

EVALUACION in vitro DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA DE COMPUESTOS QUIMICOS Y NATURALES CONTRA LOS ESTADIOS INMADUROS Y MADUROS DE Fasciola hepatica

BERTHA SANCHEZ ESTRADA

FROYLAN IBARRA VELARDE

RESUMEN

Se probó *in vitro* el efecto de 274 extractos acuosos vegetales, obtenidos de 95 especies de plantas; con el fin de detectar su posible potencial fasciolicida. Los extractos se prepararon con 5 g de planta seca en 100 ml de agua destilada y sometidos a ebullición durante 5 min. Del concentrado se preparó una dilución al 50%, ambos se probaron por duplicado en fasciolas recién desenquistadas. Los extractos que tuvieron efecto letal sobre los parásitos recién desenquistados, se probaron a dos concentraciones menores sobre ellos y también sobre fasciolas adultas. También se probó el efecto de 11 compuestos de síntesis química a concentraciones de 50 y 10 $\mu\text{g/ml}$ en fasciolas recién desenquistadas, con etanol como solvente. De las 95 especies vegetales probadas, nueve causaron mortalidad del 100% a los parásitos recién desenquistados a concentración de 5 y 2.5 mg de planta/ml; por lo que se considera a estas plantas con posible potencial fasciolicida. Estas especies son: *Ambrosia artemisiaefolia*, *Artemisia mexicana*, *Artemisia klotzchiana*, *Cynara scolymus*, *Chenopodium graveolens*, *Eucalyptus globulus*, *Peumus boldus*, *Stachytarpheta jamaicensis* y *Zaluzania triloba*. Sólo cuatro de los compuestos químicos mostraron una ligera actividad en su concentración más alta (mortalidad de menos del 50% de los parásitos) y a concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ resultaron inocuos, lo mismo que los demás compuestos químicos a las dos concentraciones probadas. Se contó con dos grupos testigo, uno

fungió como blanco y en otro se utilizó un fasciolicida de conocida efectividad.

México es un país rico en flora medicinal, un significativo número de sus plantas se han usado como antihelmínticos en humanos y en forma ocasional en animales, durante cientos de años. Aparte de *Dryopteris filix-mas* (helecho macho; Taylor, 1965), es probable que exista entre estas plantas alguna con potencial fasciolicida, susceptible de ser empleada en el combate contra *F. hepatica*; por lo que, el presente estudio tuvo como primer objetivo determinar bajo condiciones *in vitro* la actividad fasciolicida de 274 extractos acuosos de diferentes plantas, a la vez de determinar la actividad fasciolicida de 11 compuestos de síntesis química; y segundo, comparar la eficacia de la técnica desarrollada por Ibarra y Jenkins (1984) para la prueba *in vitro* de sustancias contra fasciolas recién desenquistadas en relación con fasciolas adultas.

Se realizó una investigación bibliográfica sobre las plantas que en nuestro país se utilizan en forma popular como antihelmínticos, así como entrevistas personales con gente de distintas localidades de los estados de México,

Proyecto Fascioliasis. Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología, INIFAP-SARH Km. 15.5 Carr. México-Toluca. México, D.F., C.P. 05110.

Hidalgo, Veracruz, Puebla y Distrito Federal. Durante los meses de marzo, abril, septiembre, octubre y noviembre de 1985 se colectaron en esos lugares 95 plantas pertenecientes a 37 familias; la mayoría de las cuales tienen un uso popular como antihelmínticos, algunas tóxicas señaladas en el Cuadro 2, y otras de uso variable. Las plantas fueron colectadas y procesadas según los métodos utilizados en herbolaria, se identificaron y separaron las distintas partes de las plantas, a las que se reconoce con la clave utilizada por Amo (1979): hoja (1), raíz (2), tallo (3), flor (4), fruto (5), semilla (6), planta completa (9), corteza (10).

Preparación de sustancias. Siempre protegidos de la luz, se prepararon los extractos acuosos con 5 g de planta seca y triturada, en 100 ml de agua destilada, se sometieron a ebullición durante 5 min, se filtraron y prepararon concentraciones de 5 mg y 2.5 mg/planta/ml. Los productos químicos se solubilizaron en etanol y se prepararon concentraciones de 50 µg/ml y 10 µg/ml.

Obtención de fasciolas. Las fasciolas recién desenquistadas se obtuvieron por desenquistamiento artificial de las metacercarias, de acuerdo a la técnica de Dixon (1966) con algunas modificaciones consistentes en: eliminación del ditionito de sodio para la preparación del medio de activación e incremento en el tiempo de exposición al CO₂ para el mismo, incremento en el tiempo de incubación para el medio de activación (1/2 h), y para el medio de emergencia (1 h), así como reducción de la cantidad de bilis para el medio de emergencia (0.2 ml).

Las fasciolas adultas se obtuvieron en forma aséptica de hígados de ovino, recién removidos, los cuales se habían infestado de manera artificial.

En ambos casos las fasciolas se desinfectaron durante 1 1/2 h en medio

de cultivo y antibiótico, antes de proceder a realizar las pruebas.

Cultivo de fasciolas. El trabajo de laboratorio se realizó bajo campana de flujo laminar, se colocó a las fasciolas recién desenquistadas en cajas multicámaras para cultivo de tejidos de 24 pozos, con capacidad de 3 ml (10 fasciolas por pozo), que contenían medio de cultivo estéril, desarrollado por Smith y Clegg y descrito por Ibarra y Jenkins (1984).

A este medio se adicionó un 2% v/v, de la sustancia a probar, extractos vegetales o producto químico, para un volumen final de 2 ml; el medio se homogeneizó antes de depositar con una micropipeta a las fasciolas recién desenquistadas. Después se incubaron a 37°C con 5% de CO₂, durante 72 h.

De esta manera se probaron por duplicado los 274 extractos vegetales a concentración de 5 mg/planta/ml y una concentración 50% menor, en fasciolas recién desenquistadas, así como los 11 compuestos de síntesis química a concentración de 50 µg/ml y 10 µg/ml, estas pruebas se realizaron por cuadruplicado. También se mantuvieron dos lotes testigo, a uno se le sometió a la acción de Diamphenetide diacetilado en polvo a concentración de 10 µg/ml, y el otro fungió como testigo blanco.

Valoración de resultados. Se efectuó con base en la viabilidad y motilidad presentada por los parásitos de los lotes experimentales, en relación con la de los lotes testigo; se valoraron bajo microscopio invertido. Los extractos vegetales que presentaron actividad contra los parásitos recién desenquistados, se probaron igual contra fasciolas adultas, se colocaron tres fasciolas por caja de cultivo individual, a las que se proporcionaron las mismas concentraciones de medio de cultivo y extracto, sólo

que en mayor porción; para dar un volumen final de 6 ml.

Se encontró que los extractos obtenidos de nueve plantas de las 95 con las que se trabajó, causaron la mortalidad de 100% de los parásitos recién desenquistados, este efecto se manifestó con la concentración obtenida del extracto original y su primera dilución al 50%; en las diluciones menores se perdió por completo como puede apreciarse en el Cuadro 1. También se observó que en todos los casos la actividad se localiza en la parte aérea de dichas plantas; las cuales en su mayoría pertenecen a la familia de las compuestas y dentro de ésta, dos especies pertenecen al mismo género lo cual indica que no es remota la posibilidad de que en esta familia, por cercanía filogenética, se encuentren sustancias similares, que sean las responsables de su actividad antihelmíntica. A las nueve plantas se les emplea en forma popular con este fin.

Por los resultados obtenidos, se piensa que es probable existan por lo menos tres diferentes grupos de sustancias activas contra fasciola en las nueve plantas cuyos extractos acuosos tuvieron un efecto letal sobre los parásitos; debido a que, la observación cualitativa, mostró diferentes patrones en el modo de acción de los extractos, similares a los notificados por Fairweather y col., (1984): a) Fasciolas en condición relajada, con notoria desintegración de órganos internos. b) La misma condición relajada pero con los órganos internos intactos y evidente desintegración de la pared corporal. c) Fasciolas en condición por completo contraída.

Otro efecto más, observado en las duelas adultas, fue una parálisis irreversible con incremento de tensión muscular y disminución en la amplitud de la contracción, tal como el encon-

trado por Rew y col., (1983) al probar **in vitro** el efecto de fasciolícidas comerciales.

En la mayoría de las plantas no se detectó actividad fasciolícida, estas plantas se detallan en el Cuadro 2, se señalan las partes que se probaron de cada una. El hecho de que en éstas plantas no se detectara actividad contra los parásitos, quizá se debió al sistema de extracción utilizado; ya que sólo una minoría de los principios activos son solubles en agua, y los extractos de una misma planta, según el tipo de solvente utilizado, pueden presentar diferente grado de actividad biológica, Súsplugas y col., (1980), N'Dounga y col., (1984). Por tal motivo, se considera que el potencial fasciolícida de estas plantas es mucho mayor que el detectado mediante éste sistema. Sin embargo, fue necesario utilizarlo dado el número de plantas con el que se trabajó. Ahora se cuenta con las bases para proseguir la investigación a fondo con cada una de las plantas activas, determinar y evaluar sus principios activos.

Debido a que las fasciolas adultas no tuvieron una buena adaptación al medio de cultivo no fue posible obtener resultados confiables, sin embargo, existen razones para pensar que algunas de las plantas probadas también puedan tener acción contra los estados maduros del parásito, tanto por las observaciones realizadas, como por la información obtenida en entrevistas personales acerca del uso de plantas para el combate de fasciolosis en humanos y animales, en especial en el estado de Puebla.

Los productos químicos evaluados también en parásitos recién desenquistados no mostraron potencial fasciolícida, ya que sólo cuatro de ellos, en su concentración más elevada, causaron la mortalidad de menos del 50% de los parásitos.

CUADRO 1

ACTIVIDAD in vitro DE DIVERSOS EXTRACTOS DE PLANTAS CONTRA FASCIOLAS RECIEN DESENUISADAS.

NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	FAMILIA	CONCENTRACION (mg planta/ml.)				ACTIVIDAD EN:
			5	2.5	1.25	0.62	
<u>Ambrosia artemisiaefolia</u> L.	Altamisa	Compuestas	+	+	-	-	Parte aerea.
<u>Artemisia klotzchiana</u> L.	Estafiate	Compuestas	+	+	-	-	"
<u>Artemisia mexicana</u> Willd.	Estafiate	Compuestas	+	+	-	-	"
<u>Chenopodium graveolens</u> Lag:	Epazote Zorrillo	Compuestas	+	+	-	-	"
<u>Chenopodium foetidum</u> Sch							
<u>Cynara scolymus</u> L.	Alcachofa	Compuestas	+	+	-	-	"
<u>Eucalyptus globulus</u> Labill	Eucalipto	Mirtáceas	+	+	-	-	"
<u>Peumus boldus</u> Molina	Boldo	Monimiáceas	+	+	-	-	"
<u>Stachytarpheta jamaicensis</u> Valh.	Verbena	Verbenáceas	+	+	-	-	"
<u>Zaluzania triloba</u> (Ort) Pers.	Hediondilla	Compuestas	+	+	-	-	"

CUADRO 2

PLANTAS EN LAS QUE NO SE DETECTO POTENCIAL FASCIOLICIDA MEDIANTE EL -
SISTEMA DE EXTRACCION ACUOSA.

FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMUN	PARTES PROBADAS
ACANTACEAS	<u>Jacobinia spicigera</u> (Schl.) Bailey.	Muicle	1,3,4
ANACARDIACEAS	<u>Schinus molle</u> L.	Pirul	1,3,4,5
APOCINACEAS	<u>Mandevilla foliosa</u> (Muell- Arg) Hemsl.	Hierba de la cucaracha	1,3,4
	<u>Tabernaemontana grandiflora</u> Jacq.	Lecherillo	1,3
BIXACEAS	<u>Bixa orellana</u> L.	Achiote	1,3,6
BORRAGINACEAS	<u>Heliotropium curassavicum</u> (L.) Uline.	Cola de alacrán	1,2,3,4
CAPRIFOLIACEAS	<u>Sambucus mexicana</u> Presl.	Sauco	4
CARICACEAS	<u>Carica papaya</u> L.	Papaya	1,3,4,6
CHEMOPODIACEAS*	<u>Chenopodium ambrosioides</u> L.	Epazote	1,3,6
COMELINACEAS	<u>Commelina coelestis</u> Willd.	Maclalia	1,3,4
	<u>Zebrina pendula</u> Schinz.	Hierba del pollo.	1,3
COMPUESTAS	<u>Artemisia vulgaris</u> L.	Ajenjo	1,3
	<u>Bidens pilosa</u> L.	Aceitilla	1,3,4
	<u>Coleosanthus squarrosus</u> (Cav.) Blake.	Prodigiosa	1,3,4
	<u>Montanoa tomentosa</u> Cerv.	Zopatli	3
	<u>Tagetes lucida</u> H.B.K.	Hierba anís	1,2,3,4
	<u>Tagetes tenuifolia</u> Cav.	Flor de muerto	1,2,3,4
	<u>Tagetes trirradiata</u> Green	Flor de muerto	1,2,3,4
CRUCIFERAS	<u>Brassica oleraceae</u> L.	Col.	1
CUCURBITACEAS	<u>Cucurbita pepo</u> L.	Calabaza	6
	<u>Momordica charantia</u> L.	Cundeamor	1,3
	<u>Sechium edule</u> Sw.	Chayote	1,3
EQUICETACEAS	<u>Equisetum laevigatum</u>	Cola de caballo	3
EUPHORBIACEAS	<u>Croton draco</u> Sch.	Sangregado	1,3
	* <u>Euphorbia postrata</u> Ait.	Hierba de la golondrina	9
	<u>Jatropha dioica</u> (H.B.K.) Mc. Baugh.	Sangre de drago	2
	* <u>Ricinus communis</u> L.	Higuerilla	6
GENTIANACEAS	<u>Erythraea tetramera</u> Schl.	Tlanchalahua	3
JULIANIACEAS	<u>Juliania adstringens</u> Schl.	Cuachalalate	3
LABIADAS	<u>Chenopodium macrostemum</u> Benth.	Poléo	1,3,4
	<u>Marrubium vulgare</u> Linn.	Marrubio	1,3,4
	<u>Mentha canadensis</u> L.	Menta	1,3
	<u>Mentha rotundifolia</u> L.	Menta	1,3

Continúa Cuadro 2

<u>FAMILIA</u>	<u>NOMBRE CIENTIFICO</u>	<u>NOMBRE COMUN</u>	<u>PARTES PROBADAS</u>
	<u>Mentha spicata</u> L.	Hierbabuena	1,3
	<u>Ocimum basilicum</u> L.	Albahaca	1,3
	<u>Thimus vulgaris</u> L.	Timo	1,2,3,5
LAURACEAS	<u>Persea americana</u> Mill.	Aguacate	6
LEGUMINOSAS	* <u>Caesalpinia pulcherrima</u> (L.) Sw.	Tabachfn	1,3,4
	<u>Cassia grandis</u> L.	Caña fistula	1,3,4,6
	* <u>Erythrina americana</u> Mill.	Colorín	6
	<u>Mimosa pigra</u> L.	Zarza	1,3
LILIACEAS	<u>Allium cepa</u> L.	Cebolla	3
	<u>Allium sativum</u> L.	Ajo	3
	<u>Aloe vera</u> L.	Zábila	9
LOGANIACEAS	<u>Buddleia scordioides</u> H.B.K.	Escobilla de perro	1,3,4
LITRACEAS	<u>Cuphea aequipetala</u> Cav.	Alfilerillo	1,3,4
MALVACEAS	<u>Malva parviflora</u> L.	Malva	1,2,3,5
	<u>Sida rhombifolia</u> L.	Escobilla	1,2,3,4
MIRSINACEAS	<u>Ardisia compressa</u> H.B.K.	Capulín	1,3,5
MORACEAS	<u>Cecropia peltata</u> L.	Guarumbo	1,3
	<u>Ficus carica</u> L.	Higuera	1,3
MIRTACEAS	<u>Psidium guajava</u> L.	Guayaba	1,3
ONAGRACEAS	<u>Oenothera rosea</u> Ait.	Arnica	1,3
PALMAS	<u>Cocos nucifera</u> L.	Coco	7
PLANTAGINACEAS	<u>Plantago major</u> L.	Llantén	1,2,3
PIPERACEAS	<u>Piper amalago</u> L.	Cordoncillo	1,3
	<u>Piper sanctum</u> (Miq.) Schl.	Tlanepa.	1,2,3
POLYGONACEAS	<u>Rumex crispus</u> L.	Lengua de vaca	1,3
	<u>Rumex obtusifolius</u> L.	Lengua de vaca	1,3
POLIPODIACEAS	* <u>Dryopteris filix-mas</u> (L.) Schott	Helecho macho	2
ROSACEAS	<u>Rosa centifolia</u> L.	Rosa de castilla	4
RUTACEAS	<u>Citrus limon</u> Burni	Limón	6
	* <u>Ruta graveolens</u> L.	Ruda	1,3,6
SIMARUBACEAS	<u>Castela tortuosa</u> Liebm.	Chaparro amargo	1,3,10
	<u>Cuassia amara</u> L.	Cuassia	3
SOLANACEAS	<u>Cestrum nocturnum</u> L.	Huele de noche	1,3
	* <u>Datura stramonio</u> L.	Toloache	6
	<u>Nicotiana tabacum</u> L.	Tabaco	1
	* <u>Solanum verbascifolium</u>	Uña de gato	1,3,5
UMBELIFERAS	<u>Apium graveolens</u> L.	Apio	1,3
	<u>Sium erectum</u> Huds.	Berro	1,3
	S.C. <u>Berula erecta</u> (Huds.) Coville.	Berro	
VERBENACEAS	<u>Lippia citriodora</u> H.B.K.	Cedrón	1,3,4

- Más 14 especies que no se identificaron por carecer de órganos flo-
rales.

* Plantas Tóxicas.

En todos los casos en el grupo testigo blanco las fasciolas permanecieron en perfectas condiciones, mientras que en el grupo tratado con el fasciolicida, no sobrevivió ninguna.

Por los resultados obtenidos se concluye que existe entre la flora medicinal de México y en concreto entre las plantas empleadas por tradición como antihelmínticos; un número significativo con posible potencial fasciolicida; es necesario identificar los principios activos de estas plantas y continuar la investigación a fin de llegar a producir en México un fasciolicida rentable y accesible a los ganaderos de nuestro país.

Por otra parte, se comprobó que la técnica para el probado *in vitro* de compuestos en contra de *F. hepatica* desarrollada por Ibarra y Jenkins (1984) es satisfactoria y efectiva para detectar actividad antihelmíntica en fasciolas recién desenquistadas, no así en el caso de fasciolas adultas.

SUMMARY

An *in vitro* screen was carried out to test the fasciolicidal effect of 274 aqueous plant extracts all obtained of 95 species of plants. All extracts were prepared with 5 g of dried plant in 100 ml of boiling distilled water, during five minutes. From this concentrated solution, a 50% dilution was prepared and tested by duplicate against newly excysted *Fasciola*. Extracts showing lethal effect were tested at lower concentrations against adult and newly excysted parasites. On the other hand, 11 unknown chemically synthesized compounds were similarly tested at concentrations of 50 and 10 mg/l against newly excysted *Fasciola*. The results showed that nine out of 95 species of plants exerted 100%

mortality of newly excysted *Fasciola* at concentrations of 5 and 2.5 mg of plant/ml. These species of plants were: *Ambrosia artemisiaefolia*, *Artemisia mexicana*, *Artemisia klotzchiana*, *Cynarascolymus*, *Chenopodium graveolens*, *Eucalyptus globulus*, *Peumus boldus*, *Stachytarpheta jamaicensis* y *Zaluzania triloba*. None of the chemical compounds tested were effective against newly excysted fluke.

LITERATURA CITADA

AMO, R.S., 1979. Plantas Medicinales del Estado de Veracruz, INIREB, Jalapa, Ver., México, p.480.

DIXON, K.E., 1966. The physiology of excystment of the metacercariae of *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*. 56:431.

FAIRWEATHER, I., HOMES, S.A. and THREA, D., GOLD; L.T., 1984. *Fasciola hepatica*: Mortality response to fasciolicides *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 57 (3):209.

IBARRA, V.F. y JENKINS, D.C., 1984. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents *Z. Parasitenk.* 70:655.

MARTINEZ, M., 1969. Las plantas medicinales de México. 5a. Ed. *Botas México*. pp 630.

N'DOUNGA, M., BALANSARD, G., BABADJAMAIN, P., TIMON, D., GASQUET, M. y BOUNDON, G., 1984. *Bidens pilosa*; Identification and antiparasitic activity of 1-phenyl-1,3,5-heptatriene. *Plant Med. Phytother.* 17 (2):64.

REW, R.S., RAYMOND, H.F. and TIMOTHY, C.M., 1983. *Fasciola hepatica*: Effects of diamfenetide free amine on *in vitro* physiology biochemistry, and Morphology *Exp. Parasitol.* 55 (2): 159.

SUSPLUGAS, C., BALANSARD, G., ROSSI, J.C., JULIENS, J., GASOET, M. and TIMON-DAVID, P., 1980. Evidence of antihelmintic action of serial parts from *Inula viscosa*. Attribution to a sesquiterpenic acid of this activity. *Herba. Hung.* 19 (1):19.

TAYLOR, E.L., 1965. La Fasciolosis y el distoma hepático. *FAO*, Roma. p. 176.