

**Evaluación de la Actividad Antihelmíntica de Tres Especies de Plantas con Propiedades  
Medicinales Sobre Huevos de Nematodos Gastrointestinales en Caprinos**

**Yiseth María Mendoza Daza**

**Universidad de Pamplona**

**Facultad de Ciencias Básicas**

**Programa de Biología**

**Pamplona, Norte de Santander**

**2019**

Evaluación de la Actividad Antihelmíntica de Tres Especies de Plantas con Propiedades  
Medicinales Sobre Huevos de Nematodos Gastrointestinales en Caprinos

Trabajo de Grado Presentado Para Optar por el Título de Bióloga

Director

José Flórez Gélvez

Veterinario Msc. Ciencia Veterinaria, PhD Ciencia Animal

Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias

Universidad de Pamplona

Codirector

Wlida Margarita Becerra Rozo

Bióloga Msc Enfermedades Parasitarias y Tropicales

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Pamplona, Norte de Santander

2019

Dedicado a mis padres Juan Mendoza y Elideth Daza, por todo el apoyo y esfuerzo que me  
brindaron para la culminación de mi carrera.

A mis hermanos Carlos y Elis Yineth por su apoyo incondicional.

Logramos que se hiciera realidad este sueño, gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de trabajo de grado José Flórez Gélvez y a mi codirectora Wlida Becerra Rozo por el apoyo, tiempo brindado, consejos y orientaciones.

A mis amigas Maria Teresa, Monica y Sindy, por ser incondicionales y ayudarme a seguir adelante con este proceso.

A la beca trabajo Nysha, profesores Yerson Garcia y Melissa Casadiegos por tener la disposición de brindarme apoyo logístico y gestión en el laboratorio de Parasitología.

A mis compañeros de biología y personas que hicieron parte de este proceso.

A mi familia enteramente gracias por ayudarme a ser posible este logro.

**TABLA DE CONTENIDO**

AGRADECIMIENTOS .....	IV
RESUMEN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
JUSTIFICACIÓN .....	4
MARCO TEÓRICO.....	6
Método <i>in vitro</i> (EHA).....	14
Modelos Biológicos de Nematodos Gastrointestinales en Rumiantes .....	16
MARCO REFERENCIAL.....	17
OBJETIVOS .....	22
General .....	22
Específicos .....	22
MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
Colección de Material Vegetal.....	23
Preparación de Plantas .....	23
Liofilización .....	23
Ensayo <i>in vitro</i> .....	24
Ensayo de Eclosión de Huevos .....	24
Análisis Estadístico .....	26

RESULTADOS .....	27
DISCUSIÓN .....	31
CONCLUSIONES .....	37
RECOMENDACIONES .....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Filtrado y recuperación de huevos del tamiz de 37 $\mu$

**Figura 2.** Comparaciones múltiples del número de larvas eclosionadas por extractos de las especies y por concentración de extracto. Letras iguales indican que no tienen diferencias significativas de acuerdo a una ANOVA ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos.

**Figura 3.** Comparación múltiple de las medias de inhibición de 3 concentraciones (10, 5 y 1mg / ml) vs extractos

**Figura 4.** Larva L1 de *Haemonchus* spp

**LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.** Especies de plantas medicinales usadas tradicionalmente como antihelmínticos presentes en Colombia-

**Tabla 2.** Plantas medicinales y capacidad antioxidante-

**Tabla 3.** Contenido volumétrico de las diluciones.

**Tabla 4.** Comparación de las medias de dos factores: extractos y concentración.

**Tabla 5.** Comparaciones múltiples del número de larvas eclosionadas por extracto.

**Tabla 6.** Comparaciones múltiples del número de larvas eclosionadas por niveles de concentración.

**Tabla 7.** Porcentaje de eclosión de huevos, para el extracto metanólico de las hojas de *Artemisia absinthium*.

**Tabla 8.** Porcentaje de eclosión de huevos, para el extracto metanólico de las hojas de *Petiveria alliacea*.

**Tabla 9.** Porcentaje de eclosión de huevos, para el extracto metanólico de las hojas de *Tanacetum parthenium*.



## RESUMEN

Los nematodos gastrointestinales son los parásitos más frecuentes en los rumiantes del mundo. Estas parasitosis causan gastroenteritis parasitaria con un impacto negativo sobre la productividad. El control de nematodos se ha basado en el uso de antihelmínticos químicos ante los cuales los nematodos han desarrollado resistencia. Para contrarrestar los perjuicios ocasionados por los parásitos gastrointestinales y a la resistencia ante fármacos antihelmínticos, se propone el estudio y la aplicación de componentes activos de las plantas con metabolitos secundarios con propiedades antihelmínticas, como una alternativa sostenible para el control de la nematodosis caprina. Se evaluaron las propiedades antihelmínticas de 3 plantas con propiedades medicinales, sobre huevos de nematodos gastrointestinales de la familia Trichostrongylidae, mediante la obtención de extractos vegetales metanólicos, para los cuales se utilizó el ensayo de eclosión de huevos (EHA). La comparación de las medias rechazó la hipótesis nula, mostrando diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) por extracto y por concentración. Todos los extractos mostraron una inhibición significativa en la eclosión huevos dependiente de las concentraciones evaluadas. *Artemisia absinthium* obtuvo el mejor rendimiento en inhibición (87.3%) A una concentración de 10mg/ml. Estos resultados sugieren que las especies *A. absinthium*, *P. alliacea* y *T. parthenium* poseen actividad antihelmíntica contra huevos de la familia Trichostrongylidae. Los principios activos responsables de la actividad podrían ser los terpenoides, flavonoides, compuestos fenólicos y taninos condensados presentes en las hojas.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones causadas por parásitos gastrointestinales, son el principal problema de salud en la producción caprina en el mundo, que afecta a los países con alta tasa de producción como China, India y España y en países en vías de crecimiento productivo como Chile, México y Colombia (Aréchiga et al., 2008; Cortes, 2009). Algunas especies de nematodos, especialmente aquellos que se alimentan de sangre tales como *Haemonchus contortus* son responsables de casos clínicos graves en pequeños rumiantes. Aunque el género de *Haemonchus* sp infecta a todos los rumiantes, la gravedad de la infección por este nematodo es más pronunciada en cabras y ovejas donde está vinculado a anemia severa, diarrea, pérdida de peso corporal y muerte.

Para el control de estos parásitos existen actualmente en el mercado un gran número de productos comerciales con productos activos diferentes, sin embargo, estos productos no se han utilizado correctamente por los productores pecuarios y problemas como sobredosificación, subdosificación, frecuencia de desparasitaciones, uso de principios activos inadecuados, han generado un problema de resistencia, es por ello que se hace necesario encontrar nuevas formas de control parasitario.

De tal manera que la creciente resistencia de parásitos gastrointestinales a los medicamentos comercialmente disponibles, ha generado pérdidas económicas, dando como resultado un descenso del 50% en la producción, aumentando costos de la prevención, costos de los tratamientos y la muerte de los animales infectados (Blackburn et al., 1992; Fthenakis & Papadopoulos, 2018).

El uso de drogas antihelmínticas para el control de los parásitos gastrointestinales fue exitoso en los últimos 50-60 años (Lanusse et al., 2018). Pero el uso frecuente; el aumento de dosis indiscriminada, ha conducido: a la disminución de la efectividad de los antihelmínticos, la contaminación ambiental causada por la expulsión de materia fecal con metabolitos secundarios

que actúan sobre la coprofauna y la presencia de residuos químicos en productos de origen animal, como la leche y carne.

Debido a la resistencia de los parásitos gastrointestinales a múltiples medicamentos, se ha planteado la necesidad de la utilización de tratamientos no convencionales para el control de parásitos tales como la obtención de principios activos con propiedades antihelmínticas, a partir de plantas con propiedades medicinales, (Khan, Tak, Nazir, & Lone, 2016). Para tal acercamiento, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo (pregunta biológica): ¿Los extractos de plantas con propiedades medicinales tienen la capacidad de inhibir la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales en caprinos?

## JUSTIFICACIÓN

Existen métodos de controles alternativos e inocuos para el medio ambiente que satisfacen las demandas de los consumidores y se ajusten a las necesidades de los agricultores. El uso de plantas medicinales constituye una poderosa alternativa, para el control de parásitos, que puede retardar el desarrollo de resistencia, ya que consisten en una serie de compuestos bioactivos, como son los metabolitos secundarios, que pueden afectar la relación huésped-parasito- ambiente de diferentes formas (Anthony et al., 2005; Carolina., et al 2016)

Muchos agricultores, campesinos y productores pecuarios a lo largo de los años, han usado variedad de especies de plantas de forma empírica para controlar los nematodos gastrointestinales en rumiantes, pero son necesarias pruebas científicas que corroboren su efectividad. Para comprobar la actividad de estas propiedades es fundamental realizar estudios e investigaciones más exhaustivas que utilicen técnicas enfocadas a evaluar y determinar la acción de los principios fitoterapéuticos contenidos en los vegetales que sirvan como puntos de partida para el desarrollo de formas alternativas de control de los parásitos gastrointestinales

Se ha evaluado y confirmado la efectividad de los extractos vegetales de diferentes especies de plantas a través de pruebas *in vitro* e *in vivo* en diferentes partes del mundo. Por ejemplo, el test *in vitro* de eclosión de huevos (EHA), ha sido usado ampliamente para evaluar la efectividad antiparasitaria de antihelmínticos como el tiabendazol. Se ha demostrado las propiedades antihelmínticas en las especies vegetales perteneciente al género *Artemisia*: *Artemisia absinthium*, *Artemisia ludoviciana*, *Artemisia frigida* y otras especies vegetales como *Melilotus alba*, *Rubus idaeus* entre otras, las cuales poseen propiedades ovicidas y larvicidas en nematodos perteneciente a la familia *Trichostrongylidae* como *Haemonchus contortus* (Acharya et al, 2014; Tariq et al., 2009).

Las plantas tienen gran importancia para la fitomedicina ya que contienen compuestos fitoquímicos de gran promesa como fuente de tratamientos efectivos. Hoy en día sin embargo se han adelantado investigaciones para corroborar o rechazar hipótesis relacionadas con las cualidades farmacológicas de un sin número de estas.

En Colombia existe una inmensa riqueza de florística que alberga más 40.000 especies de plantas de las cuales 6.000 poseen características medicinales. De acuerdo los registros del Instituto Nacional de Vigilancia de Alimentos y Medicamentos (INVIMA), se tiene un registro de tan sólo 95 especies aprobadas para su uso medicinal. Por esta razón la aplicación de plantas con propiedades antihelmínticas es una oportunidad para restaura la salud de los animales(Instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos, 2019).

Con este proyecto se pretende encontrar tratamientos alternativos y sostenibles (que permita suministrar cuidados a los animales mediante la utilización de recursos vegetales disponibles en las fincas) de fácil consecución, que se adapten a las condiciones económicas y ecológicas, proporcionando una producción racional para los medianos y pequeños productores de la industria caprina del Norte de Santander y Colombia, ya que son pocas las investigaciones y reportes encontrados en Colombia, sobre el uso de plantas con propiedades antihelmínticas.

## MARCO TEÓRICO

Los nematodos gastrointestinales en los rumiantes son una de las causas más importantes de enfermedades animales en todo el mundo, principalmente en áreas templadas y tropicales (Belemlilga et al., 2016; Magdeleine et al., 2014). Las infecciones parasitarias por nematodos gastrointestinales afectan adversamente la producción, el bienestar de los animales al causar varios efectos adversos, por ejemplo, reducción del consumo de alimento y el apetito, disminución en la producción de la leche, anemia, gastroenteritis hemorrágica, reducción de peso, diarrea y muerte súbita (Alberti et al., 2014; Macedo et al., 2010; Magdeleine et al., 2010).

Es evidente que las cabras en comparación con otros tipos de rumiantes bovino u ovinos son más susceptibles a infecciones por nematodos gastrointestinales, se caracterizan por un aumento de recuento de huevos fecales y una mayor carga de helmintos (Fthenakis & Papadopoulos, 2018). Esto se debe a las características de alimentación y al tipo de inmunidad adquirida lo que conduce a una menor o mayor exposición a los parásitos (Sotiraki et al., 2010).

Debido al creciente desarrollo de resistencia a los antiparasitarios por parte de los nematodos gastrointestinales, ha sido afectado la eficacia de muchos compuestos antihelmínticos (Kotze et al., 2018). Se ha evidenciado la resistencia antihelmíntica de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes hacia compuestos farmacológicos pertenecientes a los grupos químicos de los benzimidazoles, imidotiazoles y lactonas macrocíclicas (Kaplan, 2004).

Existen registros de resistencia a múltiples medicamentos para los tres géneros de nematodos más importantes de la familia Trichostrongilidae que infectan pequeños rumiantes: *Teladorsagia*, *Haemonchus* y *Trichostrongylus*, (Burgunder & Petr, 2018), la cual ocurre en diferentes regiones del mundo como China Occidental, España, India y Brasil; considerados estos como los mayores productores en la industria caprina (Aréchiga et al., 2008; Cortes, 2009; Hammond et al., 1997).

De acuerdo al estudio realizado en granjas de ovejas de Mato Grosso do Sul, Brasil, demostraron que larvas infectantes L<sub>3</sub> de *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia* spp. y *Oesophagostomum columbianum* tienen resistencia a múltiples medicamentos: albendazol, ivermectina, levamisol, triclorfón, moxidectina, closantel; el triclorfón logró el más alto nivel de efectividad al 65%, y todas las demás drogas produjeron menos del 29% (Ramos et al., 2018).

La resistencia hacia los medicamentos convencionales ha sido visto como una amenaza para la sostenibilidad de sistemas de producción caprina en todo el mundo durante varios años (Kaplan & Vidyashankar, 2012). Por otra parte, es controversial la liberación de residuos de estos fármacos en el medio ambiente y en alimentos de origen animal, que pueden afectar la salud del consumidor, estos aspectos, han alentado estudios para desarrollar métodos alternativos de control (Burgunder & Petr̃, 2018).

En Colombia hasta ahora son muy pocos los estudios que se han realizado sobre resistencia antihelmíntica y nematodosis caprina, pero se sospecha debido a los reportes en forma verbal de los capricultores sobre la poca efectividad de los diferentes antihelmínticos sobre todo contra *Haemonchus* spp.

De esta forma surge la necesidad de encontrar formas alternativas para luchar contra los nematodos gastrointestinales, como son las plantas medicinales con propiedades antihelmínticas.

Durante siglos el uso de plantas como fuente de tratamientos para enfermedades parasitarias ha prevalecido durante mucho tiempo, aunque la importancia de la aplicación de otros tratamientos para la parasitosis por resistencia antihelmíntica surgieron por primera vez en la década de 1980 (Lv et al., 2012; Melville et al., 2016).

Se le ha sacado provecho a cada una de las partes de las plantas como semillas, raíces, tallos, flores y hojas. De las cuales desde tiempos memorables se utilizan como remedios caseros para dolencias estomacales, inflamaciones, propiedades antibacterianas, anti fúngicas y antiparasitarias (Anthony et al., 2005).

Una estrategia para el control de infecciones parasitarias podría ser proporcionado por el uso de fuentes naturales, que consisten en la combinación de dos o más compuestos fitoquímicos de diferentes plantas (Santos et al., 2017). En este contexto, las plantas con propiedades medicinales pueden ser una alternativa efectiva para el control de parásitos porque tienen un desarrollo rápido, son menos tóxicas, pueden estar disponibles en la misma región o en plazas de mercados a un bajo costo, pueden ser cultivadas y proporcionadas por los mismo campesinos o productores en lugares de pastoreo o finca. (Oliveira et al., 2017; Qi et al., 2015).

El objetivo es no solo encontrar nuevos compuestos químicos efectivos contra helmintos, sino también el reemplazo de compuestos sintéticos de uso común, que proporcionarían un método orgánico para tratar los parásitos. (Romero-Benavides et al., 2017).

Colombia es un país que cuenta con una enorme variedad de fauna, flora, ecosistemas, territorios lo que lo convierte en uno de los países megadiversos del mundo (Armenteras et al., 2003).

En las diferentes regiones de Colombia, el uso de plantas como antihelmíntico es amplio (Tabla 1), por lo tanto, hay una gran oportunidad para seguir investigando sobre las propiedades antihelmínticas de plantas y su potencial uso para el tratamiento de las parasitosis gastrointestinales en animales, que se adapte las condiciones económicas, ecológicas y socioculturales de cada región.



**Tabla 1.** Especies de plantas medicinales usadas tradicionalmente como antihelmínticos presentes en Colombia(Dasilveira, 2002).

<b>Nombre científico</b>	<b>Familia</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Vermífugo</b>
<i>Bixa orellana</i>	<i>Bixaceae</i>	Achiote	Semilla
<i>Artemisia absinthium</i>	<i>Asteraceae</i>	Ajenjo	Sumidad florida
<i>Allium sativum</i>	<i>Alliaceae</i>	Ajo	Bulbo
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Lamiaceae</i>	Albahaca	Planta completa
<i>Cynara scolymus</i>	<i>Asteraceae</i>	Alcachofa	Hoja
<i>Hymenaea courbaril</i>	<i>Fabaceae</i>	Algarrobo	Corteza
<i>Petiveria alliacea</i>	<i>Petiveriaceae</i>	Anamú	Hoja
<i>Pimpinella anisum</i>	<i>Apiaceae</i>	Anis	Fruto y semilla
<i>Momordica charantia</i>	<i>Curcubitaceae</i>	Balsamina	Toda la planta
<i>Peumus boldus</i>	<i>Monimiaceae</i>	Boldo	Hoja
<i>Bidens pilosa</i>	<i>Asteraceae</i>	Cadillo	Partes aéreas
<i>Bauhinia variegata</i>	<i>Fabaceae</i>	Pata de vaca	Partes aéreas
<i>Baccharis latifolia</i>	<i>Asteraceae</i>	Chilca	Partes aéreas
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Mirtaceae</i>	Eucalipto	Hoja
<i>Ricinus comunis</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Higuerilla	Semilla
<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Poaceae</i>	Limoncillo	Hoja
<i>Tanacetum parthenium</i>	<i>Asteraceae</i>	Manzanilla criolla	Partes aéreas

Las propiedades antiparasitarias de las plantas se asocian comúnmente con la presencia de metabolitos secundarios tales como: taninos, flavonoides, terpenos y compuestos fenólicos que afectan directamente la biología, metabolismo, la integridad de la cutícula, la nutrición, reproducción y motilidad de los nematodos (Díaz et al., 2008; Soldera-Silva et al., 2018).

Estos compuestos interfieren en los procesos de desovación, eclosión de huevos y desarrollo larval (Bachaya et al., 2009; Magdeleine et al., 2010). Los metabolitos secundarios podrían usarse como materiales fitoterapéuticos o suministrarse como nutracéuticos. El desarrollo y caracterización de la fitoquímica con la evaluación de modo de acción puede ser de gran importancia en la búsqueda de un medicamento, que puede evitar la resistencia antihelmíntica (Molan et al., 2000). En la siguiente sección, se explica los principios e ingredientes bioactivos de los extractos de plantas medicinales (Tabla 2)

*Artemisia absinthium*, también conocida como ajeno, planta aromática y médica muy conocida, se distribuye ampliamente en Xinjiang (noroeste de China), Europa, Siberia, norte de África y América (Turak et al., 2014). Se usa popularmente como un agente antiparasitario, tratamiento para la indigestión, insecticida, tratamiento de fiebres crónicas, para inflamación del hígado, como un antiespasmódico y antiséptico. El análisis químico de *A. absinthium* ha demostrado que su aceite volátil es rico en tujona ( $\alpha$  y  $\beta$ ), que ha sido reportado anteriormente como antihelmíntico contra muchos parásitos y gusanos, incluidos los que causan daños a los animales domésticos (Judžentiene, 2015; Tariq et al., 2009)

*Tanacetum parthenium* conocida como manzanilla. Se encuentra distribuida en Europa y América. Es una planta medicinal utilizada tradicionalmente en el tratamiento de fiebre, migrañas,

artritis y antiespasmódico, aunque el efecto antiespasmódico no ha sido estudiado (Hammond et al., 1998). Los estudios fitoquímicos de esta especie han demostrado una gran cantidad de metabolitos secundarios, incluidas las lactonas sesquiterpénicas, como la partenolida y otros componentes potencialmente activos, incluidos los flavonoides, como santina y glucósidos flavonoides tales como derivados de 6-hidroxycampferol, quercetagenin, apigenin y apigenin 7-glucuronide, y luteolin, entre otros (Cárdenas et al., 2017; Long et al., 2003).

**Tabla 2.** *Plantas medicinales y capacidad antioxidante*

Especie	Metabolito secundario			Referencias
<i>Artemisia absinthium</i>	Terpenos	Fenoles	Alcaloides	(Aziz et al., 2018; Is, 2013; Judžentiene, 2015; Lopes et al., 2008; Tariku et al., 2011; Turak et al., 2014)
	Sabinyl acetate, sabinene, myrcene, (Z)-6,7-epoxyocimene, linalool, $\alpha$ -thujone, $\beta$ -thujone, neryl butanoate, (Z)-6,7-epoxyocimene, cis-chrysanthenyl acetate, bicyclo, [2,2,1]-hept-2-en-7-ol, $\alpha$ -bisabolol, caryophyllene			

	oxide, p-cymene, 1,8-cineole, chrysanthenol, bornyl acetate.			
<i>Tanacetum parthenium</i>	$\alpha$ -pinene, camphene, $\beta$ - pinene, sabinene, $\beta$ - myrcene, $\alpha$ - phellandrene, $\beta$ - thujene, dl- limonene, <i>cis</i> - ocimene, $\alpha$ - terpinolen, $\beta$ - cubebene, caryophyllene, $\beta$ - farnesene, $\beta$ - guaiene, $\delta$ - cadinene, germacrene B, cuparene, neryl acetate, dihydro methyl jasmonate, linalool, D-fenchyl alcohol, 4- terpineol,(-)-			(Niu et al., 2011)

	spathulenol, eudesmol, $\alpha$ - fenchone, camphor, (+)-carvone, decanoic acid, decanal, Z-citral, anisic aldehyde, cinnamaldehyde, 4-isopropyltoluene, isoborneol, borneol, anethole, thymol, carvacrol.			
<i>Petiveria</i> <i>alliacea</i>	Phytol, (R)-(-)- (Z)-14-methyl-8- hexadecen-1-ol, 1-(2- hydroxyethyl)- 1,2,4-triazole and methyl $\beta$ - dimethylaminoisob utyrate, $\alpha$ - friedelinol, isoarborinol, 3- epiilexgenin A	6-formyl-8- methyl-7-O- methylpinocembri n, 6- hydroxymethyl-7- O- methylpinocembri n, 5-O- methyl ether, engeletin, andastilbin, flavonolmyricitrin, dihidro-kem- pleferol,	Trans-N- metil-4- metoxiprolina, alantoína, triterpeno $\alpha$ - friedelinol, isoarborinol acetato de isoarborinol,	(Falcone et al., 2012; García et al., 2018; Luz et al., 2016)(Falco ne Ferreyra et al., 2012; García- Pérez et al., 2018; Luz et al., 2016)

		dihidroquercetin, myricetin, flavonoide leridalchalcone, flavanonas petiveral, o- petiveral-4-ethyl,  leridol, myricetin, petivera ypetiveral-4-ethyl	ácido babinervico, 3- epiilexgenina A	
--	--	---	---	--

*Petiveria alliacea*, conocida comúnmente como anamú, es nativa de Colombia, crece en varias regiones del mundo, principalmente en el continente americano. En la medicina popular, tiene fines curativos y místicos. Por lo tanto, es un “Remedio para domesticar al Maestro”, que se refiere a su propiedad sedante y su potencial para alterar la mente y el funcionamiento del cerebro (Luz et al., 2016). Según la medicina indígena, la raíz y la hoja de *P. alliacea* se ha asociado con varias propiedades terapéuticas, tales como diurético, antiespasmódico, analgésico, antiinflamatorio, antileucémico, antirreumático, antihelmíntico, hipoglucemiantes, abortivas, propiedades antimicrobianas, depurativas y anticancerígena. Los principales componentes fitoquímicos químicos incluyen compuestos de azufre, flavonoides, lípidos y triterpenos (García et al., 2018).

### **Método *in vitro* (EHA)**

Dentro de los principales métodos para el estudio de las propiedades antihelmínticas de plantas están las técnicas *in vitro* porque son pruebas rápidas y fácil de realizar, comparado con los test *in*

*vivo*.(Moreno et al., 2010; Rabel et al., 1994). Estas tienen como finalidad (i) eclosión de huevos, ensayo para estimar la actividad ovicida, (ii) efecto sobre las larvas evaluadas mediante ensayo de motilidad larvaria, ensayo de desarrollo larval y migración de larvas e inhibición (iii) actividad de adulticida evaluada por el efecto sobre la motilidad, parálisis y muerte de los nematodos.

Cabe resaltar que las pruebas *in vitro* de las plantas con actividad nematicida sirven como indicativo de un potencial antihelmíntico en pruebas *in vivo* (Kalarickal et al., 2015).

El test de eclosión de huevos, también denominado EHA (*egg hatch assay*), es una de las técnicas *in vitro* frecuentemente utilizadas para el diagnóstico de la resistencia frente a benzimidazoles en Trichostrongilidos (Robles et al., 2014). Esta técnica, se basa en un ensayo de dosis-respuesta con el que se calcula la concentración del antihelmíntico ( normalmente tiabendazol) capaz de inhibir la eclosión del  $\geq 50\%$  de los huevos, aunque en una forma modificada, la misma prueba se puede usar con la elección de una concentración singularmente discriminadora (Demeler et al., 2012).

El ensayo de eclosión de huevos (EHA) está recomendado por la Asociación Mundial para el Avance de la parasitología Veterinaria (W.A.A.V.P.) como la prueba *in vitro* más confiable para la detección de resistencia a benzimidazoles en nematodos(Calvete et al., 2014; Coles et al., 2000).

Varios autores reportan su uso para la comprobación de las propiedades antihelmínticas de muchas plantas y que han servido como modelo para otros estudios, en diferentes partes del mundo, por ejemplo Molan et al., (2000) evaluaron mediante el uso de la técnica *in vitro* ensayo de incubación de huevos (EHA) Magdeleine et al., 2010 demostraron que las hojas de *Manihot esculenta* (Yuca) poseen actividad antihelmíntica contra cuatro etapas de desarrollo de *Haemonchus contortus*, utilizando ensayos de incubación de huevos (EHA), ensayos de desarrollo

larval (LDA), ensayo de inhibición de la migración larval L3 (IML) y ensayo de motilidad de gusanos adultos (AWM).

### **Modelos Biológicos de Nematodos Gastrointestinales en Rumiantes**

Los modelos biológicos de especies utilizados comúnmente como nematodos relevantes de animales son *Haemonchus contortus*, *Ascaris suum* y *Taenina crassicep* y especies de vida libre como *Pheretima posthuma* y *Caenorhabditis elegans* (Romero-Benavides et al., 2017).

Una amplia variedad de especies de nematodos gastrointestinales se localiza en diferentes zonas del tracto digestivo, siendo las especies más comunes encontradas en el abomaso de rumiantes especialmente en caprinos: *Haemonchus contortus*; en el intestino delgado, *Bunostomum trigonocephalum*, *Cooperia curticep*, *C. mcmasteri*, *Nematodirus flicollis*, *N. battus*, *N. spathinger*, *Trichostrongylus columbriformes*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Strongyloides papillosus*, en el intestino grueso, se ha reportado *Oesophagostomum venulosum*, *Trichuris ovis* y *Chabertia ovina* (Herrera et al., 2013).

La familia predominante en el abomaso y el intestino delgado es la familia Trichostrongylidae. Esta familia de parásitos abarca un gran número de géneros y especies que afectan al tracto gastrointestinal; dentro de ellos, cinco son los de mayor importancia: *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* y *Nematodirus*. La especie *Haemonchus contortus*, es uno de los parásitos más dominantes, altamente patógeno y prolífico, causa principalmente el parasitismo gastrointestinal y cuadros clínicos en rumiantes especialmente en caprinos (Kozan et al., 2016).



## MARCO REFERENCIAL

Molan et al., (2000) evaluaron mediante el uso de la técnica *in vitro* la inhibición de la migración larval (IML), los efectos de los taninos condensados (CT) extraídos de siete especies de plantas forrajeras (*Lotus pedunculatus*, *Lotus corniculatus*, *Hedysarum coronarium*, *Onobrychis viciifolia*, *Dorycnium recum*, *Dorycnium pentaphyllum*, *Rumex obtusifolius*, sobre la motilidad de etapas inmadura (L3) de *Trichostrongylus colubriformis*. *D. pentaphyllum* tuvo la actividad inhibidora más alta (63%). El impacto de la CT en la migración de larvas, esta planta como posible dieta antihelmíntica para reducir la dependencia de antihelmínticos patentados.

Tariq et al., (2009) evaluaron *in vitro* la eficacia antihelmíntica de extractos acuosos crudos y extractos etanólicos crudos de *A. absinthium* sobre huevos y larvas de nematodos gastrointestinales de las ovejas, comparado con un medicamento de referencia convencional Albendazol. Obteniendo mayor actividad antihelmíntica con extractos crudos etanolicos, se obtuvo una reducción significativa en el recuento medio de huevos fecales de 90.46% seguido por 94.7 %de mortalidad larval adulta.

Magdeleine et al., (2010) en Guadeloupe (Francia) evaluaron tres extractos (acuoso, metanólico y diclorometano) de las hojas de *Manihot esculenta* (Yuca) en pruebas *in vitro* a cuatro etapas de desarrollo de *Haemonchus contortus* utilizando ensayos de incubación de huevos (EHA), ensayos de desarrollo larval (LDA), ensayo de inhibición de la migración L3 (IML) y ensayo de motilidad de gusanos adultos (AWM). Se demostró que la yuca posee una actividad antihelmíntica contra *H. contortus*. Los principios activos responsables de la actividad podrían ser los terpenoides y compuestos de taninos condensados presentes en la hoja.

*Eucalyptus staigeriana* posee un aceite esencial que actúa como un potencial componente antihelmíntico para nematodos gastrointestinales de cabras especialmente *Haemonchus contortus*.

A partir de pruebas *in vitro* e *in vivo*, se determinaron los efectos del aceite esencial. El aceite esencial de *E. staigeriana* mostró actividad antihelmíntica *in vitro* e *in vivo*. Obteniendo una reducción del conteo de huevos fecales de 99.27% e inhibición del desarrollo larval de 99.20% (Macedo et al., 2010).

Qi et al., (2015) demostraron *in vitro* los efectos ovicida y larvicida de *Zanthoxylum simulans* en *Haemonchus contortus*. El borneol y  $\beta$  elemene unos de compuestos perteneciente al aceite esencial *Zanthoxylum simulans*, inhibieron eficazmente la eclosión, desarrollo y motilidad larval de *H. contortus* en un 100%, 99.8% respectivamente a 40 mg / ml.

Los extractos metanólicos de la flor *Mallotus philippensis* posee un potente antihelmíntico contra las larvas de tercer estadio (L3) de *H. contortus* (Botura et al., 2003; Kalarickal et al., 2015).

La decocción acuosa de *Saba senegalensis* exhibió actividad antihelmíntica en ensayos *in vitro* contra la eclosión de huevos y larvas de etapa adulta de *H. contortus*, obteniendo una mortalidad 97.77% a una concentración de 15.00 mg / mL. Este efecto antihelmíntico de la planta se atribuye al alto contenido de taninos, que poseen la capacidad de unirse a la proteína libre presente en los tubos para la nutrición larval, posteriormente causar la muerte de los parásitos (Belemlilga et al., 2016).

A partir de estudios sobre la medicina tradicional de Turquía se realizaron ensayos con extractos de raíces *Pelargonium endlicherianum* , preparados con solución de metanol (MeOH), se obtuvo un potencial antihelmíntico para la inhibición de la eclosión de huevos y en las larvas de la primera etapa (L1), pero no para las etapas adultas de *H. contortus* (Kozan et al., 2016).

Los extractos metanólicos del rizoma de *Iris kashmiriana* Linn, demostró una actividad antihelmíntica significativa contra los nematodos gastrointestinales de las ovejas, dando como

resultado una inhibición de la motilidad del gusano del 100,0% *in vitro* e *in vivo* (Khan et al., 2016).

Soldera-Silva et al., (2018) demostraron con la técnica *in vitro* LMT que las semillas de aguacate *Persea americana* es una fuente prometedora de compuestos bioactivos con propiedades antihelmínticas. *Persea americana* contiene una alta fuente de polifenoles (epicatequina) que contribuyeron a una actividad larvicida contra *H. contortus*.

De acuerdo a los usos de plantas medicinales en Etiopía (África), para el tratamiento de varias dolencias que incluyen infección por helmintos, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de eclosión de huevos y pruebas de desarrollo de larvas de *Haemonchus contortus* para determinar los posibles efectos antihelmínticos de extractos acuosos e hidroalcohólicos en bruto de las hojas de *Senna occidentalis*, partes aéreas de *Leonotis ocymifolia*, *Leucas martinicensis*, *Rumex abyssinicus* y corteza del tallo de *Albizia schimperiana*. Los extractos acuosos como los hidroalcohólicos de *L. martinicensis*, *L. ocymifolia* y el extracto acuoso de *S. occidentalis* y *A. schimperiana* indujeron la inhibición completa de la eclosión del huevo a una concentración menor o igual a 1 mg / ml, de inhibición del desarrollo larval indujeron 100, 99.85, 99.31 y 96.36%, respectivamente; mientras que los extractos hidroalcohólicos de *A. schimperiana* indujeron inhibición del 99.09% a una concentración de 50 mg / ml. Se sugiere el uso de estas plantas como un antihelmíntico eficaz contra *Haemonchus contortus*(Egualé et al., 2011).

En India se evaluaron *in vitro* la actividad antihelmíntica de extractos metanolicos de hojas de *Ocimum sanctum* y *Mallotus phillipensis* contra *Setaria digitata*. Los extractos metanolicos de *Mallotus phillipensis* mostró mejor actividad antihelmíntica, produciendo la muerte a concentraciones de 1,56 mg / ml por 1,5 horas(Kalarickal et al., 2015).

En Estados Unidos en la localidad de Northern Great Plains se realizó un ensayo de eclosión de huevos (EHA) y un ensayo de migración de larvas (LMA), para evaluar la actividad antihelmíntica de extractos de metanol, de 40 plantas nativas y naturalizadas, sobre huevos y larvas *Haemonchus contortus*. De los 40 extractos metanólicos seleccionados, siete (*Chrysothamnus viscidiflorus*, *Ericameria nauseosa*, *Liatris punctata*, *Melilotus alba*, *Melilotus officinalis*, *Perideridia gairdneri* y *Sanguinaria canadensis*) mostraron una inhibición significativa del 100% a 50 mg / ml en el ensayo de eclosión de huevos (EHA). De manera similar, cuando estos ocho extractos de plantas se evaluaron adicionalmente con la LMA, los extractos de *E. nauseosa* y *R. aromatica* nuevamente exhibieron la actividad más alta ( $p < 0.001$ ), con valores 4.0 mg / ml y 10.43 mg / ml respectivamente (Acharya et al., 2014).

En México se evaluó la actividad antihelmíntica los extractos acuosos crudos de tres plantas de uso tradicional *Cydista aequinoctialis* L., *Heliotropium indicum* L. y *Momordica charantia* L. en el área rural del estado de Tabasco contra *Haemonchus contortus*. Los extractos de las tres plantas estudiadas presentaron una baja actividad antihelmíntica excepción del fruto de *M. charantia* con una mortalidad media 65.5% a las 72 h. Considerando estas especies como un prospecto para encontrar un antihelmíntico natural (Espinosa et al., 2016).

En Brasil se evaluaron los efectos *in vitro* de los extractos acuosos de *Cymbopogon citratus* y *Digitaria insularis* sobre larvas de nematodos gastrointestinales de caprinos mediante la prueba de reducción de larvas por gramo de heces (LPG). Los resultados revelaron una reducción superior al 95% del número de larvas con una concentración de 224 mg / ml para el extracto de *C. citratus* y 138,75 mg / ml para el extracto de *D. insularis*. Estos resultados sugieren que los extractos acuosos de las hojas de *C. citratus* y *D. insularis* son eficaces en el tratamiento *in vitro* de los nematodos gastrointestinales de caprinos (Mariana B Botura et al., 2003).

En Brasil se evaluó *in vitro* (pruebas de eclosión de huevos (EHT) y motilidad larval (LMT)) la actividad antihelmíntica de extractos (hidroetanólico crudo (CH), acetato de etilo (EA), butanólico (BT) y extractos hidroetanólicos residuales (RH) hojas de *Digitaria insularis* contra nematodos gastrointestinales de cabras y su citotoxicidad en células Vero. Obtuvieron como resultado una baja actividad larvicida y alta actividad ovicida (Santos et al., 2017).

En Medellín, Colombia se demostró *in vitro* el potencial antihelmíntico de extractos acuosos de *Nicotiana tabacum* y de extractos oleosos de *Azadirachta indica* sobre nematodos gastrointestinales en caprinos. Se realizaron ensayos de actividad nematicida sobre muestras de materia fecal de caprinos con alta carga parasitaria (trichostrongilidos). La evaluación se realizó por medio de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) y el tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>). Obteniendo un porcentaje de inhibición en la eclosión de huevos para el extracto acuoso de *N. tabacum* y el extracto oleoso de *A. indica* fue de 99 % y 80 %, respectivamente. Los extractos presentaron efecto sobre larvas infectantes (L3), con un tiempo letal medio para extractos de *N. tabacum* de  $8 \pm 1$  minutos, y para el extracto *A. indica* de  $8 \pm 1$  minutos. Los resultados de la actividad nematicida a nivel *in vitro* muestran que los extractos de *N. tabacum* y *A. indica* pueden ser una alternativa promisoriosa para el control de nematodos en rumiantes (Herrera et al., 2013).

## OBJETIVOS

### General

Evaluar la actividad antihelmíntica de tres especies de plantas con propiedades medicinales sobre huevos de nematodos gastrointestinales de la familia Trichostrongylidae en caprinos.

### Específicos

1. Evaluar *in vitro* la actividad antihelmíntica de tres especies de plantas con propiedades medicinales sobre huevos de nematodos gastrointestinales en caprinos utilizando el ensayo de eclosión de huevos (EHA).
2. Obtener extractos metanólicos de plantas con propiedades antihelmínticas para su utilización en pruebas *in vitro*.
3. Determinar la concentración del extracto vegetal más efectiva sobre la inhibición de eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales de la familia Trichostrongylidae.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colección de Material Vegetal

Se colectaron hojas frescas de Ajenjo (*Artemisia absinthium*), manzanilla criolla (*Tanacetum parthenium*) y anamú (*Petiveria alliacea*), en su forma natural, en el bosque seco tropical de Cúcuta, y en matorrales del bosque andino de Pamplona Norte de Santander Colombia. Para este proyecto se tomó la decisión de escoger las anteriores plantas reportadas en los documentos: plantas medicinales en Colombia, Vademécum colombiano de plantas medicinales <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SA/vademecum-colombiano-plantas-medicinales.pdf> y del libro de Fonnegra et al, 2007.

### Preparación de Plantas

Cincuenta gramos de hojas frescas de cada una de las especies fueron secados en estufa y posteriormente molidos a un milímetro de tamaño de partícula. Se adicionaron setenta y cinco mililitros de metanol a los cincuenta gramos del material ya molido, posteriormente fue dejado en agitación durante toda la noche para favorecer la extracción de los compuestos. Las muestras extraídas fueron filtradas en papel de filtro Whatmann N° 40. El filtrado luego fue liofilizado, para obtener un extracto en polvo.

### Liofilización

El filtrado se secó por congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , evitando la desnaturalización de las muestras, posteriormente se sublimó el hielo en una cámara liofilizadora obteniendo la desecación primaria. Luego se eliminó las últimas trazas de vapor de agua a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , después se almacenaron las muestras en la oscuridad, en desecadores, a  $22^{\circ}\text{C}$ , finalizando el proceso se

procedió a preservar de la humedad y el oxígeno envasando el contenido. El procedimiento de liofilización se realizó en el centro de investigación para la agro-industrialización de especies vegetales aromáticas y medicinales tropicales (CENIVAM) de la Universidad Industrial del Santander(UIS).

### **Ensayo *in vitro***

#### **Ensayo de Eclosión de Huevos**

1. Se utilizaron 200 cabras como donadores de materia fecal (MF), infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales. Se seleccionó MF con una cantidad de huevos por gramo mayor a 1000, verificado con la técnica de McMaster.
2. La MF se maceró con agua destilada a 40°C y luego fue filtrada a través de tres filtros 105 $\mu$ , 74 $\mu$  y 37 $\mu$ . En este último quedaron retenidos los huevos, se recuperaron, y centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos en agua destilada(Fig.1).
3. Eliminado el sobrenadante, se agregó solución salina (NaCl) sobresaturada y posteriormente se homogenizó con el sedimento.
4. Nuevamente se centrifugó, el sobrenadante fue vertido en el tamiz de 37  $\mu$  para enjuagar los huevos con agua destilada, evitando de este modo la deshidratación provocada por la solución salina.
5. Luego el contenido del tamiz fue colocado en una copa de sedimentación durante una hora a temperatura ambiente.
6. Posteriormente se prepararon las diluciones para cada uno de los extractos vegetales de *Artemisia absintium*, *Petiveria alliacea* y *Tanacetum parthenium*. Aplicando la técnica *in vitro* ensayo de eclosión de huevos (EHA), se evaluaron tres concentraciones de 10, 5, 1 mg/ml con 6 réplicas para cada uno de los extractos correspondientes (Tabla 3).



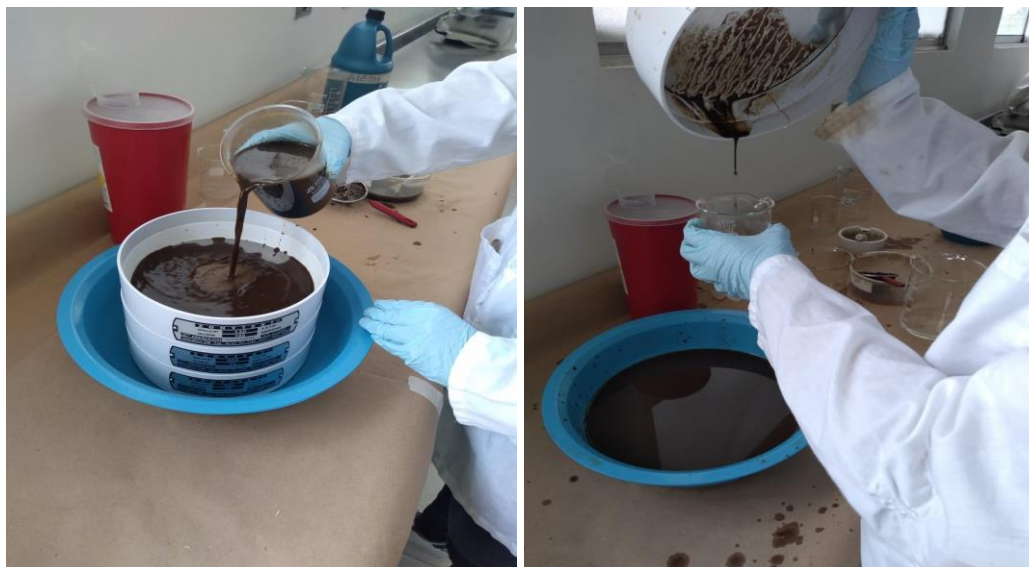
7. Junto la suspensión de huevos con una concentración de 200 huevos por ml, se distribuyeron en placas de 24 pocillo de 1 ml. Se utilizó un control positivo con Tiabendazol a 0.1 µg/ml de concentración y un control negativo solo con agua destilada las placas fueron incubadas durante 48 horas en estufa BOD a 27°C.
8. Después de 48 horas de incubación a 27 ° C, se detuvo la eclosión, agregando solución de yodo (Lugol). El número de larvas L1 por pocillo se contó luego utilizando un microscopio inverso (a 100 aumentos). El porcentaje de inhibición de la eclosión fue calculado por la siguiente formula:

$$\% \text{ de eclosión: } \frac{\% \text{ de eclosión en el grupo control} - \% \text{ de eclosión en el grupo tratado}}{\% \text{ eclosión en el grupo control}} \times 100$$

% eclosión en el grupo control-

**Tabla 3.** *Contenido volumétrico de las diluciones*

Concentración	Tween 80	Extracto vegetal µl	Huevos µl	Agua destilada µl	Suma
10%	540	600	120	4740	6000
5%	540	300	120	5040	6000
1%	540	30	120	5280	6000
Control-			120	5880	6000



**Figura1.** Filtrado y recuperación de huevos del tamiz de  $37\mu$ .

### **Análisis Estadístico**

Se aplicó un ANOVA de dos factores a los resultados para identificar diferencias significativas entre los extractos, las concentraciones, y el nivel de diferencia entre las concentraciones evaluadas y los controles positivos y negativos; Esto se hizo con el programa Statgraphics 5.1. Para elaborar el diagrama de cajas y bigotes se aplicó la función *boxplot* en el ambiente R versión 3.5.3 (R Core Team 2018).

## RESULTADOS

La comparación de las medias rechazó la hipótesis nula, mostrando diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) por extracto y por concentración; sin embargo la interacción entre extractos y concentración no existen diferencias significativa aceptando la hipótesis nula (Tabla 4). Las comparaciones múltiples de la tasa de eclosión media de los extractos de *P. alliacea*(A) y *T. parthenium* (A) no son significativamente diferentes entre sí, sin embargo; si son significativamente diferente con la tasa de eclosión de *A. absinthium* (B) (Tabla 5). Los niveles de concentración de cada uno de los extractos; 10mg/ml(A), 5mg/ml(B) y 1mg/ml(C), son significativamente diferente entre sí, demostrando una reducción de larvas L1 a medida que aumenta la concentración (Tabla 6).

**Tabla 4.** Comparación de las medias de dos factores: extractos y concentración

Factorial AOV Table for NLarvas							
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)		
Extractos	2	836	418	23.570	7.4e-08	***	
Concetracion	1	4532	4532	255.629	< 2e-16	***	
Extractos:Concentración	2	103	52	2.905	0.0644	.	
Residuals	48	851	18				
Grand Mean			29,463				
CV			14,06				

**Tabla 5.** Comparaciones múltiples del número de larvas eclosionadas por extracto

Extractos	Mean	Homogeneous Groups
<i>P. alliacea</i>	32,833	A
<i>T. partheni</i>	31,611	A
<i>A. absinth</i>	23,944	B

**Tabla 6.** Comparaciones múltiples del número de larvas eclosionadas por niveles de concentración

Concent	Mean Homogeneous Groups
1	39,111 A
5	32,333 B
10	16,944 C

Todos los extractos demostraron una inhibición significativa en la eclosión huevos dependiente de las concentraciones probadas. A una concentración de 10mg/ml se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición de eclosión en todos extractos, mostrando valores superiores al 80% en la inhibición de eclosión de huevos. El porcentaje de eclosión del extracto de *A. absinthium* (87.3%) obtuvo el mayor rendimiento (Tabla 7), seguido por *T. parthenium* (86.4%) (Tabla 8). El rendimiento más bajo se registró por *P. alliacea* (81.9%) (Tabla 9).

**Tabla 7.** Porcentaje de eclosión de huevos, para el extracto metanólico de las hojas de *A. absinthium*

Concentración (µg/ml)	% de eclosión
Control negativo	120.6
Tiabendazol 0.1	98
10	87.3
5	79.4
1	75.4

**Tabla 8.** Porcentaje de eclosión de huevos, para el extracto de metanólico de las hojas de *P. alliacea*

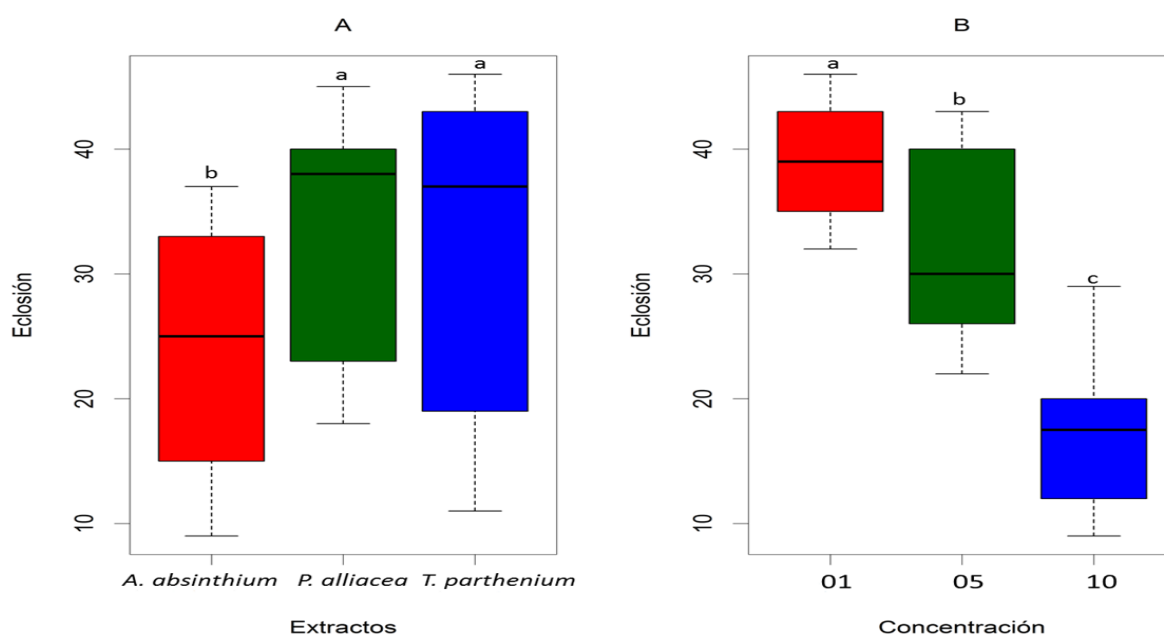
Concentración (µg/ml)	% de eclosión
Control negativo	120.6
Tiabendazol 0.1	98
10	81.9
5	69.7

1	66.7
---	------

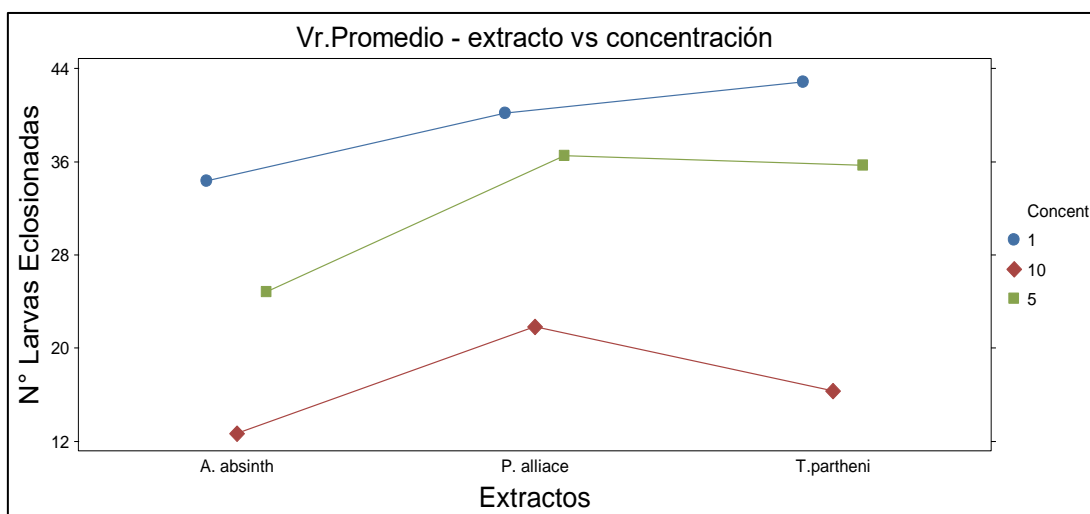
**Tabla 9.** Porcentaje de eclosión de huevos, para el extracto de metanólico de las hojas de *T. parthenium*

Concentración (µg/ml)	% de eclosión
Control negativo	120.6
Tiabendazol 0.1	98
10	86.4
5	70.4
1	65

Todos los extractos evaluados difirieron significativamente de los controles negativos y positivos (Tiabendazol). Para el control negativo (agua destilada), la eclosión media fue del 120.6% y para el control positivo fue del 98.5%.



**Figura 2.** Comparaciones múltiples del número de larvas eclosionadas por extractos de las especies y por concentración de extracto. Letras iguales indican que no tienen diferencias significativas de acuerdo a una ANOVA ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 3.** Comparación múltiple de las medias de inhibición de 3 concentraciones (10, 5 y 1 mg / ml) vs extractos



**Figura 4.** Larva L1 de *Haemonchus*

## DISCUSIÓN

En la Tabla 4 se puede apreciar que las medias obtenidas de la comparación de los extractos y concentraciones existen diferencias significativas dentro de un intervalo de confianza de 95%, rechazando la hipótesis nula, constatando el efecto de los niveles de concentración influyen directamente en la inhibición de la eclosión de los huevos demostrando las variaciones de la capacidad antihelmíntica de los extractos de *A. absinthium*, *P. alliacea* y *T. parthenium*.

El contraste de las medias de cada uno de los extractos demuestra un rendimiento variable, apreciando la actividad más alta de inhibición de eclosión huevos del extracto de *A. absinthium* y *T. parthenium*, obteniendo valores muy cercanos (Tabla 5). La comparación múltiple entre las concentraciones es directamente proporcional ya que la eclosión es dependiente a los niveles de concentración, observándose reducido el número de larvas L1 a medida que la concentración aumenta (Tabla 6) (Fig. 2), (Fig. 3).

La inhibición de eclosión, es debido a la capacidad antioxidante de cada una de las especies de plantas mencionadas en la tabla 2. Estas plantas contienen varios metabolitos secundarios de interés medicinal: terpenoides, flavonoides, compuestos fenólicos y taninos condensados. Que actúan de forma directa e indirecta sobre la biología de los huevos de nematodos gastrointestinales como son  $\alpha$  y  $\beta$  thujone, sabinene, myrcene, cis-sabinyl, flavanona petiveral ( Lopes et al., 2008; Is, 2013; Nguyen & Németh, 2016)).

Otra de las razones de la alta inhibición de eclosión es el disolvente orgánico, que es el componente principal que facilita la dilución de los componentes activos de las plantas, además está demostrado que los extractos de plantas de metanol tienen baja toxicidad en los mamíferos por estudios realizados con animales de laboratorio (Flota et al., 2017). En el presente estudio se utilizó una solución alcohólica de metanol como disolvente orgánico, que facilitó exhibir la capacidad antioxidante de las plantas obteniendo así un buen rendimiento, e incluso en las concentraciones más bajas (5 y 1%). En contraste con otros estudios en los que se reporta mayor efectividad ovicida de extractos metanólicos como Magdeleine et al., (2010) quienes reportaron mayor actividad de ovicida contra *Haemonchus contortus* utilizando tres extractos (acuoso, metanólico y diclorometano) de las hojas de *Manihot esculenta* en pruebas *in vitro* siendo el extracto metanólico el más efectivo.

En términos de porcentaje de eclosión todos los extractos obtuvieron una buena actividad ovicida, siendo la concentración de 10mg/ml la más efectiva, reduciendo el porcentaje de eclosión más del 80%, aunque el porcentaje de inhibición de eclosión sobre las otras concentraciones no son notablemente bajas, porque se obtuvieron valores por encima del 50% de efectividad, es decir que se considera como posibles antihelmínticos, con capacidad ovicida. Todos los extractos evaluados difirieron significativamente del control positivo (Tiabendazol) que obtuvo un porcentaje de



inhibición del 98 %, que es el rango óptimo efectividad de un antihelmíntico farmacéutico. Este resultado comparado con los extractos, los valores del porcentaje eclosión en la concentración de 10mg/ml no se alejan considerablemente del porcentaje del Tiabendazol, siendo el valor más próximo a este el de *A. absinthium* con una diferencia de 10.7%. Considerando que la efectividad mínima de un antihelmíntico farmacéutico se define una reducción de más del 90% (Tabla 7)(M. B. Botura et al., 2011). Kmaraj & Rahuman (2010) registraron valores de inhibición de eclosión del 80-100%, en la concentración más alta 50mg/ml, con extractos de acetato de etilo, acetona y metanol de las especies de plantas: *S. torvum*, *T. chebula*, *A. squamosa*. Valores muy cercanos a los resultados control positivo(albendazol), que representó una inhibición del 100%. Carvalho et al (2011) exhibieron resultados con valores del 100% inhibición de eclosión huevos para el control positivo y para los extractos acuosos *M. piperita*, *L. sidoides* y *P. tuberculatum*. a una concentración de 2.5 mg mL – 1. El porcentaje de eclosión para *A. absinthium* fue el más bajo, siendo la concentración de 10mg/ml con el conteo más bajo de larvas L1 (Tabla 7), es decir tiene una alta capacidad ovicida. En otros estudios, obtuvieron niveles similares del efecto antihelmíntico del extracto alcohólico de las hojas de *Artemisia absinthium* demostrando que posee una potente acción antihelmíntica a las dosis en dosis de 0.5, 1, 2%(mg/ml). Incluyendo la dosis mínima empleada, 0.25%, sobre *Eisenia foetida*( Zhindón &Trelles, 2007). Tariq et al (2009) reportaron niveles de efectividad muy cercano al del presente estudio, demostrando una reducción significativa superior al 80% en el recuento de huevos fecales de *Haemonchus contortus* de extractos vegetales acuoso y etanólicos de *A. absinthium*.

El género *Artemisia* famoso por su sabor amargo y de fuerte olor es considerado de alto valor etnológico por su amplio uso en la medicina tradicional (Herb, 1995). Abarca un gran número de

especies con actividad antiparasitaria como: *A. brevifolia*, *A. annua*, *A. abyssinica*, *A. afra*, *A. douglasia*, *A. elegantissima*, *A. maciverae*, *A. mexicana* y *A. roxburghiana*. (Iqbal et al., 2004; Naß & Efferth, 2018). Como en el caso de Iqbal et al. (2004) demostraron que extractos de metanol crudo y extractos acuosos de *A. brevifolia* dio como resultado una reducción del 62% en el recuento de huevos *Haemonchus contortus*. En comparación con los resultados de este estudio los valores del extracto de *A. absinthium* fueron más efectivos con una diferencia del mas 20 % de efectividad. Las propiedades antihelmínticas de *Artemisia* es debido a la presencia tujona, considerado como el componente principal de acción antiparasitaria. Sin embargo, las propiedades tujona produce respuestas adversas en altas concentraciones (dosis minima 35mg/kg). El mayor efecto en humanos y animales experimentales se reportó neurotoxicidad manifestada por convulsiones epileptiformes(Bach et al., 2016)( Lachenmeier et al., 2010).

*P. alliacea* registro el porcentaje de eclosión más alto (Tabla 9). Obteniendo los valores de eclosión de larvas L1 más bajo en la concentración 10%. (81.9%), sin embargo; el porcentaje de eclosión en comparación con *A. absinthium* y *T. parthenium*, no es considerablemente bajo, ya que la diferencia es mínima. Gran parte de la actividad antihelmíntica de *P. alliacea* se debe a los flavonoides (flavanones6-formyl-8-methyl-7-0-methylpinocembrin), leridol, 5-O- methylether) y al aceite esencial petiverina que han sido detectados particularmente en las hojas de esta especie, aunque la cantidad y la variedad de metabolitos secundarios depende de las condiciones de recolección (variabilidad estacional y ambiental) y método de extracción(Luz et al., 2016; Sagbo et al., 2018). Estos resultados fueron cercanos a los de Flota et al (2017) quienes demostraron mayor actividad antihelmíntica contra los huevos y larvas *Cyathostomin* utilizando extractos de metanol de tallo y hojas de *P. alliacea* recolectados en la estación seca y lluviosa. Exhibiendo el extracto de tallo un 97% de eclosión a 75 µg / ml de la estación lluviosa y el extracto de hoja de la

estación lluviosa produjo la misma inhibición a partir de 150 µg / ml. *P. alliacea* se le atribuyen propiedades tóxicas por sus efectos sedantes y asiogénicos en mamíferos, de acuerdo a sus usos tradicionales y etnológicos, sin embargo; aún no hay datos certeros sobre su toxicidad. (Luz et al., 2016; García et al., 2018). García et al (2018) no encontraron signos de toxicidad con el extracto acuoso administrado por vía oral de hojas de *P. alliacea* en ratones, no obtuvieron cambios perjudiciales significativos o por la administración oral diaria de la suspensión de *P. alliacea*.

*T. parthenium* registro un bajo porcentaje de eclosión, exhibiendo el número de eclosión de larvas L1 más reducido en la concentración de 10mg/ml de 86.4%, (Tabla 9) valor muy cercano a al obtenido por *A. absinthium* (87.3%). Estos resultados indican que *T. parthenium* se considera un potente antihelmíntico en condiciones *in vitro*, igualmente para *A. absinthium* y *P. alliacea*. Hasta ahora, no se han abordado estudios sobre la actividad antihelmíntica de esta planta, a diferencia del presente estudio, aunque su capacidad antioxidante en otros organismos no ha estudiada ampliamente.

Los resultados del ensayo de eclosión de huevos para la mayoría de las plantas medicinales en el presente estudio es comparable a similares estudios realizados anteriormente para otras plantas tomando como modelo de estudio nematodos gastrointestinales *Trichostrongylidae*. Eguale et al (2011) y Tadesse et al (2009) obtuvieron porcentajes superiores al del presente estudio con un registro de inhibición de eclosión de huevos al 100% de *H. contortus* con extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Leucas martinicensis*, *Leonotis ocymifolia* *Maesa lanceolata* y *Plectranthus punctatus* a una concentración máxima de 1mg/ml.

Gran parte de la actividad antihelmíntica de *A. absinthium*, *P. alliacea* y *T. parthenium* se debe a la capacidad que tienen estas plantas de adaptarse y crecer en diversos entornos, esto se debe a que son hierbas perennes que se encuentran entre el primer y segundo estado sucesional ecológico. Además, las condiciones de recolección, almacenamiento y método extracción de las plantas afectan sus propiedades físicas y químicas y probablemente también su actividad antihelmíntica.

Los extractos de plantas son una alternativa viable para el control de nematodos gastrointestinales en cabras. Pueden reemplazar parcialmente a los tratamientos farmacéuticos ya que los parásitos están en una existente coevolución (parasito-metabolito-ambiente) ante las presiones selectivas de ambiente. Sin embargo, las investigaciones sobre el uso de plantas medicinales como antihelmíntico son limitadas. Es discutible las atribuciones toxicológicas de las especies, porque los componentes que causan el efecto tóxico, son los mismo que producen el efecto antihelmíntico y aun estas plantas se recomiendan medicamentos caseros para la cura de enfermedades.

## CONCLUSIONES

El presente estudio ha demostrado que todas las plantas evaluadas en extractos metanólicos *In vitro* (*A. absinthium*, *P. alliacea*, *T. parthenium*) tiene un moderado grado de actividad antihelmíntica contra la eclosión de huevos de la familia Trichostrongylidae, gracias a que las partes aéreas de las plantas exhibieron una amplia variedad de ingredientes activos (metabolitos secundarios) con actividad antihelmíntica.

- El extracto que demostró mejor rendimiento en la inhibición de eclosión de huevos fue *A. absinthium*.
- Se determinó que la concentración de 10mg/ml fue la más efectiva reduciendo al máximo el porcentaje de eclosión.
- El porcentaje de inhibición con mayor rendimiento no se aleja de los valores mínimo de efectividad (90%) de los antihelmínticos comerciales.

## RECOMENDACIONES

Añadir concentraciones más altas e incluir otras partes de la planta como tallo y raíces para evaluar extractos vegetales. Tener en cuenta las variables meteorológicas (estaciones), métodos de recolección, almacenamiento. Porque estas condiciones tendrá un impacto en las rutas sintéticas de los metabolitos secundarios, que potencialmente pueden afectar sus propiedades físicas y químicas.

Se necesitan seguir realizando estudios *in vitro* para identificar los metabolitos secundarios específicos que proporcionan a estas plantas su actividad antihelmíntica.

Corroborar la acción antihelmíntica de estos estratos en posteriores estudios *in vitro* en larvas infectivas L3 y en adultos en condiciones *in vivo* que ayudarán a comprender la farmacodinámica de estos metabolitos dentro de los animales para determinar las dosis adecuadas y corroborar la eficacia del extracto en entornos de campo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, J., Hildreth, M. B., & Reese, R. N. (2014). In vitro screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 201(1–2), 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.008>
- Agency, E. M., Papyrus, E., Greek, T., Greek, T., Naturalis, H., Ages, M., & Historiae, T. S. (2010). Journal of Ethnopharmacology, 131, 224–227. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.062>
- Alberti, E. G., Zanzani, S. A., Gazzonis, A. L., Zanatta, G., Bruni, G., Villa, M., ... Manfredi, M. T. (2014). Effects of gastrointestinal infections caused by nematodes on milk production in goats in a mountain ecosystem: Comparison between a cosmopolite and a local breed. *Small Ruminant Research*, 120(1), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.04.017>
- Alonso-Díaz, M. A., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., & Hoste, H. (2008). In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus*

- contortus larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*, 153(3–4), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.042>
- Anthony, J. P., Fyfe, L., & Smith, H. (2005). Plant active components - A resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*, 21(10), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.004>
- Aréchiga, C. F., Aguilera, J. I., Rincón, R. M., Méndez De Lara, S., Bañuelos, V. R., & Meza-Herrera, C. A. (2008). Situación Actual Y Perspectivas De La Producción Caprina Ante El Reto De La Globalización [Role and Perspectives of Goat Production in a Global World]. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 9, 1–14. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911227001>
- Armenteras, D., Gast, F., & Villareal, H. (2003). Andean forest fragmentation and the representativeness of protected natural areas in the eastern Andes , Colombia, 113, 245–256. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(02\)00359-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(02)00359-2)
- Aziz, A. T., Alshehri, M. A., Panneerselvam, C., Murugan, K., Trivedi, S., Mahyoub, J. A., ... Benelli, G. (2018). The desert wormwood (*Artemisia herba-alba*) – From Arabian folk medicine to a source of green and effective nanoinsecticides against mosquito vectors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180(2017), 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.02.012>
- Bach, B., Cleroux, M., Sallen, M., Schönenberger, P., & Burgos, S. (2016). A new chemical tool for absinthe producers , quantification of  $\alpha$  /  $\beta$  -thujone and the bitter components in *Artemisia absinthium*. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.045>
- Bachaya, H. A., Iqbal, Z., Khan, M. N., Sindhu, Z. ud D., & Jabbar, A. (2009). Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against *Trichostrongylid*



- nematodes of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(2), 325–329.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.043>
- Belemlilga, M. B., Traoré, A., Ouédraogo, S., Kaboré, A., Tamboura, H. H., & Guissou, I. P. (2016). Anthelmintic activity of *Saba senegalensis* (A.DC.) Pichon (Apocynaceae) extract against adult worms and eggs of *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 945–949. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.07.015>
- Blackburn, H. D., Rocha, J. L., Figueiredo, E. P., Berne, M. E., Vieira, L. S., Cavalcante, A. R., & Rosa, J. S. (1992). Interaction of parasitism and nutrition in goats: effects on haematological parameters, correlations, and other statistical associations. *Veterinary Parasitology*, 44(3–4), 183–197. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90116-Q](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90116-Q)
- Botura, M. B., Silva, G. D., Lima, H. G., Oliveira, J. V. A., Souza, T. S., Santos, J. D. G., ... Batatinha, M. J. M. (2011). In vivo anthelmintic activity of an aqueous extract from sisal waste (*Agave sisalana* Perr.) against gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, 177(1–2), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.039>
- Botura, Mariana B, Almeida, G. N., Domingues, L. F., & Costa, S. L. (2003). EFEITOS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE *Cymbopogon citratus* ( DC .) STAPF ( CAPIM-SANTO ) E DE *Digitaria insularis* ( L .) FEDDE ( CAPIM-AÇU ) SOBRE. *Medicina*, 129, 125–129.
- Burgunder, A. J., & Petr̃, J. (2018). Fractal measures in activity patterns: do gastrointestinal parasites affect the complexity of sheep behaviour? *Applied Animal Behaviour Science*.  
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2018.05.014>
- Calvete, C., Ferrer, L. M., Lacasta, D., Calavia, R., Ramos, J. J., Ruiz-de-arkaute, M., & Uriarte,

- J. (2014). Veterinary Parasitology Variability of the egg hatch assay to survey benzimidazole resistance in nematodes of small ruminants under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 203(1–2), 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.002>
- Cárdenas, J., Reyes-Pérez, V., Hernández-Navarro, M. D., Dorantes-Barrón, A. M., Almazán, S., & Estrada-Reyes, R. (2017). Anxiolytic- and antidepressant-like effects of an aqueous extract of *Tanacetum parthenium* L. Schultz-Bip (Asteraceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.023>
- Carolina, A., Chagas, D. S., & Chagas, A. C. S. (2016). Medicinal plant extracts and nematode control Medicinal plant extracts and nematode control, (MARCH 2015). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201510008>
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., & Taylor, M. A. (2000). 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, 44(1992), 35–44.
- Cortes López Hector. (2009). SITUACIÓN DEL RECURSO OVINO Y CAPRINO EN COLOMBIA. Retrieved June 18, 2018, from <https://sioc.minagricultura.gov.co/OvinoCaprina/Documentos/005> - Documentos Técnicos/Situacion Recursos Ovino - Caprino.pdf
- Dasilveira, R. (2002). Vademecum colombiano de plantas medicinales. Ministerio de la protección social. *Mycological Research*, 106(11), 1323–1330.
- Demeler, J., Kleinschmidt, N., Küttler, U., Koopmann, R., & Samson-himmelstjerna, G. Von. (2012). Parasitology International Evaluation of the Egg Hatch Assay and the Larval

- Migration Inhibition Assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. *Parasitology International*, 61(4), 614–618. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.06.003>
- Eguale, 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*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.063>
- Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Vera y Cuspinera, G. G., Pérez-Castañeda, E., Zaragoza-Vera, C. V., Martínez-Martínez, S., ... González-Cortázar, M. (2016). Actividad antihelmíntica in vitro de tres especies vegetales utilizadas tradicionalmente en Tabasco, México. *Polibotánica*, 0(41), 91–100. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.41.6>
- Faculdade, F.-, Medicas, C., Estadual, U., & Brazil, C.-. (2000). ORALLY WITH PETIVERIA ALLIACEA EXTRACT ., 22(3).
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3(September), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>
- Fthenakis, G. C., & Papadopoulos, E. (2018). Impact of parasitism in goat production. *Small Ruminant Research*, 163, 21–23. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.04.001>
- García-Pérez, M. E., Alfonso-Castillo, A., Lores, O. F., Batista-Duharte, A., & Lemus-Rodríguez, Z. (2018). Toxicological evaluation of an aqueous suspension from leaves and stems of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 211, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.022>

- Hammond, G. B., Fernández, I. D., Villegas, L. F., & Vaisberg, a J. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. *Journal of Ethnopharmacology*, *61*, 17–30. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00009-9)
- Hammond, J. A., Fielding, D., & Bishop, S. C. (1997). Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Veterinary Research Communications*, *21*(3), 213–228. <https://doi.org/10.1023/A:1005884429253>
- Herb, A. P. (1995). *Artemisia absinthium* , wormwood, 105–121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10344-5.00016-1>
- Herrera O, L., Ríos O, L., & Zapata S, R. (2013). Frecuencia de la infección por nemátodos gastrointestinales en ovinos y caprinos de cinco municipios de Antioquia. *Revista MVZ Cordoba*, *18*(3), 3851–3860.
- Instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos. (2019). Listados de plantas medicinales aceptadas con fines terapéuticos - Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Retrieved July 9, 2019, from <https://www.invima.gov.co/web/guest/listados-de-plantas-medicinales-aceptadas-con-fines-terapéuticos?inheritRedirect=true>
- Iqbal, Z., Lateef, M., Ashraf, M., & Jabbar, A. (2004). Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep, *93*, 265–268. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.046>
- Is, E. (2013). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology, *141*, 1361–1368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.003>

- Judžentiene, A. (2015). Wormwood (*Artemisia absinthium* L.) oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 849–856. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00097-3>
- Kalarickal, D. C., Samraj, S., Udayan, D., Narayanan, P. M., Ramachandran, S., & Gouri, S. S. (2015). Effect of various extracts of *Ocimum sanctum* and *Mallotus philippensis* on *Setaria digitata*. *Pharmacognosy Journal*, 7, 344–347. <https://doi.org/10.5530/pj.2015.6.5>
- Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance : a status report, 20(10). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001>
- Kaplan, R. M., & Vidyashankar, A. N. (2012). An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186(1–2), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048>
- Khan, A., Tak, H., Nazir, R., & Lone, B. A. (2016). In vitro and in vivo anthelmintic activities of *Iris kashmiriana* Linn. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.05.001>
- Kotze, A. C., Ruffell, A., Lamb, J., & Elliott, T. P. (2018). Response of drug-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus* larvae to monepantel and abamectin alone or in combination in vitro. *Veterinary Parasitology*, 249(November 2017), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.007>
- Kozan, E., Küpeli Akkol, E., & Süntar, I. (2016). Potential anthelmintic activity of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. *Journal of Ethnopharmacology*, 187, 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.044>

- La, D. D. E., Antihelminthico, A., & Ajenjo, A. L. (n.d.). Universidad de cuenca facultad de ciencias químicas escuela de bioquímica y farmacia.
- Lanusse, C., Canton, C., Virkel, G., Alvarez, L., Costa-Junior, L., & Lifschitz, A. (2018). Strategies to Optimize the Efficacy of Anthelmintic Drugs in Ruminants. *Trends in Parasitology*, *xx*. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.05.005>
- Long, C., Sauleau, P., David, B., Lavaud, C., Cassabois, V., Ausseil, F., & Massiot, G. (2003). Bioactive flavonoids of *Tanacetum parthenium* revisited. *Phytochemistry*, *64*(2), 567–569. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00208-5)
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, *69*(8), 1732–1738. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014>
- Luz, D. A., Pinheiro, A. M., Silva, M. L., Monteiro, M. C., Prediger, R. D., Ferraz Maia, C. S., & Fontes-Júnior, E. A. (2016). Ethnobotany, phytochemistry and neuropharmacological effects of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*, *185*(01), 182–201. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.053>
- Lv, W., Piao, J.-H., & Jiang, J.-G. (2012). Typical toxic components in traditional Chinese medicine. *Expert Opinion on Drug Safety*, *11*(6), 985–1002. <https://doi.org/10.1517/14740338.2012.726610>
- Macedo, I. T. F., Bevilaqua, C. M. L., de Oliveira, L. M. B., Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Vieira, L. da S., Oliveira, F. R., ... Nascimento, N. R. F. (2010). Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, *173*(1–2), 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.004>

- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., & Archimede, H. (2010). In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 173(1–2), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.017>
- Marie-Magdeleine, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., & Archimede, H. (2014). In vitro effects of *Musa x paradisiaca* extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*, 96(1), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.12.004>
- Melville, L. A., McBean, D., Fyfe, A., Campbell, S. J., Palarea-Albaladejo, J., & Kenyon, F. (2016). Effect of anthelmintic treatment strategy on strongylid nematode species composition in grazing lambs in Scotland. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1493-6>
- Molan, A. L., Waghorn, G. C., Min, B. R., & McNabb, W. C. (2000). The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. *Folia Parasitologica*, 47(1), 39–44. <https://doi.org/10.14411/fp.2000.007>
- Moreno, F. C., Gordon, I. J., Wright, A. D., Benvenuti, M. A., & Saumell, C. A. (2010). Efecto antihelmíntico in vitro de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(3), 155–163. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2010000300006>
- Naß, J., & Efferth, T. (2018). PT US CR. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.06.002>
- Nguyen, H. T., & Németh, Z. É. (2016). Sources of variability of wormwood (*Artemisia*

absinthium L.) essential oil. *Journal of Dermatological Science*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.07.005>

Niu, Y., Zhang, X., Xiao, Z., Song, S., Eric, K., Jia, C., ... Zhu, J. (2011). Characterization of odor-active compounds of various cherry wines by gas chromatography – mass spectrometry , gas chromatography – olfactometry and their correlation with sensory attributes. *Journal of Chromatography B*, 879(23), 2287–2293. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.06.015>

Oliveira, A. F., Costa Junior, L. M., Lima, A. S., Silva, C. R., Ribeiro, M. N. S., Mesquista, J. W. C., ... Vilegas, W. (2017). Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. *Veterinary Parasitology*, 236, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.02.005>

Qi, H., Wang, W. X., Dai, J. L., & Zhu, L. (2015). In vitro anthelmintic activity of Zanthoxylum simulans essential oil against Haemonchus contortus. *Veterinary Parasitology*, 211(3–4), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.029>

Rabel, B., McGregor, R., & Douch, P. G. C. (1994). Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *International Journal for Parasitology*, 24(5), 671–676. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)90119-8)

Ramos, F., Portella, L. P., Rodrigues, F. S., Reginato, C. Z., Cezar, A. S., Sangioni, L. A., & Vogel, F. S. F. (2018). Anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in sheep to monepantel treatment in central region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38(1), 48–52. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5188>

Robles-pérez, D., Martínez-pérez, J. M., & Rojo-vázquez, F. A. (2014). *Veterinary Parasitology* Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole



in *Fasciola hepatica* isolated from sheep. *Veterinary Parasitology*, 203(1–2), 217–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.020>

Romero-Benavides, J. C., Ruano, A. L., Silva-Rivas, R., Castillo-Veintimilla, P., Vivanco-Jaramillo, S., & Bailon-Moscoso, N. (2017). Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 129, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.005>

Sagbo Idowu Jonas, M. O. W. (2018). Plants Used for Cosmetics in the Eastern Cape Province of South. *Pharmacognosy Review*, 12(24), 139–156. <https://doi.org/10.4103/phrev.phrev>

Santos, F. O., de Lima, H. G., de Souza Santos, N. S., Serra, T. M., Uzeda, R. S., Reis, I. M. A., ... Batatinha, M. J. M. (2017). In vitro anthelmintic and cytotoxicity activities the *Digitaria insularis* (Poaceae). *Veterinary Parasitology*, 245, 48–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.007>

Soldera-Silva, A., Seyfried, M., Campestrini, L. H., Zawadzki-Baggio, S. F., Minho, A. P., Molento, M. B., & Maurer, J. B. B. (2018). Assessment of anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of *Persea americana* seed extracts. *Veterinary Parasitology*, 251(December 2017), 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.019>

Sotiraki, S., Landau, S. Y., Jackson, F., & Beveridge, I. (2010). Goat – Nematode interactions : think differently, 26(May 2000), 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.007>

Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A., & Rohloff, J. (2011). In vitro evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. *Chemistry and Biodiversity*, 8(4), 614–623. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000331>

Tariq, K. A., Chishti, M. Z., Ahmad, F., & Shawl, A. S. (2009). Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary Parasitology*, *160*(1–2), 83–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.084>

Turak, A., Shi, S. P., Jiang, Y., & Tu, P. F. (2014). Dimeric guaianolides from *Artemisia absinthium*. *Phytochemistry*, *105*, 109–114.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.06.016>

Veterinary Parasitology Anthelmintic activity of methanol extracts of *Diospyros anisandra* and *Petiveria alliacea* on cyathostomin ( Nematoda : Cyathostominae ) larval development and egg hatching. (2017). *Veterinary Parasitology*, *248*(October), 74–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.10.016>