuesto por medio de RMN <sup>1</sup>H (Konno *et al.*, 1990). Los lignanos han mostrado gran actividad como metabolitos secundarios producidos bajo el estrés de la planta y con objetivo de defensa por ejemplo sobre hongos o insectos, incluso sobre parásitos. El lignano descrito, fue reportado nuevamente por Gnabre *et al.*, (1995) con actividad antiviral para humanos, al igual que el anterior autor, extraído de la planta *Larrea tridentata*. En 1999 Gnabre (1999), notificó la patente del compuesto evidenciando su actividad antiviral. Además de ello, Garza González *et al.*, (2015) notificaron actividad antibacteriana del mismo compuesto y lo demuestra como una alternativa para el control de bacterias con multi-resistencia. Garza-González *et al.*, (2015) demostraron que 3'- demetoxi-6-O demetil isoguaiacina extraída a partir de *Larrea tridentata* inhibe la propagación y el crecimiento de *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Mycobacterium tuberculosis* resistente a la isoniacida y cobra importancia, porque al igual que las parasitosis, la resistencia a antibacterianos es un fenómeno mundial que aqueja la mayoría de la población.

Favela-Hernández *et al.*, (2015), demostraron que el lignano que aislaron en este estudio se acercó al mecanismo de acción del efecto observado sobre *S. aureus* utilizando la metodología de microarreglos, donde se demostró que la actividad del lignano está situada en la membrana celular que afecta las proteínas de transporte de unión a ATP o también denominadas ABC, lo cual, impide a la bacteria utilizar el

ATP y le causa la muerte. Dicho mecanismo es novedoso, ya que ningún antibacteriano posee este mecanismo de acción y puede ser una alternativa para las nuevas terapias de control.

Aunado a los beneficios que tiene 3'- demetoxi-6-O demetil isoguaiacina, Luna-Vázquez *et al.*, (2018) demostraron que el compuesto es capaz de inducir la relajación del músculo liso vascular y por ende considerarse como fármaco antihipertensivo y se planteó que el posible mecanismo de acción va relacionado con la participación de la vía de óxido nítrico (ON) y con la expresión de segundos mensajeros como guanosin monofosfato cíclico (GMPc) y la alteración de los canales de potasio sensibles a H<sub>2</sub>S y ATP en la cascada fisiológica de vasodilatación. Aunado a lo anterior, se demostró que existe una vía de vasodilatación independiente del endotelio que aún no está establecida y que puede considerarse como un segundo mecanismo de acción.

El 34% restante de la mezcla se identificó como norisoguaiacina, la cual tiene un grupo metoxilo en el carbono 3', para lo cual Pardini *et al.*, (1973), demostraron el efecto del lignano norisoguaiacina sobre la inhibición del sistema de transporte de electrones de la mitocondria, el lignano se obtuvo a partir de *Larrea divaricata* el cual mostró que inhibe la enzima NADH oxidasa en la mitocondria del corazón de bovinos, además de la enzima succinoxidasa, sin embargo, demostraron que no inhibe el citocromo oxidasa. En 1974, Gisvold y Thaker demostraron la obtención de los lignanos: ácido dihidroguaiaretico, norisoguaiacina y 3'-demethoxyisoguaiacina a partir de *Larrea divaricata* utilizando complejos de molibdato de sodio para el aislamiento. Además, este lignano en particular inhibe la enzima formiltetrahidrofolato sintetasa y la carboxilesterasa, esta última permite que norisoguaiacina inhiba la fagocitosis y se adhiera a varios sitios de unión que impidan reacciones metabólicas importantes a nivel mitocondrial.

Gnabre *et al.*, (1996) observaron que norisoguaiacina posee propiedades antivirales, específicamente anti-VIH, enfermedad de importancia humana. Así



mismo, Torres *et al.*, (2003) demostraron que los lignanos obtenidos a partir de *Larrea nítida* como nor-isoguaiacina y ácido meso-nor-dihidroguaiaretico poseen actividad antioxidante cuando se utilizan como resina o como compuestos puros, el estudio se llevó a cabo sobre transportadores ABTS los cuales derivan radicales catiónicos.

Schmidt *et al.*, (2012) encontraron que el lignano descrito tiene propiedades anti protozoarias, utilizaron el extracto en diclorometano de *Larrea tridentata* y lo desafiaron sobre *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum* y demostraron que si bien el lignano causaba efectos citotóxicos sobre los mioblastos de las ratas a dosis de 25.4µg/mL, las dosis terapéuticas (DL<sub>50</sub>) fueron de 2.8, 14.6, 5.2, 2.9 ug/mL respectivamente para cada parásito. El lignano de mayor presencia y más activo de *L. tridentata* se describió como ácido meso-nordihidroguaiaretico al cual también se le atribuyen propiedades antiinflamatorias. Norisoguaiacina fue reportada en el 2014 por Song *et al.* como un metabolito que actúa sobre las hormonas femeninas, así que también se consideró como un fitoestrógeno, el cual tiene su aplicabilidad práctica en la prevención del cáncer de mama y uterino, además de disminuir los síntomas característicos de la menopausia y su subsecuente reducción hormonal. Se plantea a norisoguaiacina como suplemento en la dieta humana a través de alimentos funcionales que posean este lignano para prevenir cáncer femenino y síntomas menopáusicos.

En el presente estudio se demostró que los lignanos 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacina y norisoguaiacina poseen actividad antihelmíntica que no ha sido reportada por otros autores, aunque el mecanismo de acción es aún desconocido, inducen la muerte de la larva 3 de *H. contortus* a las 24 horas post-exposición. Otros estudios como el de De Paula Carlis *et al.*, (2019) demostraron el efecto antihelmíntico del extracto crudo de las frutas de *Piper cubeba* sobre huevos (inhibición de la eclosión de huevos), L<sub>3</sub> mediante el ensayo de inhibición de la migración e inhibición del desarrollo larvario, el extracto inhibió el 100% de la migración larvaria a concentraciones de 83 µg/mL. La purificación del compuesto

responsable de la actividad biológica se llevó a cabo por columna cromatográfica en sílica gel donde se identificó a los lignanos hinoquinina, cubebina y dihidrocubebina. Dichos compuestos tienen en común que son metabolitos secundarios de la familia de los lignanos, sin embargo, son compuestos diferentes a los reportados en este estudio.

García *et al.*, (2018) reportaron la actividad antihelmíntica de *Larrea tridentata* sin embargo los compuestos responsables de la actividad antihelmíntica se identificaron como flavonoides: sesamina, galocatequina, peonidina 3-rutinosido, metil galangina, epigallocatequina 7-o-glucuronido y epigallocatequina, sin embargo, los lignanos reportados en la misma planta no reportaron actividad.

### 7.7 Conclusión

Se considera a isoguaiacina y norisoguaiacina como compuestos responsables de la actividad antihelmíntica in vitro sobre huevo y L<sub>3</sub> de *H. contortus*.

---

## CAPÍTULO VIII

---

### 8 Experimento 4: Evaluar la fracción más activa de *A. cina* en cabras con infección natural de *H. contortus*

#### 8.1 Resumen

El objetivo de este experimento fue evaluar la fracción hexánica de *A. cina* en cabras con infección natural de *H. contortus*. Este estudio se llevó a cabo en el rancho Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro, México. Se utilizaron 200 cabras entre dos y cinco años en parto. Al día 0, se colectaron muestras heces y se estimó el índice FAMACHA©, para evaluar la infección parasitaria. Se observó que el 60% de la infección correspondía al género *Haemonchus* y el restante al género *Teladorsagia*. Los datos de carga parasitaria se distribuyeron totalmente al azar por medio del programa Statgraphics (Centurion XV®) para la distribución aleatoria de dos grupos de 100 animales cada uno. En el día 7 se realizó el tratamiento vía oral con la fracción hexánica de *A. cina* a dosis de 4 mg/Kg, y se designó un grupo control de 100 cabras sin tratar. Los datos del número de hpg obtenidos se ajustaron a logaritmo base 10 y se analizaron con el programa Statgraphics (Centurion XV®), utilizando un diseño completamente al azar con prueba de LSD para comparación de medias. Los muestreos se realizaron en los días 14, 30, 100, 130 y 160 post-tratamiento. El conteo de hpg en heces del grupo tratado con fracción hexánica mostró 28% de reducción en el día 30. El indicador FAMACHA© mejoró de forma notable a 2.4 en el día 30. Así mismo, en el día 100 se observó un ligero incremento de la carga parasitaria, pero al día 130 y 160 no se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), respecto al grupo control ( $p > 0.05$ ). El indicador FAMACHA© se mantuvo en el nivel 2 para ambos grupos después del día 14 postratamiento. Se plantea a la fracción hexánica como potencial antihelmíntico en infecciones naturales, así como conocer el efecto sobre el parásito adulto de otros géneros de nematodos gastroentéricos.

## 8.2 Materiales y métodos

### 8.2.1 Ubicación

Este experimento se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Querétaro, México, campus Amazcala con las cabras en producción del rancho, bajo la colaboración del Dr. Héctor Andrade-Montemayor.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM.

### 8.2.2 Cabras

Se utilizaron doscientas cabras de raza Alpina y Anglonubiana, en el último tercio de gestación, edad entre 3 y 7 años, alimentadas en pastoreo y positivas a nemátodos gastroentéricos. Las cabras se encontraron en condiciones de semi-estabulación, pastaban y ramoneaban durante el día. La suplementación se llevó a cabo con una ración totalmente mezclada realizada en el mismo rancho. La infección por nematodos fue confirmada por técnica de McMaster y la identificación de géneros por coprocultivo.

### 8.2.3 Diseño experimental

Antes del tratamiento (día 0), las cabras se asignaron en dos grupos totalmente al azar con 100 cabras cada uno con el apoyo del programa Statgraphics (Centurion XV®) (día 0), el criterio de selección que se utilizó fue la carga parasitaria. Al día 7 el primer grupo recibió fracción hexánica de *A. cina* (5 mg/Kg) vía oral, única dosis, el segundo grupo actuó como testigo, no se administró ningún tratamiento. El color de la mucosa ocular fue evaluado por medio de FAMACHA®. La condición corporal fue evaluada siguiendo las indicaciones de Urrutia y Gámez (2006).

Se realizaron evaluaciones postratamiento a los días 14, 30, 100, 130 y 160.

Las cabras utilizadas se encontraban en el día 120 de gestación aproximadamente, esto en el momento del día 0 de muestreo, se encontraban en pastoreo diurno de cinco horas, sin suplementación. Los cabritos se destetaron al día 30 de la lactancia y las lactancias permanecen aproximadamente por 211 días.

#### 8.2.4 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de huevos por gramo (hpg) se llevaron a logaritmo base 10 y posteriormente las medias de hpg de los tratamientos se compararon utilizando un análisis ANOVA, con prueba de Tukey utilizando el software Statgraphics (Centurion XV®).

Utilizando el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu_1 + \mu_2 + \epsilon_{ij}$$

Donde:  $Y_{ij}$ : Es la observación de la  $j$ -ésima unidad experimental del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\mu_1$ : Es la media del tratamiento con fracción hexánica de *A. cina*

$\mu_2$ : Es la media del tratamiento del grupo sin tratamiento

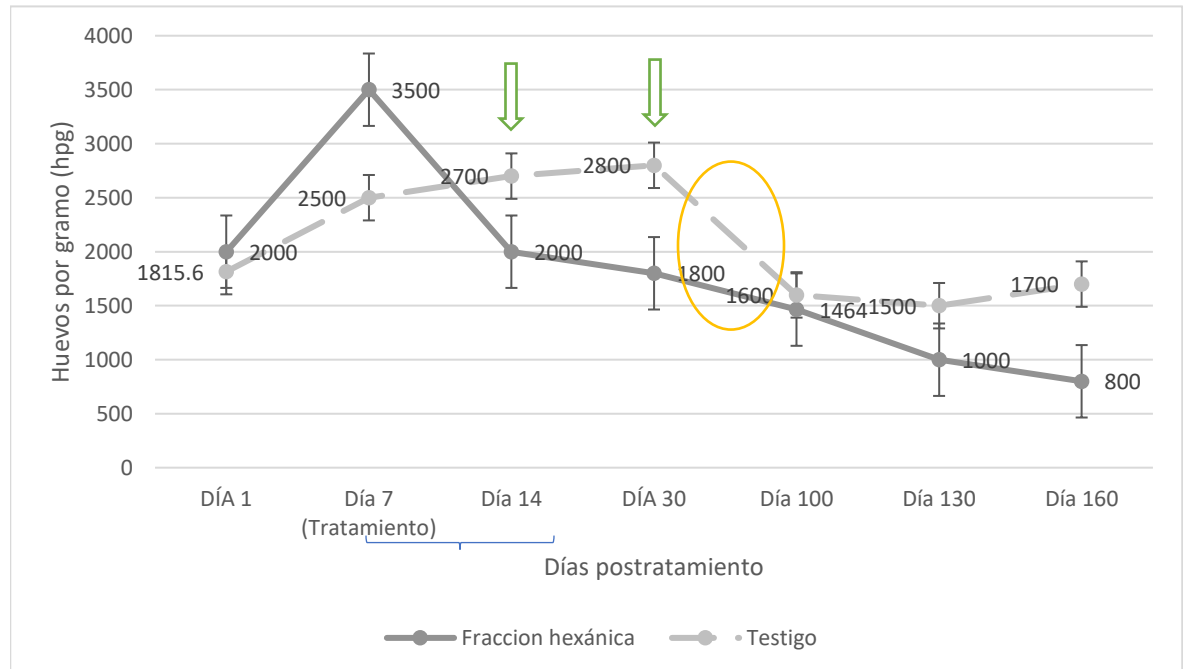
$\epsilon_{ij}$ : Es el error experimental de la unidad  $ij$ .

### 8.3 Resultados

La fracción hexánica de *A. cina* mostró reducción en el conteo de hpg después del día 7 postratamiento como se muestra en la figura 22. Respecto al grupo testigo se observó que la dinámica de la liberación de huevos por gramo disminuye después del día 30, pero vuelve a incrementar a partir del día 100, en la medida que el régimen de lluvias vuelve a iniciar. Las cargas más altas se observan al día 7 (día de tratamiento) que coincide con la primera o segunda semana posparto de las cabras. La evaluación de los coprocultivos mostró que el 80% de las larvas

corresponden a *Haemonchus sp.*, mientras que el porcentaje restante corresponden a *Teladorsagia sp.*

Figura 27. Huevos por gramo eliminados en cabras tratadas con la fracción hexánica de *A. cina* sobre la infección natural por nemátodos gastroentéricos



↓ La flecha indica una unidad experimental muerta en el grupo testigo

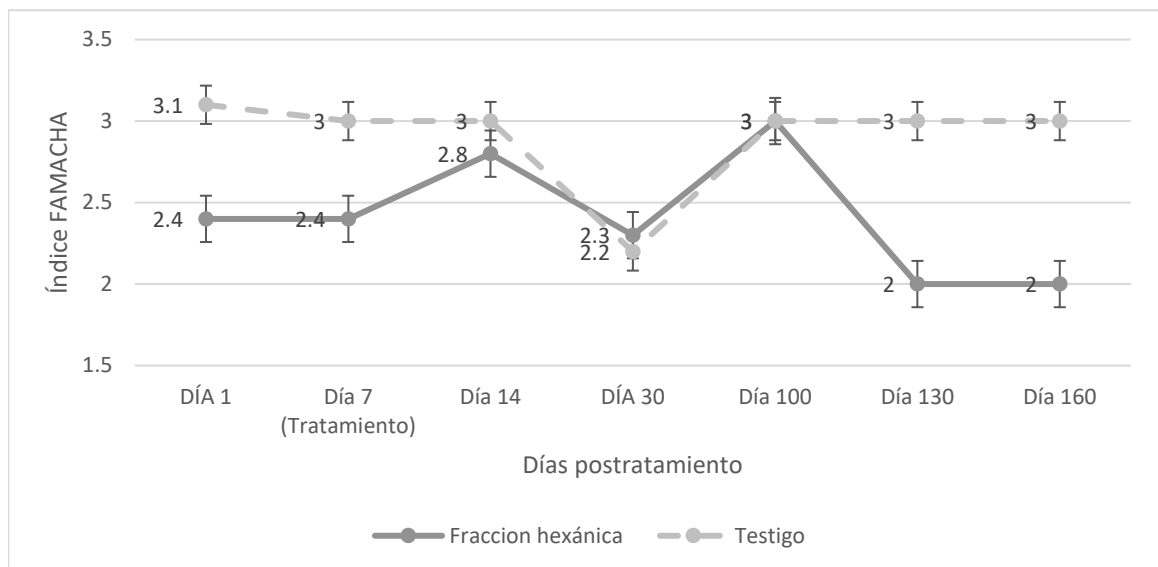
— La línea azul indica las fechas de partos

El círculo amarillo indica el tiempo en que los caprinos alcanzaron el pico de lactancia

Respecto al parámetro FAMACHA® se observó que las cabras tratadas con la fracción hexánica de *A. cina* muestran una mejora significativa y mantienen un promedio de 2. Sin embargo, los animales del grupo testigo muestran promedio de 3, por lo cual son continuamente evaluados para evitar muertes por parasitismo. Queda evidenciado que las dos semanas después del parto y las del pico de

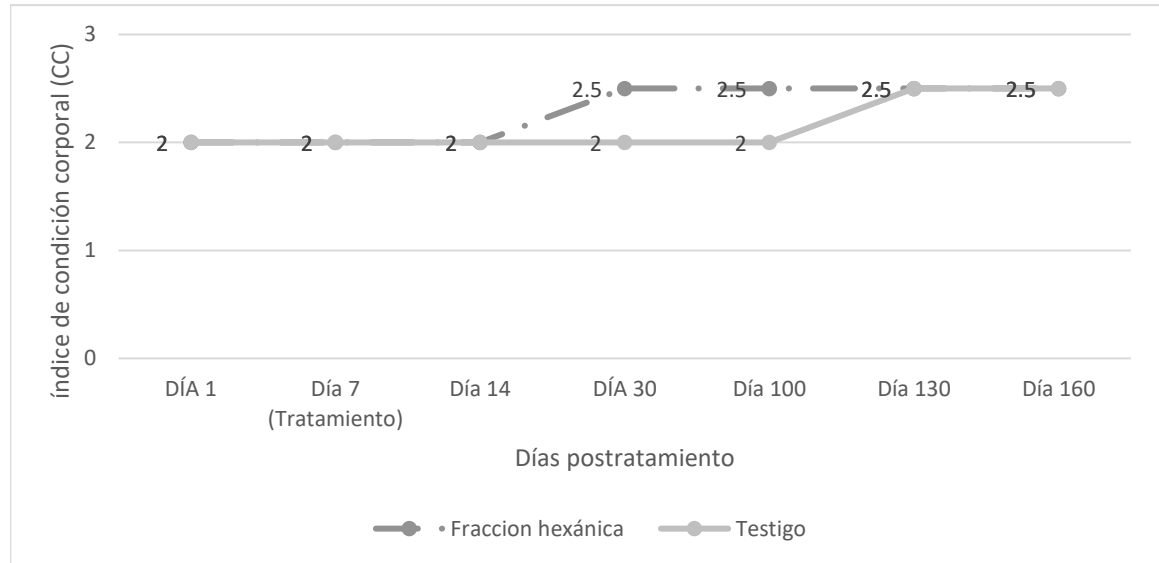
lactancia (3-4 semana postparto) tienden a un parámetro de 2.3 a 3.1 en ambos grupos, pero el tratamiento con fracción hexánica coadyuva a mejorar el parámetro hasta 2 y mantenerlo hasta por 160 días.

Figura 28. Dinámica de FAMACHA© de las cabras tratadas con fracción hexánica de *A. cina* y testigo en infección natural por nemátodos gastroentéricos



En la figura 24 se muestra la dinámica de condición corporal de las cabras infectadas de forma natural con nemátodos gastroentéricos, el grupo desafiado con la fracción hexánica mostró mejor recuperación de la condición corporal, de forma tal, que fue evidente a partir del día 14 llegando a 2.5 como condición óptima para la producción lechera en cabras, además de ello se mantuvo hasta el día 160. En el grupo control se observó que después del primer tercio de lactancia (día 100) se observa una mejora significativa del parámetro alcanzando el 2.5.

Figura 29. Condición corporal en cabras tratadas con la fracción hexánica de *A. cina* en infección natural por nematodos gastroentéricos



#### 8.4 Discusión

En este experimento se demostró que la fracción hexánica de *A. cina* tiene efecto sobre la reducción de la carga parasitaria en animales con infecciones naturales de nemátodos gastroentéricos, resultados comparables con los reportados por Higuera-Piedrahita (2016) donde se evaluó el extracto etanólico de *A. cina* y se observó reducción respecto al grupo testigo, la reducción reportada fue de 51.7% mientras que en este estudio se observó reducción de 57.14%, por lo cual se presume que la fracción hexánica concentra los metabolitos responsables de la actividad antihelmíntica, en este caso los lignanos reportados en el capítulo VII, mientras que el extracto etanólico arrastra todos los compuestos dada su polaridad. La relación que existe entre la carga parasitaria y el parámetro FAMACHA© se ha reportado por varios autores y puede ser una medida indirecta de la carga parasitaria y de la clasificación del animal *per se* (resistente, resiliente o susceptible) (Aróstica et al., 2009; Cuéllar-Ordaz, 2009) sobre todo cuando la infección se refiere a parásitos hematófagos, razón por la cual, se puede ver que el tratamiento con



fracción hexánica mostró cambios en la parámetro FAMACHA® y de cierta forma coadyuvó a recuperar a los individuos tratados de un fenómeno fisiológico como lo es el parto, pero que energéticamente e inmunológicamente es muy demandante. Cuando existen episodios de requerimientos altos e inmunosupresión se conjuntan para dar lo que se conoce como el fenómeno de alza posparto (Alba y Cuéllar, 1990) que se pudo observar de forma tangible en la figura 22. Sin embargo, asumiendo el mecanismo de acción de los lignanos presentes en el extracto, así como, flavonas y flavonoides que se observaron en el experimento anterior, se puede presumir que el extracto tiene compuestos antioxidantes que colaboran con la recuperación del tejido uterino y con la síntesis de la leche y que además algunos lignanos pueden considerarse como fitoestrógenos pueden ayudar a la recuperación rápida del puerperio de las cabras (Song *et al*, 2014). Puede considerarse la administración de la fracción hexánica como un alimento funcional, para la recuperación rápida de los animales después del parto y en las etapas más exigentes como el pico de lactancia.

Rosalinski-Moraes *et al.*, (2012) demostraron la relación que existe entre la carga parasitaria, la condición corporal y el parámetro FAMACHA® como criterio de desparasitación selectiva en ovinos, por lo que, si un compuesto tiene propiedad antihelmíntica, puede incidir sobre estos parámetros y coadyuvar al tratamiento de las helmintiasis.

Mravcakova *et al.*, (2020) evaluaron la actividad ovicida del extracto acuoso de *Artemisia absinthium* L. en ovinos infectados de forma experimental con concentraciones letales 50 y 90 de 1.40 y 3.76 mg/mL respectivamente, mientras que la evaluación *in vivo* sobre corderos experimentalmente infectados con *H. contortus* no mostró diferencia entre los grupos tratados y no tratados, hallazgos que se comparan con este trabajo ya que se demostró la actividad ovicida del extracto y además se observó la reducción de la carga parasitaria sobre los animales naturalmente infectados. Ahmed *et al.*, (2020) evaluaron el efecto de *Artemisia herba-alba* en extracto metanólico sobre la motilidad de adultos de *H. contortus*, en donde a concentraciones de 10 mg/mL se obtuvo la actividad

nematicida del 100%, para lo cual el género *Artemisia* posee metabolitos con actividad adulticida que deben ser evaluados. Mravcakova *et al.*, (2019) demostraron el efecto antihelmíntico de una mezcla de plantas incluida *Artemisia* y además de obtener el efecto antihelmíntico sobre fases de vida libre, observó el efecto sobre adultos in vitro, sin embargo, al momento de realizar el desafío sobre animales experimentalmente infectados no existieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), pero al analizar otros parámetros como el efecto antioxidante, antiinflamatorio, si se observó diferencia significativa con el grupo control. Este tipo de parámetros son interesantes, ya que la fisiopatología de *Haemonchus* induce oxidación y la inflamación volviendo crónico el cuadro de parasitosis y afectando gravemente la salud del animal, si el extracto además de poseer efecto sobre el parásito como tal, tiene efecto directo sobre otros signos subclínicos, permiten la recuperación acelerada del paciente.

### 8.5 Conclusión

En conclusión, se propone a la fracción hexánica de *A. cina* como alimento funcional en las dietas de los animales naturalmente infectados con parásitos gastrointestinales, ya que reduce la carga parasitaria, pero al mismo tiempo tiene injerencia sobre otros indicadores importantes para la salud y producción como FAMACHA© y condición corporal.

---

## CAPÍTULO IX

---

### 9 Artículo científico enviado a la revista Acta Parasitológica

#### **Anthelmintic efficacy of *Artemisia cina* n-hexane extract in *Haemonchus contortus* *in vitro* and *in vivo* assays**

Rosa Isabel Higuera-Piedrahita<sup>a</sup>, Mariana Dolores-Hernández<sup>a</sup>, Luis Gerardo Jiménez-Pérez<sup>b</sup>, Brígida C. Camacho-Enríquez<sup>a</sup>, Alejandro Zamilpa<sup>c</sup>, Raquel López-Arellano<sup>a</sup>, Pedro Mendoza-de-Gives<sup>b</sup>, Jorge A. Cuéllar-Ordaz<sup>a</sup>, María E. López-Arellano<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México.

<sup>b</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-SAI, INIFAP). Jiutepec, Morelos, México

<sup>c</sup> Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos, México.

\***Corresponding autor:** Dr. M. E. López Arellano. Carr. Fed. Cuernavaca-Cuatla 8534, Col. Progreso, Jiutepec, Mor., México. CP 62550. CENID-SAI, INIFAP. Jiutepec, Morelos, México. Tel: +52-777-3192860. Email address: [mlopez.arellano@gmail.com](mailto:mlopez.arellano@gmail.com)

**Disclosure.** The authors of this manuscript have no financial or personal relationship with other people or organization that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

#### **Summary**

The anthelmintic efficacy evaluation of *Artemisia cina* extracts illustrates the possibilities to reduce the infection of *H. contortus* *in vitro* and *in vivo* assays. The *A. cina* ethyl acetate (*Acea*), *n*-hexane (*Acnhx*) and methanol (*Acm*) extracts at 2 and 1mg/mL were evaluated against the infective (L<sub>3</sub>) and fourth (L<sub>4</sub>) larval stages at 24- and 72-hours *in vitro* assays, respectively. For nematocidal effect, six groups of five gerbils were infected with *H. contortus* L<sub>3</sub> and treated with 0.1mg/oral route per

gerbil from each *A. cina* extract, including polyvinylpyrrolidone (solvent), ivermectin (positive) and PBS (negative) controls. Five days after treatments, gerbils were necropsied and nematode counting. The *A. cina* extracts showed a range from 13% to 82.6% of larval mortality *in vitro* assays and the nematocidal activity was from 5.22% to 100% displaying the maximum toxicity to *Acnhx* extract ( $p < 0.05$ ). Two main compounds from *Acnhx* extract were identified as artemisinin (sesquiterpene lactone) and isoguaiacine (phenolic lignan) by mass spectrometry and NMR, respectively. The anthelmintic evaluation of isoguaiacine compound and *Acnhx* extract also exhibited lethal effect of 23% and 69% on *H. contortus* L<sub>4</sub>, respectively. Also, upregulation of *H. contortus* *Hc29* gene (GPx family) of 13- and 80-fold ( $p < 0.01$ ) was observed on L<sub>4</sub> stage after exposure to *Acnhx* extract and isoguaiacine at 0.078 mg/mL, respectively. We conclude that the *Acnhx* extract had major anthelmintic efficacy than other *A. cina* extracts evaluated against *H. contortus* larvae and a new compound was identified as isoguaiacine with mild antioxidant activity.

**Keywords:** *Haemonchus contortus*, *Artemisia cina*, *Meriones unguiculatus*, artemisinin and isoaguiacine compounds

## **Introduction**

*Haemonchus contortus* is one of the most pathogenic GINs and causes inflammation, mucosal secretions and micro-haemorrhages in the abomasum (stomach) and is responsible for important economic losses in flocks worldwide (Roeder et al. 2013). Likewise, *H. contortus* and other GINs possess the ability to evade the host immune response and have developed different genetic mechanisms to tolerate the toxicity of commercial anthelmintic drugs. In this context, the efficacy of most anthelmintic drugs in many countries is decreasing (Emery et al. 2016; Craig 2018). Consequently, the control of GINs is of worldwide concern, and the search for control strategies other than chemotherapy, *i.e.*, the use of medicinal plants, is being investigated all over the world (GITHORI et al. 2010; Cala et al. 2014). The genus *Artemisia* was introduced into Mesoamerica during the Spanish conquest (Beltran-Rodriguez et al. 2017). This species has been used as an aqueous extract to treat helminth infections and anti-inflammatory activity in public health and domestic animals (Woerdenbag et al. 1997; Basthar et al. 2011; Zang et al. 2019). Part of its effect has been attributed to the presence of a bioactive

compound identified as santonin (Sakipova et al. 2017; Zhang et al. 2019). Although, high concentration of santonin (> 60mg) caused toxicity (Zhang et al. 2019), so far, limited information about the activity of *A. cina* as an anthelmintic in ruminants.

On the other hand, nematodes have developed genetic strategies to avoid the toxicity of anthelmintic drugs, *i.e.*, cellular mechanisms, such as an antioxidant enzyme system, that nematodes use to detoxify compounds. Among the main parasite antioxidant enzymes, the glutathione peroxidase (GPx) family plays an important role in parasite defence (Rotilio et al. 1985; Henkle-Dührsen and Kampkötter 2001). Studies performed by Hartman et al. (2001) and Sun et al. (2012) identified *Hc29* as a gene regulated during the development stages of *H. contortus*, showing high similarity with other GPx (~80.4%) homologues of the thioredoxin-like family and selenium-independent enzymes. Considering the importance of the results from these studies, assessment of the possible toxicity of metabolites or extracts derived from plants might contribute to reducing the nematode infection process. The objectives of the present study were to assess the anthelmintic efficacy of different extracts collected from *A. cina* *in vitro* and *in vivo* assays using *H. contortus* L<sub>3</sub> and L<sub>4</sub> and in gerbils infected with *H. contortus*. In addition, the relative expression of the *Hc29* gene was quantified on *H. contortus* L<sub>4</sub> after exposure to the *n*-hexane extract and the isoguaiacine compound from *A. cina*.

## **Materials and Methods**

### **Plant material**

*Artemisia cina* is recorded at The Plant List website (<http://www.theplantlist.org>) with the data access number EDBD41D2-71C1-479D-BE37-17879304A6AA. The *A. cina* plants were obtained from a commercial laboratory in Mexico (Millennium Lab., Ciudad de México, Mexico, Batch Number ARC1170117) that uses a Mexican seed and it is growing following the quality control specifications: appearance, colour and odour to ensure optimal plant growing conditions, *i.e.* 80% humidity, 24 °C air temperature, and soil pH of 6.3. Plants were collected during the pre-flowering period and taxonomic identification performed (Millennium Lab., Ciudad de México, Mexico).

### **Preparation of *A. cina* extracts**

Five kg of *A. cina* (fresh) were dried at 60 °C for one week. Extracts were obtained by solvent extraction in *n*-hexane, ethyl acetate and methanol, respectively. The plant extracts were dried in a rotatory evaporator (Heidolph Laborota 4000, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) at reduced pressure at 60 °C (Iqbal et al. 2004). Extracts were lyophilised and kept at 4 °C until used (Labconco FreeZone™ Freeze-Dry Systems 4.5 L). Then, the solubility of *A. cina* extracts was assessed by adding an amount of 200mg of each extract with 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP, K-30 Merck, USA) in distillate water (DW) at a 1:1 ratio and continuous shaking for 20 minutes at room temperature to improve the *A. cina* extracts solubility following the method cited by Hernandez-Patlan et al. (2018). This procedure was followed before each experimental study.

### ***A. cina* phytochemical analysis**

The *A. cina* extracts were examined for compounds with anthelmintic activity using high-performance liquid chromatography. Commercial artemisinin (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, USA) was used as control to verify the presence of this molecule in the extracts. The most bioactive extract was fractionated by silica column chromatography and pure compounds were obtained, which were analysed using <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR methods (Tabasco University, México).

### **Sourcing of *H. contortus* larvae**

Faecal samples were collected from a 4-month-old Pelibuey sheep, previously infected (*per os*) with 5000 *H. contortus* L<sub>3</sub>. Faecal cultures were prepared in Petri dishes following the Corticelli-Lai technique and kept for 7 days to allow the development of infective larvae (Corticelli and Lai, 1963). Larvae were recovered by the Baermann funnel technique (Thienpont et al. 1979). The collected larvae were kept at 4 °C for 7 days and thoroughly washed with PBS at pH 7.4 and treated with 40% sucrose and 0.187% sodium hypochlorite (Cloralex, Sta. Catarina, Nuevo León, Mexico) to remove detritus and the second larval moult from L<sub>3</sub> in order to collect the first endoparasitic stage, L<sub>4</sub>. Biological material was recovered and transferred into tubes with PBS, pH 7.4, with 100X antibiotic-antimycotic mixture (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) for 12 h. Then, *in vitro* larvae assays were performed in a 6-well culture plate with 2000 L<sub>3</sub> per 3 mL per well at 37 °C in Hank's medium with a 100X antibiotic-antimycotic mixture (Gibco, Carlsbad CA, USA) and 4 µL of ruminant erythrocytes, previously cleaned with the VyM solution (Contreras-Ochoa et al. 2019).

### ***In vitro* assays**

The lethal effect of the three *A. cina* extracts on *H. contortus* L<sub>3</sub> was investigated using microtitration plates at room temperature (24 °C) for 24 h. Two control groups were used: a) DW and b) levamisole (Lab. Rema, México). *A. cina* extracts were used at concentrations of 1 and 2 mg/mL. For the *A. cina* extract × *H. contortus* L<sub>3</sub> confrontations, 100 L<sub>3</sub> in 100 µL of aqueous suspension were used per well (n = 3) with three replicates under the same conditions. In addition, 50% and 90% lethal doses (LD<sub>50-90</sub>) from the *A. cina* n-hexane extract and metabolite, identified as isoguaiacine, were analysed on *H. contortus* L<sub>4</sub> with 1.25 mg/mL as stock concentration. Then, the *A. cina* n-hexane extract was diluted with 2% Tween-20 and isoguaiacine were diluted with DW at 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 and 0.039 mg/mL using Hank's medium, 2% Tween-20, DW and 5.71 mM ivermectin (Sigma, USA) as control groups.

### **Relative expression of the *Hc29* gene and *H. contortus* L<sub>4</sub>**

The expression analysis was performed with approximately 4,000 *H. contortus* L<sub>4</sub> per treatment. Before the expression analysis, three different time-points (24, 48 and 72 h) were examined at 0.078 mg/mL after exposure to the *A. cina* n-hexane extract to select the period with mild lethal effect in order to conserve the integrity of larvae. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 0.078% and Hank's medium were used as positive and negative controls, respectively. All treatments were incubated at 37 °C under CO<sub>2</sub>. After incubation, larvae were collected by centrifugation at 1000g for 5 min and ground with a pestle at 4 °C. Then, they were suspended in 1 mL of Trizol (Thermo Fisher Scientific, USA) to conduct a total RNA analysis. RNAm reverse transcription (RT) was performed with the RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, USA). The yield was calculated at 260 nm and the purity assessed using the 260–280 nm range (NanoPhotometer NP80, IMPLEN, USA).

### ***Hc29* primer designs for RT-qPCR**

Oligonucleotides were designed for the *Hc29* and *β-tubulin* genes using GQ927327.1 and FJ981644.1 sequences ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), and synthesised in the Biotechnology Institute, UNAM (México) (Sun et al. 2012). Previously, sequences from both genes were analysed using the Primer3Plus ([www.bioinformatics.nl](http://www.bioinformatics.nl)) and SnapGen ([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)) software. The oligonucleotide sequences were as follows: GPx-Fw ACGTCGCATCTCAATGTGGT and GPx-Rv TGGCGTAGAGATCAGGCTCA; *β-tubulin*-Fw

CCATTGACGCATTCACCTTG and  $\beta$ -tubulin-Rev GATCAGCATTCAGCTGTCCA. Thirty cycles of amplification with an initial incubation at 95 °C for 5 min, followed by denaturation at 95 °C for 15 s and annealing at 63 °C for 15 s, were performed for the RT-qPCR assays (Corbett Research Roto-Gene 6000).

#### **mRNA quantification analyses**

For relative quantification, the comparative  $C_T$  method was used (Pfaffl 2001). The  $C_T$  value for the *Hc29* gene was subtracted from the average  $C_T$  value of the  $\beta$ -tubulin gene to normalise expression; this value is called  $\Delta C_T$ . To assess the effect of the expression level of each gene, the mean  $\Delta C_T$  was recorded from both the treated and non-treated groups; this value is called  $\Delta\Delta C_T$  and was used to determine the fold change with the housekeeping gene and the control group. Data were analysed using the Qiagen platform (<https://www.qiagen.com>).

#### ***In vivo* assays**

Gerbils (*Meriones unguiculatus*) were provided by the National Institute of Public Health located in Cuernavaca, Morelos, México. A group of 30 male and female gerbils (21 days post-weaning and ~30 g bodyweight) were selected to assess the nematicidal effect of the three *A. cina* extracts. Prior to the experimental assays, the gerbils were dewormed with 5 mg/kg of albendazole (~0.15 mg/gerbil); seven days later they were injected with 0.05 mg/kg of dexamethasone (Azium® MSD, Ciudad de México, México) for three consecutive days to depress the immune system and improve the *H. contortus* infection. Six groups of five gerbils each were infected orally with 10,000 unsheathed *H. contortus* L<sub>3</sub>. The six groups of gerbils were treated with *A. cina* extracts as follows: methanolic; ethyl acetate; *n*-hexane (note: these extracts were administered orally over three consecutive days at 0.06 mg/per gerbil); commercial ivermectin (Ivomec® Boehringer Ingelheim); PVP K-30 and oral DW. Prior to administration, all fractions were mixed with PVP, K-30 (Merck) and DW to create a safe and clear product. Nine days post-treatment, gerbils were euthanised following the Official Instructions for Animal Care (NOM-051-ZOO-1995, NOM-033-ZOO-1995 y NOM-062-ZOO-1999, [www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx)). Stomachs were removed, longitudinally opened and cleaned with PBS pH 7.4 at 37 °C. The L<sub>4</sub> were recovered and quantified immediately after necropsy.



### Statistical analyses

All *in vitro* and *in vivo* assays were analysed in the same way: data were transformed using a random design to determine the percentage efficacy of the *A. cina* extracts. The means of *H. contortus* L<sub>3</sub> mortality (*in vitro* assays) and the means of recovered L<sub>4</sub> (*in vivo* assays) were compared with the corresponding control groups using an ANOVA analysis, followed by Tukey's test to identify differences among treatments. Analyses were carried out using SAS software (Version 9, 2004, Cary, NC). In addition, the efficacy of *A. cina* extracts on *H. contortus* *in vitro* and *in vivo* (with gerbils) was expressed as a percentage reduction and estimated using the following formula:

$$\% \text{ Reduction} = 100 \times ((C - T)/C)$$

Where: C = arithmetic mean of *H. contortus* larvae (L<sub>3</sub> or L<sub>4</sub>) used to estimate either the lethal effect or the anthelmintic effect in gerbils in control treatments; T = arithmetic mean of worms in treated groups.

### Ethical statement

Experimental gerbils were treated following the Norma Oficial Mexicana (Official Rule Numbers NOM-051-ZOO-1995, NOM-033-ZOO-1995 and NOM-062-ZOO-1999, [www.senasica.gob.mx](http://www.senasica.gob.mx)), as well as the Ley Federal of Sanidad Animal (Federal Law for Animal Health [[www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/Ifsa.htm](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/Ifsa.htm)]). Gerbils were housed and maintained in a pathogen-free environment at the biotherium of the Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán- UNAM. All experiments were performed according to the protocol No DC-2018/2-6 approved by Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales- SICUAE.

## Results

### *A. cina* extracts

Once extracts were obtained, the following materials were collected: *n*-hexane (4.3 g), ethyl acetate (4.8 g), and methanol (3.2 g). Artemisinin was found in the *n*-hexane extract at 282.33 [M + H<sup>+</sup>] = 283 *m/z* by mass spectrometry (Fig. 1a-b). In addition, NMR data showed an isoguaiacine a phenolic lignan compound in the *A. cina* *n*-hexane extract at [M + Na + 2H<sup>+</sup>] = 309 *m/z*. (Fig. 1c). *n*-hexane fraction of *A. cina* was separated by HPLC and all components. This molecule was reported with Patent No. 71113-16-1.

### **Larval mortality**

The *A. cina* *n*-hexane extract showed high lethal efficacy of 70% and 80% against *H. contortus* L<sub>3</sub> when tested at 1 and 2 mg/mL, respectively. In comparison, the ethyl acetate and methanolic extracts achieved 40% and 30% efficacy, respectively, at 2 mg/mL. At 1 mg/mL, the ethyl acetate and methanolic fractions resulted in low larval mortality (<20%). The negative control (DW) showed no larvicidal effect; whole larvae were seen moving actively in the wells of the microtitration plate in these treatments. The PVP K-30 used as solvent had 4% and levamisole (positive control) showed 100% lethal efficacy against the parasitic stage (Table 1).

### **Effect of *A. cina* extracts on *H. contortus* L<sub>4</sub>**

The IC<sub>50-90</sub> of the *n*-hexane extract was 0.23 mg/mL (0.21–0.26) and 1.96 mg/mL (1.53–2.67), respectively. In addition, the lethal effect of five *A. cina* dilutions, from 0.625 to 0.039, had a dependent dose against *H. contortus* L<sub>4</sub> of between 69% ± 0.83 and 10.97% ± 1.0 for the *n*-hexane extract and between 23% ± 0.47 and 2.85% ± 0.23 for the isoguaiacine metabolite ( $p < 0.05$ ) after 24 h (Table 2). The exposure of *H. contortus* L<sub>4</sub> to the *n*-hexane extract at 0.078 mg/mL had 78% ± 0.07 after 72 h exposure and the morphology appeared to be affected for treated group showing small intestinal granules that might indicate a cell degenerative process in death larvae compared with control group with active larval motility (Fig. 3a - d).

### **Relative expression of *Hc29* gene on *H. contortus* L<sub>4</sub>**

Upregulation of *Hc29* gene expression in *A. cina*-treated and positive control larvae was observed. The *A. cina* *n*-hexane extract increased *Hc29* gene expression 80.08-fold ( $p < 0.01$ ) and the isoguaiacine metabolite, belonging to the lignan phenol group, showed a 13.09-fold increase regulation ( $p < 0.001$ ). The hydrogen peroxide (positive control) was upregulated 2.38-fold, but no statistical differences were observed ( $p > 0.05$ ).

### **Recovery of *H. contortus* L<sub>4</sub> from gerbil stomachs**

Table 3 shows the number of *H. contortus* L<sub>4</sub> recovered from the stomachs of the six treatment groups, as well as the percentage reduction in the numbers of worms attributed to the effect of treatment with *A. cina* extracts. No parasites were recovered from the stomachs of gerbils treated with either the *n*-hexane extract or ivermectin. In contrast, values of parasitic reductions were recorded in gerbils treated with the methanolic and ethyl acetate extracts.

## Discussion

This study observed the anthelmintic function of the *A. cina* *n*-hexane extract, which achieved more than 70% mortality of *H. contortus* larvae. In contrast, the ethyl acetate and methanolic extracts showed activity values below 45%. Currently, there is little information on the anthelmintic activity of *A. cina* extracts, and previously aqueous, ethanolic and hydroalcoholic extracts had been assessed against *H. contortus* (Equale et al. 2011). Hernandez-Patlan et al. (2018) showed the advantage to use PVP to improve the solubility of curcumin, in this study similar function of PVP could be involved in the improvement of the anthelmintic activity of *A. cina* *n*-hexane extract conformed by diverse metabolites such as isoguaiacine. Although, santonin compound was non-existent in *A. cina* *n*-hexane extract, the santonin has been recognized as important antiparasite compound that beneficial bioactivities require more studies as possible anthelmintic (Githiori et al. 2003; Ivasenko et al. 2006; Wang et al. 2019). Notably, we observed a dose-dependent anthelmintic effect when using the *A. cina* *n*-hexane extract, with the high effect obtained at a concentration of 2 mg/mL. The anthelmintic activities of other species of *Artemisia* have been evaluated against *H. contortus*, with diverse activity. For example, aqueous and methanolic extracts of *A. brevifolia* were assessed against *H. contortus* L<sub>3</sub>, with 67.2–100% mortality after 24 h (Iqbal et al. 2004). Another study assessed the *in vitro* effect of an ethanolic extract of *A. absinthium* against *H. contortus* L<sub>3</sub>, as well as the *in vivo* ovicidal effect in sheep faeces; in both cases, a significant 95% anthelmintic effect was recorded (Tarik et al., 2008). Conversely, methanolic extract of *A. parviflora* and *A. sieversiana* were assessed against *H. contortus* both *in vitro* and *in vivo* and showed 100% egg hatching inhibition, and an *in vivo* assay in sheep revealed a faecal egg reduction of 77%. The different anthelmintic effects of *Artemisia* spp. extracts may be related to the use of different extraction procedures and the polarity of their compounds. Additionally, the compound content of plant material can differ depending on the aerial parts of the plant, soil type, and phenol compounds (Tardieu, 2013). For instance, in the case of *A. brevifolia*, the presence of sesquiterpene and flavonoid molecules has been associated with its anthelmintic activity (Iqbal et al. 2004).

We confirmed the presence of artemisinin using the methodology described by Reale et al. (2008), who obtained the same metabolite from *A. annua*. In recent years, artemisinin has been reported to be active against several

types of parasite, e.g., the protozoan *Plasmodium* (Beshbishi et al. 2018), and against other helminths, for instance, *Schistosoma*, *Echinococcus* and *Fasciola* (Ferreira et al. 2011). In contrast, *A. annua* ethanol and, in other studies, an aqueous and pure artemisinin, were administered to gerbils artificially infected with *H. contortus* and in naturally infected sheep with GIN, however, no anthelmintic effect was reported with either product (Squires et al. 2011; Cala et al. 2014). In contrast, artemisinin efficacy was notified against experimental trichinellosis (Abou et al. 2017). Notably, the total anthelmintic effectiveness of the *A. cina* hexanic extract in our study was equivalent to that recorded for ivermectin. This result might be important considering that artemisinin was present in the *A. cina* *n*-hexane extract together with the lignan metabolite, identified for the first time in the *A. cina* *n*-hexane extract as natural dewormers that might contribute to improve animal health.

Currently, there are only a few reports of *A. cina* products as potential anthelmintics (Basthar et al. 2011, Higuera-Piedrahita et al. 2016). Basthar et al. (2011) determined the impact of *A. cina* on the sheep cestode *Moniezia expansa* 14 h post-treatment. Sesquiterpene molecules in *Artemisia* spp., other than artemisinin, have also been shown to have an anthelmintic effect. For example, a methanolic extract from the plant *Melaleuca alternifolia* reduced the parasitic burden of *H. contortus* in infected gerbils by 46.3–48.6% (Grando et al. 2016). The authors attributed this anthelmintic effect to terpinen-4-ol (a sesquiterpene). In addition, our results showed that the *n*-hexane extract of *A. cina* and isoguaiacine as phenolic lignan induced upregulation of the expression of the *Hc29* gene coding for essential antioxidant enzymes in parasites (belonging to the GPx family). The treatment with *A. cina* *n*-hexane extract induced an oxidative unbalance causing the larvae death that showed small granulations when compared to control larvae. In our study, the *A. cina* *n*-hexane metabolite was shown to include lignan, substances belonging to phenolic group that might be involved in *H. contortus* toxicity. Previous studies with the Piperaceae plant family containing active lignan groups caused damage on the protozoa *Trypanosoma cruzi* (important parasite that affect human health). The authors mention structural alterations activated by lignan substances through oxidative mechanisms (Pelizzaro-Rocha et al. 2011). The redox process has been linked to pharmacological effects for long time. Many drugs are redox molecules, and, in many instances, oxidative damage is evident in tissues undergoing drug action, such as xenobiotic products containing phenolic molecules (Lazarin-Bidóia et al. 2013; García-Huertas et al. 2018). In addition, the *Piper*

plant containing a group of phenolic lignan showed high ovicidal activity in *in vitro* assays against GINs of small ruminants (Souza de Paula Carlis et al. 2019). All these studies displayed the possible use of a plant derivate to treat parasitic diseases affecting human beings and animals. The *A. cina* derivate had toxicity against the larval stages of *H. contortus* in *in vitro* and *in vivo* studies using gerbils as laboratory model. The effect of the *A. cina* *n*-hexane extract and artemisinin and lignan metabolites *in vivo* require more studies as possible integrated methods of control of *H. contortus* and other GINs that affect animal health and production.

### **Conclusions**

The results suggest that *Artemisia cina* *n*-hexane displayed high toxicity on *H. contortus* larval stages *in vitro* and *in vivo* trials, and it induced the expression of the *Hc29* gene in L<sub>4</sub> when compared with the control, while, *A. cina* ethyl acetate and methanolic extracts decreased the mortality of *H. contortus* larvae with a maximum efficacy around 45%. Furthermore, increase expression of *Hc29* as representative gene of the GPx family suggest a mild *A. cina* *n*-hexane and isoguaiacine reaction with ROS and reactive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as positive control. These results lead us to propose major number of studies with *A. cina* *n*-fraction as an anthelmintic in infected sheep with GINs. In addition, two main compounds, artemisinin and isoguaiacine, were identified into *A. cina* *n*-hexanic extract which anthelmintic activity require more studies to contribute in the understanding of how natural plant derivatives work against parasitic nematodes, including mechanism of action.

**Conflict of interest disclosure.** Authors have no potential conflict of interest pertaining to this submission.

### **Acknowledgments**

This study received financial support from the Universidad Nacional Autónoma de México, FES-Cuautitlán, PAPIIT IN226217 UNAM project. Authors wish to express our gratitude to the following institutions: CENID-SAI, INIFAP and the Bioterium of the National Institute of Public Health, Cuernavaca, Morelos, Mexico and CONACYT (scholarship 556932). This research forms part of the PhD thesis of MSc Rosa Isabel Higuera-Piedrahita at the Graduate Unit of FES-Cuautitlán, UNAM, Mexico under direction of PhD Maria Eugenia López-Arellano.

## Author contributions

HPRI and LAME conceived, designed, and draft the manuscript. DHM AND CEBC contributed to obtain the *Artemisia* plant extracts. HPRI and JPL contributed with the molecular and data analysis. LAR and ZA carried out the chromatography analysis and contributed to the manuscript revision. MDP and COJA contributed to the animal infections, data analysis and financial support.

## References

Abou Rayia DM, Saad AE, Ashour DS, Oreiby RM (2017) Implication of artemisinin nematocidal activity on experimental trichinellosis: In vitro and in vivo studies. *Parasitol Int* 66, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.11.012>

Bashtar A, Hassanein M, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid K, Hassan S, Mehlhorn H, Al-Mahdi M, Morsy K, Al-Ghamdi A (2011) Studies on monieziasis of sheep I. Prevalence and anthelmintic effects of some plant extracts, a light and electron microscopic study. *Parasitol Res* 108:177–186. Doi:[10.1007/s00436-010-2060-2](https://doi.org/10.1007/s00436-010-2060-2)

Beshbishi S, Bardicy S, Tadros M, Ayoub M, Taman A (2018) Efficacy of artemisinin- naphthoquine phosphate against *Schistosoma haematobium* adult flukes: dose- effect relationship and tegumental alterations. *J Helminthol* 21:1-6. Doi: [10.1017/S0022149X18000421](https://doi.org/10.1017/S0022149X18000421)

Cala AC, Ferreira JF, Chagas AC, et al (2014). Anthelmintic activity of *Artemisia annua* L. Extracts in vitro and the effect of an aqueous extract and artemisinin in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Parasitol Res* 113:2345–2353. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3891-z>

Contreras-Ochoa CO, Lagunas-Martínez A, Reyes-Guerrero DE, et al (2019) Excreted and secreted products (72/60 kda) from *Haemonchus placei* larvae induce in vitro peripheral blood mononuclear cell proliferation and activate the expression of cytokines and *fcγr1a* receptor. *Experimental parasitology*, 206, 107755. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107755>

Corticeli, Lai M. (1963): Ricerche sulla tecnica di coltura delle larve infestive degli strongili gastro-intestinali del bovino. *Acta Med Vet* 9: V/VI.

Craig TM (2018) Gastrointestinal nematodes, diagnosis and Control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 34, 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.10.008>

Emery DL, Hunt PW, leJambre LF (2016): *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? Int J Parasitol 46:755-769. Doi:[10.1016/j.ijpara.2016.07.001](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.001)

Equale T, Tadesse D, Giday M (2011): *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. J Ethnopharmacol 1:108- 113. Doi:[10.1016/j.jep.2011.04.063](https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.063)

Ferreira JF, Peadar P, Keiser J (2011): *In vitro* trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. Asinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*: trematocidal plant alcoholic extracts. Parasitol Res 109:1585-1592. Doi:[10.1007/s00436-011-2418-0](https://doi.org/10.1007/s00436-011-2418-0)

García-Huertas P, Olmo F, Sánchez-Moreno M, Domínguez J, Chahboun R, Triana-Chávez IM (2018): Activity *in vitro* and *in vivo* against *Trypanosoma cruzi* of a furofuran lignan isolated from *Piper jericense*. Exp Parasitol 189:34-42. Doi: [10.1016/j.exppara.2018.04.009](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.04.009).

Githiori JB, Höglund J, Waller PJ, Leyden Baker R (2003). Evaluation of anthelmintic properties of extracts from some plants used as livestock dewormers by pastoralist and smallholder farmers in Kenya against *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. Vet Parasitol 118, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.006>

Githiori, JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM (2006) Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. Vet Parasitol 139, 308–320. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.04.021>

Grando TH, Baldissera MD, Gressler LT, Facco de Sá M, Bortoluzzi BN, Schafer S, Ebling RC, Raffin RP, Santos RCV, Stefani LM, Vaucher R, Leal MLR, Monteiro SG (2016): *Melaleuca alternifolia* anthelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. Exp Parasitol 170:177–183. Doi: [10.1016/j.exppara.2016.09.004](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.004).

Hartman D, Donald D, Nikolaou S, Savin K, Hasse D, Presidente P, Newton S (2001): Analysis of developmentally regulated genes of the parasite *Haemonchus contortus*. Int J Parasitol 31:1236-1245. Doi: [10.1016/s0020-7519\(01\)00248-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00248-x)

Henkle-Duhrsen K, Kampkotter A (2001): Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Mol Biochem Parasitol* 114:129-42. Doi: [10.1016/S0166-6851\(01\)00252-3](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00252-3)

Higuera-Piedrahita RI, López-Arellano ME, López-Arellano R, Cuenca-Verde C, Cuéllar-Ordaz JA (2020): *Artemisia cina* 30 CH homeopathic treatment against *Haemonchus contortus*. *Rev Mex Ciencia Pec* 11:342.354 <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.4946>

Iqbal Z, Lateef M, Ashraf M, Jabbar A (2004). Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. *J Ethnopharmacol* 93, 265–268. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.046>

Ivasenko SA, Edil'baeva TT, Kulyyasov AT et al (2006) Structure and biological activity of  $\alpha$ -santonin chloro-derivatives. *Chem Nat Compd* 42, 36–40. <https://doi.org/10.1007/s10600-006-0031-8>

Lazarin-Bidóia D, Desoti VC, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Nakamura CV, Silva OS (2013): Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: Confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. *Free Radic Biol Med* 60:17-28. Doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.008](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.008)

Hernandez-Patlán D, Solís-Cruz B, Pontin KP, et al (2018) Evaluation of a solid dispersion of curcumin with Polyvinylpyrrolidone and boric acid against *Salmonella enteritidis* infection and intestinal permeability in Broiler chickens: A Pilot Study. *Front Microbiol* 9,1289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01289>

Pelizzaro-Rocha KJ, Veiga-Santos P, Lazarin-Bidóia D, et al (2011) Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 13, 1018–1024. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.05.011>

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Roeber F, Jex A, Gasser R (2013): Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance- an Australian perspective. *Parasite Vector* 6:153. Doi: [10.1186/1756-3305-6-153](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-153)

Rotilio G, Mavelli I, Rossi L, Ciriolo MR (1985) Biochemical mechanism of oxidative damage by redox-cycling drugs. *Environ Health Perspect* 64, 259–264. <https://doi.org/10.1289/ehp.8564259>



- Sakipova Z, Wong NS, Bekezhanova T, Sadykova, Shukirbekova A, Boylan F (2017). Quantification of santonin in eight species of *Artemisia* from Kazakhstan by means of HPLC-UV: Method development and validation. Plos one 12 e0173714. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173714>
- De Paula Carlis MS, Féboli A, de Laurentiz AC, et al (2019) In vitro anthelmintic activity of the crude hydroalcoholic extract of *Piper cubeba* fruits and isolated natural products against gastrointestinal nematodes in sheep. Vet Parasitol 275, 108932. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108932>
- Squires JM, Ferreira JF, Lindsay DS, Zajac AM (2011) Effects of artemisinin and *Artemisia* extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). Vet Parasitol 175, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.011>
- Sun W, Song X, Yan R, Xu L, Li X (2012) Cloning and characterization of a selenium-independent glutathione peroxidase (HC29) from adult *Haemonchus contortus*. J Vet Sci 13, 49–58. <https://doi.org/10.4142/jvs.2012.13.1.49>
- Tardieu F. (2013). Plant response to environmental conditions: assessing potential production, water demand, and negative effects of water deficit. Front Physiol 4, 17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00017>
- Tariq KA, Chishti MZ, Ahmad F, Shawl AS (2009) Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. Vet Parasitol 160(1-2), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.084>
- Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ (1979) Diagnosing helminthiasis through coprological examination. Janssen Animal Health. 3<sup>rd</sup> edn. Beerse, Belgium.
- Wang J, Su S, Zhang S, et al (2019) Structure-activity relationship and synthetic methodologies of  $\alpha$ -santonin derivatives with diverse bioactivities: A mini-review. Eur J Med Chem, 175:215-233. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.066>
- Woerdenbag HJ, van Uden W, Pras N (1997) *Artemisia cina*. In: P.A.G.M. De Smet, K., Keller, R., Hansel, R.F., Chandler (eds) Adverse Effects of Herbal Drugs, pp. 14-22. Springer – Verlag Berlin Heidelberg.

Zhang H, Liu C, Zheng Q (2019) Development and application of anthelmintic drugs in China. *Acta tropica* 200, 105181. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105181>

### Figure and Tables Leyends

**Fig. 1a–c** Artemisinin identified in the *A. cina* n-hexanic extract using mass spectrometry: a) commercial artemisinin (Sigma-Aldrich) used as reference; b) artemisinin from the *A. cina* n-hexane plant extract. Red square = 283 m/z; and c) lignan from de *A. cina* n-hexane extract. Red square = 309 m/z

**Fig. 2 a–d** Morphology changes of *H. contortus* L<sub>4</sub> exposed to the *A. cina* n-hexane extract after 72 h: a) and b) larvae without treatment; c) and d) larvae treated with *A. cina* n-hexane extract at 0.078 mg/mL

**Table 1.** *In vitro* lethal activity of *Artemisia* extracts against *H. contortus* L<sub>3</sub>, expressed as percentage efficacy after 24 h of exposition

**Table 2.** Percentage of *Artemisia cina* n-hexane extract and isoguaiacine compound against *Haemonchus contortus* L<sub>4</sub> *in vitro* assays

**Table 3.** Nematicidal activity of *Artemisia cina* extracts against *H. contortus* L<sub>4</sub> in artificially infected gerbils, expressed as a percentage reduction of *H. contortus* larvae

Table 1. *In vitro* nematicidal activity of *Artemisia* extracts against *H. contortus* L<sub>3</sub>, expressed as percentage efficacy after 24 h of exposition

| Treatments               | Concentration (mg/mL) | Reduction (%)<br>24 h |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>n</i> -hexane extract | 2                     | 82.6 (± 38.8) *       |
|                          | 1                     | 75 (± 44.3) *         |
| Ethyl acetate extract    | 2                     | 46.3 (± 22.4) *       |
|                          | 1                     | 23 (± 20) *           |
| Methanolic extract       | 2                     | 34 (± 16.3) *         |
|                          | 1                     | 13 (± 3.6) *          |
| Levamisole               | 7.5                   | 100 (± 1) *           |
| PVP K-30                 | 2                     | 4 (± 1)               |
|                          | 1                     | 0                     |

\* = Significance differences between treatments ( $p < 0.05$ ); PVP K-30 = Polyvinylpyrrolone K-30

Table 2. Percentage of *Artemisia cina* *n*-hexane extract and isoguaicine compound against *Haemonchus contortus* L<sub>4</sub> *in vitro* assays

| <i>A. cina</i> (mg/mL) | Mortality percentage (x ± SD) |                              |
|------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|                        | <i>n</i> -hexane (mg/mL)      | Isoguaicine compound (mg/mL) |
| 0.625                  | 69 ± 0.83                     | 23 ± 0.47*                   |
| 0.312                  | 56.87 ± 1.0                   | 13.8 ± 0.25*                 |
| 0.156                  | 43.32 ± 1.0                   | 11.17 ± 0.27*                |
| 0.078                  | 27.6 ± 0.64                   | 8 ± 0.26*                    |
| 0.039                  | 10.97 ± 1.0                   | 2.85 ± 0.23                  |
| Distilated water       | 0                             | 1 ± 0.23                     |
| 2 % Tween-20           | 1.0 ± 0.17                    | --                           |
| 5 mg/mL Ivermectin     | 100                           | 100                          |

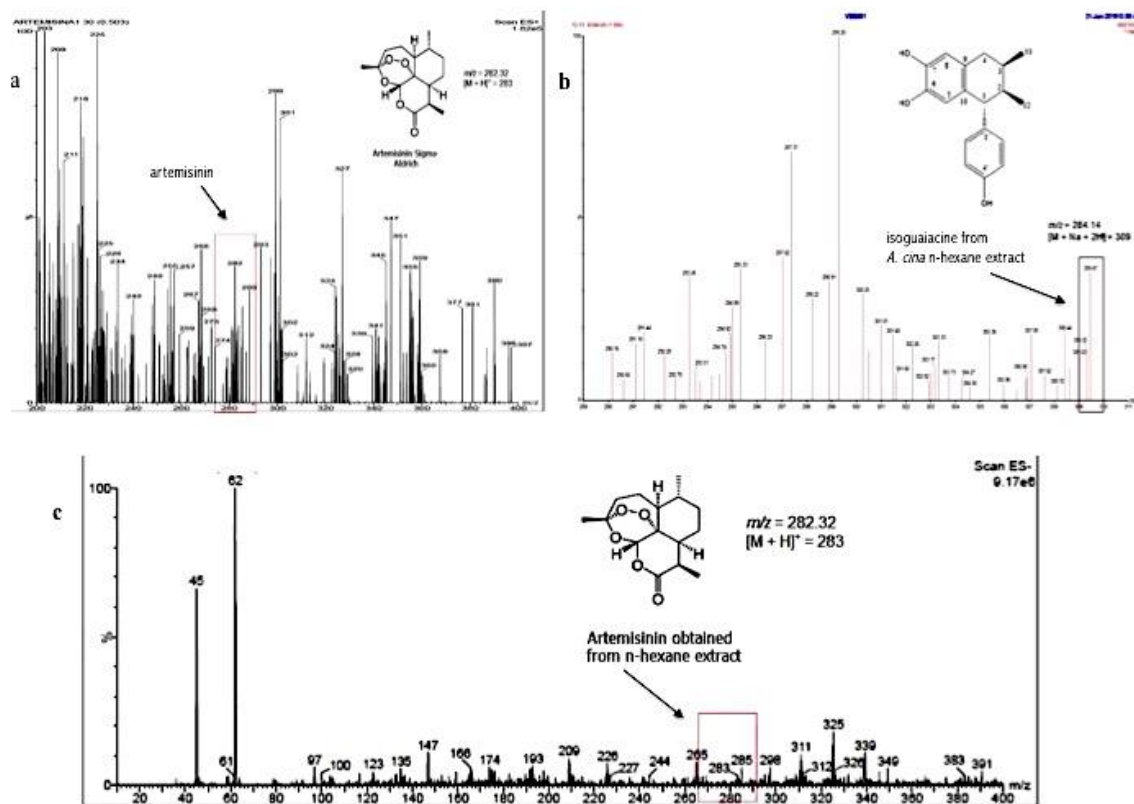
\* = Significance differences between treatments (p < 0.05)

Table 3. Nematicidal activity of *Artemisia cina* extracts against *H. contortus* L<sub>4</sub> in artificially infected gerbils, expressed as a percentage reduction of *H. contortus* larvae

| Treatments               | Larvae recovered from gerbils stomachs<br>× ± SD | Reduction percentage |
|--------------------------|--|----------------------|
| <i>n</i> -hexane extract | 0  | 100 *                |
| Ethyl acetate extract    | 127 ± 10   | 5.22                 |
| Methanolic extract       | 126 ± 13   | 5.97                 |
| Ivermectin               | 0  | 100 *                |
| PVP K-30                 | 117 ± 20   | 12.69                |
| Distilled water          | 134 ± 12   | ----                 |

\* = Significance differences between treatments (p < 0.05); PVP K-30 = Polyvinylpyrrolone K-30

**Fig. 1a–c** Artemisinin identified in the *A. cina* n-hexanic extract using mass spectrometry: a) commercial artemisinin (Sigma-Aldrich) used as reference; b) artemisinin from the *A. cina* n-hexane plant extract. Red square = 283 m/z; and c) lignan from de *A. cina* n-hexane extract. Red square = 309 m/z




**Fig. 2 a–d** Morphology changes of *H. contortus* L<sub>4</sub> exposed to the *A. cina* n-hexane extract after 72 h: a) and b) larvae without treatment; c) and d) larvae treated with *A. cina* n-hexane extract at 0.078 mg/mL




10 Artículo publicado en la Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias

<https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.4946>

Article



*Artemisia cina* 30 CH homeopathic treatment against *Haemonchus contortus*



Rosa Isabel Higuera-Piedrahita <sup>a\*</sup>

María Eugenia López-Arellano <sup>b</sup>

Raquel López-Arellano <sup>c</sup>

César Cuenca-Verde <sup>c</sup>

Jorge Alfredo Cuéllar-Ordaz <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Carr. Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, Col. San Sebastián Xhala. Cuautitlán, Estado de México, México.

<sup>b</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI). Jiutepec, Morelos, México.

<sup>c</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán, Estado de México, México.

\*Corresponding author: [rositah\\_10@hotmail.com](mailto:rositah_10@hotmail.com)

**Abstract:**

The anthelmintic resistance problem is widely recognized in sheep production. Therefore, new methods of control against gastrointestinal nematodes (GIN) need to be integrated. The aim of this work was to assess the toxicity of *A. cina* 30 CH as a homeopathic product against *Haemonchus contortus* in *in vitro* and *in vivo* assays. *A. cina* 30 CH was obtained from a commercial laboratory, and confirmation of artemisinin as a key ingredient was performed with mass spectrophotometry. The *A. cina* 30 CH and the artemisinin pure reagent were used for the inhibition of egg hatching (IEH) and for the inhibition of larval migration of *H.*



*contortus* L<sub>3</sub> (ILM). In addition, three groups of 10 naturally infected lambs with GIN were treated with *A. cina* 30 CH and albendazole, and 10 were used as control. The parasitic infection was monitored at 0, 7, 14 and 28 d posttreatment (PT) to determine the number of eggs per gram (epg) and FAMACHA index. The *in vitro* data showed 100 % IEH and 64.7 % ILM by *A. cina* 30 CH, and nonlethal activity was observed with the artemisinin pure reagent. The toxicity of *A. cina* 30 CH against *H. contortus* in infected lambs was observed after 7 d of infection. Administration of the *A. cina* 30 CH yielded a 69 % reduction in the egg at 28 d PT, similar to the albendazole ( $P<0.05$ ). In conclusion, *A. cina* 30 CH had the ability to IEH and ILM of *H. contortus* in *in vitro* assays and reduced the number of eggs of *H. contortus*, which is the primary parasitic nematode in grazing lambs, thereby reducing infection.

**Key words:** *Artemisia cina* 30 CH, Artemisinin, *Haemonchus*, Lambs.

Received: 14/06/2018

Accepted: 04/03/2019

## Introduction

Gastrointestinal nematodes (GIN), primarily *H. contortus*, which is the most prevalent nematode in tropical regions, are among the primary pathogens that reduce animal production<sup>(1)</sup>. For a long time, anthelmintic drugs have been used as the main traditional method of control, and only one is on the market<sup>(2)</sup>. However, the inadequate use of this drug has caused worldwide resistance problems in various ruminant species<sup>(3,4)</sup>. The high prevalence and the fast dispersion of anthelmintic resistance have increased in domestic ruminants, which show resistance to multiple anthelmintic drugs in certain regions<sup>(5)</sup>. In Mexico, diverse reporting on GIN has occurred, and other strategies of control are under study<sup>(6)</sup>.

The use of different methods of control have been denoted Parasite Integral Control (PIC)<sup>(7)</sup>. The strategy of most studies is to focus on the control of highly pathogenic nematodes, such as *H. contortus* and *Teladorsagia*, in small ruminants because of their blood-feeding habits. Paddock rotation, selection of resistant breeds, biological control (*i.e.*, nematophagous fungi and predatory nematodes)<sup>(8)</sup>, selective deworming, vaccines and derivatives of the traditional herbology (*i.e.*, homeopathic products) are considered in the PIC<sup>(9)</sup>. However, more studies

are needed of alternative methods to reduce the epg and the adult nematodes during husbandry procedures<sup>(10)</sup>.

Homeopathic compounds are substances of different origins, such as vegetable or mineral, that have therapeutic effects. The homeopathic products are prepared following the instructions of the Homeopathic Pharmacopeia<sup>(10,11)</sup>. For instance, the homeopathic products obtained from plants are acquired as ethanolic extracts (generally), and they are diluted in 99 parts alcohols until the desired concentration (decimal and centesimal) below the Avogadro number  $6.02214 \times 10^{23}$  is reached. In this way, the homeopathic drugs are obtained with low inversion and easy extraction and represent a safe method of control<sup>(12)</sup>. Recently, several reports regarding the possible use of homeopathic products with a nematocidal effect have provided a new opportunity to integrate *A. cina* as a novel method of control. *A. cina* is a plant that belongs to the Asteraceae family and contains artemisinin as the active metabolite<sup>(13)</sup>. This plant has shown anthelmintic and antimalarial properties<sup>(14)</sup>. For instance, *A. cina* appears to have a potential therapeutic effect against parasites, but further study is required to determine if *A. cina* can be used as a homeopathic or natural product as a possible anthelmintic against GDN. *A. cina* tincture is conformed by the 30 centesimal hannemaniana (CH) concentration as reported by the Mexican Homeopathic Pharmacopoeia (concentration:  $10^{-66}$ M), which is suggested to be administered in ruminants. The aim of this study was to determine the antiparasitic efficacy of a homeopathic product based on *A. cina* 30 CH in *in vitro* and *in vivo* assays against a natural infection of small ruminants with GDN.

## Material and methods

### Locality

The analysis by mass spectrometry was carried out in laboratory 5 of Unidad de Investigación Multidisciplinaria, and the *in vitro* analysis carried out in laboratory 3 and 5 of the Unidad de Investigación Multidisciplinaria of Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), UNAM, in Cuautitlan Municipality, State of México and the *in vivo* assay on a farm in Mixquiahuala Municipality, Hidalgo State at 2,100 m asl with a semi-dry climate, an annual temperature of 16.6° C and rainfall of 500 mm<sup>(15)</sup>.

## Identification of artemisinin in *A. cina* 30 CH

The artemisinin molecules were identified from *A. cina* 30 CH commercial products (Millenium Lab, México). Ultra-performance liquid chromatography with mass spectrometry (UPLC/MS) was used with a reversed-phase column in positive mode. All samples were performed according to the following conditions: 70 cone velocity, 5m (Mn 2\*0.75) and UPLC/MS reading from 200 to 300 m/z laboratory 5 of Unidad de Investigación Multidisciplinaria. Concentration of *A. cina* 30CH was 10<sup>-6</sup>M.

## Parasites

Faeces positive for parasitic nematode eggs were collected from a donor lamb previously infected with 5,000 eggs of *H. contortus* L<sub>3</sub>, a strain isolated and maintained in the FESC, UNAM. The quantitative McMaster technique was used to determine the number of epg, and coproculture techniques were performed to collect *H. contortus* L<sub>3</sub> at 21 d post-infection (PI). Larvae were kept at -20 °C until used (the larvae recovered from the larval culture were cryopreserved in glycerol; for bioassays, the larvae were thawed at room temperature, and 95 % motility was verified).

## Bioassays

Two different *in vitro* assays were performed to determine the inhibition of egg hatching (IEH) and the inhibition of larval migration (ILM)<sup>(16)</sup>. All techniques were performed using 100 eggs or infective stages of larvae (L<sub>3</sub>) of *H. contortus*. For each assay, three replicates were prepared, and five treatments were applied as follows: 1) 20 µL *A. cina* 30 CH (10<sup>-6</sup>M); 2) 100 µL of distilled water (DW, control); 3) 50 mg/mL albendazole (ABZ, control) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), solubilized with 0.1 mg/mL dimethyl sulfoxide (DMSO); 4) 20 µL of ethanol; and 5) 1 mg/mL artemisinin (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA).

The IEH was performed in ELISA plates that were incubated at 28 °C for 48 h. The IEH reading was conducted using Lugol's iodine solution, which was added to each well after incubation. The total volume of each ELISA well was read to count the number of active *H. contortus* L<sub>3</sub> and IEH per well with a microscope under 10× magnification (Olympus, model CK-2, Japan).

The ILM received similar treatment as the IEH, except that the ABZ was replaced by levamisole (300 mg/mL). Larvae were also read using Lugol's solution after incubation. The total volume per well was read to determine the ILM.

### *In vivo* assays

#### Lambs

Thirty Suffolk breed lambs, 16 males and 14 females, 3 mo of age and at 20 d post-weaning, were naturally infected with GIN. All lambs were kept in semi-stabled conditions, grazing in paddocks during the day and kept inside at night. Lambs were fed commercial concentrate and water *ad libitum*. No anthelmintic treatment was applied to any lamb before the present study. All lambs were positive for GIN eggs, which was confirmed by McMaster and coproculture techniques.

### Experimental design

Prior to the treatments, the lambs were randomized into three groups of 10 each with the support of the Statgraphics Centurion XV. Treatments were designed as follows: group A received 1 mL per 5 kg of body weight (BW) by oral route of *A. cina* 30 CH (Millenium Laboratories, México) as a single dose, concentration of *A. cina* 30CH was  $10^{60}$ M. (1); group B was orally treated with ABZ at 7.5 mg/kg of BW; and group C, without treatment, was used as the control. Faecal and haematological samples were collected at 1 d pre-treatment (0 day) and at 7, 14 and 28 d post-treatment (PT). In addition, eye mucosa colour was observing using the FAMACHA index.

### Statistical analysis

The means of *H. contortus* eggs and larvae L<sub>3</sub> were compared between treatments and control groups using ANOVA analysis, complementary with Tukey's test to identify the differences between treatments, using Statgraphics Centurion XV software. The number of egg was transformed to  $\log_{10} \text{egg} + 10$  to stabilize the variance, and the least significant difference (LSD) test was applied using Statgraphics Centurion XV software with a completely

randomized design that considered repeated measurements over time and treatment. Differences with  $P < 0.05$  were considered to be significant.

### Ethics note

The management of the lambs was performed according to the Guideline of the Institutional Committee for the Care and Use of Experimental Animals of the Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM (CICUAE-FESC-UNAM) and authorized under Protocol No. DC- 2014-14.

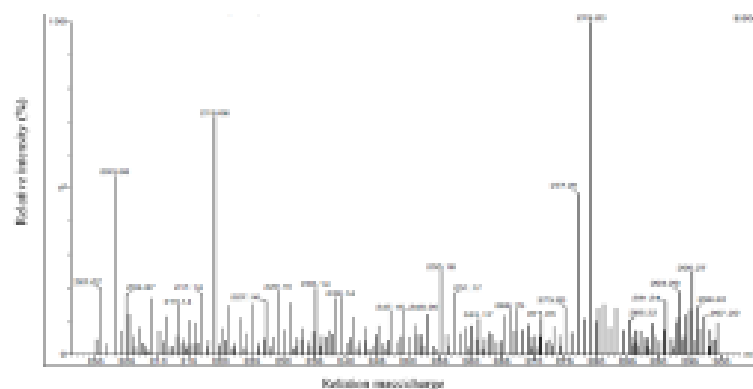
## Results

### Identification of artemisinin in *A. cina* 30 CH

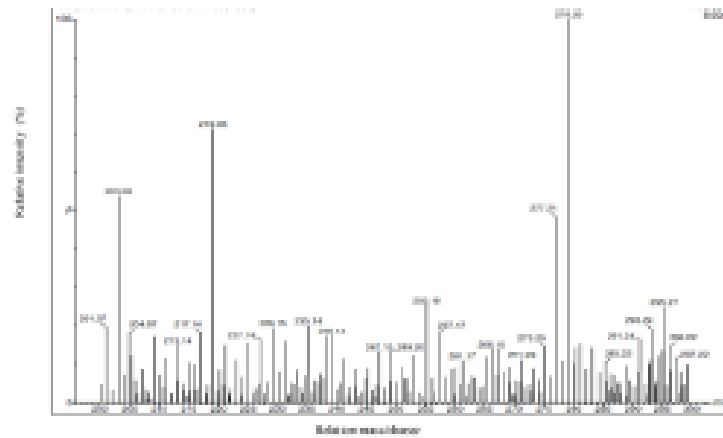
The mass spectrophotometry analysis showed artemisinin molecules in the *A. cina* 30 CH commercial products used in the present study. The *A. cina* 30 CH chromatographic analysis was performed to compare the profile of the commercial products to the artemisinin pure reagent. Figure 1, a-b showed artemisinin molecules corresponding to *A. cina* 30 CH and the artemisinin pure reagent with 279.20 m/z.

**Figure 1a-b:** Mass spectrophotometry analysis of pure reagent (a) and *A. cina* 30 CH (b), showing similarities between 283 and 290 m/z

a



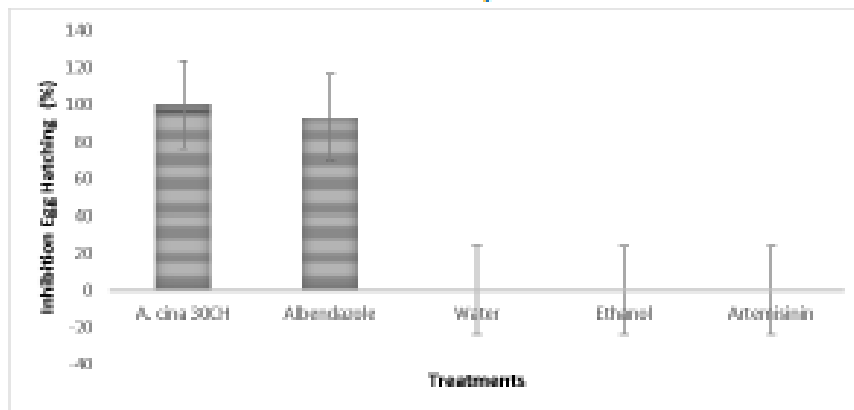
b



*In vitro* assays

**IEH.** Data obtained from the evaluation of *A. cina* 30 CH showed 100 % IEH of *H. contortus* *A. cina* after 48 h; this result was followed by the ABZ treatment, with 93 %. In contrast, no IEH of *H. contortus* was observed with the 80 % ethanol, the artemisinin pure reagent and the DW treatments did not show effect (Figure 2).

**Figure 2:** Inhibition of egg hatch assays against *Haemonchus contortus* eggs exposed with *Artemisia cina* 30 CH and albendazole treatments and controls (artemisinin, water and methanol)



**ILM.** The *A. cina* 30 CH showed 65.7 % inhibition of migration of the *H. contortus* infective larvae. Different results were observed with the artemisinin pure reagent used at 0.1 and 1 mg/mL with DW and ethanol, with all treated groups showing 100 % larval migration, indicating that no inhibition was observed in the control groups. The levamisole used as the anthelmintic showed lethal efficacy of 100 % against larvae; therefore, no migration was observed (Table 1).

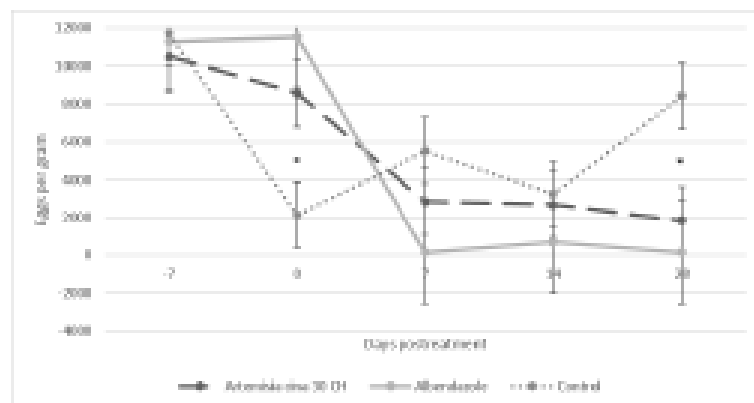
**Table 1:** Percentage of inhibition of larval migration (ILM) against L<sub>3</sub> *Haemonchus contortus* (X±SE)

| Treatments                  | Migration (%) |
|-----------------------------|---------------|
| <i>Artemisia cina</i> 30 CH | 35.0 ± 8.1    |
| Levamisole (300 mg/mL)      | 0             |
| Water                       | 92.0 ± 12.4   |
| Ethanol 80%                 | 86.6 ± 11.5   |

### *Artemisia cina* nematicide efficacy

Natural infection with GIN on grazing lambs showed two main GIN species: *H. contortus* (75%) and *T. circumcincta* (25 %). Infected lambs for all groups showed a mean of approximately 2,000 epg prior to treatment (d- 0). Through the following periods, significant differences in the reduction in epg were observed at 7 and 14 d PT ( $P<0.05$ ) (Figure 3). In addition, significant differences were also observed between groups A (*A. cina* 30 CH) and B (ABZ) in comparison to group C (control,  $P<0.05$ ) at 7 d.

**Figure 3:** Egg per gram observed at -7, 0, 7, 14 and 28 d posttreatment of lambs infected naturally with gastrointestinal nematodes \* ( $P<0.05$ )



**FAMACHA Index Card.** For all groups, the FAMACHA card index was determined to be 3.0 to 5.0 in the *in vivo* study. The FAMACHA values were variable for all groups. Important differences were observed at 14 and 28 d PT for the *A. cina* 30 CH and ABZ treatments (Table 2).

**Table 2:** FAMACHA index of lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes and receiving *Artemisia cina* 30 CH or albendazole

| Treatment                   | Days post-treatment     |                          |                          |                          | p    |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------|
|                             | 0                       | 7                        | 14                       | 28                       |      |
| <i>Artemisia cina</i> 30 CH | 3.0 ± 0.13 <sup>a</sup> | 4.0 ± 0.44 <sup>aA</sup> | 3.0 ± 0.52 <sup>bB</sup> | 2.0 ± 0.31 <sup>bA</sup> | 0.44 |
| Albendazole                 | 5.0 ± 0.26 <sup>a</sup> | 3.0 ± 0.21 <sup>bB</sup> | 2.0 ± 0.30 <sup>aA</sup> | 1.0 ± 0.22 <sup>aA</sup> | 0.19 |
| Control                     | 3.0 ± 0.25 <sup>b</sup> | 2.0 ± 0.29 <sup>aB</sup> | 1.0 ± 0.20 <sup>aA</sup> | 3.0 ± 0.71 <sup>bB</sup> | 0.62 |

Equal lower case letters have no statistical significance and different lower case letters have statistical difference within the group ( $P < 0.05$ ). Equal capital letters have no statistical significance and different capital letters have statistical difference between groups ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

*A. cina* has chemical compounds, such as the terpenoids, that provide insecticidal activity against reproductive capacity and cause antioxidative stress in the pathogens<sup>(17,18,19)</sup>. In recent years, important results identified artemisinin as having a possible anthelmintic effect<sup>(20)</sup>. For instance, Akkari *et al.*<sup>(21)</sup>, reported a lethal dose (LD) of *Artemisia campestris* of 0.8 mg/mL against *H. contortus* when using an ethanolic extract. In the present study, *A. cina* 30 CH showed 100 % of *H. contortus* IEH. In addition, *A. cina* 30 CH showed efficacy for decreasing the larval migration, and these results were like those reported by others<sup>(22)</sup>. Bashtar *et al.*<sup>(22)</sup> described the ethanolic extract of *A. cina* with efficacy against the cestode *Moniezia*. In addition, the present study had 64.7 % ILM of *H. contortus* using *A. cina* 30 CH. It was reported a reduction in the larval rate in rats infected with the nematode *Trichinella spiralis* when the rats were treated with *A. cina* 30 CH, *Podophyllum* 0 and Santoninum 30 CH (homeopathic products) in 68.14 %, 84.10 % and 81.20 % respectively<sup>(23)</sup>. Conversely, artemisinin pure reagent was used as control, and no inhibition of egg or larval migration was observed. These results suggest that the absence of activity might have been produced by the chemical conformation of *A. cina* 30 CH, and a solvent that used compounds with hydrogens and phenyl rings, thereby enabling a fast change in conformation.

Regarding the natural infection with GIN and the *A. cina* 30 CH treatments applied after 2 wk, the ABZ and *A. cina* 30 CH showed significant differences ( $P < 0.05$ ) in reductions in the



number of egg. These findings were like those reported by Bashtar *et al*<sup>(22)</sup>, who found a reduction of proglottids of *Moniezia* sp. in animals treated with *A. cina*. However, more studies are required to confirm the possible anthelmintic effect of *A. cina* 30 CH against nematode stages using artemisinin from native plants.

Treatments with *A. cina* 30 CH and ABZ against natural infection improved the FAMACHA values caused by the blood-feeding habit of *H. contortus* at 7 and 14 d after administration ( $P<0.05$ ). Similar results were found by Cala *et al*<sup>(11)</sup>, with artemisinin supported as a possible nematicide metabolite after infection. Demeler *et al*<sup>(24)</sup> showed the anaemia caused by *H. contortus* infection in lambs treated with ABZ showed nematicidal efficacy. A review carried out by Kerboeuf *et al*<sup>(23)</sup> suggests the activity of flavonoids on the structure and cell target is similar to the antioxidant effect caused by artemisinin. Although the *A. cina* anthelmintic mechanism of action is unknown, determination of this mechanism is needed for its application to nematodes infecting hosts. It was demonstrated the stability of artemisinin in the rumen, which was detectable in blood samples at 33 mg of artemisinin/kg of body weight<sup>(21)</sup>. The study of *A. cina* 30 CH showed participation of the drug as an anthelmintic, and it should be considered as a possible method for use in the control of parasitic nematodes.

## Conclusions and implications

The *A. cina* 30 CH had anthelmintic efficacy against *H. contortus* egg hatching during natural infection. The FAMACHA index suggest reduction of nematode activity after treatment with *A. cina* 30 CH and ABZ. In addition, this product demonstrated inhibition of egg hatching and larval migration, which indicates its possible anthelmintic effect. To optimize the use of this homeopathic compound, the mechanism of its action must be determined.

## Acknowledgments

This study was supported by PAPIIT IN226217, named "Efecto antihelmíntico del extracto etanólico de *Artemisia cina*, semilla de papaya (*Carica papaya*) y taninos condensados sobre el nemátodos hematófago *Haemonchus contortus*." Miss Higuera-Piedrahita R.I. was partially supported by a CONACYT grant, México. The strain of *Haemonchus contortus* used was isolated and maintained in laboratory 1 and 3 of the Multidisciplinary Research Unit of the Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

## Conflict of interest statement

None of the authors declare a conflict of interest.

## Literature cited:

1. Peter JW, Chandrawathani P. *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. Trop Biomedicine 2005;22:131-137.
2. Medina-Pérez P, Ojeda-Robertos N, Reyes-García M, Cámara-Sarmiento R, Torres-Acosta J. Evaluation of a targeted selective treatment scheme to control gastrointestinal nematodes of hair sheep under hot humid tropical conditions. Small Ruminant Res 2015;127:86-91.
3. Van der Brom R, Moll L, Kappert C, Vellema P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. Vet Parasitol 2015;209:278-280.
4. Geurden T, Chartier C, Fanke J, di Regalbono AF, Traversa D, et al. Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. Int J Parasitol: Drugs and drug resistance 2015;5:163-171.
5. Crook E, O'Brien D, Howell S, Storey B, Whitley N, Burke J, Kaplan R. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the mid-Atlantic region and comparison of *in vivo* and *in vitro* detection methods. Small Ruminant Res 2016;143:89-96.
6. Sales N, Love S. Resistance of *Haemonchus contortus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel/abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. Vet Parasitol 2016;228:193-196.
7. González-Garduño R, López-Arellano M, Ojeda-Robertos N, Liébano-Hernández E, Mendoza de Gíves P. Diagnóstico *in vitro* y en campo de resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. Arch Med Vet 2014;46:399-405.
8. Torres-Acosta J, Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. Small Ruminant Res 2008;77:159-173.
9. Delgado C, Rosegrant M, Steinfeld H, Ehui S, Courbois C. Livestock to 2020: The next food revolution. IFPRI, FAO/UN, ILRI Discussion Paper 1999;28-72.

10. Coop RL, Kyriazakis I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitol* 2001;17: 325-330.
11. Farmacopea homeopática Mexicana. 2007. [www.ismhei.com.mx/.../Farmacopea%20Homeopatica%20Dr%20Oswaldo\\_Martinez.p](http://www.ismhei.com.mx/.../Farmacopea%20Homeopatica%20Dr%20Oswaldo_Martinez.p). Accessed Nov 10, 2017.
12. Meier L, Torgerson P, Hertzberg H. Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. *Vet Parasitol* 2016;229:15- 21.
13. Zhonglei W, Liyan Y, Xiuwei Y, Xiaohua Z. Advances in the chemical synthesis of artemisinin. *Synthetic Communications: An Int J Rapid Communic Synthetic Organic Chemistry* 2014;44(14):1987-2003.
14. Montalvo X, López M, Vázquez V, Liébano E, Mendoza P. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala. *Téc Pecu Méx* 2006;44(1):81-90.
15. Cavalcanti A. Efeito do medicamento homeopático *sulphur* sobre nematódeos gastrintestinais, resistentes a ivermectina, de cordeiros infectados naturalmente. [tesis maestría]. Salvador, Brasil: Universidad Federal de Bahia; 2008.
16. Zacharias F, Guimaraes F, Araújo R, Almeida M, Ayres M, Bavia M, Mendonca-Lima M. Effect of homeopathic medicines on helminth parasitism and resistance of *Haemonchus contortus* infected sheep. *Homeopathy* 2008;97:145-151.
17. Saifbaeva I, Sidyakin G. Artemisin from *Artemisia cina*. *Chem Nat Comp* 1971;7(1):113.
18. Bhakuni R, Jain D, Sharma R, Kumar S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Sci* 2011;80(11):35-48.
19. Ayuntamiento de Mixquiahuala de Juárez. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Mixquiahuala de Juárez, Estado de Hidalgo 2013. <http://mixquiahuala.hidalgo.gob.mx/>. consultado 30 Nov, 2017.
20. Coles G, Borgsteede F, Geerts S, Klei T, Taylor M, Waller P. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1992;44:35-44.
21. Akkari H, Rtibi K, B'chir F, Reikik M, Aziz M, Gharbi M. *In vitro* evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet Res Commun* 2014;38:249-255.

22. Bashtar A, Hassanein M, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid K, Hassan S, Mehlhorn H, *et al*. Studies on monieziasis of sheep I prevalence and anthelmintic effects of some plant extracts, a light and electron microscopic study. *Parasitol Res* 2011;108:177-186.
23. Sukul N, Ghosh S, Sinhababu S. Reduction in the number of infective *Trichinella spiralis* larvae in mice by use of homeopathic drugs. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*. 2005;12(4):202-205.
24. Demeler J, Kleinschmidt N, Kuttler U, Koopmann R, Von Samson G. Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. *Parasitol Int* 2012;61:614-618.
25. Kerboeuf D, Riou M, Guegnard F. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. *Mini Rev Med Chem* 2008;8:116-128.

### 11 Discusión general

Esta investigación mostró hallazgos interesantes sobre una planta pobremente estudiada como lo es *A. cina*, si bien el género *Artemisia* ha sido ampliamente estudiada, en particular *A. cina* presenta pocos reportes sobre sus efectos biológicos. Dentro de los que se reportan en este trabajo es la actividad ovicida, larvicida y adulticida sobre *H. contortus*, pero además el efecto novedoso sobre L<sub>4</sub> in vitro y en jerbos, lo que permite considerarla como un antihelmíntico completo, en este orden, los antihelmínticos de referencia tienen acción sobre cierta fase del ciclo de vida del parásito como la larva o el adulto en particular. La mayoría de los estudios reportados del género *Artemisia* han atribuido el efecto antiparasitario a moléculas como flavonoides, cumarinas (Zhang *et al.* (2019) o a la mezcla de plantas en extracto acuoso apostando al efecto sinérgico de las moléculas como lo describe Mravcakova *et al* (2019). El control de parásitos debe girar en torno a las alternativas sustentables y dentro de ellas un gran campo a explorar es la herbolaria, muchas de las plantas han tenido actividad conocida, sin embargo, no se conocen los principios, las dosis o su toxicidad y es imperativo que se pueda realizar basándose en una metodología clara, precisa y repetible de obtención de metabolitos, estudios de estabilidad, farmacocinética y farmacodinamia como se reporta en es este trabajo y que se contrasta con el reportado por Olmedo-Juárez *et al* (2014) y Von Son-de Fernex *et al* (2015).

Los compuestos lignanos propuestos en este trabajo como responsables de la actividad antihelmíntica han sido descritos desde 1974 (Konno *et al.*) con actividad antibacteriana o como compuestos que se consideran preventivos para el cáncer femenino, sin embargo, no han encontrado reportes sobre su actividad antiparasitaria, más que como antiprotozoaria sobre *Plasmodium* y *Trypanosoma* (Schmitdt *et al.* 2012). Sin embargo, es bien conocida la actividad antioxidante de otros lignanos y que se consideran por la misma razón antivirales y anticancerosos

(Hadeel *et al.* 2020) Este efecto se demostró midiendo los valores de peróxido y valores de ácido tiobarbitúrico en aceites de semillas de ajonjolí y Salucci *et al* (2020) demostró que el uso de estos compuestos además puede prevenir la atrofia muscular.

Wang *et al* (2019) reportó la presencia de un lignano glucósido a partir de *Artemisia ordosica* extraído a partir del extracto en acetato de etilo. Li *et al* (2019) demostró la presencia de dos nuevos lignanos extraídos a partir de *A. annua* con actividad antifúngica sobre los hongos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Cylindrocarpon destrutans* de forma tal que el potencial de los lignanos extraídos a partir de *A. cina* debe ser explorado en otros campos como antioxidante, anticanceroso, antifúngico y antibacteriano.

## 12 Perspectivas

Este trabajo demostró el efecto antihelmíntico de la fracción hexánica de *A. cina* sobre fases de vida libre como huevo, L<sub>3</sub> y sobre fases endógenas como L<sub>4</sub> y adulto, por lo cual, se puede considerar como una planta promisorio para seguir estudiándola. Además de ello, con la identificación de los compuestos responsables de la actividad, se observó que dichos compuestos tienen además otras características reportadas que pueden coadyuvar a la recuperación de la infección crónica, es necesario realizar estudios de efecto antioxidante, antiinflamatorio e incluso explorar la capacidad que tienen los lignanos para actuar como fitoestrógenos, como mecanismo preventivo al fenómeno de alza posparto. Los metabolitos además deben ser estudiados a profundidad, es decir, estudios de farmacocinética, toxicidad y vías de administración mediante formulaciones farmacéuticas que puedan mejorar la distribución y absorción de los compuestos sobre el parásito para obtener su efecto tóxico y sobre el organismo para identificar el efecto nutracéutico.

### 13 Conclusiones

- ✓ La fracción hexánica mostró  $76.6 \pm 9.3\%$  de inhibición de la eclosión de huevos y  $80 \pm 9\%$  de efecto letal sobre L<sub>3</sub> el extracto en acetato de etilo y metanólico mostraron menor efecto letal por debajo del 60% al igual que en la inhibición de la eclosión de huevos. Se mostró una CL<sub>50</sub> 0.5mg/mL y de 1mg/mL para la CL<sub>90</sub>.
- ✓ Se plantea la fracción hexánica de *A. cina* como un potencial antihelmíntico, ya que tiene eficacia sobre las fases exógenas del ciclo de vida de *H. contortus*.
- ✓ La reunión C2F21-30 obtenida a partir de la columna cromatográfica 2 mostró 100% de efecto letal sobre L<sub>3</sub> de *H. contortus* y mostró ser una mezcla de dos compuestos denominados 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin que se encuentra en 63% y norisoguaiacina que se encuentra en 36%. El peso molecular es de 309 y 315m/z respectivamente.
- ✓ Se plantea a la fracción hexánica como potencial antihelmíntico en infecciones naturales ya que reduce la carga parasitaria en cabras naturalmente infectadas, coadyuva con la reducción del fenómeno de alza posparto e incide en la mejora de otros parámetros como FAMACHA© y condición corporal.

#### 14 Referencias

- ✓ Achi Y, Zinsstag J, Yao K, Yeo N, Dorchie P, Jacquet P. Host specificity of *Haemonchus* spp. For domestic ruminants in the savanna in northern Ivory Coast. *Veterinary Parasitology*. 2003. 116:151-158.
- ✓ Ahameethunisa A, Hopper W. Antibacterial activity of *Artemisia nilagirica* leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria. *BMC Complement Alternative Medicine*. 2010. 10:6.
- ✓ Ahmed A, Ejo M, Feyera T, Regassa D, Mammed B, Huluka S. In vitro anthelmintic activity of crude extracts of *Artemisia herba-alba* and *Punica granatum* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Parasitology Research*. 2020:4950196.
- ✓ Alba F, Cuéllar A. The “post parturient rise” phenomenon of gastroenteric nematodes in ewes native to Mexico. III Congreso Nacional de Producción Ovina. *Memorias de congreso*. 1990: 299-231.
- ✓ Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzman M. Immune responses associated with resistance to Haemonchosis in sheep. *Biomedical Research International*. 2013. 162158:1-11.
- ✓ Alberola, V. El síndrome de anorexia-caquexia. *Memorias del XI Congreso Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)*. 2006. 129-131.
- ✓ Al-Baytar A, Al-Jamee, Le-Mofradaat, Al-Adwiah W, Al-Aghziyah. Book in *Simple Drugs and Foods*. Beirut: Dar al-Kotob al-Ilamiyah. (in Arabic). 1992. 1:56-118.
- ✓ Allonby E, Dargie J. Pathophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: Studies on red cell kinetics and the “self -cure” phenomenon. *International Journal for Parasitology*. 1975. 5(2):147-157.
- ✓ Almahdawy SS, Said AM, Abbas IS, Dawood AH. The evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of the essential oil extracted from the aerial



parts of southernwood herb (*Artemisia abrotanum* L.) that recently grown in Iraq. Asian J Pharm Clin Res. 2017. 10:384–387.

- ✓ Andrews S. The efficacy of levamisole, and a mixture of oxfendazole and levamisole, against the arrested stages of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep. Veterinary Parasitology, 2000. 88:139-146.
- ✓ Angulo-Cubillán F, García-Coiradas L, Cuquerella M, Fuente C, Alunda J. *Haemonchus contortus*- sheep relationship: a review. Revista científica. 2007. XVII (6): 577-587.
- ✓ Aniya Y, Shimabukuro M, Shimoji M, *et al.* Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. Biol Pharm Bull. 2000. 23:309–312.
- ✓ Arece J, Mahieu M, Archimède H, Aumont G, Fernández M, González E, Cáceres O, Menéndez-Buxadera A. Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of gastrointestinal nematodes in sheep in Matanzas Cuba. Small Ruminant Research. 2004. 54:61–67.
- ✓ Aróstica N, Arece J, López J, Rodríguez D. Evaluation of FAMACHA color chart in the detection of anemia in goats under silvopastoral system conditions. Preliminary studies. Revista de Salud Animal. 2009. 31(3):183-187.
- ✓ Balint, G. Artemisinin and its derivatives. An important new class of antimalarial agents. Pharmacology Therapeutics. 2001. 90:261- 265.
- ✓ Banks D, Singh R, Barger I, Pratap B, Le Jambre L. Development and survival of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* on pasture in a tropical environment. International Journal for Parasitology. 1990. 20:155-160.
- ✓ Barger I. Control by management. Veterinary Parasitology. 1997. 72:493-500.
- ✓ Bashtar A, Hassanein M, Ghaffar F, Rasheld K, Hassan S, Mehlhorn H, Al-Mahdi M, Morsy K, Ghamdi A. Studies on monieziasis of sheep I. Prevalence

an anthelmintic effect of some plant extracts, a light and electron microscopic study. *Parasitology research*. 2011. 108:177- 186.

- ✓ Bautista Cerón O. Efecto de la administración oral de partículas de óxido de cobre en ovinos sobre el establecimiento de larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Haemonchus contortus* y posibles alteraciones en la mucosa abomasal. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2015.
- ✓ Beech R, Prichard R, Scott M. Genetic variability of the beta-tubulin genes in benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics*, 1994. 138:103-110.
- ✓ Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharm Biol*. 2011.49:101–109.
- ✓ Borges D, Teles J, Lima T, Pererira R, Green M, Alves G, Alexandre C, Almeida F. Discovery of potential ovicidal natural products using metabolomics. *Plos one*. 2020. 14(1):1-16.
- ✓ Bowman D.D. Georgis' Parasitology for Veterinarians. 7th Ed., 255-283. W.B. Saunders Company, 1999.
- ✓ Calderone V, Martinotti E, Baragatti B, Cristina Breschi M, Morelli I. Vascular effects of aqueous crude extracts of *Artemisia verlotorum* Lamotte (Compositae): *in vivo* and *in vitro* pharmacological studies in rats. *Phytotherapy Research*. 1999.13:645–648.
- ✓ Carvalho N. Suplementacao alimentar em cordeiros: influencia sobre a imunidade do hospedeiro, biología e patogenia de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. 2017. Tesis de grado. Universidad Estadual Paulista. Brasil.
- ✓ Chandrawathani P, Jamnah O, Adnan M, Waller P, Larsen M, Gillespie A. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*. 2004. 120:177-187.

- ✓ Chartier C, Pors I, Hubert J, Rocheteau D, Benoit C, Bernard N. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in western France. *Small Ruminant Research*. 1998. 29:33-41.
- ✓ Chetan J, Sampath K, Sekhar S, Prakash H. Antioxidant antibacterial and DNA protecting activity of selected medicinally important Asteraceae plants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012. 4(2):257-261.
- ✓ Chung K, Choi J, Back N, Choi M, Kang E, Chung H, Jeong T, Lee K. Eupafolin, a flavonoid isolated from *Artemisia princeps*, induces apoptosis in human cervical adenocarcinoma HeLa cells. *Molecular Nutrition Food Research*. 2010. 54(9):1318-1328.
- ✓ Coles G, Bauer C, Borgsteede F, Geerts S, Klei T, Taylor M, Waller P. World Association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 1992. 44(1-2):35-44.
- ✓ Coles G. Drug-resistant parasites of sheep: An emerging problem in Britain? *Parasitology Today*. 1998. 14:86-88.
- ✓ Corticelli B y Lai M. Osservazioni sulle larve infestive di *Haemonchus* ottenute dal bovino e dall'ovino in Sardegna. *Extracto de Alli della Societü Italiana delle Scienze Velerinarie*. (1961): 15:708-715.
- ✓ Cox G, Shamansky M, Boisvenue R. Identification and preliminary characterization of cuticular surface proteins of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1989.36(3):233-241.
- ✓ Cuéllar-Ordaz A. Nuevas opciones para el control de parásitos en la ovinocultura tropical. In: 1er Simposio de Ovinocultura Tropical, Palenque, Chiapas, México. 2009.
- ✓ Cuéllar-Ordaz J. Blackbelly, una raza ovina resistente a parásitos, opción para los sistemas tropicales subhúmedos. *Revista académica Ciencia Animal*. 2019. 17(Supl 1):6-17.

- ✓ Cuéllar-Ordaz J. nuevas opciones para el control de parásitos en la ovinocultura tropical. 1er Simposio de Ovinocultura Tropical. 2009.
- ✓ Dandan Z, Jianjiang Z. Two cytotoxic sesquiterpenes from hairy root cultures of *Artemisia annua* L. induced apoptosis of highly metastatic lung carcinoma cell line 5-D. *Journal Bioscience Bioenergy*. 2009. 108: S24–S25.
- ✓ Dash K. Distribution of trichostrongylid nematodes in the abomasum of sheep. *International Journal Parasitology*. 1985.15: 505-510.
- ✓ Davuluri T, Chennuru S, Pathipati M, Krovvidi Rao G. In vitro anthelmintic activity of three tropical plant extracts on *Haemonchus contortus*. *Acta Parasitologica*. 2020. 65(1):11-18.
- ✓ De Paula Carlis M, Féboli A, Laurentiz A, Dilva F, Oliveira A, Andrade e Silva M, Dos Anjos L, Guidi L, Sa Silva Laurentiz R. In vitro anthelmintic activity of the crude hydroalcoholic extract of *Piper Cubeba* fruits and isolated natural products against gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2019. 275: 108932.
- ✓ Eddi C, Caracostantogolo J, Peña M, Schapiro J, Marangunich L, Waller P, Hansen J. The prevalence of anthelmintics resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Argentina. *Veterinary Parasitology*. 1996. 62:189-197.
- ✓ Encalada Mena L, López Arellano M, Mendoza de Gives P, Liébano E, Vázquez V, Vera G. Primer informe sobre la presencia de resistencia a ivermectina en bovinos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales. *Veterinaria México*. 2008. 39(4): 423-428.
- ✓ Eysker M, Ploeger H. Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology*. 2000. 120: S109-S119.
- ✓ Facultad de química. Universidad Nacional Autónoma de México. Material de clase digital. 2018. En línea. Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/proteinas/estructura/ChrTLC.html>
- ✓ Falcone F, Pritchard D, Gibbs B. Do basophils play a role in immunity against parasites? *Trends Parasitology*. 1997. 27(9):1037-1040.

- ✓ Favela-Hernández J, Clemente-Soto A, Balderas-Rentería I, Garza-González E, del Rayo Camacho-Corona M. Potential mechanism of action of 3'-demethoxy-6-O-demethylisoguaiacin on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2015. 20(7):12450-12458.
- ✓ Fernández Foren A. Restricción alimenticia en ovinos: respuesta endocrino-metabólica dependiente de las reservas corporales. 2015. Tesis de grado. Universidad de la República. Uruguay.
- ✓ Ferreira R. Estigmasterol: alteracoes estruturais nos anéis A e B e estudo de atividade biológica. Tesis de maestría. Universidade Federal de Minas Gerais. 2014.
- ✓ Fonte- Galindo L, Baldriche J, Sarracent J, Hernández Y, González A. Regulación por helmintos de las respuestas inmunitarias del hospedero. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2016. 88(1):1-19.
- ✓ Galindo B, Torres A, Cámara S, Sandoval C, Aguilar C, Ojeda R Reyes R, España E. Persistence of the efficacy of cooper oxide wire particles against *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2011.176:201-207.
- ✓ Garcia C, Adams. Healing with medicinal plants of the west: cultural and scientific basis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 28. 2020:115180.
- ✓ García J, Gómez L, Mendoza de Gives P, Rivera-Coronoa J, Millán-Orozco J, Ascasio J, Medina M, Mellado M. Anthelmintic efficacy of hydro-methanolic extracts of *Larrea tridentate* against larvae of *Haemonchus contortus*. *Tropical Animal Health and Production*. 2018.1099-1105.
- ✓ Garza González E, Camacho Corona M, Favela Hernández J. Use of 3'-demethoxy-6-O-demethyl isoguaiacin as an antibacterial agent. Mexican Patent Applying. Información de la patente: febrero 18 de 2015. MX: 2013009248A.
- ✓ Getachew T, Dorchies P, Jacquet P. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Review. Parasite*. 2007. 14:3-14.

- ✓ Ghasani AM, Hadiqat, al-Azhar F, Mahiyyat A, Al-Khattabi M, ed. Beirut: Dar al-Gharb al-Islami. (in Arabic); 1990. p. 11 and 130–1.
- ✓ Gisvold O, Thaker E. Lignans from *Larrea divaricata*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1974. 63(12):1905-1907.
- ✓ Gnabre J, Ito Y, Ma, Y, Chih R. Isolation of anti-HIV-1 lignans from *Larrea tridentata* by counter – current chromatography. Journal of Chromatography A. 1996. 719(2):353-364.
- ✓ Gnabre John, Huang Ru, Chih C, Robert B, Burns J, Caldera S, Malcomson M, McClure K. Characterization of anti-HIV lignans from *Larrea tridentata*. Tetrahedron. 1995. 51(45):12203-10. doi:10.1016/0040-4020(95)00794-9.
- ✓ Gnabre, John N. Extracts of *Larrea tridentata* having antiviral activity and their use for treating viral infections. Información de la patente: Nov 23, 1999. US:5989555.
- ✓ Gómez-Samblás M. Inmunoprotección de un antígeno recombinante y del lipopéptido derivado del mismo, frente a nematodos intestinales: estudios de la inmunomodulación. 2017. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- ✓ González-Cortázar M, Zamilpa A, López-Arellano M, Aguilar-Marcelino L, Reyes-Guerrero D, Olazarán-Jenkins S, Ramírez-Vargas G, Olmedo-Juárez A, Mendoza de Gives P. Lysiloma acapulcensis leaves contain anthelmintic metabolites that reduce the gastrointestinal nematode egg population in sheep faeces. Comparative Clinical Pathology. 2018. 27(1):189-197.
- ✓ González-Garduño R, Mendoza de Gives P, Torres Hernández G, Becerril Pérez C, Ortega Jiménez E, Hernández Mendo O. Estudio in vitro de la capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* contra larvas de nematodos gastrointestinales de ovinos de pelo. Técnica Pecuaria Mexicana. 2005. 43(3): 405-414.
- ✓ Gou de B, Ferte H, Depaquit J, Justine J, Tillier A, Durette-Desset M. Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28s rDNA sequences. Molecular Phylogenetic Evolution. 2001. 19(3):430-442.

- ✓ Green P, Forsyth B, Rowan K, Payne G. The isolation of a field strain of *Haemonchus contortus* in Queensland showing multiple anthelmintic resistance. *Australian Veterinary Journal*. 1981. 57:79-84.
- ✓ Gruner L, Aumont G, Getachew T, Brunel J, Pery C, Cognié Y, Guerin Y. Experimental infection of Blackbelly and INRA 401 straight and crossbred sheep with trichostrongyle nematode parasites. *Veterinary Parasitology*. 2003. 116:239-249.
- ✓ Hadeel S, Khalida S, Walsh M. Antioxidant activity of sesame seed lignans in sunflower and flaxseed oils. *Food research*. 2020. 4(3): 612-622.
- ✓ Hennesy D. Modifying the formulation of delivery mechanisms to increase the activity of anthelmintics compounds. *Veterinary Parasitology*. 1997. 72:367-390.
- ✓ Herawati M, Pudjihartati E, Pramono S, Sulistyarningsih E, Purwantoro A. Obtaining *Artemisia cina* polyploidy through plant growth regulator treatment in shoot culture. *Agrivita*. 2015. 37(2):178-184.
- ✓ Herrerias T, Oliveira B, Gomes M, Oliveira M, Carnieri E, Cadena S, Martínez G, Rocha M. Eupafolin: Effect on mitochondrial energetic metabolism. *Bioorganic and Medicinal Plant*. 2008. 16(2):854-861.
- ✓ Higuera-Piedrahita R, López-Arellano M, López-Arellano R, Cuenca Verde C, Cuéllar Ordaz J. Evaluación del efecto de las artemisininas provenientes del extracto etanólico de *Artemisia cina* sobre L<sub>3</sub> de *Haemonchus contortus* en una técnica de explantes abomasales. *Revista Ciencia y Agricultura*. 2015. 13(1): 108-116.
- ✓ Higuera-Piedrahita R. Efecto de *Artemisia cina* 30CH y *Artemisia cina* en extracto etanólico contra la infección natural e inducida por *Haemonchus contortus*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 2016. México.
- ✓ Ho WE, Peh HY, Chan TK, Wong WF. In vitro immunomodulatory properties of a sesquiterpene lactone-bearing fraction from *Artemisia khorassanica*. *Pharmacology Therapy*. 2014. 142:126–139.

- ✓ Hong L, Ying S-h. Ethanol extract and isolated constituents from *Artemisia dracunculus* inhibit esophageal squamous cell carcinoma and induce apoptotic cell death. *Drug Resistance*. 2015. 65:101–106.
- ✓ Howard C, Brooke G, Werling D, Sopp P, Hope J, Parsons K, Collins R. Dendritic cells in cattle: phenotype and function. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 1999. 72:119-124.
- ✓ Hunter A, Mackenzie G. The pathogenesis of a single challenge dose of *Haemonchus contortus* in lambs under six months of age. *Journal Helminthology*. 1982. 56:135-144.
- ✓ Irum S, Ahmed H, Mirza B, Donskow K, Muhammad A, Qayyum M, Simsek S. In vitro and in vivo anthelmintic activity of extracts from *Artemisa parviflora* and *A. sieversiana*. *Helmintologia*. 2017. 54(3):218-224.
- ✓ Iyengar M. Homeopathy for control of root-knot disease of mulberry. *Indian silk*. 2009. 48(8): 1-17.
- ✓ Janbaz KH, Gilani A. Evaluation of the protective potential of *Artemisia maritima* extract on acetaminophen-and CCl4-induced liver damage. *Journal of Ethnopharmacology*. 1995. 47:43–47.
- ✓ Khan M, Hyat S, Hussain M, Iqbal Z. Effect of haemonchosis on body weight gain and values in sheep Park. *Veterinary Journal*. 1988.8(2):62-67.
- ✓ Khan M, Yu B, Rasul A, *et al.* Jaceosidin induces apoptosis in U87 glioblastoma cells through G2/M phase arrest. *Evidence Based Complement Alternative Medicine*. 2011: 703034.
- ✓ Kitson R, McAllister G, Taylor R. Synthesis of yomogin using a telescoped  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone annelation procedure. *Tetrahedron letters*. 2011. 52(5): 561-564.
- ✓ Klayman L. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*. 1985. 228:1049-1055.
- ✓ Klongsiriwet C, Quijada J, Williams A, Mueller-Harvey I, Williamson E, Hoste H. Synergistic inhibition of *Haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid



monomers and condensed tannins. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2015. 5:127-134.

- ✓ Knox M. Effectiveness of cooper oxide wire particles for *Haemonchus contortus* control in sheep. *Australian Veterinary Journal*. 2002. 80(4):224-227.
- ✓ Konno C, Hui-Zhong X, Zhi-Zhen L, Bao-Xia M, Clemesn E, Chun-Tao C, Cordell G, Soejarto D, Waller D, Fong H. 1989. 1-Aryl tetralin lignans from *Larrea tridentate*. *Journal of natural Products*. 52(5):1113-1117.
- ✓ Konno, Chohachi; Lu, Zhi Zhen; Xue, Hui Zhong; Erdelmeier, Clemens A. J.; Meksuriyen, Duangdeun; Che, Chun Tao; Cordell, Geoffrey A.; Soejarto, D. Doel; Waller, Donald P.; Fong, Harry H. S. Furanoid lignano de *Larrea tridentata* *Journal of Natural Products* 1990. 53(2):396-406.
- ✓ Labruzzo A, Cantrell C, Carruba A, Ali A, Wedge D, Duke S. Phytotoxic lignans from *artemisia arborescens*. *Natural product communications*. 2018. 13(3):237-240.
- ✓ Lans C, Turner N, Khan T, Brauer G. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada. *Veterinary parasitology*. 2007. 148:325-340.
- ✓ Le Jambre L, Gill J, Lenane I. Characterization of an avermectin resistant strain of Australian *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology* 1995. 25: 691- 698.
- ✓ Lee R, Jeon Y, Cho J, *et al*. Esculetin exerts anti-proliferative effects against nonsmall- cell lung carcinoma by suppressing specificity protein 1 *in vitro*. *Genetic Physiology Biophysical*. 2016. 36:31–39.
- ✓ Li K, Xian D, Yu-Nan M, Ze-Hong W, Yong-Ming Y, Yong-Xian C. Antifungal coumarins and lignans from *Artemisia annua*. *Fitoterapia*. 2019. 134: 323-328.
- ✓ Liu W, Gan H, Fang C. Synergism of cytotoxicity effects of triptolide and artesunate combination treatment in pancreatic cancer cell lines. *Zhongguo Zhen Jiu*. 2013. 33:171–172.

- ✓ Lu G, Nagbanshi M, Goldau N, Mendes J, Meissner P, Müller O. Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria. *BMC Medicine*. 2018.
- ✓ Luna-Vázquez, Francisco J.; Ibarra-Alvarado, Cesar; Del Rayo Camacho-Corona, Maria; Rojas-Molina, Alejandra; Rojas-Molina, J. Isela; García, Abraham; Bah, Moustapha. Vasodilatador activity of compounds isolated from plants used in Mexican traditional medicine. *Molecules*. 2018. 23(6):1474/1-1474/17. DOI:10.3390/molecules23061474.
- ✓ Lv W, Sheng X, Chen T, Xu Q, Xie X. Jaceosidin induces apoptosis in human ovary cancer cells through mitochondrial pathway. *Biomedical Research International*. 2008: 216.
- ✓ Lyengar M. Homeopathy for control of root- knot disease of mulberry. *Indian Silk*. 2009. 48(8):17.
- ✓ Maciel S, Giménez A, Gaona C, Waller P, Hansen J. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay. *Veterinary Parasitology*. 1996.62:207–212.
- ✓ Malan, F.S., VanWyk, J.A., Wessels, C.D. Clinical evaluation of anaemia in sheep: early trials. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*. 2001. 61:165–174.
- ✓ Maroto R, Jiménez A, Álvarez V, De Oliveira J, Hernández J. Evaluación de la resistencia antihelmíntica de nematodos gastrointestinales en ovinos de Costa Rica. In: XV Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Colegio de Médicos Veterinarios, San José, Costa Rica. 18–20 de nov. 2009.
- ✓ Masuda Y, Asada K, Satoh R, Takada K, Kitajima. Capillin, a major constituent of *Artemisia capillaris* Thunb. flower essential oil induces apoptosis through the mitochondrial pathway in human leukemia HL-60 cells. *Journal of Phytomedicine*. 2015. 22:545–552.
- ✓ Mckenna P, Watson T. The comparative efficacy of four broad spectrum anthelmintics against some experimentally induced trichostrongylid infections in sheep and goats. *New Zealand Veterinary Journal*. 1987. 35:192-195.

- ✓ Mederos A. Situación actual de la resistencia antihelmíntica en los ovinos. El País Agropecuario, Montevideo, Uruguay. 2002: 25–28.
- ✓ Mendoza de Gives P, Flores Crespo J, Herrera Rodriguez D, Vazquez Pratz V, Liébano Hernandez E, Ontiveros Fernandez G. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. Journal of Helminthology. 1998. 72(4):343-347.
- ✓ Meshnick S, Taylor T, Kamchonwongpaisan S. Artemisinin and the Antimalarial Endoperoxides; from Herbal Remedy to Targeted Chemotherapy. Microb. Rev. 1996. 60: 301-315.
- ✓ Mravcakova D, Komaromyova M, Babjak M, Dolinska M, Konigova A, Petric D, Cobanova K, Slusarczyk S, Cieslak A, Varady M, Varadyova Z. Anthelmintic activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and mallow (*malva sylvestris* L.) against *Haemonchus contortus* in sheep. Animals. 2020. 10(2): 219.
- ✓ Mravcakova D, Varadyova Z, Kopcakova A, Cobanova K, Gresakova L, Kisidayova S, Babjak M, Dolinska M, Dvoroznakova E, Konigova A, Vadlejch J, Ciedlak A, Slusarczyk S, Varady M. Natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in sheep. BMC Veterinary Research. 2019. 15(1):302.
- ✓ Muchiut S, Fernández A, Lloberas M, Steffan P, Elisabet S, Cardozo P, Bernat G, Riva E, Fiel C. Recovery of fenbendazole efficacy on resistant *Haemonchus conrtotus* by management of parasite refugia and population replacement. 2019. 271:31-37.
- ✓ Nari A, Salles J, Gill A, Waller P, Hansen J. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. Veterinary Parasitology. 1996. 62:213-222.
- ✓ Olmedo-Juarez A, Rojo-Rubio R, Arece-García J, Salem A, Kholif A, Morales-Almaraz E. In vitro activity of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis*

on exogenous development stages of sheep gastrointestinal strongyles. Italian Journal of Animal Science. 2014. 13(3): 221-225.

- ✓ Onyiah L, Arslan O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. Journal Thermal Biology. 2005. 30:203-211.
- ✓ Pardini R, Chung K, Raymond B, Morris R, Fletcher D. Inhibition of mitochondrial transport system by norisoguaiacin. Biochemical Pharmacology. 1973. 22(15):1921-1925.
- ✓ Passos C, Arbo M, Rates S, Poser G. Terpenóides com atividade sobre o sistema nervoso control (SNC). Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009. 19(1): 140-149.
- ✓ Peña M, Miller J, Horohov D. Effect of dexamethasone treatment on the immune response of Gulf Coast Native lambs to *Haemonchus contortus* infection. Veterinary Parasitology. 2004. 119(2-3):223-235.
- ✓ Pérez S, Argurcia M. Evaluación de la efectividad de fitofármacos antiparasitarios internos en ovino-caprinos de productoras asociadas al organismo Xochitl Acalt del municipio de Malpaisillo, León, Nicaragua. Tesis de licenciatura. 2008. Costa Rica.
- ✓ Pochetino M, Martinez M, Arenas P, Crivos M, Navone G, Digiani M, Teves L, Remorini C, Illkow C, Delorenzi N. Fitoterapia mbya: análisis y evaluación del tratamiento de las parasitosis- Acta académica. 2003. 46: 301-310.
- ✓ Quiroz H. Parasitología veterinaria. Editorial Limusa. 2003.
- ✓ Ramawat KG, Merillon JM. Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. Springer. 2013. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>.
- ✓ Rimbaud E, Zúniga P, Doña M, Pineda N, Luna L, Rivera G, Molina L, Gutiérrez J, Vanegas J. First diagnostic from levamisole and ivermectin nematodes resistance in Pelibuey sheep at Nicaragua. La Calera UNA. 2005. 5:49–51.

- ✓ Rodrigues R, Foglio M, Boaventura S, Da Silva A, Garcia V. Otimizacao do proceso de extracao e isolamento do antimalárica artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. *Química nova*. 2006. 29(2): 368-372.
- ✓ Rojas N, Arece J, Carrión M, Pérez K, San Martín C, Valerino P, Ramírez W. Identificación y caracterización de especies de *Haemonchus* en caprinos del Valle de Cauto en Granma. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 2012.13(1):1-10.
- ✓ Rosalinski-Moraes F, Fernandes F, Munaretto A, de Oliveira S, Wilmsen M, Pereira M, Meirelles A. Famacha system, body condition score and diarrhea score as indicators for the targeted selective anthelmintic treatment of breeding ewes. *Bioscience Journal*. 2012. 28(6):1015-1023.
- ✓ Rowe J, Nolan J, De Chaneet G, Teleni E. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. *British Journal Nutrition*. 1988. 59:125-139.
- ✓ Ryu J, Lee H, Jeong Y, Ryu S Nam Y. Yomogin, an inhibitor of nitric oxide production in LPS-activated macrophages. *Archives of Pharmacology Research*. 1998. 21:481-484.
- ✓ Ryu S, Min O, Kyeong K. Yomogin inhibitis the degranulation of Mat Cells and the Production of the Nitric Oxide in Activated Raw 264.7 cells. *Planta Medica*. 2000. 66(2):171-173.
- ✓ Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, *et al*. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals Clinical Microbiology Antimicrobiology*. 2007.6:10.
- ✓ Saitbaeva I, Sidyakin G. Artemisin from *Artemisia cina*. *Chemistry of Natural Compounds*. 1971. 7(1):113.
- ✓ Saleh AM, Aljada A, Rizvi SA, Nasr A, Alaskar AS. Williams JD. *in vitro* cytotoxicity of *Artemisia vulgaris* L. essential oil is mediated by a mitochondria-dependent apoptosis in HL-60 leukemic cell line, *BMC Complement*. *BMC Complement Alternative Medicine*. 2014.14:118-226.

- ✓ Salucci S, Falcieri E. Polyphenols and their potential role in preventing skeletal muscle atrophy. *Nutrition Research*. 2020. 74:10-22.
- ✓ San Primitivo F, De la Fuente L. Situación actual de la oveja de raza churra. *Archivos de zootecnia*. 2000. 49(186):161-165.
- ✓ Sangster N, Redwin J, Bjorn H. Inheritance of levamisole and benzimidazole resistance in an isolate of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 1998. 28:503-510.
- ✓ Sangster N. Introduction on recent research on *Haemonchus contortus*. *International Journal Parasitology*. 1995.25:1271-1272.
- ✓ Saratikov A, Pritchep T, Vengerovsky A, *et al*. Antiinflammatory properties of etheric oils of *Achillea-asiatica* and some species of *Artemisia*. *Khim-Farm Zh*. 1986. 20:585–588.
- ✓ Schmitdt T, Rzeppa S, Marcel K, Reto B. *Larrea tridentate* Absolute configuration of its epoxyignans and investigations on its antiprotozoal activity. *Phytochemistry letters*. 2012. 5(3):632-638.
- ✓ Sharma P, Joshi T, Joshi T, Chandra S, Tamta S. In silico screening of potential antidiabetic phytochemicals from *Phyllanthus* therapeutic targets of type 2 diabetes. *Journal of ethnopharmacology*. 2020. 248: 1-12.
- ✓ Simpson H. Pathophysiology of parasitism abomasal: is the host or parasite responsible? *Vet. J*. 2000. 160:177-191.
- ✓ Singh HP, Kaur S, Mittal S, Batish DR, Kohli RK. Z. Phytotoxicity of major constituents of the volatile oil from leaves of *Artemisia scoparia*. *Waldst & Kit Naturforsch C*. 2008. 63:663–666.
- ✓ Sissay M, Asefa A, Ugglä A, Waller P. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: exploitation of refugia to restore anthelmintics efficacy. *Veterinary Parasitology*. 2006. 135:337-346.
- ✓ Song Y, Jang M, Chin Y, Jeong S, Zhan D, Oh S, Lee J, Choi S, Soo Y, Choon G. Pharmaceutical composition from *Larrea nitida* extract for preventing and treating female cancers and menopausal symptoms. *International Appling*. 2014. 1-37.

- ✓ Sprenger L, Baron J, Zawadzki S, Magalhaes P, Molento M. Ovicidal and larvicidal activity of *Artemisia annua* hydroalcoholic extract against *Haemonchus contortus*. *Archives of Veterinary Science*. 2016. 21(4):57-65.
- ✓ Suchitra S, Paritosh J. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggest its role in feeding and immune evasion by the parasite. 2005. 1722 (3):293-303.
- ✓ Taherkhani M. Chemical constituents and *in vitro* anticancer, cytotoxic, mutagenic and antimutagenic activities of *Artemisia diffusa*. *Pharm Chem J*. 2015. 48:727–732.
- ✓ Taleghani A, Tayarani-Najaran Z. Potent cytotoxic natural flavonoids: the limits of perspective. *Current Pharm Des*. 2018. 24:5555–5579.
- ✓ Tan RX, Lu H, Wolfender JL, *et al*. Mono-and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. *Planta Medicinal*. 1999. 65:064–067.
- ✓ Tan RX, Zheng W, Tang H. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Med*. 1998. 64:295–302.
- ✓ Tanaka K. Antimicrobial activity of capillin, a component of the essential oil of *Artemisia capillaris* and of its derivatives. *Seikagaku*. 1981. 33:399–409.
- ✓ Thring T, Weitz F. Medicinal plant use in the bredasdorp/elim region of the southern overberg in the western cape province of south Africa. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006.103:261–275.
- ✓ Torres R, Urbina F, Morales C, Modak B, Monache D. Antioxidant properties of lignans and ferulic acid from the resinous exudate of *Larrea nitida*. *Journal of the Chilean chemical society*. 2003. 48(3):61-63.
- ✓ Torres-Acosta J, López-Cervantes C, Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Cámara-Sarmiento R, Rodríguez J, Canul-Ku H, Tirado-Muñoz F, Aguilar-Caballero A, Roberts B. Prevalence of sheep farms with anthelmintic resistant nematodes in two states of Topical México. In: *Proc. First North American Parasitology Congress, Mérida. México*. 2007:136–137.

- ✓ Torres-Acosta J, Rodríguez Vivas R, Cámara-Sarmiento R. Efecto del parto doble en la eliminación de huevecillos de nemátodos y ooquistes de *Eimeria* en cabras criollas. *Revista Biomédica*. 1995. 6:208-215.
- ✓ Torres-Acosta JFJ, Jacobs DE, Aguilar-Caballero A, Sandoval-Castro C, May-Martinez M, Cob-Galera LA. The effect of supplementary feeding on the resilience and resistance of browsing Criollo kids against natural gastrointestinal nematode infections during the rainy season in tropical Mexico. *Veterinary Parasitology*. 2004. 124: 217-238.
- ✓ Turi CE, Shipley PR, Murch SJ. North American *Artemisia* species from the subgenus *Tridentatae* (Sagebrush): A phytochemical, botanical and pharmacological review. *Phytochemistry*. 2014.98:9–26.
- ✓ Uppal R, Yadov C, Bhushan C. Efficacy of closantel against fenbendazole and levamisole resistant *Haemonchus contortus* in small ruminants. *Tropical Animal Health and Production*. 1993. 25:30-32.
- ✓ Urrutia J, Gámez H. Condición corporal en caprinos. INIFAP. Desplegable para productores. 2006. En línea. Disponible en: <file:///C:/Users/rosit/Downloads/68.pdf>
- ✓ Van Agtmael MA, Eggelte T, Boxtel C. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. Kidlington, 1999. 20:199-205.
- ✓ Van wyk J, Malan F, Randles J. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? *Veterinary Parasitology*. 1997. 70:111-122.
- ✓ Van Wyk JA, Hoste H, Kaplan RM, Besier B. Targeted selective treatment for worm management—how do we sell rational programs to farmers? *Veterinary Parasitology*. 2006.139:336–346.
- ✓ Von Son-de Fernex E, Alonso-Diaz M, Mendoza de Gives P, Valles de la Mora B, González Cortázar M, Zamilpa A, Castillo Gallegos E. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the



- ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Veterinary parasitology*. 2015. 214(1-2):89-95.
- ✓ Wang J, Guo Y, Zhang BC, Chen ZT, Gao JF. Induction of apoptosis and inhibition of cell migration and tube-like formation by dihydroartemisinin in murine lymphatic endothelial cells. *Pharmacology*. 2007. 80:207–218.
  - ✓ Wang Q, Gong J, Hao J, Xu Y. Structure elucidation of a new lignan glycoside from *Artemisia ordosica*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2019. 55(6): 1007-1009.
  - ✓ Wegiera M, Smolarz HD, Jedruch M, Korczak M, Koproń K. Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line—pilot study. *Acta Pol Pharm*. 2012 69:263.
  - ✓ Willcox M. Alternative pathway targets. *Journal Alternative Complement Medicine*. 2009. 15:101–109.
  - ✓ Woerdenbag H, Van Uden W, Pras N. *Artemisia cina*. Adverse effects of herbal drugs. 2017. 3: 15-22.
  - ✓ Xie ZY, Lin TT, Yao MC, Wan JZ, Yin S. Unusual guaiane sesquiterpenoids from *Artemisia rupestris*. *Helv Chim Acta*. 2013 96:1182–1187.
  - ✓ Zarza-Albarrán M, Olmedo Juárez A, Rojo Rubio R, Mendoza de Gives P, González-Cortázar M, Tapia Maruri D, Mondragón-Ancelmo J, García-Hernández C, Blé-González E, Zamilpa A. Galloyl flavonoids from *Acacia farnesiana* pods possess potent anthelmintic activity against *Haemonchus contortus* eggs and infective larvae. *Journal of ethnopharmacology*. 2020. 249 (1):121-127.
  - ✓ Zhan H, Congshan L, Zheng Q. Development and application of anthelmintic in China. *Acta tropica*. 2019. 200:105-181.
  - ✓ Zhang B. Artemisinin – derived dimers as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms, and structure-activity relationships. *Arch der Pharmazie*. 2020. 353(2):1-11.
  - ✓ Zhang H, Liu C, Zheng Q. Development and application of anthelmintic drugs in China. *Acta tropica*. 2019. 200: 105181.

---

## ANEXO I

---

### 15 Cromatografía en capa fina

La técnica de cromatografía en capa fina se utilizó para identificar compuestos obtenidos de las fracciones obtenidas del extracto de *A. cina* y se siguió el siguiente fundamento:

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica y rápida para determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar muestras y realizar seguimientos en una reacción. La muestra se deposita cerca de un extremo de la lámina de aluminio que ha sido cubierta con una capa adsorbente (fase estacionaria). La lámina con las muestras a evaluar se coloca en un recipiente de vidrio cerrado que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla asciende por capilaridad a través del adsorbente los productos se separan (Facultad de química, 2018).

El orden de elución de un compuesto se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. El orden creciente de fuerza del eluyente con los solventes comúnmente utilizados está el

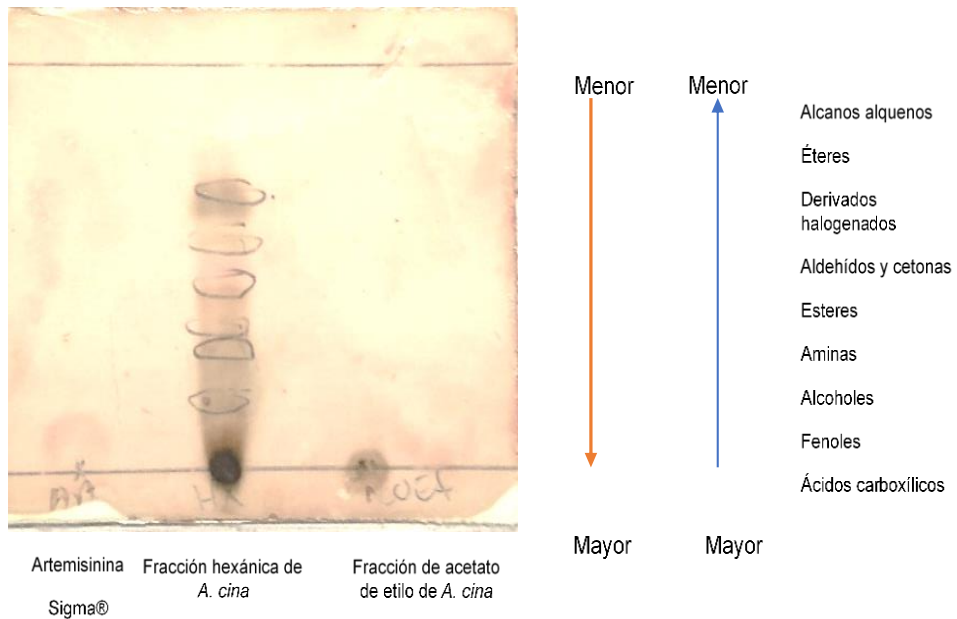
Hexano < tetraclorometano < cloroformo < diclorometano < acetato de etilo < acetona < 2propanol < metanol < agua (Facultad de química, 2018).

La retención se puede explicar en base a la competencia que se establece entre el soluto a separar y la fase móvil por adsorberse a los centros activos polares de la fase estacionaria. Las moléculas del soluto se adsorben en la fase estacionaria y a medida que se produce la elución van siendo desplazadas por la fase móvil. La retención y la selectividad en la separación dependen de los valores de las constantes de los equilibrios químicos y dependen de la polaridad del compuesto, la naturaleza del disolvente (Figura 25).

Para calcular el  $R_f$  se utiliza la siguiente fórmula:

$R_f = \text{distancia recorrida por el compuesto (X)} / \text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}$ .

Figura 30. Fracción hexánica de *Artemisia cina* y artemisinina en placas de cromatografía en capa fina fase normal.



---

## ANEXO II

---

### 16 Separación de compuestos de la fracción hexánica de *A. cina* a través de cromatografía líquida de alta resolución

Como método para la separación de compuestos obtenidos a partir de la fracción hexánica de *A. cina* y sus fracciones se utilizó cromatografía líquida de alta resolución utilizando el método denominado Poco polar en fase móvil de agua: acetonitrilo, con tiempo de retención como lo muestra el siguiente cuadro.

Cuadro 11. Sistema utilizado en cromatografía líquida para el análisis de muestras de la fracción hexánica y reuiones obtenidas a partir de *A. cina*

| Tiempo | Flujo | % Agua grado HPLC | % Acetonitrilo grado HPLC |
|--------|-------|-------------------|---------------------------|
| 0      | 0-90  | 100               | 0                         |
| 1      | 0-90  |                   |                           |
| 10     | 0-90  |                   |                           |
| 12     | 0-90  | 70                | 30                        |
| 15     | 0-90  |                   |                           |
| 16     | 0-90  | 50                | 50                        |
| 20     | 0-90  |                   |                           |
| 21     | 0-90  | 30                | 70                        |
| 24     | 0-90  |                   |                           |
| 28     | 0-90  | 100               | 0                         |
| 30     | 0-90  |                   |                           |

---

## ANEXO III

---

### 17 . Cromatografía de la columna 1

Se muestran a continuación las condiciones de la columna cromatográfica al vacío en sílice (Cuadro 12).

Cuadro 12. Condiciones de la columna cromatográfica al vacío en sílice.

| <b>Fracción</b> | <b>Sistema: (Hexano: Acetato de etilo)</b> |
|-----------------|--|
| 1-10            | 100  |
| 11-14           | 98:2                                       |
| 15-19           | 96:4                                       |
| 20-24           | 94:6                                       |
| 25-30           | 92:8                                       |
| 31-35           | 90:10                                      |
| 36-40           | 88:12                                      |
| 41-44           | 86:14                                      |
| 45-50           | 84:16                                      |
| 51-55           | 82:18                                      |
| 56-62           | 80:20                                      |
| 63-67           | 80:20                                      |
| 68-72           | 80:20                                      |
| 73-77           | 80:20                                      |
| 78-81           | 78:22                                      |
| 82-86           | 76:24                                      |
| 87-93           | 74:26                                      |
| 94-103          | 72:28                                      |
| 104-106         | 70:30                                      |
| 107-113         | 68:32                                      |
| 114-119         | 66:34                                      |
| 120-123         | 64:36                                      |
| 124-126         | 62:38                                      |
| 127-129         | 60:40                                      |
| 130-134         | 55:45                                      |
| 135-139         | 50:50                                      |
| 140-144         | 45:55                                      |
| 145-150         | 40:60                                      |
| 151-155         | 35:65                                      |
| 156-160         | 30:70                                      |
| 161-166         | 25:75                                      |
| 176-171         | 20:80                                      |
| 172-176         | 15:85                                      |
| 177-181         | 10:90                                      |
| 182-186         | 5:95                                       |
| 187-191         | 0:100                                      |
| -               | 100- Metanol                               |

---

## ANEXO IV

---

### 18 Técnica de Corticelli-Lai (1963)

La técnica de cultivo larvario e identificación de las L<sub>3</sub> se llevó a cabo mediante la técnica de Corticelli – Lai descrita a continuación: La técnica se basa en permitir la eclosión de huevos a partir de las heces y desarrollar la fase de vida libre in vitro hasta obtener las L<sub>3</sub>. El cultivo larvario debe contar con tres características importantes: humedad, temperatura y oxigenación. El agua que se utiliza debe ser libre de cloro así que puede ser estéril, hervida, filtrada, destilada.

Se utilizan dos cajas de Petri, una de diámetro de 10 cm y la otra de cuatro cm, la caja pequeña contiene la materia fecal, húmeda y debe ser removida cada dos días hasta completar los siete días y debe ser puesta dentro de la caja grande la cual contará con al menos 2 mL de agua, de forma que el agua cubra hasta la mitad de la caja del centro. La caja pequeña se deja sin tapa y la grande se añade la tapa para dar las condiciones de humedad, luego que asegurarse de este procedimiento, se dejan las cajas en la incubadora a temperatura de 24 a 27°C por siete días y posteriormente se destapan las cajas y se recupera el agua de la caja grande, donde estarán las L<sub>3</sub>. Se debe destapar el cultivo cada dos días máximo para airear el cultivo y para remover la materia fecal evitando la formación de hongos que puedan ser predadores de las L<sub>3</sub>.

En el caso de requerir *Nematodirus* sp. El cultivo se debe dejar de 13 a 15 días.

---

## ANEXO V

---

### 19 Fracciones colectadas a partir de la columna 2

Se observan las fracciones y los pesos obtenidos a partir de la columna 2 de cromatografía en columna (Cuadro 13).

Cuadro 13. Fracciones y pesos obtenidos a partir de la columna 2 de cromatografía el vacío en sílice.

| <b>Fracción</b> | <b>Peso (gramos)</b> |
|-----------------|----------------------|
| 25-28           | 0.0007               |
| 29-30           | 0.0519               |
| 31              | 0.0004               |
| 32              | 0.0681               |
| 33              | 0.0014               |
| 40              | 0.0207               |
| 44-46           | 0.0008               |
| 49-50           | 0.0015               |
| 51-52           | 0.0009               |
| 60-61           | 0.0008               |
| 69-70           | 0.0007               |
| 71-76           | 0.0019               |

## ANEXO VI

20 Datos espectrales de  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz) de los compuestos 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacina y norisoguaiacina.

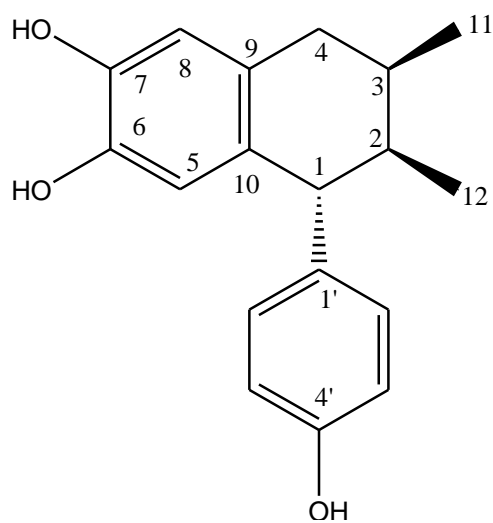
Los datos espectrales de la resonancia magnética de protón ( $^1\text{H}$ ) [ $\delta_{\text{H}}$  ( $\delta$ , J in Hz) 600 MHz] y carbono ( $^{13}\text{C}$ ) [ $\delta_{\text{C}}$  ( $\delta$ )150MHz] se muestran en la tabla 13, de la molécula 1 y de la molécula 2. Las estructuras moleculares se muestran en la figura 20.

Cuadro 14. Datos espectrales de  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz) 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacina (**1**) y norisoguaiacina (**2**) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

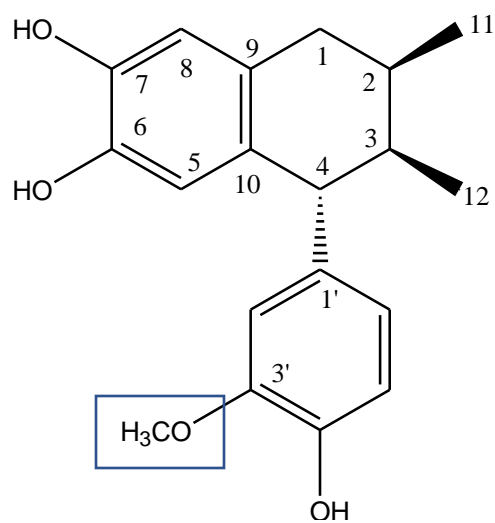
| POSITION         | <b>1</b><br>$\delta_{\text{H}}$ ( $\delta$ , J in Hz)<br>600 MHz | <b>1</b><br>$\delta_{\text{C}}$ ( $\delta$ )<br>150 | <b>2</b><br>$\delta_{\text{H}}$ ( $\delta$ , J in Hz)<br>600 MHz | <b>2</b><br>$\delta_{\text{C}}$ ( $\delta$ )<br>150 |
|------------------|--|---|--|---|
| 1                | 3.53(1H, d, 6.2)   | 51.3  | 3.53 (1H, d, 5.1)  | 51.6  |
| 2                | 1.86, s  | 42.3  | 1.90 (m)   | 42.2  |
| 3                | 1.98 (m)   | 30.7  | 1.98 (m)   | 30.9  |
| 4 a<br>B         | 2.8 (1H, dd, 5.1,<br>16.1)<br>2.3 (1H, dd, 6.6,<br>16.1)         | 36.1  | 2.82 (1H, dd, 5.1,<br>12.8)<br>2.38 (1H, dd, 4.7,<br>16.1)       | 36.2  |
| 5                | 6.51, s  | 116.2   | 6.51 (1H, s)   | 118.1   |
| 6                |  | 144.5   |  | 144.6   |
| 7                |  | 144.3   |  | 144.3   |
| 8                | 6.21, s  | 118.1   | 6.34, (1H, s)  | 116.2   |
| 9                |  | 130.9   |  | 130.9   |
| 10               |  | 128.6   |  | 128.6   |
| 11               | 0.86 (3H, d, 6.2)  | 16.3  | 0.88 (3H, d, 5.1)  | 16.1  |
| 12               | 0.87 (3H, d, 6.2)  | 16.3  | 0.86 (3H, d, 6.2)  | 16.4  |
| 1'               |  | 139.9   |  | 140.6   |
| 2'               | 6.82 (1H, d, 8.4)  | 131.14  | 6.57 (1H, br, s)   | 113.6   |
| 3'               | 6.67 (1H, d, 8.4)  | 115.8   |  | 148.7   |
| 4'               |  | 156.3   |  | 145.5   |
| 5'               | 6.67 (1H, d, 8.4)  | 115.8   | 6.68 (1H, d, 7.7)  | 115.7   |
| 6'               | 6.82 (1H, d, 8.4)  | 131.14  | 6.45 (1H, d, br,<br>7.7)   | 122.9   |
| OCH <sub>3</sub> |  |   | 3.7 (3H, s)  | 56.4  |



Figura 31. Estructura molecular de 3'-Demethoxy-6-O-demethylisoguaiacina (1) y norisoguaiacina (2).



**1**  
3'-Demethoxy-6-O-  
demethylisoguaiacina  
(63 %)



**2**  
Norisoguaiacina  
(37 %)

---

## ANEXO VII

---

### 21 Identificación de *Artemisia cina*

La planta se identificó por el Químico fármaco biólogo David Solorzano quien realiza el control de calidad de laboratorios Hunab.



### FICHA DE IDENTIDAD

Nombre común o vulgar: ARTEMISA CINA  
Género: ARTEMISA  
Familia: ASTERACEAS  
Reino: PLANTAE  
Clase: MAGNOLIOPSIDIA  
Lote: ARC1170117  
Fecha de producción: 17-01-2017  
Fecha de caducidad: 17-01-2019

Características:

Es un arbusto con olor aromático de 40-60 cm, tiene los tallos erectos algodonosos y leñosos en su base. Las hojas son pequeñas, con peciolo corto en las hojas basales y sésales en las hojas superiores, son espatuladas con las puntas redondeadas, las flores tubulares son amarillentas y se agrupan en panículas de 3-5 pequeñas flores.

PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS:

| Identidad  | Especificación | Resultado |
|------------|----------------|-----------|
| Apariencia | Entera         | Conforme  |
| Color      | Verde          | Conforme  |
| Olor       | Herbáceo       | Conforme  |



O.F.B. D. DAVID SOLORZANO MORENO  
CONTROL DE CALIDAD.