

Métodos alternativos para el control del hospedador intermediario de *Fasciola hepatica* L.
(Echinostomida: Fasciolidae) en la Granja Experimental ISER, Pamplona, Norte de Santander,
Colombia.



JEFFERSON ARMANDO LEÓN PÁEZ

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS

BIOLOGIA

COLOMBIA

2020

Métodos alternativos para el control del hospedador intermediario de *Fasciola hepatica* L.
(Echinostomida: Fasciolidae) en la Granja Experimental ISER, Pamplona, Norte de Santander,
Colombia.

JEFFERSON ARMANDO LEÓN PÁEZ

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE:
BIOLOGO

DIRECTOR:

Ph.D. JOSÉ FLÓREZ GÉLVEZ

CODIRECTORA:

MSC. WLDA MARGARITA BECERRA ROZO

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAS DE CIENCIAS BÁSICAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ÁREA DE PARASITOLOGÍA

2020

PÁGINA DE ACEPTACIÓN

Nota de aceptación

Firma Jurado 1

Firma Jurado 2

Dedicatoria

A mis padres Armando León y Eyna Páez por impulsarme, apoyarme, inspirarme y por su gran esfuerzo para lograr esta meta.

A mi hermana Alejandra León por demostrarme que la dedicación por lo académico trae recompensas y por todo el cariño que siempre me ha brindado.

A toda mi familia presente en este proceso, su compañía fue necesaria para lograr este título.

Agradecimientos

A mis padres Armando León y Eyna Páez que siempre han sido mi inspiración para lograr este título profesional.

A mi hermana Alejandra León que me llena de orgullo día a día.

A mi amiga Leidy Flórez por estar presente en todo el proceso académico y apoyarme en los momentos difíciles.

A mi director José Flórez Gélvez por haber prestado sus conocimientos y su apoyo para la culminación de la carrera y del presente trabajo.

A mi codirectora Wlida Margarita Becerra por su apoyo y compañía en todo este proceso investigativo, tanto científico como personal.

A todos mis compañeros cercanos, que aportaron su conocimiento, risas y compañía en este proceso culminado.

A todos los profesores que me brindaron su sabiduría en cada área académica.

CONTENIDO

Página

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Generalidades del parásito.....	12
1.2 Hospedador intermediario.....	13
1.3 Control del hospedador intermediario.....	14
1.4 Hospedador definitivo.....	15
1.5 Control de la <i>F. hepatica</i> en el hospedador definitivo.....	16
1.6 Parasitosis provocada por <i>F. hepatica</i>	16
1.7 Distribución de <i>F. hepatica</i>	17
1.8 Familia Lymnaeidae, hospedero intermediario de <i>F. hepatica</i>	17
1.9 Morfología de los moluscos <i>Lymnaea</i>	18
1.10 Familia Euphorbiaceae.....	19
1.11 Química y actividad biológica de la familia <i>Euphorbiaceae</i>	21
1.12 Terpenoides en las <i>Euphorbiaceae</i>	21
1.13 El género <i>Euphorbia</i> para el control biológico de caracoles.....	23
1.14 Familia Asparagaceae.....	25
1.15 Química y actividad biológica de la familia <i>Asparagaceae</i>	26
1.16 El género <i>Agave</i> para el control biológico de caracoles.....	28
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 General.....	29
2.2 Específicos.....	29

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 Descripción del sitio de recolección de los moluscos.....	29
3.1.1 Localización.	30
3.1.2 Zona de muestreo en la Granja Experimental ISER.....	30
3.2 Fase Campo.....	32
3.2.1 Método de recolección.....	32
3.2.2 Obtención del material vegetal.....	33
3.3 Métodos de laboratorio.....	33
3.3.1 Técnica Dennis.	33
3.3.2 Observación morfológica de los moluscos.....	34
3.3.3 Extracción y preparación de muestras.....	34
3.3.4 Ensayos de actividad química.....	36
3.3.5 Ensayos de actividad biológica.....	36
3.3.6 Análisis de datos.....	37
3.3.7 Prevalencias totales de los hospedadores.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1 Colecta del material biológico.....	38
4.1.1 Caracteres diagnósticos del molusco utilizado.....	39
4.2 Colecta del material vegetal.....	40
4.3 Ensayos de actividad química.....	41
4.4 Ensayos de actividad biológica con extractos vegetales.....	44
5. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	49
5.1 Ensayos con productos molusquicidas químicos tradicionales.....	49

5.2 Ensayos de actividad biológica con extractos vegetales.....	52
---	----

6. CONCLUSIONES.....	47
-----------------------------	-----------

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
---	-----------

FIGURAS

Figura 1. <i>Fasciola hepatica</i> L. Verme adulto.....	11
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i> L.....	13
Figura 3. Distribución del género <i>Lymnaea</i> en Colombia.....	18
Figura 4. Concha dextral y huevos de <i>Lymnaeae</i>	19
Figura 5. Estructura base de un éster de fórbol.	22
Figura 6. <i>Euphorbia mili</i> con propiedad molusquicida.....	25
Figura 7. Estructura base de saponina.	28
Figura 8. <i>Agave attenuata</i> con propiedad molusquicida.	29
Figura 9. Mapa físico del municipio de Pamplona, Norte de Santander.....	30
Figura 10. Entrada de la Granja Experimental ISER.....	31
Figura 11. Zona de muestreo.....	32
Figura 12. Látex de <i>Euphorbia mili</i>	35
Figura 13. A) Muestra macerada de <i>Agave attenuata</i> B) <i>Agave attenuata</i> diluida en agua....	35
Figura 14. Dilución 2g de sulfato de cobre x 100 ml de agua destilada.....	36
Figura 15. Tanques para el depósito de agua de los bebederos del ganado.....	38

Figura 16. Riachuelo formado por el agua sobrante de la naciente.....	39
Figura 17. <i>Lymnaea</i> utilizados en los ensayos biológicos.....	40
Figura 18. Recipiente (caja de Petri) con los moluscos y la dosis aplicada.....	41
Figura 19. <i>Lymnaea</i> expuestos al óxido de calcio.....	43
Figura 20. Infección natural de <i>Fasciola hepática</i> L. en <i>Lymnaea</i>	48

TABLAS

Tabla 1. Valores de mortalidad de <i>Lymnaea</i> por la acción del sulfato de cobre (CuSO ₄).	42
Tabla 2. Valores de mortalidad de <i>Lymnaea</i> por la acción del óxido de calcio (CaO).....	43
Tabla 3. Valores de mortalidad de <i>Lymnaea</i> por la acción del látex de <i>E. mili</i>	45
Tabla 4. Valores de mortalidad de <i>Lymnaea</i> por la acción del extracto acuoso de <i>A. attenuata</i>	46
Tabla 5. ANOVA de <i>Lymnaea</i> frente a los tratamientos de actividad química y biológica en 24 horas.....	46
Tabla 6. TUKEY de <i>Lymnaea</i> frente a los tratamientos de actividad química y biológica en 24 horas.....	47
Tabla 7. Prevalencia de <i>F. hepatica</i> por tratamiento.....	48

RESUMEN

El control de *Lymnaea* sp, con molusquicidas sintéticos es el método más utilizado para reducir sus poblaciones, pero el impacto ambiental que estos productos causan debido a su toxicidad generan daños en las zonas afectadas, su aplicación puede ser costosa, por lo que el tratamiento con plantas puede ayudar a reducir las pérdidas económicas asociadas a la distomatosis. La presente investigación se desarrolló entre los meses de agosto de 2019 y marzo de 2020, con el objetivo de estudiar métodos alternativos mediante la utilización de extractos vegetales para el control del hospedador intermediario de *Fasciola hepática* L. en la Granja Experimental ISER del Municipio de Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Los moluscos muestreados (n=144) se clasificaron taxonómicamente por características morfológicas de la concha y la masa visceral. La prevalencia total de la infección en los hospedadores intermediarios fue del 24,31%. Se evaluaron 2 tratamientos de control alternativos diferentes, el látex de *Euphorbia mili* y el extracto acuoso de *Agave attenuata*. Al comparar los tratamientos alternativos con los químicos (sulfato de cobre y óxido de calcio) no se observó diferencia significativa entre ellos ($P < 0,002$), se concluye que los tratamientos alternativos tienen efecto molusquicida sobre los moluscos del género *Lymnaea* sp hospedador intermediarios de *F. hepatica*.

PALABRAS CLAVE: Extractos vegetales, *Fasciola hepatica*, *Lymnaea* sp, *Euphorbia mili*, *Agave attenuata*.

1. INTRODUCCIÓN

La Distomatosis hepática, o Fascioliasis es una enfermedad parasitaria producida por tremátodos del género *Fasciola*. La especie más común es *Fasciola hepática* L. (Trematoda: Digenea) la cual se localiza en los conductos biliares como su hábitat final, principalmente de los mamíferos herbívoros, y también del hombre (Min-Salud, 1999; Bravo, 2007). La fascioliasis afecta con mayor frecuencia a rumiantes, ovinos, bovinos, caprinos, equinos y búfalos; siendo causante de alteraciones digestivas y lesiones hemáticas que a veces pueden llegar a provocar la muerte súbita de los animales infestados (Benavides, 2001; Morales y Cols, 2004; Ferreira, 2003).



Figura 1. *Fasciola hepática* L. Verme adulto. (Fuente: Atlas de parasitología clínica 2000).

La distribución de esta especie es cosmopolita y ha sido reportada en todos los continentes. Los principales hábitats de este parásito son las regiones en las cuales se cría ganado ovino y bovino, siendo las especies más susceptibles (Bravo y Ferreira, 2003), y donde existen, además, las especies de moluscos dulceacuícolas que funcionan como sus hospederos intermediarios (Malek, 1974).

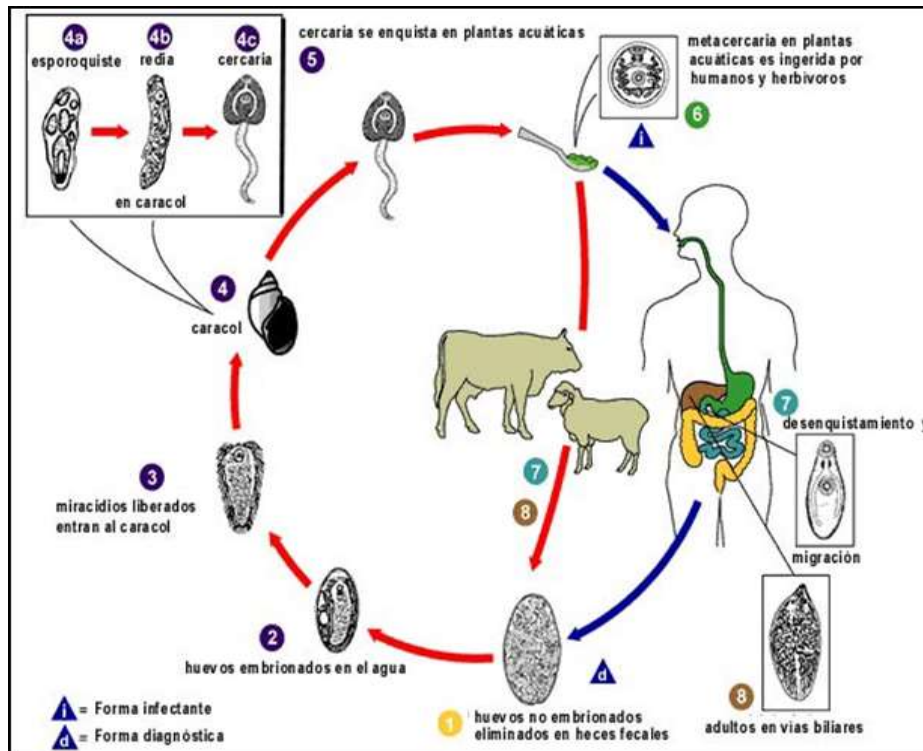
1.1 Generalidades del parásito

F. hepatica es un parásito digeneo de la clase Trematoda que se caracteriza por la complejidad de sus ciclos de vida (Figura 2), los cuales incluyen dos fases reproductivas e intervienen varios hospedadores (Vélez et al., 2002). Presenta un ciclo biológico indirecto, lo que significa obligatoriedad de un hospedador intermediario, a nivel del cual se desarrollan y multiplican las etapas asexuadas; a este nivel la especificidad hospedador- parásito es estricta (Morales et al., 2004).

Numerosos huevos operculados de *F. hepatica*, salen con la bilis y la materia fecal (1); al caer en una corriente de agua dulce se embrionan en pocos días (2) dando salida al miracidio (3), que penetra en caracoles de la familia Lymnaeidae (4). Al penetrar en el caracol, en la glándula digestiva los miracidios se transforman en esporocistos (4a), después de tres semanas se generan docenas de redias (4b). Cuando la temperatura es favorable se procrean las cercarias (4c) que emergen al abandonar el caracol y nadan hasta enquistarse sobre las hojas de la vegetación acuática y formar las metacercarias enquistadas (5).

El caracol de agua dulce sirve como un sistema amplificador: aproximadamente por cada miracidio salen cerca de 250 cercarias. La metacercaria contenida en el pasto o verduras, especialmente berros, al ser ingerida por los animales o por el hombre (6), continúa su desarrollo en el tubo digestivo, en donde se disuelve la envoltura y queda libre la forma juvenil (7), el distoma joven atraviesa la pared intestinal hasta llegar a penetrar en el hígado; migra a través del parénquima hepático y se localiza en los conductos biliares, donde alcanza el estado adulto (8). Se estima que un adulto de *F. hepatica* produce 2.000 huevos/día. Estos son transportados en la bilis y luego expulsados por las heces, cerrando el ciclo (Boray, 2007).

Figura 2. Ciclo biológico de *Fasciola hepática* L. (Fuente: <https://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>).



1.2 Hospedador intermediario

El hospedador intermediario es un molusco pulmonado del género *Lymnaea* (Boray, 1994; Olaechea, 2004; Bowman et al., 2004; Quiroz, 2005). La importancia de la malacología radica en el estudio de estos y otros moluscos ya que son fuente de alimentación para el hombre y en algunos casos plagas de cultivos (Hernández, 1992). Son caracoles hermafroditas y auto-fértiles en los que no se ha comprobado fecundación cruzada (Nari y Fiel, 1994). Su descripción morfológica; el giro de su concha es determinante para este género ya que suele ser dextrógiro (gira a la derecha), su concha en espiral pronunciada (no más de 3 o 4 espiras); su tamaño alcanza los 6 mm máximo, la concha es de color café o marrón oscuro con manto de colores grisáceos oscuros, sus antenas son triangulares y aplanadas.

En el departamento Norte de Santander se reportan a *L. cousini* y *L. truncatula* como hospedadores intermediarios de este parásito (Becerra et al., 2007; López y Becerra, 2009).

1.3 Control del hospedador intermediario

Los caracoles Lymnaeidos, son los principales hospedadores intermediarios de *F. hepatica*, donde se reproducen los estadios juveniles para completar su ciclo de vida, (Malek, 1985, Boray, 2007), viven en barro húmedo o lugares de aguas poco profundas y no estancadas, en condiciones de sequía pueden adaptarse penetrando el barro, de este modo disminuyen su actividad metabólica para sobrevivir varios meses y poder reaparecer en condiciones más favorables.

Su rol principal es la trasmisión de los trematodos, de este modo la eliminación del hospedador intermediario resultaría en la eliminación de la enfermedad. Como alternativas a su control se utilizan molusquicidas, la implementación de medidas ecológicas y control biológico, para reducir las poblaciones de caracoles y evitar la proliferación de larvas de *F. hepatica* que lo parasitan.

La utilización de molusquicidas sintéticos es un método sencillo para disminuir las poblaciones de caracoles, pero se debe tener en cuenta el impacto ambiental que generan estos productos (Malek, 1985). Su aplicación provoca un daño ambiental debido a su toxicidad y en la mayoría de las zonas afectadas, además que el proceso para su aplicación puede ser costoso, de este modo su tratamiento puede no llegar a evitar las pérdidas económicas asociadas a la distomatosis (Eddi y Cols, 1998).

Niclosamida, pentaclorofenato de sodio y N-tritylmorpholine, son algunos compuestos utilizados para el control de *Lymnaea* sp, el sulfato de cobre es comúnmente sugerido en épocas de actividad del caracol; sin embargo, su utilización provoca la acumulación de residuos tóxicos en agua y suelo, generando un efecto negativo en la fauna del área tratada.

En la actualidad se realiza una práctica común de los criadores de bovinos, evitando las pasturas húmedas durante algunas épocas del año, se alambra las áreas de presencia del caracol para impedir el acceso a los animales en estas zonas distomatósicas, logrando de este modo la reducción de las probabilidades de infestación de los rumiantes (Morales-Pino, 2004; Malek, 1983), pero se reduce el área de pastoreo para los animales.

La importancia de desarrollar alternativas de origen vegetal como control biológico han aumentado en años recientes, considerados como métodos ecológicamente sanos y más aceptados que los sintéticos (Becerra-Rozo, 2001) En este contexto las familias de plantas como la *Euphorbiaceae* y *Asparagaceae* tienen un gran número de especies con efecto potencial molusquicida (Mello-Silva y Cols, 2006).

1.4 Hospedador definitivo

Los huéspedes definitivos más importantes de *F. hepatica* son las ovejas, vacas, búfalos, cabras, llamas, caballos y cerdos. Algunos animales salvajes, como antílopes y otros rumiantes, cebras, conejos y herbívoros sirven también de hospedadores y reservorios para la contaminación de los pastizales. El hombre puede contraer la enfermedad al ingerir berros

contaminados con metacercarias de forma natural (Boray, 1994; Bowman et al., 2004; Quiroz, 2005).

1.5 Control de la *F. hepatica* en el hospedador definitivo

El uso regular de antihelmínticos o fasciolicidas es la práctica más común empleada en campo, drogas que son altamente eficaces tanto contra las formas larvarias como adultas del parásito (Eddi y cols, 1998). El objetivo del tratamiento es eliminar el agente causal de la enfermedad, interrumpir la excreción de los huevos con la materia fecal y así prevenir la infección de los caracoles. Tradicionalmente se logra combatir el problema pero no se evita la perpetuación de los niveles de infección.

1.6 Parasitosis provocada por *F. hepatica*

La Distomatosis hepática, también conocida como Fascioliosis, es una enfermedad parasitaria debida a la migración a través del parénquima hepático a los canales biliares de los rumiantes (Urquhart et al., 1999; Bowman et al., 2004; Quiroz, 2005). Este parásito hematófago determina por su presencia en los canales biliares del hígado ictericia por retención, además de trastornos generalizados como enflaquecimiento, edema sub-mandibular, anemia, angiocolitis, diarrea y esclerosis hepática (Troncy, 1981; Urquhart et al., 1999; Bowman et al., 2004; Olaechea, 2004). Esta enfermedad es de distribución cosmopolita. Se han identificado dos especies de Fasciola: *F. gigantica* y *F. hepatica*. En Latinoamérica únicamente *F. hepatica* está presente (Boray, 1994).

1.7 Distribución de *F. hepatica*

La distribución de este parásito en América Latina es amplia, incluyendo reportes que señalan su presencia desde México, pasando por Centroamérica, como lo es Costa Rica; y Suramérica: Colombia, Venezuela, Brasil, Perú, Bolivia, Argentina, Chile, Ecuador, Uruguay y Paraguay. También se encuentra en las islas caribeñas: Cuba, Puerto Rico, República Dominicana, Santa Lucía, Jamaica, Guadalupe y Martinica (Gretillat, 1967; Pino et al., 1992; Boray, 1994; Bowman et al., 2004).

1.8 Familia Lymnaeidae, hospedero intermediario de *F. hepatica*

El género *Lymnaea* pertenece al Phylum Mollusca, grupo más rico en especies después de los artrópodos (alrededor de unas 130.000 especies). Clase Gasteropoda, subclase Pulmonata (exclusivamente continentales), caracterizados por tener pulmones, y que agrupa a los caracoles terrestres, dulceacuícola y babosas. Se ubican dentro del orden *Basommatophora* (caracoles de agua dulce), la cual incluye la familia Planorbidae, Physidae y Lymnaeidae, hospederos de tremátodos de gran importancia económica (Malek, 1974; Malek y Cheng, 1980).

La familia Lymnaeidae, tiene distribución a nivel mundial, siendo más numerosa en la zona templada del norte; sin embargo, las especies de *Lymnaea* han sido ampliamente introducidas en Sur América, en Venezuela, Colombia y Brasil (Malek, 1974).

De las tres especies del género *Lymnaea* registradas para Colombia, *L. ubaquensis*, *L. columella* y *L. bogotensis*, sinónimo de *L. cousini* (Salazar y cols, 2006), solo *Lymnaea bogotensis* y *Lymnaea columella*, son identificadas como intermediarios hospederos de *Fasciola hepatica* (Malek,1974; Malek y Congswell,1980; Longo,2004), con amplia distribución en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Meta, Nariño, Cauca, Valle del Cauca y Tolima (Malek y Congswell, 1980; Longo, 2004) (Figura 3).



Figura 3. Distribución del género *Lymnaea* en Colombia. (Fuente: Longo, 2004).

1.9 Morfología de los moluscos *Lymnaea*

Los limneidos presentan una concha helicoidal, ovalada, elongada, de contornos cónicos y de color amarillento claro o café, la cual se enrolla en el plano vertical y hacia la derecha en su desarrollo ontogénico, siendo por lo tanto dextrógira (Malek, 1985) (Figura 4).

Las partes blandas del molusco contienen el pie, que es amplio, oval o elongado y aplanado en los márgenes. En la cavidad bucal, la disposición de los dientes en la rádula es de gran importancia taxonómica.



Figura 4. Concha dextral y huevos de *Lymnaeae*. (Fuente: Autor).

Los limneidos son ovíparos y depositan sus huevos (Figura 4) envueltos en una masa gelatinosa, que por la forma y número de huevos que contiene, tiene valor taxonómico (Malek y Cheng, 1974). La masa ovígera de *Lymnaea columella* tiene forma alargada y es de consistencia firme; contiene en promedio 30 huevos de 0,77x0,65 mm; la duración del desarrollo embrionario es de 9 días en promedio.

1.10 Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae, con aproximadamente 322 géneros y alrededor de 8910 especies, tiene valor económico y contribuye a la riqueza florística de las regiones tropicales y

subtropicales del mundo. Es una de las familias más grande y diversa de plantas con flores, ubicándose la mayoría en América y África tropical. Se caracterizan por contener un látex altamente irritante para la piel y los ojos (Freitas et al., 1991). Las flores de las euforbias son unisexuales y en su mayoría pequeñas e incóspicuas; los frutos son usualmente una cápsula de tres cámaras, cada una con una o dos semillas.

En Colombia, está representada por 78 géneros, 390 especies con 12 subespecies y 9 variedades, ampliamente distribuidas en todas las regiones naturales de Colombia. Entre los géneros más importantes se destacan: *Croton* (80 especies), *Euphorbia* (43 especies), *Phyllanthus* (36 especies), *Acalypha* (25 especies), *Alchornea* (19 especies), *Mabea* (18 especies), *Hevea* (7 especies), *Manihot* (4 especies), *Sapium* (6 especies), *Ricinus* (1 especie). Por la variada topografía el mayor número de especies de *Euphorbiaceae* se encuentra en la región andina (210 spp), de las cuales 83 son endémicas de esta región; le sigue la región amazónica con 129 spp., (71 exclusivas), la región Caribe con 114 spp. (36 exclusivas), la región pacífica con 110 spp. (14 exclusivas) y la Orinoquia con 88 spp. (9 exclusivas) (Murillo, 2004).

Muchos miembros de esta familia son cultivados para uso medicinal, industrial, alimenticio y ornamental; además poseen varias funciones ecológicas. Las especies más conocidas son el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), fuente principal del látex natural; la yuca (*Manihot utilissima*), una de las plantas alimenticias más importante a nivel mundial; el ricino (*Ricinus communis*) y la corona del Inca o rosa de navidad (*Euphorbia pulcherrima*), especie cultivada como ornamental.

1.11 Química y actividad biológica de la familia Euphorbiaceae

Bioquímicamente, la familia Euphorbiaceae es muy diversificada mostrando un gran potencial como fuente de moléculas bioactivas, como terpenoides, flavonoides, taninos, lignanos y otros compuestos polifenólicos, cumarinas, lectinas glicósidos cianogénicos, ácidos grasos, glucosinolatos y péptidos (Salamanca, 2000; Llanes, 2009; Villalobos-Castellanos, 1992).

La mayoría de euforbiáceas poseen látex que contiene aceites, caucho, taninos, resinas y sustancias gomosas (Bittner, 2001). Algunos géneros como *Acalypha*, *Croton*, *Euphorbia*, *Jatropha*, *Sapium*, entre otros, son responsables de producir sustancias tóxicas como ésteres de alcoholes diterpenicos, forbal, resiniferonol e ingenol como mecanismo de defensa contra herbívoros y patógenos (Salamanca, 2000; Villalobos-Castellanos, 1992). En algunos casos el látex llega a ser venenoso como en la subfamilia *Phyllantoideae*.

1.12 Terpenoides en las Euphorbiaceae.

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas son de gran interés debido a su amplia diversidad funcional. Los terpenos representan una de la mayor diversidad de clases de metabolitos secundarios (González, 2010). En las Euphorbiaceae se han identificado más de 55 triterpenoides (tetra y pentacíclicos), principalmente del látex pero también presentes en otras partes de la planta como corteza, flores, hojas, raíces, etc. Algunos de ellos se encuentran libres y otros en forma de ésteres (acetatos) o glicósidos.

Diferentes moléculas de diterpenos macrocíclicos tienen actividad anti-bacterial, anti-cancerígena, anti-parasitaria, anti-viral, anti-inflamatoria y actividad analgésica los cuales han sido aislados principalmente de diferentes especies de *Euphorbia*.

Los ésteres de forbol son diterpenoides, compuestos tetra cíclicos presentes en el látex de diferentes géneros de estas plantas, sobre todo en *Croton* y *Euphorbia*, son responsables del efecto irritante en la piel y la transformación de células malignas, por lo que son conocidos como agentes carcinogénicos (Freitas, 1991, González, 2010).

Los ésteres de forbol también exhiben un amplio rango de propiedades bioquímicas ya que inducen alteraciones en la morfología celular, mitosis en leucocitos y agregación plaquetaria (Figura 5).

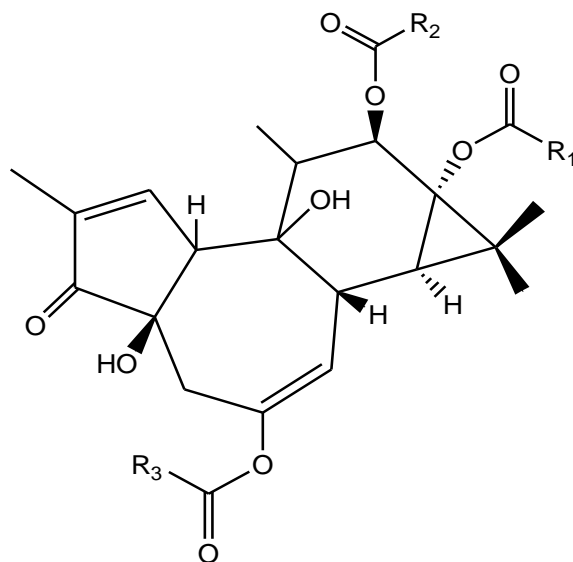


Figura 5. Estructura base de un éster de fórbol.

La mayoría de los diterpenos están presentes en resinas, látex y aceites, encargándose de hacer tóxicas como medida de defensa contra herbívoros, actúan como antibióticos para

proteger a las plantas de microorganismos patógenos. Algunas plantas sintetizan los diterpenos para la inhibición de la germinación de plantas competentes (González, 2010).

1.13 El género *Euphorbia* para el control biológico de caracoles

La actividad molusquicida está presente en un gran número de familias botánicas, las infusiones, los látex y los extractos de diferentes partes de la planta que contienen químicos, los cuales se han probado en laboratorios para evaluar su eficacia en la disminución de las poblaciones de caracoles hospedadores como parte de la estrategia para el control de esta parasitosis (Schall y Cols, 1998; Arango y Cols, 2004).

Dentro de la familia Euphorbiaceae el género más grande es *Euphorbia*, (aproximadamente 1600 especies), algunas especies tienen efectos cancerígenos y fuertes irritaciones en la piel llegando a ser tóxicas (Salamanca, 2000; Omale-James et al, 2010). Entre los principales compuestos químicos se han encontrado triterpenoides, flavonoides y alcaloides, pero también contienen cumarinas, glucósidos cianogénicos y taninos (Salamanca, 2000; Bittner y Cols, 2001).

La fracción proteica del látex de *E. mili* principalmente milin, es un monómero proteico, provoca mionecrosis con infiltración de leucositos, lo que produce una lisis celular a las 24 horas después de su exposición a la misma (Costa, 2010). Su actividad molusquicida se mantiene en aguas tranquilas y corrientes, con modificaciones en concentraciones y tiempo de exposición de los caracoles (Mendes et al. 1992; Baptista et al. 1992).

El látex de *E. mili* es considerado como medicinal, molusquicida y aunque algunas investigaciones indican que puede causar problemas cancerígenos (Soare y Dobrescu 2009), e irritación de la piel por la presencia de una fracción alcaloidea (Rojas et al. 2008); además otros estudios sobre el látex de *E. mili* demostraron ser uno de los más seguros y con un alto poder molusquicida, para el control del caracol *Lymnaea* (Vasconcellos y Amorim, 2003). La acción tóxica del látex puede ser atribuida a una clase de diterpenos (tiglianos, ingenanos y dafnanos), causantes de los efectos irritantes (Bittner y Cols, 2001).

La actividad molusquicida de *Euphorbia mili* (Figura 6), se ha evaluado en varias especies. En Sur América el país que más ha indagado al respecto es Brasil obteniendo resultados promisorios con las especies investigadas.

De algunas especies de las *Euphorbia* estudiadas se ha llegado al descubrimiento de *miliaminas*, el más potente molusquicida identificado hasta ahora (Mata et al, 2001, Bittner, 2001). También se ha reportado diferentes núcleos químicos con actividad molusquicida de tipo diterpeno, con núcleo jatropano, tigliano, forbol e ingenol principalmente (Arango, 2004).

La utilización del látex de *E. mili* como molusquicida puede ser una alternativa viable al uso de molusquicidas químicos, además de matar el caracol tiene efecto en sus embriones, provocando una tasa alta de malformaciones que causa la muerte de los mismos. Este hecho no ocurre al utilizar molusquicidas químicos (Oliveira-Filho et al. 2010). Además de acuerdo al trabajo de Oliveira- Filho y Paumgarten (1997); el látex de *E. mili* pierde su actividad molusquicida al ser expuesto a la luz, es fotodegradable, después de 96 horas (4 días) de ser expuesto. Si se mantiene a temperatura ambiente y protegido de la luz puede alcanzar su

actividad molusquicida hasta 9 días. De igual forma a temperatura de refrigeración (-4 °C) se extiende aproximadamente 1 año.



Figura 6. *Euphorbia mili* con propiedad molusquicida. (Fuente: Autor).

1.14 Familia Asparagaceae

La familia Asparagaceae se distribuye en casi todo el mundo e incluye 120 géneros y 3101 especies de hierbas, arbustos y plantas arborescentes con inflorescencias desde solitarias a espigadas (WCSP, 2017). Está conformada por siete subfamilias: Aphyllanthoideae, Asparagoideae, Brodiaeoideae, Lomandroideae, Nolinoideae, Scilloideae y Agavoideae (APG, 2009; García-Mendoza, 2013; Gordillo, 2014).

El género *Agave* es el más grande de esta familia, comprendiendo aproximadamente, doscientas setenta y cinco especies (Lawrence, 1951). Sin embargo, (Hutchinson, 1934) lo ubicó dentro del orden Agavales y específicamente en la familia Agavaceae, en donde se incluye el género *Agave*. Este género incluye, de la nomenclatura tradicional, géneros que pertenecen a la familia Liliacea y otros a la Amaryllidacea (Lawrence, 1951; Gómez, 1963). En esta nomenclatura, el subgénero *Agave* lo integran 12 secciones con 82 especies, 21 subespecies y 23 variedades. En total 197 taxas (Gentry, 1982).

Los Agaves son plantas que pueden encontrarse en gran diversidad de hábitats, desde los valles y planicies hasta cerros y laderas pedregosas, incluyendo lugares montañosos de gran altitud. Se desarrollan mejor, tanto a nivel individual como poblacional, sobre planicies extensas con suelos aluviales, de profundidad y textura medias y pH de neutro a ligeramente alcalino. Generalmente forma grupos o conglomerados dispersos dentro de la vegetación de pastizal. Puede encontrarse tanto en sitios con altitudes de 300 msnm, como en lugares situados a más de 3000 msnm (Gentry, 1982).

1.15 Química y actividad biológica de la familia Asparagaceae

Entre las familias de plantas estudiadas que presentaron actividad molusquicida se encuentra el género *Agave*, de cuyos miembros se han aislado saponinas (Figura 7) como compuestos activos (Ritchie, 1963; Otieno, 1966). La presencia de saponinas triterpénicas, sustancias que poseen propiedades farmacológicas tales como hemolíticas, antimicrobiales, insecticidas, molusquicidas y antitumorales (Chan, 2007).

La aparición de saponinas esteroides en el género *Agave* está bien documentada (Ding et al., 1993). En la naturaleza, las saponinas triterpénicas están ampliamente distribuidas, las pentacíclicas se encuentran con frecuencia en las monocotiledóneas (Abreu, 2005; Aguirre, 2012). En la actualidad se ha realizado un notable incremento en el conocimiento de este tipo de compuestos, porque aparte de que manifiestan ciertas propiedades tóxicas, también se les han reconocido otras cualidades tecnológicas y medicinales (Guerrero, 2003).

Las saponinas son glicósidos que están formadas por una aglicona de origen terpénica, esteroidal o alcaloide; Algunas saponinas tienen adicionalmente un azúcar, el cual es generalmente glucosa, unido al carbono 26 ó 28 (Guzmán et al., 2015). La gran diversidad estructural de las saponinas se refleja en sus diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas (Vincken et al., 2007). Existen dos tipos de saponinas las cuales presentan propiedades distintivas y facilitan su identificación. Poseen sabor amargo, producción de espuma al ser agitadas en soluciones acuosas, y producción de hemólisis de los glóbulos rojos. En su mayoría las saponinas son solubles en alcoholes y agua, técnicas para su extracción y purificación.

Las saponinas presentan una característica muy importante, poseen la capacidad de provocar hemólisis debido a que pueden alterar la permeabilidad de las membranas. La capacidad de las saponinas para romper la membrana de los eritrocitos está vinculada a la capacidad de las saponinas para fijar los esteroides de la membrana como resultado de ello, la membrana estalla, provocando un aumento en la permeabilidad (Hernández y Fariñas, 2005; Jaramillo, 1969).

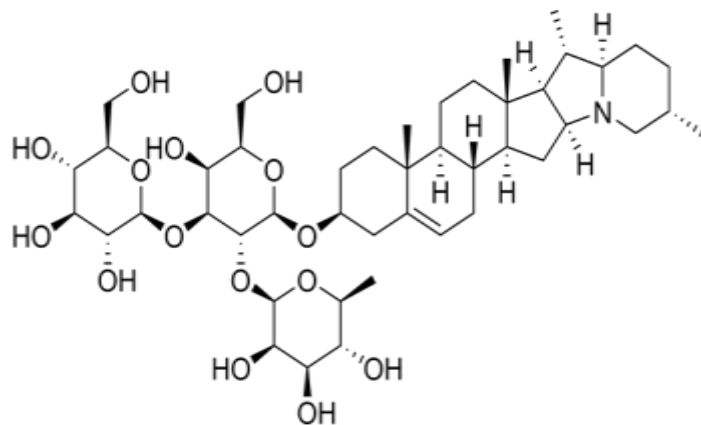


Figura 7. Estructura base de saponina.

1.16 El género *Agave* para el control biológico de caracoles

Las plantas poseen una capacidad casi ilimitada para biosintetizar fitoquímicos, que sirven como fuente de antioxidantes naturales y como mecanismos de defensa de las plantas contra la depredación por microorganismos, herbívoros e insectos (Rehna et al., 2010).

Agave attenuata (Figura 8) es una especie nativa de América tropical. En Colombia, esta planta es una planta suculenta perenne y de hoja perenne. Especies que carecen de espinas. No es invasivo, pero es una planta ornamental muy extendida que a menudo se cultiva en jardines y parques (Lorenzi y Souza, 1995). Recientemente, se evaluó la actividad del extracto acuoso de *A. attenuata* contra *Bulinus africanus*, *Daphnia pulex*, *Anopheles arabiensis* y *Oreochromis mossambicus* demostrando propiedades molusquicidas, piscicidas y larvicidas (Brackenbury y Appleton, 1997).



Figura 8. *Agave attenuata* con propiedad molusquicida. (Fuente: Autor).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar métodos alternativos mediante la utilización de extractos vegetales para el control del hospedador intermediario de *F. hepatica*, en la Granja Experimental ISER del Municipio de Pamplona, Norte de Santander, Colombia.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Clasificar taxonómicamente los moluscos presentes en la zona de estudio.
- Probar en condiciones simuladas de laboratorio dos modelos alternativos para el control del hospedador intermediario de *F. hepatica*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del sitio de recolección de los moluscos

3.1.1 Localización. El estudio se realizó en el municipio de Pamplona en el departamento de Norte de Santander, Colombia; (Figura 9), que presenta una temperatura de 14 a 18 °C y está ubicado a 75 km de Cúcuta. Su Altitud es 2.287 msnm, su extensión es 1342 km², ubicada a longitud al oeste de Greenwich 72° 39', latitud norte 7° 23', que limita con los municipios en la parte norte con Cucutilla y Pamplonita, al sur con Mutiscua, al oriente Chitagá, Labateca y al occidente con el departamento Santander. Su población según el Censo DANE 2005 es de 53.147 habitantes.



Figura 9. Mapa físico del municipio de Pamplona, Norte de Santander. (Fuente: <http://pamplona-nortedesantander.gov.co/>).

3.1.2 Zona de muestreo en la Granja Experimental ISER

La granja experimental del Instituto Superior de Educación Rural ISER de Pamplona, Norte de Santander, está ubicado en la sede central a un kilómetro vía Pamplona - Chitagá. La

granja se dedica a la producción pecuaria y agrícola. Las principales áreas de producción pecuaria son la avícola, porcina, vacuna y cunícola. (Figura 10). Esta finca cuenta con una temperatura promedio de 15 a 17 °C; sus coordenadas son N 07° 20'50.8'' W 72° 40'44.4'' a una altitud de 2199 msnm.



Figura 10. Entrada de la Granja Experimental ISER. (Fuente: Google earth).

La granja cuenta con un nacimiento de agua propio, del cual se derivan canaletas, las cuales se drenan exteriormente en las porquerizas y conejeras, de esta forma se crea un microhábitat que se asemejan a un ecosistema acuático apto para el molusco *Lymnaea* sp (Figura 10). Las canales recorren los potreros conformados por pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) que sirve de alimento para el ganado vacuno. De esta manera en los potreros se encuentran los biotopos óptimos para que se cumpla el ciclo biológico del trematodo *Fasciola hepatica* ya que se encuentran las condiciones propicias para el desarrollo del molusco.



Figura 11. Zona de muestreo. (Fuente: Autor).

3.2 Fase Campo

3.2.1 Método de recolección

La zona de recolección cumplió con las características ambientales, fisicoquímicas y biológicas propias del molusco, estas deben tener presencia de ecosistemas lóticos y lénticos (ríos, arroyos, lagunas, lagos o charcos) que son biotopos apropiados del molusco. Se identificó previamente la presencia de los moluscos dulceacuícolas del genero *Lymnaea* sp. Los moluscos se muestrearon en días soleados ya que estos aprovechan el sol, haciendo fácil su captura, utilizando redes de malla fina, en piedras, palos, vegetación riparia, hojarasca y canales de desagüe de potreros (López, 2008). En frascos plásticos se colectaron las heces de bovino, se transportaron al laboratorio de parasitología SB-210, de la sede principal de la Universidad de Pamplona.

Siguiendo las indicaciones de Malek (1984), los moluscos extraídos en cada barrida fueron depositados en viales plásticos etiquetados con las indicaciones ecológicas, acondicionados con agua fresca; luego, las muestras fueron transportadas en recipientes garantizando su supervivencia con la recolección de material propio del biotopo para garantizar su supervivencia y de alguna forma simular lo que acontece de forma natural en los potreros.

3.2.2 Obtención del material vegetal

La investigación se realizó con el látex obtenido de la especie *Euphorbia mili*, perteneciente a la familia de las Euphorbiaceas y el extracto acuoso de la especie *Agave attenuata* perteneciente a la familia Agavaceae colectada en el campus principal de la Universidad de Pamplona. Las muestras de las plantas fueron identificadas en el Herbario Catatumbo Sarare (HECASA) del Departamento de Biología de la Universidad de Pamplona.

3.3 Métodos de laboratorio

3.3.1 Técnica Dennis.

Las heces colectadas en frascos plásticos, se diluyeron en agua de grifo, se filtró con gasa doblada hasta cuatro partes, se adicionó agua en un vaso precipitado de 250 ml, y se esperaron 15 minutos, posteriormente decantó, seguidamente se agregó al precipitado agua hasta completar otra vez los 250 ml, se esperó 10 minutos, se decantó y se volvió a llenar a 250 ml con una espera de 5 minutos. Se repitió nuevamente el proceso. Por último el sedimento que quedó colocó en una caja de Petri, se agregaron 5 ml de agua destilada, se realizó la observación al estereoscopio con un aumento de 24 X.

3.3.2 Observación morfológica de los moluscos.

Los moluscos se colocaron en el estereoscopio en una caja de Petri, se observó la morfología característica de la familia Lymnaeidae que son: la abertura de la concha dextrógira, el ápice de 3 a 4 espiras, la forma del pie, los tentáculos que sirven para diferenciar de un género a otro (Tomado del manual: Vigilancia y control de moluscos de importancia epidemiológica: directrices técnicas: Programa de vigilancia y control de esquistosomiasis).

Para la búsqueda de formas larvarias del parásito se disecaron el total de moluscos colectados (144) buscando infección especialmente en el hepatopáncreas.

3.3.3 Extracción y preparación de muestras

La preparación del látex de *Euphorbia mili* se realizó mediante modificación del método descrito por Vasconcellos y Amorim (2003), La colecta de las muestras del látex (Figura 11) fue llevada a cabo el mismo día que se realizó el ensayo biológico para evitar la posible variación de la composición del látex, lo cual podría alterar la concentración de las sustancias activas.

Las concentraciones usadas en los ensayos biológicos fueron preparadas del látex crudo (látex total), en dilución con agua destilada. Se hizo la preparación en un balón volumétrico con 8 ml de agua destilada y 2 ml del látex crudo.



Figura 12. Látex de *Euphorbia mili*. (Fuente: Autor).

La preparación del extracto acuoso se realizó picando finamente una hoja de la especie *Agave attenuata*, luego se colocó en un mortero donde se maceró la muestra (Figura 12), al final se diluyó en 300 ml de agua destilada en un vaso precipitado (Figura 12).



Figura 13. A) Muestra macerada de *Agave attenuata* B) *Agave attenuata* diluida en agua.

(Fuente: Autor).

3.3.4 Ensayos de actividad química

Los bioensayos para la determinación de los modelos químicos, el control (sulfato de cobre) y el óxido de calcio se realizaron mediante seis series experimentales con seis moluscos del género *Lymnaea* sp en cada prueba; los moluscos fueron expuestos al sulfato de cobre con una concentración de 2g x 100ml de agua destilada (Figura 13), con una dosis de 1 ml en cada serie. Para el óxido de calcio los moluscos fueron expuestos a una dosis de 3 g en cada serie. Los moluscos utilizados fueron seleccionados antes del comienzo de cada prueba por tamaño.



Figura 14. Dilución 2g de sulfato de cobre x 100 ml de agua destilada. (Fuente: Autor).

3.3.5 Ensayos de actividad biológica

Los bioensayos para la determinación de los modelos alternativos, látex de *Euphorbia splendens* y el extracto acuoso de *Agave attenuata* se realizaron mediante seis series experimentales con seis moluscos del género *Lymnaea* sp en cada prueba; los moluscos fueron expuestos al látex de *Euphorbia splendens* con una concentración de 2ml de látex por 8ml de agua destilada, con una dosis de 2ml en cada serie. Para el extracto acuoso de *Agave attenuata*

los moluscos fueron expuestos a una dosis de 3 ml en cada serie. Los moluscos utilizados fueron seleccionados antes del comienzo de cada prueba por tamaño.

Caracterización de la muerte de los caracoles. La muerte de los moluscos durante las pruebas fue confirmada por la observación a las 24 y 48 horas. En cada observación la selección de moluscos vivos y muertos se tomó por el cambio en el color de la concha y la ausencia de contracciones musculares de la masa cefalopodal (Malek y Cheng, 1974).

3.3.6 Análisis de datos

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) para determinar la eficacia de los tratamientos y las repeticiones, con la prueba complementaria de significancia de Tukey. Se empleó el paquete estadístico SPSS, versión 21 compatible con Windows 7 para el cálculo de los estadísticos descriptivos e inferenciales a un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

3.3.7 Prevalencias totales de los hospedadores.

Para cada uno de los hospedadores se efectuaron las prevalencias totales, aplicando la ecuación.

$$\text{Prevalencia} = \frac{\# \text{ total de infectados}}{\# \text{ total de individuos}} \times 100\%$$

Se realizaron prevalencias totales del parásito *F. hepática* presentes en moluscos del género *Lymnaea* sp por tratamiento aplicado.

4. RESULTADOS

4.1 Colecta del material biológico

Para detectar las zonas distomatósicas es importante la localización de micro hábitats con humedad permanente, como los bordes de acequias, márgenes de riachuelos de corriente lenta, potreros inundados, entre otros; ya que los limneidos requieren de sitios bien oxigenados y sin putrefacción. Así, Las muestras de los moluscos fueron colectadas en las zonas correspondientes a:

Sitio 1: Depósitos de agua para los bebederos del ganado

Los Lymnaeidos colectados en esta zona se encontraron adheridos sobre las paredes o sobre el agua de los tanques, utilizados como depósitos para los bebederos del ganado. (Figura 14).



Figura 15. Tanques para el depósito de agua de los bebederos del ganado. (Fuente: Autor).

Sitio 2: Sobrante de agua del tanque de captación

La zona del riachuelo está formada por el agua sobrante de la naciente colectada en el tanque de captación. Los *Lymnaea* se encontraron adheridos a las piedras, en palos, en la vegetación riparia o sobre hojarasca (Figura 15).



Figura 16. Riachuelo formado por el agua sobrante de la naciente. (Fuente: Autor).

4.1.1 Caracteres diagnósticos del molusco utilizado

Los especímenes seleccionados para cada prueba pertenecieron al genero *Lymnaea*, los cuales fueron identificados en el laboratorio de parasitología SB-210, de la sede principal de la Universidad de Pamplona, basados en los caracteres macroscópicos y microscópicos de la concha y la masa visceral. Se identificaron por la abertura de la concha dextrógira, el ápice de 3 a 4 espiras, la forma del pie, los tentáculos que sirvieron para diferenciar de un género a otro (Figura 16). Esta clasificación se hizo según El Manual: de Vigilancia y Control de

Moluscos de importancia epidemiológica: directrices técnicas según el Programa de vigilancia y control de esquistosomiasis 2007.



Figura 17. *Lymnaea* utilizados en los ensayos biológicos. (Fuente: Autor).

4.2 Colecta del material vegetal

El látex del lechero (*E. milii*) y la hoja de (*A. attenuata*) fueron colectados en el campus de la Universidad de Pamplona del municipio de Pamplona (Norte de Santander), a la altura del kilómetro 1 por la vía Pamplona-Bucaramanga. El látex y la hoja fueron colectados a partir de plantas adultas, en perfecto estado de desarrollo, a simple vista fueron plantas sanas, sin exposición a plagas o insecticidas o cualquier otra sustancia química de acción biológica tóxica. La obtención del látex se hizo realizando cortes profundos a lo largo del tallo de la planta, colectando directamente en recipientes de plástico. La hoja de *A. attenuata* fue cortada en su totalidad.

Las muestras colectadas fueron procesadas en el laboratorio de parasitología SB-210, de la sede principal de la Universidad de Pamplona.

4.3 Ensayos de actividad química

La colecta de los moluscos fue llevada a cabo el mismo día que se realizaron cada uno de los ensayos químicos para evitar la posible variación en los resultados.

Para la prueba control, se diluyeron 2 gramos de sulfato de cobre en 100 ml de agua destilada. Para cada exposición se utilizaron 6 caracoles adultos *Lymnaea* por recipiente (Figura 17). La base interna del recipiente fue cubierta con el mismo material recolectado en la zona de muestreo. Se depositaron los 6 moluscos y se adiciono directamente 1 ml de la dilución con un spray, en cada una de las repeticiones realizadas (Tabla 1). La selección de moluscos vivos y muertos se tomó por el cambio en el color de la concha y la ausencia de contracciones musculares de la masa cefalopodal (Malek y Cheng, 1974).



Figura 18. Recipiente (caja de Petri) con los moluscos y la dosis aplicada. (Fuente: Autor).

Tabla 1. Valores de mortalidad de *Lymnaea* por la acción del sulfato de cobre (CuSO₄).

SERIES	TOTAL CARACOLES EXPUESTOS	MUERTOS 24h	VIVOS 24h	MUERTOS 48h	VIVOS 48h
1	6	6	0	6	0
2	6	6	0	6	0
3	6	6	0	6	0
4	6	6	0	6	0
5	6	6	0	6	0
6	6	6	0	6	0
Total	36	36	0	36	0

Para el ensayo del óxido de calcio se adicionaron 3 g directamente sobre los moluscos, en cada una de las repeticiones realizadas (Tabla2). Los moluscos utilizados fueron seleccionados antes del comienzo de cada prueba. Luego del tiempo expuesto los moluscos fueron lavados con agua destilada para retirar el químico y realizar las observaciones de los moluscos muertos por la ausencia de contracciones musculares de la masa cefalopodal y el cambio de color de la concha, donde además de presentar una pérdida del color también se notó que el molusco fue fuertemente afectado por la sustancia (Figura 18) debido a que este producto mineral ejerce un efecto de deshidratación.

El óxido de calcio fue el tratamiento con mayor efecto en la morfología externa del molusco (Figura 18), además de la pérdida de color se notó un desgaste marcado en la concha, además al igual que el sulfato de cobre presentó un porcentaje del 100% de muertes en las primeras 24 horas después de su aplicación.



Figura 19. *Lymnaea* expuestos al óxido de calcio. (Fuente: Autor).

Tabla 2. Valores de mortalidad de *Lymnaea* por la acción del óxido de calcio (CaO).

SERIES	TOTAL CARACOLES EXPUESTOS	MUERTOS 24h	VIVOS 24h	MUERTOS 48h	VIVOS 48h
1	6	6	0	6	0
2	6	6	0	6	0
3	6	6	0	6	0
4	6	6	0	6	0
5	6	6	0	6	0
6	6	6	0	6	0
Total	36	36	0	36	0

4.4 Ensayos de actividad biológica con extractos vegetales

Con el látex total de *E. milii* se preparó la dilución con agua destilada en un balón volumétrico, con 2 ml de látex puro y 8 ml de agua destilada y se obtuvo la dilución para utilizar en los bioensayos. La preparación y aplicación del látex de *E. milii* sobre *Lymnaea* sp se llevó a cabo el mismo día de la extracción del látex crudo, para evitar la pérdida de la actividad molusquicida al ser expuesto a la luz. Esta pérdida fue notoria al realizar ensayos extras, donde se realizó la aplicación días después de la extracción del látex, dando como resultado un porcentaje del 0% de mortalidad a las 24 horas.

Para cada exposición se utilizaron 6 caracoles adultos *Lymnaea* sp por recipiente (caja de Petri), de igual manera la base interna del recipiente fue cubierta con el material recolectado en la zona de muestreo. Se depositaron los 6 moluscos y se adiciono directamente 1 ml de la dilución con un spray, en cada una de las repeticiones realizadas (Tabla 3).

El tiempo de exposición total de las muestras biológicas a las diferentes concentraciones fue de 48 horas a temperatura ambiente (entre 16 y 21 °C). Las observaciones de mortalidad se llevaron a cabo a las 24 h y 48 horas según lo recomendado por Malek y Cheng, (1974).

Se obtuvo una mortalidad del 86,11% en las primeras 24 horas después de su aplicación y el 100% a las 48 horas, Por lo que se observó la eficacia del látex como molusquicida, la cual radica en la concentración aplicada como en los tiempos de exposición.

Tabla 3. Valores de mortalidad de *Lymnaea* por la acción del látex de *E. mili*.

SERIES	TOTAL CARACOLES EXPUESTOS	MUERTOS 24h	VIVOS 24h	MUERTOS 48h	VIVOS 48h
1	6	5	1	6	0
2	6	4	2	6	0
3	6	6	0	6	0
4	6	5	1	6	0
5	6	5	1	6	0
6	6	6	0	6	0
Total	36	31	5	36	0

Para el ensayo del extracto acuoso de *Agave attenuata* los moluscos fueron expuestos a una dosis de 3 ml en cada serie (Figura 4). Los moluscos utilizados fueron seleccionados antes del comienzo de cada prueba.

Los valores de mortalidad obtenidos fueron del 83,33% en las primeras 24 horas. Fue el tratamiento menos eficiente, debido a que el molusco tiene la posibilidad de evadir el efecto del extracto, por ende se necesita una mayor concentración del mismo. Los mayores efectos sobre *Lymnaea sp* se observaron a las 48 horas, con un porcentaje de mortalidad del 100%, lo que permite inferir que el compuesto activo presente en el extracto acuoso de *Agave attenuata* tiene actividad molusquicida sobre *Lymnaea sp*. Pero con mayor tiempo de exposición.

Tabla 4. Valores de mortalidad de *Lymnaea* por la acción del extracto acuoso de *A. attenuata*.

SERIES	TOTAL CARACOLES EXPUESTOS	MUERTOS 24h	VIVOS 24h	MUERTOS 48h	VIVOS 48h
1	6	4	2	6	0
2	6	5	1	6	0
3	6	5	1	6	0
4	6	6	0	6	0
5	6	5	1	6	0
6	6	5	1	6	0
Total	36	30	6	36	0

Tabla 5. ANOVA de *Lymnaea* frente a los tratamientos de actividad química y biológica en 24 horas.

ANOVA

Muertos 24h

	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5,125	3	1,708	7,069	,002
Dentro de grupos	4,833	20	,242		
Total	9,958	23			

La Tabla 5 corrobora que no existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados al cabo de las primeras 24 horas. Donde al analizar los datos obtenidos anteriormente confirman que los tratamientos biológicos fueron significativamente similares que los tratamientos químicos, en el control del hospedador intermediario de *F. hepatica*.

Tabla 6. TUKEY de *Lymnaea* frente a los tratamientos de actividad química y biológica en 24 horas.

Muertos 24h

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
4	6	5,00	
3	6	5,17	
1	6		6,00
2	6		6,00
Sig.		,935	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Para cada uno de los hospedadores se efectuaron las prevalencias totales, aplicando la ecuación

$$\text{Prevalencia} = \frac{\# \text{ total de infectados}}{\# \text{ total de individuos}} \times 100\%$$

Prevalencia total de los hospedadores intermediarios

La prevalencia total de los hospedadores intermediarios fue del 24,31 %

$$\text{Prevalencia} = \frac{35}{144} \times 100\% = 24,31\%$$

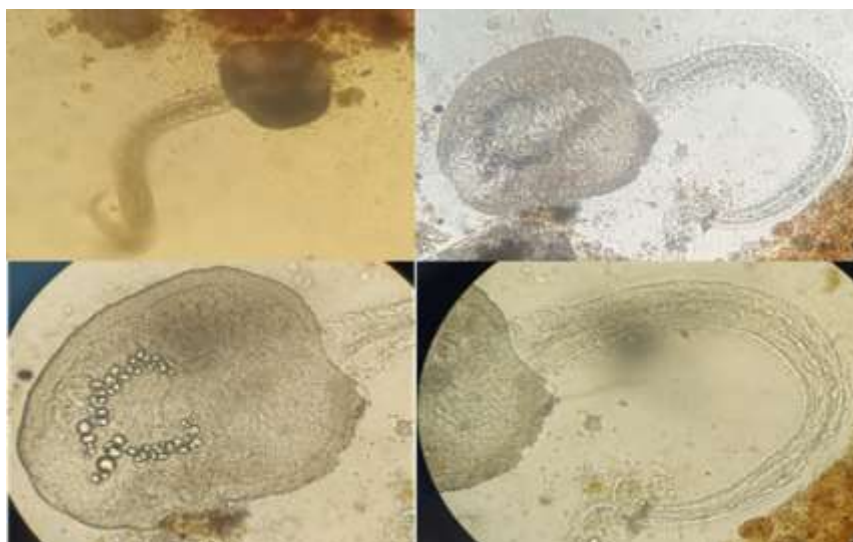


Figura 20. Infección natural de *Fasciola hepatica* en *Lymnaea*. (Fuente: Autor).

Tabla 7. Prevalencia de *F. hepatica* por tratamiento.

Prevalencia por tratamientos							
Sulfato de cobre	T 1	T2	T3	T4	T5	T6	TOTAL (%)
Infectados	1	3	2	1	2	1	10
Sanos	5	3	4	5	4	5	26
Prevalencia Total (%)	16,66	50	33,33	16,66	33,33	16,66	27,77
Óxido de calcio							
Infectados	1	1	2	1	1	1	7
Sanos	5	5	4	5	5	5	29
Prevalencia Total (%)	16,66	16,66	33,33	16,66	16,66	16,66	19,44
Látex de <i>E. mili</i>							
Infectados	1	1	2	2	1	1	8
Sanos	5	5	4	4	5	5	28
Prevalencia Total (%)	16,66	16,66	33,33	33,33	16,66	16,66	22,22
Extracto acuoso de <i>A. attenuata</i>							
Infectados	2	1	1	1	2	3	10
Sanos	4	5	5	5	4	3	26
Prevalencia Total (%)	33,33	16,66	16,66	16,66	33,33	50	27,77

La Tabla 7 demuestra la prevalencia de *F. hepatica* por tratamiento aplicado. Indicando que los moluscos con sulfato de cobre y el extracto acuoso de *A. attenuata* presentan el mayor porcentaje de infección 27,77% y el óxido de calcio presenta el menor porcentaje 19,44%. Presentando un porcentaje general del 24,31% de infectados (35n), la cantidad total de los muestreos fue 144 moluscos.

5. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Ensayos con productos molusquicidas químicos tradicionales

Los moluscos en medio natural pueden acumular metales pesados como Cu, Cr, Cd, Pb entre otros, sin embargo, cuando las concentraciones son elevadas de estos elementos en el medio pueden producir mortalidad. Los moluscos presentan la capacidad para eliminar elementos, llamado depuración. Sin embargo, cuando la tasa de depuración es mayor a la tasa de incorporación genera problemas en los tejidos y ciertos órganos, lo que conlleva incluso a su muerte (Rodríguez-de la Rúa et al., 2005). Las variaciones en los tiempos de acumulación y depuración varían según la especie y tamaño de los organismos (Rojas et al., 2015). Así, los Limneidos son muy susceptibles a estos cambios, no pueden soportar concentraciones mayores como la aplicada en este estudio, provocando la muerte de los mismos, con un porcentaje del 100% en las primeras 24 horas después de su aplicación.

Existe una relación directa entre la mortalidad, la concentración y tiempo de exposición a metales pesados, aumentando la mortalidad mientras mayor es la concentración y el tiempo de exposición (Sobrino, 2001). Esta relación se observa con certeza en este trabajo, debido a que la concentración de 1ml de sulfato de cobre mostró mortalidades similares tanto a las 24 horas como a las 48 horas, generando un potente efecto tóxico en los caracoles acuáticos.

Los ensayos de 24, 48 y 72 horas realizados por Cardenas (2019), con una concentración del 0, 0,5 0,8 y 1,0 mg/l de SO₄Cu sobre moluscos *Mulinia* sp, observaron valores de mortalidad del 0%, 60%, 87% y 87% en las primeras 24 horas. Mientras que a las 48 horas la mortalidad aumentó al 0%, 67%, 93% y 93% respectivamente. Además no fue sino hasta las 72 horas donde se presentó el 100% de mortalidad con una dosis de 1,0 mg/l. En comparación con el porcentaje del presente estudio, donde se muestran que los moluscos del género *Lymnaea* sp presentan mayor sensibilidad al SO₄Cu que *Mulinia* sp, con valores de mortalidad del 100% en las primeras 24 horas.

La efectividad de los diferentes productos químicos depende, principalmente de la especie trabajada; así se tiene, que Wright, Dobrovly y Berry (1958) trabajaron con hospedadores de *Schistosoma mansoni*, Bruaux y Gillet (1961) con caracoles del genero *Biomphalaria*, y Harada (1974) con *Lymnaea ollula* encontraron mayor efectividad con pentaclorofenato de sodio que con sulfato de cobre, mientras que los mismos Bruaux y Gillet encontraron que *Lymnaea natalensis* es más susceptible al sulfato de cobre que al pentaclorofenato de sodio; en este trabajo se encontró gran susceptibilidad de *Lymnaea* sp al sulfato de cobre.

Los moluscos son sensibles a los elementos químicos encontrados en el óxido de calcio, conocida comercialmente como cal viva reacciona con el agua formando hidróxido de calcio o cal apagada, ya que incrementa el pH (Boyd, 1995) y produce un efecto osmótico adverso.

La aspersion de óxido de calcio o cal se ha establecido dentro del protocolo de erradicación en muchas entidades gubernamentales de Colombia (MAVDT, 2008). Sin embargo, el uso de esta sustancia no genera un incremento de la efectividad en el control del molusco. Por el contrario, su uso puede generar efectos negativos tanto en la dinámica del

suelo como en el agua, afectando a plantas y microorganismos asociados (Haynes, 1982; Zhang et al., 2015). Además la artropofauna también puede verse afectada debido al efecto causado de esta sustancia, generando la pérdida de agua y la muerte por deshidratación (Subramanyam y Roesli 2000; Ritter et al., 2014).

5.2 Ensayos de actividad biológica con extractos vegetales

Cuando se evalúa la actividad que presenta un producto natural frente al control de caracoles, no sólo es importante analizar el efecto letal que estos causen, también se debe evaluar el posible efecto fisiológico ejercido por su acción biocida. Un estado alterado del caracol podría evidenciarse por un cambio en su motricidad o en la coloración de la concha, cambios en su frecuencia cardíaca o en la actividad reproductiva del caracol, variaciones de los fluidos de la hemolinfa como los niveles de glucosa, ácido úrico, proteínas totales y calcio, entre otros (Mello-Silva et al., 2006; Mello-Silva et al., 2007).

En el presente estudio los resultados obtenidos en relación a la evaluación de los parámetros fisiológicos registrados, como la respuesta de irritación de los caracoles, el color de la concha y su motricidad, no permitieron evidenciar ningún posible efecto tóxico, sino un efecto letal de los extractos en las primeras 24 horas de exposición.

Algunos autores señalan que el efecto molusquicida de los compuestos naturales pudiera provocar inestabilidad osmótica y vesiculación superficial causando la muerte de los caracoles (Vasas et al., 2014; Baloch et al., 2010). Por otro lado, los terpenos, saponinas y los flavonoides presentes en el látex son los principales compuestos aislados del género *Euphorbia*. Especialmente importante ha sido la actividad molusquicida reportada para los compuestos triterpénicos aislados, los cuales, en algunos casos, han sido tan potentes como el

producto molusquicida comercialmente disponible conocido como Bayluscide[®] (Baloch et al., 2009; Baibado y Cheung, 2015).

Neto, Bessa y Soares (2010), observaron que *E. milii* fue letal para *L. unilamellata*. En las diluciones de 1:10 y 1: 100, el látex causo el 100% de mortalidad de los moluscos en 24 horas. Cuando se diluyó a 1: 1,1000 el látex pierde efecto dado una tasa de mortalidad del 25%. Los moluscos presentaron contracciones y secreción intensa de moco después de la aplicación del látex. La muerte de la mayoría de moluscos se observó en los primeros 3 minutos y los porcentajes máximos de mortalidad a las 24 horas. *E. mili* mostró una acción eficaz sobre este molusco

Respecto a la utilización de otros extractos vegetales como molusquicidas Bortolucci et al., (2011), al evaluar la actividad de varios extractos, encontraron que solo la especie *S. grantii* (Euphorbiaceae) mostró actividad en la concentración más alta probada (200 tg mL⁻¹). Esta especie exótica, de origen africano, es altamente tóxica. El extracto de la especie *S. grantii* ha presentado alta actividad, podría considerarse un agente molusquicida alternativo. Otra especie de (Euphorbiaceae) evaluada fue *Jatropha curcas* que ya había sido previamente reportado como molusquicida contra diferentes huéspedes acuáticos intermedios.

Entre todos los extractos evaluados inicialmente, solo la especie *S. grantii* (Euphorbiaceae) mostró actividad en la concentración más alta probada (200 tg mL⁻¹). Esta especie exótico, de origen africano, es altamente tóxico.

Rug y Rupel (2000) probaron extractos acuosos y metanólicos de las semillas de *J curcas* contra *Biomphalaria glabrata* (huésped intermedio de origen *Schistosoma mansoni* americano, que causa esquistosomiasis intestinal), *Bulinus truncatus* (inter- medio de origen africano de *S.*

haematobium, agente de esquistosomiasis urinaria) y *Bulinus natalensis* (huésped intermedio de origen africano de *S. haematobium*). Según el estudio, el extracto metanólico fue el más activo (CL50 = 25 tg mL⁻¹ contra *B. glabrata*; LC50 = 1 tg mL⁻¹ contra *B. truncatus* y *B. natalensis*). Liu y col. (1997) postuló que la actividad de las semillas de *J. curcas* podría estar relacionada con la presencia de ésteres de forbol.

Bortolucci et al., (2011), realizaron bioensayos de laboratorio y de campo con el látex de la especie *E. mili*, mostrando excelente actividad molusquicida contra estas especies de huéspedes intermediarios (*Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* y *B. straminea*) en Brasil y contra *B. pfeifferi* y *Bulinus sp*, caracoles que actúan como huéspedes de *S. haematobium* en África (Schall et al., 1998). *E. mili* también ha mostrado una importante actividad contra el caracol *Lymnaea columella*, el más importante huésped intermedio del trematodo *Fasciola hepatica*.

Se aprecia claramente la relación que se da, entre la exposición de los caracoles al látex de la *Euphorbia milli* y la mortalidad de *Lymnaea sp*. A mayor tiempo de exposición mayor número de individuos muertos, esto posiblemente debido a que uno de los mecanismos del látex es producir necrosis a nivel de la glándula digestiva y otros órganos del caracol (Pile et al. 1998; Araújo et al. 2002), esto indica que se genera un daño celular y por ende lisis de las mismas (Mello-silva et al. 2006), ocasionando que los tejidos reciban menos oxígeno, lo que conlleva a cuadros de hipoxia que generan posteriormente la necrosis (Tiwari & Singh 2005; Patel et al. 2011; Araújo et al. 2002), alterando de esta manera sus funciones fisiológicas, lo que deviene en la muerte de los caracoles (Yadav & Jagannadham 2008); además, se ha demostrado en los trabajos de Mello-silva et al. (2007) y Chauhan & Singh (2011) que el látex

de las Euphorbias, en dosis sub letales, afectan la actividad reproductiva de los caracoles, lo cual no evaluó en este trabajo y hace parte de futuras investigaciones.

Las característica del látex de la *Euphorbia milli* permite que los daños al medio ambiente sean menores (Mello- Silva et al. 2006); Es importante recalcar que la manipulación y preparación de la dosis letal es sencilla y se pueden replicar con facilidad en el campo (Schall et al. 1992), razón por la cual se puede considerar una alternativa viable en el control de la Fasciolosis en la región; solo hay que tener en cuenta al momento de utilizarlo su sensibilidad a la fotodegradación (Oliveira-Filho & Paumgarten 1997).

Las saponinas presentes en el extracto acuoso de *Agave attenuata*, principalmente pertenecen al grupo de las hecogeninas. Las hecogeninas muestran concentraciones bastante altas y son las más estudiadas, presentando actividad molusquicida bien documentada (Debnath et al., 2010; Hammuel et al., 2011; Osman et al., 2011; Almaraz-Abarca et al., 2013). Las hecogeninas son consideradas en la biogénesis de las sapogeninas como de tercera generación, obtenidas a partir de las gitogeninas y tigogeninas, de primera y segunda generación, respectivamente. Se ha demostrado que las hecogeninas son más abundantes en las hojas maduras de Agave (Debnath et al., 2010) las cuales fueron utilizadas en la presente investigación

Amambal y Vega (2017), al evaluar la actividad molusquicida del liofilizado de saponinas de los frutos de *Sapindus saponaria L* frente a caracoles del género *Lymnaea* después de 24 horas de post-exposición, y observó que presentaba actividad molusquicida, siendo los porcentajes más altos de efectividad del 100% a la concentración de 320 ppm. Mientras que este mismo porcentaje fue alcanzado en 48 horas a una concentración de 220 ppm.

Los ensayos in vitro realizados por Amambal y Vega (2017), comprueban la efectividad de las saponinas obtenidas de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*, teniendo la probabilidad de utilizarse como un biomolusquicida, frente a caracoles *Lymnaea*.

Iannacone et al (2013): estudiaron la toxicidad de los bioplaguicidas *Agave americana*, *Furcraea andina* (Asparagaceae) y *Sapindus saponaria* (sapindaceae) sobre el caracol invasor *Melanooides tuberculata* (Thiaridae) y evaluaron la toxicidad de extractos de las hojas de *A. americana*, *F. andina* y de los frutos de *S. saponaria* sobre *M. tuberculata*, después de 24 horas de exposición y 24 horas de recuperación en agua destilada para evaluar la mortalidad. Los resultados mostraron que existieron diferencia significativa con relación a los grupos controles a partir de concentraciones de 0,5 mL/L. Además este estudio concluyó que los extractos estudiados pueden sustituir al molusquicida niclosamina, en forma segura para el control de caracoles.

La actividad molusquicida de *Agave attenuata* se debe principalmente a las saponinas, que forman complejos con los esteroides de las membranas celulares produciendo grandes poros alterando su permeabilidad, esta interacción cambia dependiendo de la estructura del esteroide, es así que no solo puede causar la lisis de la célula sino también cambios en la morfología haciendo que la membrana se separe y desintegre para una posterior degradación total de los componentes celulares.

En conclusión la utilización de extractos vegetales se puede presentar como una buena alternativa para el control de los moluscos hospedadores intermediarios de *Fasciola hepatica*, sin embargo se deben hacer investigaciones más extensas sobre los compuestos bioactivos de

estas plantas y su acción patógena sobre diferentes órganos del molusco. Adicionalmente se debe hacer estudios sobre los posibles efectos tóxicos de estas sustancias presentes en los vegetales sobre otros organismos acuáticos presentes en los biotopos característicos para el molusco.

6. CONCLUSIONES

- Se confirma mediante taxonomía clásica que los moluscos presentes en la granja experimental ISER Pamplona, pertenecen al género *Lymnaea* sp.
- La exposición al látex de *Euphorbia milli* y el extracto acuoso de *Agave attenuata* afectan de manera similar al caracol *Lymnaea* sp expuestos al sulfato de cobre y óxido de cobre.
- El látex de *Euphorbia milli* y el extracto acuoso de *Agave attenuata* tienen efecto molusquicida sobre el caracol *Lymnaea* sp.
- Se determinó que la prevalencia de *F. hepatica* en los moluscos del género *Lymnaea* sp analizados fue del 24,31% (n=35).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, J., y Peixoto, M. (2015). Biomass reduction of *Salvinia molesta* exposed to copper sulfate pentahydrate (CuSO₄.5H₂O). *Ambiente Y Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 10(3), 520-529. DOI: 10.4136/ambi-agua.1633

Almaraz-Abarca, N, Delgado-Alvarado, EA, Ávila-Reyes, JA, Uribe-Soto, JN Y González-Valdez, LS. (2013). The phenols of the genus *Agave* (Agavaceae). *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, vol. 4, pp. 9-16.

Amambal, E Y Vega, E. (2017). Efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria L.* “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* (trabajo de titulación). Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, Carrera Profesional De Farmacia y Bioquímica.

Angiosperm Phylogeny Group. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical journal of the Linnean Society, 161(2), 105-121.

Abreu O. Potencial medicinal del género *Sapindus L.* (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria L.* Rev Cuba Plant Med. 2005; 10: 3 - 4.

Aguirre Z. Especies forestales de los bosques secos del Ecuador. Guía dendrológica para su identificación y caracterización. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático. MAE/ FAO - Finlandia, Quito, Ecuador. 2012; p. 140.

Alfonso-Hernández, Margarita y cols. (2008). Molusquicidas naturales de origen botánico. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT). Revista Agrotecnia de Cuba. La Habana Cuba. 15 p.

Avila L. et al. (2010). Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on Human Immunodeficiency Virus type 1 reactivation. Phytochemistry 71. 243–248.

ALCALDÍA MUNICIPAL DE SILVIA, CAUCA. (2009). Informe técnico de inspección antemorten y postmorten 2008 de la planta de sacrificio Silvia – Cauca. Secretaría de Desarrollo-Alcaldía Municipal.

Arango-Acosta, Gabriel Jaime. (2004). Actividad molusquicida sobre *Lymnaea columella* y toxicidad de plantas de diferentes géneros de la familia *Euphorbiaceae*. Corporación Académica para el Estudio en Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia.

Arboleda, Daniel; López, Carlos; Vasquez, Luis Reinel; Salazar, Harold. (2006). Prevalencia de *Fasciola hepatica* e identificación de hospederos en cuatro fincas ganaderas de la vereda Malvazá, municipio de Totoró, departamento del Cauca de Enero a Mayo de 2006. Trabajo de Grado de Medicina Veterinaria. Universidad Antonio Nariño - UAN. Popayán. 79 p.

Amato S.B, DeRezende H.E.B, Gomes D.C y Freire N.M DaSerra. (1986). Epidemiology of *Fasciola hepatica* infection in the Paraíba River Valley, Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 22 (3-4):275-284.

Baqueiro-Cárdenas, Erick Raúl; BORABE, Luz; Goldaracena-Islas, Carolina y Rodríguez-Navarro; Josefina. (2007). Los moluscos y la contaminación. Una revisión. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Altamira, Tamaulipas, México. 7p.

Benavides, E.; Romero, A. (2001). Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Explotaciones Ganaderas. El control de los parásitos internos del ganado en sistemas de pastoreo en el trópico colombino. Carta Fedegan. Federación Colombiana De Ganaderos. Pp. 88-111.

Becerra-Rozo, Wilda Margarita. (2001). Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepática* en Latinoamérica. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 14: 28-35.

Betancur-Galvis LA, Morales GE, Forero JE, Roldan J. (2002). Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Jun;97(4):541-6.

Botero, D.; Restrepo, M. (2003). Parasitosis humana. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín – Colombia. 4 ed. Pp. 340 – 343.

Boray, JC. (1985). Flukes of domestic animals. In: Gaafar S.M, Howard W.E and Marsh R.E. (Eds) *Parasites, pest and predators*. Elsevier. New York. 179 - 218.

Boray, JC. 2007. Liver fluke disease in sheep and cattle. *Primefact* 446. 10 p.

Carrada-Bravo, T. (2003). Fascioliasis. Diagnóstico, epidemiología y tratamientos. *Rev. Gastroenterol Mex*. 8: 135–142.

Bittner, M. et al. (2001). Estudio químico de especies de la familia *Euphorbiaceae* en Chile. *Bol. Soc. Chil. Quím.* [online]. vol.46, n.4 [cited 2012-02-17], pp. 419-431 . Available from: <<http://www.scielo.cl>

Bilbao, M.R. (2000). Análisis fitoquímico preliminar. Universidad de Quindío, Armenia. Pp 181.

Brackenbury T. D. and Appleton C. C. (1997), A com- methylation of glycoprotein glycans in small amounts prehensive evaluation of *Agave attenuata*, a candidate by using lithiummethylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. plant molluscicide in South Africa. Acta Trop.* 68, Res. 141, 41D47. 201D213.

Bortolucci, H, Marim, R, Silva, Y, Zardeto, G, Silva, I, Mattos, D, Laverde Jr, A. (2011). Letalidade do extrato de *Synadenium grantii* Hook. F. (Euphorbiaceae) frente a caramujos

Biomphalaria glabrata Say. (1818) (Gastropoda, Planorbidae). Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.1, p.90-95, 2010.

Bruaux, P. and J. Gillet. (1961), Comparison of the activity of various molluscicides in the laboratory', Bull. Wld. Hlth. Org., 25(4) :519-523.

Baibado JT, Cheung HY. Biological functions of the metabolites from *Euphorbia hirta* L. Int J Pharm Biol Arch. 2015; 3: 27-9

Baloch IB, Baloch MK, Baloch AK. Schistosomiasis suppressing deoxyphorbol esters from *Euphorbia cauducifolia* L. Latex. Planta Med. 2010; 76: 809–14

Baloch IB, Baloch MK, Baloch AK. Bioactive compounds from *Euphorbia cornigera* Boiss. Eur J Med Chem. 2009; 44: 3188–94

Baptista, D. Vasconcellos, M. Lopes, F. Silva, I. & Schall, V. (1992). Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* 2 lotic habitat. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, 87(4), pp.549–553.

Boyd, C.E. (1995). Bottom Soils, Sediment, and Pond Aquaculture. Chapman & Hall, New Yo Boyd, C., y Tucker, C. (1998). Pond aquaculture water quality management. Estados Unidos de América: Kluwer Academic Publishers.

Boyd, C., y Massaut, L. (1999). Risk associated with use of chemicals in pond aquaculture. Aquacultural Engineering, 20, 113- 132. DOI: 10.1016 / S0144-8609 (99) 00010-2.

Bautista, J., Frías, M., Velarde, G., Voltolina, D., García-de la Parra, L., y Soto, M. (2015). Relationships between copper and stress indicators in the Pacific White Shrimp,

Litopenaeus vannamei. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, 48(3), 193-203.

DOI: 10.1080/10236244.2015.1024079.rk, 348 pp.

Costa, J. (2010). ‘Caracterização funcional e estrutural de novas proteases isoladas da peçonha de *Bothrops alternatus* e do látex de *Euphorbia milii* var. *Hislopii*. Tese Doutorado, Universidad Federal de Uberlandia, Uberlandia – Brazil.

Chan P. Acylation with diangeloyl groups at C21–22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. Biochemical Pharmacology. 2007; 73 (3): 341 - 50.

Cardenas, J. (2019). CL50 de sulfato de cobre pentahidratado *en mulinia sp.* y su efecto en la supervivencia de postlarvas de *litopenaeus vannamei* (trabajo de titulación). Universidad Técnica De Machala, Facultad De Ciencias Agropecuarias, Carrera De Ingeniería Acuícola.

Carrada–Bravo, T. (2007). *Fasciola hepatica*: Ciclo biológico y potencial biótico. Rev. Méx. Patol Clin, Vol. 54, Núm. 21-Enero – Marzo. Pp 21 -27

Cruz-Reyes, A.; Chavaririn, C.; Campos, M.P. & Taboada, J. (1989). Actividad molusquicida del piquerol A aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae), sobre 8 especies de caracoles pulmonados. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 84:35-40.

Dominuez, X. Métodos de investigación Fitoquímica. Editorial Limusa (1973). México. Pp. 217-219.

Debnath, M, Pandey, M, Sharma, R, Thakur, GS & Lal, P. (2010). Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. Journal of Medicinal Plants Research, vol. 4, pp. 177-187

Delgado, I. & Paumgarten, F. (2014). Effects of *Euphorbia milii* latex on mitogeninduced lymphocyte proliferation. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 16(1), pp.107–111.

Ding Y., Tian R.-H., Yang C.-R., Chen Y.-Y. and Nohara moral response to the FML antigen of *Leishmania T.* (1993), Two new steroidal saponins from dried fer- donovani. *Vaccine* 15, 1024–1029. mented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Sawardeker J. S., Sloneker J. H. and Jeanes, A. (1965), Dong No. 1. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 557–560.

Eddi y cols. (1998). Epidemiología y control de la fascioliasis bovina. *Vet. Arg.*, 15(141): 38-43.

Ferreira, G. de la Cuesta. (2003). *Patología Veterinaria. Ciencia y tecnología.* Ed. Universidad de Antioquia.

Freitas, J., Presgrave, O., Fingiola, F. (1991). Toxicological study of the Molluscicidal latex of *Euphorbia splendens*: irritant action on skin and eye. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 86: 87-88.

Fuentes, Lilian. (2006). Moluscos de importancia agrícola. Dpto. Ciencias Biológicas. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado-Venezuela. *Revista Digital CENIAP HOY* N° 11 mayo-agosto (2006).

Fasciola hepatica Linnaeus, (1758). *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), pp.557–563.

García-Mendoza, A. J. y Chávez-Rendón, C. (2013). *Agave kavandivi* (Agavaceae: grupo *Striatae*), una especie nueva de Oaxaca, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(4): 1070–1076.

Gordillo, M. (2014). Atlas de familias de angiospermas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

Gómez-Pompa, M. (1963). El género Agave: Cactaceas y suculentas Mexicanas, 8(1):3-28, México.

Gentry, Howard Scott. (1982). Agaves of continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, Az. U.S.A. 670 p.

Gentry, Howard Scott. (1982). Agaves of continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, Az. U.S.A. 670 p.

González y cols. (2007). Fasciolosis bovina. Evaluación de las principales pérdidas provocadas en una empresa ganadera. Rev. Salud Anim. Vol. 29 No. 3: 167-175.

González, Luis Alberto. (2010). Determinación de las señales características del núcleo estructural diterpénicos por espectroscopia de RMN, en fracciones con actividad antiviral del latex de *Euphorbia laurifolia* (Euphorbiaceae).

Guzmán B, Tenorio R, Cruz D, Espinal C, Alvarado J, Mollinedo P. Saponins from *Chenopodium Quinoa* Willd and *Chenopodium Pallidicaule* Aellen as biocontrollers of phytopathogen fungi and hemolysis agents. Revista Boliviana de Química. 2015; 32 (1): 8 - 14.

Hutchinson, J. (1979). The families of flowering plants. Third ed. Oxford University Press, West Germany. 968 p.

Harada, Y. (1974). Effect of various molluscicides against *L. ollula*, intermediate host of Fasciola species in Japan. I. Molluscicide efficiency of sodium pentachlorophenate, Yurimin. p-99 and 23(5) :285-292 (citado en el Chemical Abstracts 83-38741-u).

Hammuel, C, Yebpella, GG, Shallangwa, GA, Asabe, M, Magomya, AM & Agbaji, AS. (2011). Phytochemical and antimicrobial screening of methanol and aqueous extracts of *Agave sisilana*. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, vol. 68, pp. 535-539.

Haynes, R. (1982). Effects of liming on phosphate availability in acid soils. Plant and soil 69 (3): 289-308.

Hernández G, Fariñas M. Propiedades biológicas de extractos acuosos de órganos de cavier, piel y músculo de *Brandothuria impatiens* (forskal, 1776) (echinodermata: holothuroidea). Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad del Oriente. 2005; 17 (2): 118 - 124.

Jurberg, P; Sarquis, O; A Dos Santos, J.A & Reis, R.C. (1995). Effect of Niclosamide (Bayluscide WP 70®), *Anacardium occidentale* Hexane Extract and *Euphorbia splendens* latex on Behavior of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), under laboratory Conditions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol. 90(2): 191-194, mar.

Jaramillo M. Introducción al Estudio Fitoquímico de *Chloroleucon Mangense*. [Resumen de Tesis para optar el Grado de Doctor en Farmacia]. Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas. 1969; 1 (2): 111- 135.

Kleiman F, Pietrokovsky S, Prepelitchi L, Carbajo A y Wisnivesky-Colli C. (2007). Dynamics of *Fasciola hepatica* transmission in the Andean Patagonian valleys, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 145:274-286.

Longo, Magnolia. (2004). Estudio Taxonómico y Ecológico de *Lymnaea* (Mollusca: Lymnaeidae) hospedero intermediario de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae). Trabajo de Grado de Bióloga. Universidad del Cauca. Popayán. 67 p.

Lorente Lamarca. (2003). Estudio farmacognóstico de *Euphorbia hirta* L. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Llanes, Doris Susana. (2009). Actividad inmunomoduladora de extractos de 10 plantas de la familia *Euphorbiaceae*. Trabajo de grado presentado para optar por el título de Magíster en Ciencias – Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia Facultad de ciencias. Maestría en ciencias – biotecnología. Medellín. 93 p.

Lorenzi H. and Souza H. M. (1995), Plantas ornamentais meability in mice to distinguish between narcotic and no Brasil: arbustivas, herbaceas e trepadeiras. Editora nonnarcotic analgesics. Br. J. Pharmacol. Chemother. Plantarum, Sao Paulo.

Lawrence, H.M.G. (1951). Taxonomy of vascular plants. McMillan Publishing., Co; Inc. New York.

Londoño, L., Londoño, P., y Muñoz, F. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153. DOI: 10.18684/BSAA(14)145-153.

López LP, Romero J, Velásquez LE. (2008). Aislamiento de Paramphistomidae en vacas de leche y en el hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula* y *Lymnaea columella*) en una granja del trópico alto en el occidente de Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu, 21: 9 – 18.

Malek, E. Y Cheng, T. Medical and economic malacology. New York, Academic Press, 1974.

Marengoni, N., Klosowski, E., Oliveira, K., Chambo, S., y Junior, A. C. (2013). Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu binacional. Quim. Nova. 36(3), 359- 363. DOI: 10.1590/S0100-40422013000300002

Mendes, N., Baptista, D., Vasconcellos, M. & Schall, V. (1992). Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* 1 experimental test in a lentic habitac. Memorias Instituto Oswaldo Cruz, 87(1), pp.21–23.

Mezghani R, Hammami H, Ayadi A, Damak M. Molluscicidal activity of Hammada scoparia (Pomel) Iljin leaf extracts and the principal alkaloids isolated from them against *Galba truncatula*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (7): 1035 - 1038.

Morales G.; Pino A. (1983). Infection de *Lymnaea cu-bensis* par *Fasciola hepatica* dans une région d`altitude, au Venezuela. Ann Parasitol Hum Comp 58: 27-30.

Müller G.; Ueno H. (1984). *Lymnaea viatrix* como hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* em Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul. Arq Bras Med Vet Zoot 36: 183-190.

Malone J.B. (1994). The landscape epidemiology of Fasciolosis: Geographic determinants of disease risk. En: Immunology, Pathobiology and Control of Fasciolosis - ICOPA VIII, J. C. Boray (Ed). Izmir, 65-81.

Makkar H, Francis G, Becker K. Bioactivity of phytochemicals in some lesserknown plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. The Animal Consortium [Revista en Internet] 2007; 1 (9): 1371 - 1391 [citado el 4 de Agosto del 2016]. Disponible en: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1751731107000298.

Malek, E.A. Y Cheng, T.C. (1974). Medical and economic malacology. Academic Press, INC. New York and London (1974); 382 p. ISBN 0-12-466150-5.

Malek, E., Congswell, F.B. (1980). *Lymnaea* (Pseudosuccinea) *columella* in Colombia. Nautilus. 94, 112–114.

MAVDT 2008. Resolución Número 0848 del 23 de mayo de (2008). Por el cual se declaran unas especies exóticas como invasoras y se señalan las especies introducidas irregularmente al país que pueden ser objeto de cría en ciclo cerrado y se adaptan otras determinaciones. Ministerio de Ambiente. Vivienda y Desarrollo Territorial. MAVDT. Colombia.

Malek E. (1985). Snail host of Schistosomiasis and other snail transmitted diseases in Tropical America: A Manual, Pan American health Org Scientific Publication. 478.

Mata et al. (2011). Molluscicidal Activity of Compounds Isolated from *Euphorbia conspicua* N. E. Br. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 22, No. 10, 1880-1887, 2011. Sociedade Brasileira de Química.

Mas-Coma, S., Esteban, J.G., Bargues, M.D. (1999). Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. Bull. Wld. Hlth. Org. 77, 340-346.

Mas-Coma, S. (2004). Human Fascioliasis En: World Health Organization (WHO). Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control. Edited by J.A. Cotruvo, A. Dufour, G. Rees, J. Bartram, R. Carr, D.O. Cliver, G.F. Craun, R. Fayer. Published by IWA Publishing, London, UK. ISBN: 1 84339 058 2. Pp. 305-322

Mas-Coma S. (2005). Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. J. Helminthol. (2005), 79(3):207-16.

Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A. (2005). Fascioliasis and other plant-borne Trematode Zoonoses. Int. J. Parasitol., 35, 1255–1278.

Mendes, N.M; Vasconcellos, MC; Baptista, DF; Rocha, RS; Schall VT. Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (N.E.B.) latex: experimental test in an endemic area of Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz (1997); 92:719-24.

Mello-Silva, C.C; Magno Vilar, M; Barreto Bezerra, C; Vasconcellos, M.C; Pinheiro, J & Rodrigues, M.L. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex. February (2006), Vol. 101(1): 3-8.

MINISTERIO DE SALUD COLOMBIA. (1999). Dirección General de Promoción y Prevención. Sub-dirección Ambiente y Salud. Manual de enfermedades zoonóticas. Ministerio

de Salud. Dirección General de Promoción y Prevención. Ed: Santa Fe de Bogotá: El Ministerio. Pp 89-92.

Morales, G.A.; Pino De Morales, L. (2004). *Fasciola hepatica* y Distomatosis hepática bovina en Venezuela. Instituto de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Laboratorio de Parasitología Las Delicias, Maracay. Red de Helminología para América Latina y El Caribe.

Murillo- A. José. (2004). Las Euphorbiaceae de Colombia. Biota Colombiana 5 (2): 183-200.

Manual: Vigilancia y control de Moluscos de importancia Epidemiológica: directrices técnicas: Programa de Vigilancia y control de esquistosomiasis, (2007). 2 ed – Brasília: Editora do Ministério da Saúde. Pp 21.

Morales G.; Pino A. (1983). Infection de *Lymnaea cu-bensis* par *Fasciola hepatica* dans une région d`altitude, au Venezuela. Ann Parasitol Hum Comp 58: 27-30.

Müller G.; Ueno H. (1984). *Lymnaea viatrix* como hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* em Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul. Arq Bras Med Vet Zoot 36: 183-190.

Malone J.B. (1994). The landscape epidemiology of Fasciolosis: Geographic determinants of disease risk. En: Immunology, Pathobiology and Control of Fasciolosis - ICOPA VIII, J. C. Boray (Ed). Izmir, 65-81.

Neto, A, Bessa, E y Soares. (2010). Avaliação da atividade moluscicida do látex de três espécies de *Euphorbia* (Euphorbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* D'Orbigny, 1835 (Gastropoda - Subulinidae) Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.12, n.1, p.90-95, 2010.

Oliveira-Filho, E., Geraldino, B., Coelho, D., De-carvalho, R. & Paumgarten, F. (2010). Comparative toxicity of *Euphorbia milii* latex and synthetic molluscicides to *Biomphalaria glabrata* embryos. Chemosphere, 81(2), pp.218–227.

Osman, GY, Mohamed, AM, Kader, AA & Mohamed, AA. (2011). Biological studies on *Biomphalaria alexandrina* snails treated with *Furcraea selloa marginata* plant (Family: Agavaceae) and *Bacillus thurigiensis kurstaki* (Dipel-2x). Journal of Applied Pharmaceutical science, vol. 1, pp. 47-55.

Ojewole, JAO. (2004). Indigenous plants and schistosomiasis control in South Africa. Molluscicidal activity of some Zulu medicinal plants. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 3, pp. 8- 22.

Otieno L H. Observations on the action of sisal waste on freshwater pulmonate snails. East Afr Agric Forest J. 32: 68-71. 1966.

Oliveira-Filho, E. & Paumgarten, F. (1997). Photodegradation of the molluscicidal latex of “Crown-of-Thorns” *Euphorbia milii* var *hislopii*. Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 92(5), pp.657–659.

Olaechea, Fermín. (2005). Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum*. Argentina. Cap.10. p 213-232.

OMS. Lucha Contra las Trematodiasis de Transmisión Alimentaria. Serie de informes técnicos Palencia Y. Sustancias Bioactivas en los Alimentos. Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo, Guerrero. México. 2003; 148 - 162.

Policegoudra, R.S.; Rehna, K.; Rao, L.J.; Aradhya, S.M. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity and platelet aggregation inhibitory activity of a novel molecule isolated and characterized from mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome. *J. Biosci.* 2010, 35, 231–240.

Pérez y cols. 1998. Actividad molusquicida del Paraiso (*Melia azedarach* L.) (Meliaceae) sobre *Lymnaea cubensis*, molusco vector de Fasciolosis. *Rev. Saúde Pública.* 32 (3): 262-6.

Pile, E; Santos, J.A; São Luiz, J; Vasconcellos, M.C. (2001). Bovine Fascioliasis: control with Christ's crown latex (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*). *Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo*, v. 38, n. 6, p. 288-289.

PLAN DE ORDENAMIENTO TERRITORIAL – POT. 2001. Municipio de Silvia Cauca.

Pointier, Jean-Pierre. (2000). El control biológico de los moluscos vectores intermediarios de los esquistosomas: el ejemplo de la región del Caribe. Laboratorio de Biología Marina y Malacología. Universidad Perpignan, Francia. 12 p. 849 Ginebra. (1995).

Rojas, J., Rincón, J., Marín, J., Ortega, P., Buonocore, R., Colina, M., y Montilla, J. (2015). Toxicidad y bioacumulación de cromo (Cr+6) en la almeja *Polymesoda solida* del sistema estuarino Lago de Maracaibo. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 49(1), 5-25. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/285579532_Toxicidad_y_

bioacumulacion_de_Cromo_Cr6_en_la_almeja_Polymesoda_solida_del_sistema_estuarino_Lago_de_Maracaibo.

Romero, B. (2014). Determinación de la Concentración letal media (CL50) producida por sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) en alevines de Tilapia Roja (*Oreochromis* sp.) (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

Rodríguez-de la Rúa, A., Arellano, J. M., González-de Canales, L., Blasco, J., y Sarrasquete, C. (2005). Acumulación de cobre y alteraciones histopatológicas en el ostión *Crassostrea angulata*, Accumulation of copper and histopathological alterations in the Oyster *Crassostrea angulata*. *Ciencias Marinas*, 31(3), 455-466. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018538802005000400001&lng=es&tlng=es.

Rezende H.; Araujo J.; Gomes P.; Nurenberg S.; Neto M. (1973). Notas sobre duas espécies de *Lymnaea* hospedeiros intermediários de *Fasciola hepatica* no estado do Rio de Janeiro. *Arq Univ Fed Rur Rio de Janeiro* 3: 21-23.

Rognlie M., Dimke K.L., Potts R.S. y Knapp S.E. (1996). Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected

Rodríguez-de la Rúa, A., Arellano, J. M., González-de Canales, L., Blasco, J., y Sarrasquete, C. (2005). Acumulación de cobre y alteraciones histopatológicas en el ostión *Crassostrea angulata*, Accumulation of copper and histopathological alterations in the Oyster *Crassostrea angulata*. *Ciencias Marinas*, 31(3), 455-466. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802005000400001&lng=es&tlng=es.

Rojas, J., Rincón, J., Marín, J., Ortega, P., Buonocore, R., Colina, M., y Montilla, J. (2015). Toxicidad y bioacumulación de cromo (Cr+6) en la almeja *Polymesoda solida* del sistema estuarino Lago de Maracaibo. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 49(1), 5-25. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/285579532_Toxicidad/_y_bioacumulacion_de_Cromo_Cr6_en_la_almeja_Polymesoda_solida_del_sistema_estuarino_Lago_de_Maracaibo.

Rizwan, K, Zubair, M, Rasool, N, Riaz, M. (2012). Phytochemical and biological studies of *Agave attenuata*. International Journal of Molecular Sciences, vol. 13, pp. 6440- 6451.

Ritter. C., E. Richter, I. Knolck y K. U. Katroschan. (2014). Laboratory studies on the effect of calcium cyanamide on wireworms (*Agriotes ustulatus*. Coleoptera: Elateridae). Journal of Plant Diseases and Protection 121 (3): 133-137

Ritchie LS, Hillyer G H, Cushing E C. Molluscicidal and cercaricidal activities of substances contained in tissues of certain plants. Milit Med 8: 795- 798. 1963.

Rojas, J., Rondón, M., Meccia, G. & Morales, A. (2008). Análisis por CG/EM de hidrocarburos y compuestos terpénicos en las especies *Euphorbia caracasanas* y *Euphorbia cotinifolia* L. (Euphorbiaceae). Revista Latinoamericana de Química, 36(1), pp.22–28.

Redvet. (2008). *Fasciola hepatica*: Avances en el empleo de candidatos vacunales. Revista electrónica de Veterinaria. La Habana Cuba.1695-7504. Volumen IX Número 4. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040807.pdf>.

Rognlie M., Dimke K.L., Potts R.S. y Knapp S.E. (1996). Seasonal transmission of *Fasciola hepatica* in Montana, USA, with detection of infected intermediate hosts using a DNAbased assay. *Veterinary Parasitology*, 65:297-305.

Scotto, C., Arrilucea, M., Vargas, G., Salas, J., e Ybañez Caferino, J. (2016). Implementación de una metodología toxicológica para la rápida determinación del CL50 del sulfato de cobre en peces Cebra (*Danio rerio*) a 24, 48, 72, 96 y 120 horas de exposición. *Cátedra Villarreal*, 1(2), 185-190. DOI: 10.24039/cv20164272.

Sobrino, A. (2001). Efecto de los metales Cd, Cr, Pb y sus mezclas en la almeja *Catarina Agropecten ventricosus* (Sowerby, 1842), (Bivalvia, Pectinidae) (tesis doctoral). Instituto Politecnico Nacional, Centro de Investigaciones Marinas, La Paz, México.

Subramanyam. B y R. Roesli. (2000). Inert dust. Pp: 321-379. En: Subramanyam. B, y D. W. Hagstrum (Eds.), *Alternatives to pesticides in stored product IMP*. Kluwer Academic Publishers, Boston. MA. USA.

Soare, L. Y Dobrescu, C. (2009). Anatomical peculiarities of stem and leaf in *Euphorbia splendens*. *Lucrari Stiintifice, Universitatea de Stiinte Agricole Si Medicina Veterinara "Ion Ionescu de la Brad"* Lasi, *Seria Horticultura*, 52, pp.95 – 100.

Salatino et al. (2007). Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* Vol. 18, No. 1. Sociedade Brasileira de Química

Salazar, L.; Estrada, V.; Velásquez, L. E. (2006). Effect of the exposure to *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) on life history traits of *Lymnaea cousini* and *Lymnaea columella* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Experimental Parasitology* 114. 77–83

Schall, V.T; Vasconcellos, MC; Souza, C.P; Baptista, D.F. (1998). The molluscicidal activity of Crown of Christ (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*) latex on snails acting as intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58:7-10.

Tabares, P. Ávila, L. Torres, F. Cardona, D. Quiñones, W. Forero, J. Rugeles, M. T. Echeverry, F. (2007). Metabolitos secundarios y efectos antivirales de algunas especies de la familia *Euphorbiaceae*. *Scientia et Technica*, Vol, XII, No. 33, 107 - 110.

UETA M. (1980). Ocorrência de infecção natural de Fasciola hepática em *Lymnaea columella* no vale do Paraíba, Brasil. *Rev Saúde Pública* 14: 230-233.

Villalobos, M. J. Pascual; Castellanos E. Correal. 1992. La familia *Euphorbiaceae* como fuente de aceites vegetales para la industria tecno química. Consejería de Agricultura de la Región de Murcia. C.R.I.A. Dpto. Cultivos Zonas Áridas. 30105-La Alberca - MURCIA. Vol. 43 Faso. 1, 39-44 <http://grasasyaceites.revistas.csic.es>

Vasconcellos, M. Y Amorim, A. (2003). Molluscicidal action of the latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N. E. B. ("Christ's Crown") (*Euphorbiaceae*) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata : Lymnaeidae), Intermediate host of WCSP, 2017. World Checklist of Selected Plant Families, KEW. Consultado en mayo 2018 en: <http://wcsp.science.kew.ogr>, consultado en mayo de 2018.

Vasconcellos, M.C; Giovanelli, A; Pinto, C.L; Coelho Da Silva, A; Madeiros, L. (2002). The Molluscicidal Activity of Niclosamide (Bayluscide WP70®) on *Melanooides tuberculata* (Thiaridae), a Snail Associated with Habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Río de Janeiro, Vol. 97(5): 743-745, July.

Vasconcellos, M.C Y Amorim, A. (2003) a. Molluscicidal Action of the Latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (“Christ’s Crown”) (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), Intermediate Host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematode: Fasciolidae). 1- Test in Laboratory. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol. 98(4): 557-563.

Vasconcellos, M.C & Amorim, A. (2003). Activity of *Euphorbia splendens* var. *Hislopii* N.E.B. (Euphorbiaceae) Latex against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), Intermediate Host of *Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758 (Trematoda: Fasciolidae). 2- Limited Field-testing. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol. 98(7): 981-985.

Vasas A, Hohmann J. *Euphorbia* diterpenes: Isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008–2012). Chem Rev. 2014; 114: 8579-612.

Vasconcellos, MC, Y Schall, VT. (1986). Latex of “Coroa-de-Cristo” (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. Mem Inst Osqaldo Cruz. 81:475-6.

Vincken J, Heng L, de Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry. 2007; 68 (3): 275 - 97.

Wric'ht, W.H., C H. G. Dobrovlny y E.G. Berry. (1958). Pruebas de campo de diversos molusquicidas (en especial del pentaclorofenato sódico) para el control de los huéspedes acuáticos intermediarios de la bilhamasis humana, Bol. Off. Stmü. Panam., 45:421429.

WHO-World Health Organization. (1983). Report of a Scientific Working Group on Plant Molluscicide and Guidelines for Evaluation of Plant Molluscicide. (1983). Geneva: World

Health Organization, (TDR/SCH-SWE (4)/83.3). Citado por: Vasconcellos Y Amorim. Molluscicidal Action of the Latex of *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B. (“Christ’s Crown”) (Euphorbiaceae) against *Lymnaea columella* (Say, 1817) (Pulmonata: Lymnaeidae), Intermediate Host of *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 (Trematode: Fasciolidae). 1- Test in Laboratory. (2003). Mem Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Vol. 98(4): 557-563.

WHO. (1984). Información técnica sobre el agente de control biológico *Thiara granifera* (Lamarck). Geneva: World Health Organization,. (WHO/VBC/81.833) (VBC/BCDS/81.17). 5p.

Yadav, S. & Jagannadham, M., 2008. Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and Milin on *Biomphalaria glabrata*, *Chemosphere*, 71, pp.1295– 1300.

Zhang. X. Y. Ning, Y. Yang, T. Sun, S. M. Zhang y B, Wang, 2015. Effects of different application rates of calcium cyanamide on soil microbial biomass and enzyme activity in cucumber continuous cropping *The journal of Applied Ecology* 26 (10): 3073.

Zamith. P.S; Paumgartten J.R.; Speit. G. (1996). Evaluation of the mutagenicity of the molluscicidal latex of Christ's Crown (*Euphorbia milii* var. *hislopii*) in mammalian cells in vitro and in vivo, *Mutation Research* 368. 15 - 20.