



## ***In vitro fascioliscide activity of the raw extract of estafiate (*Artemisia ludoviciana* nutt. spp *mexicana*)***

## **Evaluación fasciolicida *in vitro* de extractos de estafiate (*Artemisia ludoviciana* nutt. spp *mexicana*)**

Alonso Ezeta-Miranda<sup>1\*</sup>, Yolanda Vera-Montenegro<sup>1</sup>, José Guillermo Ávila-Acevedo<sup>2</sup>, José Manuel Álvarez-Mercado<sup>1</sup>, Gerardo Francisco-Márquez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Parasitología, FMVZ-UNAM, Ciudad Universitaria, D.F. México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Fitoquímica, UBIPIRO, FES Iztacala-UNAM. Tlalnepantla, Estado de México.

<sup>3</sup>Universidad Interserrana del Estado de Puebla-Ahuacatlan. Puebla, México.

[\\*mvzaem@gmail.com](mailto:mvzaem@gmail.com)

### **ABSTRACT**

The aim of the present study was to evaluate the fascioliscide activity *in vitro* of some extracts of Estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*) from different polarities, using different organic solvents (hexane, methanol and ethyl acetate) in tropical plants from Veracruz, Mexico. The evaluation was carried out in newly artificially excysted *Fasciola hepatica* metacercariae, incubated at 37°C in sterile 24 well NUNC culture plates in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Each extract was tested by triplicate at concentrations of 125, 250, 375 and 500 mg/L, including always non-treated controls. The efficacy was assessed on the mortality rate based on the number of live and dead flukes after 24, 48 and 72 h post-exposure compared against the non-treated control using an inverted microscope at 40X. The results obtained indicated that after 24 hours the methanolic extracts and the ethyl acetate exerted an efficacy of 100% (p<0.05), while the hexanic extract showed an efficacy of 71%, reaching a 100% at the 72 hours evaluation (p<0.05). It is concluded that all raw extracts from *A. ludoviciana* showed a promising efficacy *in vitro* against newly excysted flukes, suggesting that further work should be undertaken to identify the secondary metabolites responsible of this fascioliscide activity.

Keywords: Estafiate, *Fasciola hepatica*, *in vitro*, raw extracts, secondary metabolites.

### **RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue evaluar en condiciones *in vitro* el efecto fasciolicida de extractos de Estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*) de diferentes polaridades, utilizando solventes orgánicos (hexano, metanol y acetato de etilo), de plantas recolectadas en el estado de Veracruz, México. La evaluación se llevó a cabo con formas jóvenes de *Fasciola hepatica*, desenquistadas artificialmente e incubadas en cajas estériles de cultivo de 24 pozos a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las concentraciones a las que se expusieron por triplicado fueron de 125, 250, 375 y 500 mg/L, incorporando siempre los correspondientes controles. Como fármaco de referencia se utilizó Triclabendazol a concentraciones de 10 y 50 mg. La eficacia se midió en base al porcentaje de mortalidad, comparando la sobrevivencia del grupo tratado con relación al grupo control, llevando a cabo lecturas a las 24, 48 y 72 h post-exposición usando un microscopio invertido (40x). Los resultados obtenidos en los bioensayos, indican que a partir de las 24 horas, los extractos metanólicos y de acetato de etilo tienen una eficacia del 100% (p<0.05), mientras que el extracto hexánico mostró una eficacia del 25% (p<0.05). Se concluye que los extractos metanólicos y de acetato de etilo de *A. ludoviciana*, presentan una eficacia promisoria *in vitro* contra fasciolas recién desenquistadas, lo cual sugiere continuar con la obtención de fracciones para identificar los principales metabolitos secundarios como posibles responsables de esta actividad fasciolicida.

Palabras clave: Estafiate, extractos, *Fasciola hepatica*, *in vitro*, metabolitos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las parasitosis mas importantes a nivel mundial, dentro del campo de la medicina veterinaria, es la fasciolosis, la cual es provocada por el trematodo *Fasciola hepatica*. Este parásito es de ciclo indirecto y se localiza en conductos biliares de rumiantes, suinos, équidos, conejos y ocasionalmente en el hombre (Vera, 2011).

Es una de las enfermedades hepáticas mas importantes ya que ocasiona pérdidas económicas estimadas en millones de dólares (PAHO, 2003; FAO, 2003) El ganado se ve afectado en los parámetros productivos, reproductivos, decomisos en rastros y en algunos casos la muerte del animal. Es una enfermedad que ha evolucionado con el paso del tiempo debido al crecimiento de la industria ganadera a nivel mundial y al cambio climático que ha permitido la adaptación del huésped intermediario (Dargie, 1987; Rojo, et al., 2012).

Durante décadas, el principal método de control de esta enfermedad ha sido la quimioterapia, por desgracia, debido al uso indiscriminado de estos fármacos junto con la mala prevención y diagnóstico ha permitido la generación y aumento de resistencia (Kaplan, et al., 2012; Olaechea, et al., 2011; Ceballos, et al., 2010; Moll, et al., 2000). Una alternativa a esta problemática, es la medicina herbal o el uso de extractos de plantas con efecto parasiticida. Diversos investigadores han demostrado eficacia parasiticida *in vitro* de diferentes extractos de plantas en contra de distintas especies de parásitos, tales como *Haemonchus contortus* (Alonso, et al. 2008), *Trichostrongylus colubriformis* (Alonso, et al. 2008a), *Paramphistomum explanatum* (Hossain, et al. 2012), *Paramphistomum cervi* (Zahir, et al. 2012), entre otros.

Sin embargo, la información disponible con relación al uso de extracto de plantas con actividad fasciolicida es limitada. Dentro de los extactos de plantas evaluados contra *F. hepatica* se encuentra el Estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*) (Ibarra, et al., 2012; Vera, et al., 2008; Ferreira, et al., 2011; Álvarez, et al 2015).

El Estafiate (*A. ludoviciana*) es una planta de climas cálidos, semisecos y templados, se puede encontrar desde Canadá hasta Guatemala; su uso es principalmente medicinal para tratar afecciones gastrointestinales y respiratorias (Aguilar, et al. 1994). Recientemente los extractos de esta planta están siendo motivo de evaluación para determinar si existe actividad fasciolicida bajo condiciones *in vitro*.

El objetivo del presente estudio fue el de determinar y evaluar la actividad fasciolicida *in vitro* de los extractos crudos de Estafiate (*A. ludoviciana* Nutt. *mexicana*).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

La colecta del material vegetativo se llevo a cabo en el municipio de Tlapacoyan, en el estado de Veracruz, México, de acuerdo a la metodología descrita por Monroy, et al (2007); y Rodríguez et al. (2009).

Los extractos crudos se obtuvieron en el laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala-UNAM. Se utilizaron las hojas secas y molidas de la planta, a las cuales se adicionaron hexano, metanol y acetato de etilo en una proporción de 100 grs. de planta por 500 ml. de solvente. Se realizaron de 3 a 5 destilaciones de cada uno de los solventes cada 7 días. Los extractos obtenidos se almacenaron en envases de vidrio a una temperatura de 4°C, hasta la evaluación *in vitro*.

La evaluación fasciolicida *in vitro* se llevó a cabo en el laboratorio de Quimioterapia experimental de helmintos del Departamento Parasitología de FMVZ-UNAM. Para ello se utilizaron fasciolas desenquistadas artificialmente de acuerdo a la técnica descrita por Ibarra y Jenkins, (1984). Las fasciolas fueron expuestas por triplicado a las concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L de cada uno de los extractos, incorporando los correspondientes testigos de cada solvente para corroborar que por si solo no afecta al parásito. Adicionalmente, se utilizó Triclabendazol como fármaco de referencia a las concentraciones de 10 y 50 mg; este procedimiento se realizó en cajas de cultivo celular de 24 pozos. Las lecturas de la prueba se llevaron a cabo a las 24, 48 y 72h postexposición, utilizando un microscopio invertido a 40 x. La eficacia anti-fasciola se midió comparando la sobrevivencia del grupo tratado con relación al grupo testigo (Marchiondo, et al., 2007).

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

Los datos obtenidos, se analizaron por medio de la prueba de Kruskall-Wallis con un intervalo de confianza del 95% para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Systat Software V12, 2011).

### 3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos, indican que a partir de las 24 horas postexposición, el extracto metanólico y el extracto de acetato de etilo tuvieron una eficacia del 100%, mientras que el extracto hexánico mostró una eficacia del 71%, alcanzando el 100% a las 72 horas ( $P<0.05$ ). En cuanto a la concentración y al tiempo, se observó que son factores determinantes en la eficacia total, obteniendo porcentajes superiores al 90%, en las concentraciones altas a las primeras 24 horas y del 100% de eficacia a partir de las 48 horas, respectivamente y mostrando diferencias significativas con respecto a los testigos ( $P<0.05$ ). Los extractos que presentaron eficacia superior al 90%, fueron reevaluados *in vitro*, para confirmar resultados, obteniendo resultados similares a la primera evaluación ( $P<0.05$ ). El triclabendazol, presentó 100% de eficacia desde las primeras 24 horas, en sus dos concentraciones (10 y 50 mg).

**Tabla 1. Porcentaje de eficacia *in vitro* de extractos de *Artemisa ludoviciana*, con solventes de distinta polaridad y concentración.**

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

### 4. DISCUSION

En la actualidad, los extractos de plantas han demostrado ser un alternativa más para el control y tratamiento de diversas enfermedades a nivel mundial, sin embargo aún es un campo en el que hace falta investigación para determinar completamente su potencial.

Dentro de este estudio, se demostró la eficacia anti-fasciola *in vitro* de extractos herbales de *A. ludoviciana*, estos resultados concuerdan con investigaciones anteriores (Ibarra, et al. 2012; Álvarez, et al. 2015), lo cual demuestra que esta planta tiene un efecto en contra de *Fasciola hepatica*, sin embargo aún es necesario realizar estudios a fondo para determinar

el o los metabolitos secundarios de la planta que tienen esta actividad, por lo cual es necesario realizar el fraccionamiento, identificación y aislamiento de los mismos

Estudios previos en ratones CD1 han demostrado que el extracto de Estafiate no tuvo ningún tipo de toxicidad hepática o renal Ibarra, et al (2012a), no obstante se necesitan realizar estudios para determinar las correspondientes concentraciones en rumiantes. Sin embargo es sumamente importante realizar esto en el huésped natural (rumiantes) con la finalidad de determinar si estos extractos pueden fungir como una opción inocua y viable para el tratamiento de la fascilosis.

## AGRADECIMIENTOS

Financiado gracias al proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IN220313.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

- Aguilar C. A., Camacho J. R., Chino S., Jacquez P., López M. E. (1994). Plantas Medicinales del Herbario del IMSS; Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. IMSS Editorial. México, D.F.
- Alonso D. M. A., Torres A. J. F. J., Sandoval C. C. A., Capetillo L. C., Brunet S., Hoste H. (2008a). Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol*; 153 (1-2):187- 192.
- Alonso D. M.A., Torres A. J. F. J., Sandoval C. C. A., Aguilar C. A. J., Hoste H. (2008). In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet Parasitol*; 153 (3-4):313-319.
- Álvarez J. M., Ibarra F., Alonso M. A., Vera Y., Avila J. G., García A. M. (2015). In vitro antihelminthic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. *BMC Veterinary Research* 11:45
- Ceballos L., Moreno L., Alvarez L., Shaw L., Fairweather I., Lanusse C. (2010). Unchanged triclabendazole kinetics after co-administration with ivermectin and methimazole: failure of its therapeutic activity against triclabendazole-resistant liver fluke. *Vet Res*; 6:1-8.
- Dargie J. D. (1987). The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. *Int J Parasitol*; 17:453-463.

Ferreira J. F. S., Peaden P., Keiser J. (2011). In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*. Trematocidal plant alcoholic extracts. Parasitol Res; 109:1585-1592.

Hossain E., Chandra G., Nandy A.P., Mandal S.C., Gupta J.K. (2012) Anthelmintic effect of a metanol extract of leaves of *Dregea volubilis* on *Paramphistomum explanatum*. Parasitology Research; 110:809-814.

Ibarra, O. F. y Jenkins, D. C. (1984). An in vitro screen for new fasciolicidal agents. Zeitschrift für Parasitenkunde; 70, 655-661.

Ibarra M. S., Ibarra V. F., Ávila A. J. G. (2012). In Vitro Evaluation of Fasciolicide Activity with Hexane, Methanol and Ethyl Acetate with Extracts Processed and Obtained from Some Mexican Plants Used in Traditional Medicine Based on Ethno Botanical Studies. Am J of Plant Sci; 3:506-511.

Ibarra M. S., Ibarra V. F., Ávila A. J. G. (2012a). Obtaining the minimum lethal dose against *Fasciola hepatica* in vitro using plant extract hexanes with fasciolicide activity and toxicity evaluation on CD1 male mice. Am J Plant Sci.; 3:899-903.

Kaplan R. M., Vidyashankar A. N. (2012). An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. Veterinary Parasitology; 186:70-78.

Marchiondo A. A., Holdsworth P. A., Green, P., Blagburn B. L. y Jacobs D. E. (2007). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestation on dogs and cats. Veterinary Parasitology; 145, 3-4.

Moll L., Gaasenbeek C.P.H., Vellema P., Borgsteede F.H.M. (2000). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. Veterinary Parasitology; 91:153-158.

Monroy O. C. y Castillo, E. P. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. CONABIO. México.

Olaechea F., Lovera V., Larroza M., Raffo F., Cabrera R. (2011). Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). Veterinary Parasitology, 178:364-366.

Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Organización para la Alimentación y la Agricultura; 157:35-37.

Organización Panamericana de la Salud (PAHO). (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización panamericana de la salud; 580:132-141.

Rodríguez, A.M.; Coombes, A.J. y Jimenez, R.J. (2009). *Plantas silvestres de puebla herbario y jardín botánico BUAP*. México: Herbario BUAP.

Rojo V. F. (2012). A., Meana A., Valcárcel F., Martínez V. M. Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*; 189:15-38.

Systat Software, Inc. (2011). Systat (Computer program) versión 12(32-bits) EUA. <http://www.systat.com>.

Vera M. Y., Ibarra V. F., Ramirez A. G., Munguia X. I. (2008). In vitro fasciolicide activity of some plant extracts against newly excysted flukes. *Ann. N.Y. Acad. Sci*; 1149:180-182.

Vera M.Y. (2011). Fasciolosis. En: *Parasitología Veterinaria*, Vol II. Helmintos. Eds: Ibarra V. F.; Figueroa C.J.A. y Quiroz R.H. 1<sup>a</sup>. Edición. Ed. Color. México, D.F. p. 51-61.

Zahir A.A., Rahuman A.A., Bagavan A., Geetha K., Kamaraj C., Elango G. (2012). Evaluation of medicinal plant extracts and isolated compound epicatechin from *Ricinus communis* against *Paramphistomum cervi*. *Parasitology Research*; 111:1629-1635.