

ACTIVIDAD MOLUSQUICIDA EN LABORATORIO Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE
Euphorbia laurifolia (EUPHORBIACEAE), SOBRE CARACOLES DEL GÉNERO *Lymnaea*,
HOSPEDEROS DE TREMATODOS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA



NATALIA GÓMEZ BONILLA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2013

ACTIVIDAD MOLUSQUICIDA EN LABORATORIO Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE
Euphorbia laurifolia (EUPHORBIACEAE), SOBRE CARACOLES DEL GÉNERO *Lymnaea*,
HOSPEDEROS DE TREMATODOS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

NATALIA GÓMEZ BONILLA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Bióloga

Director

Mg. Luis Reinel Vásquez Arteaga
Centro de Estudios en Microbiología y Parasitología-CEMPA
Facultad Ciencias de la Salud
Universidad del Cauca

Asesor

Ph.D Fabio Antonio Cabezas Fajardo
Grupo de Química de Compuestos Bioactivos
Departamento de Química
Universidad del Cauca

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2013

Nota de aceptación

Director. Mg. Luis Reinel Vásquez Arteaga

Jurado. Mg. Gerardo Andrés Torres

Jurado. Mg. Víctor Campo Daza

Sustentación: Popayán, Marzo 06 de 2013

*A mi Padre, (en la gloria de Dios), y a mi madre por haberme dado la vida;
a Kike por su ternura e inteligencia y a mi Bebe por regalarme una tierna sonrisa.
Los adoro y me llenan de alegría.*

AGRADECIMIENTOS

“Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora”

Eclesiastés 3:1

La autora expresa sinceros agradecimientos a:

Dios, porque él con su infinito poder ha guiado mi vida haciendo que no desfallezca en momentos difíciles, y quien me bendijo con una hermosa familia; a **Irene, Carolina, Francisco y Octavio Gómez** por su compañía y punto de apoyo constante; a **Armando Muñoz**, por enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación, y a mi bella **Dana V.** por su paciencia.

Mg. Luis Reinel Vásquez por su vasto conocimiento en parasitología con el cual guió este trabajo. GRACIAS por su constante esfuerzo y amabilidad brindada para no permitir que abandonara el proyecto.

Mg. Hildier Zamora G, porque en el transcurso de su labor académica siempre fue un gran maestro y una persona muy amigable.

Mg. Fabio Cabezas por ser un excelente ser humano y excelente profesional, quien con su valioso conocimiento en Química de Compuestos Bioactivos, me guió y asesoró el desarrollo de este trabajo.

Mg. Luz Elena Velásquez, de la Universidad de Antioquia por su recibimiento en el laboratorio de malacología del PECET, y por el aprendizaje recibido sobre la identificación de los moluscos.

Al Químico **Luis Alberto González** por todo el conocimiento proporcionado para la realización del proyecto y las orientaciones entregadas en el laboratorio de Química de Compuestos Bioactivos de la Universidad del Cauca,.

Mg. Víctor Campo por su paciencia y colaboración para la determinación de la DL50 de este informe.

Alcaldía Municipal de Silvia (Cauca), por la información brindada y al médico Veterinario por su acompañamiento y explicación sobre la Fasciolosis en el matadero municipal.

A unos grandiosos compañeros, Andrea Fernández y Luis Alberto Ortiz, que por situaciones adversas de la vida nuestra amistad termino, pero que sin ellos no hubiese vivido innumerables momentos de felicidad para seguirlos recordando.

Magister Edier Zambrano, grupo de Secretarias de Decanatura y al grupo de laboratorio de Biología de la Universidad el Cauca, por facilitar el normal desarrollo del proceso académico.

Finalmente, en la consecución de un sueño que por fin se hace realidad, doy Gracias a muchas personas que han apoyado y han estado conmigo en el transcurso de este proyecto y en mi construcción como profesional, en diferentes ocasiones han soportado mis ansiedades e incluso desilusiones; sin embargo, me han dado fortaleza, a todos infinitamente DIOS LOS BENDIGA.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	16
ANTECEDENTES	18
MARCO CONCEPTUAL	21
2.1 IMPORTANCIA ZONÓTICA DE LA FASCIOLASIS	23
2.1.1 Control de <i>Fasciola hepatica</i> en el huésped definitivo	24
2.1.2 Control del caracol intermediario	25
2.1.3 Métodos alternativos de control	26
2.2 MOLUSCOS DE LA FAMILIA LYMNAEIDAE	27
2.2.1 Morfología de los moluscos <i>Lymnaea</i>	28
2.3 LA FAMILIA EUPHORBIACEAE	29
2.3.1 Química y actividad biológica de las Euphorbiaceae	30
2.3.2 Terpenoides presentes en las Euphorbiaceae	32
2.3.3 Las Euphorbia en el control biológico de caracoles	33
2.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	35
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GENERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36

4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1 DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE RECOLECCIÓN DE LOS MOLUSCOS	37
4.1.1 Localización.	37
4.1.2 Clima.....	37
4.2 MÉTODOS DE CAMPO	37
4.2.1 Colecta y transporte de material biológico.....	37
4.3 MÉTODOS DE LABORATORIO	39
4.3.1 Identificación de especímenes	39
4.3.2 Establecimiento de colonia de caracoles en ecosistemas artificiales.....	40
4.3.3 Ensayos de actividad biológica	40
4.3.4 Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50)	40
4.3.5 Análisis Fitoquímico	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
5.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE LOS MOLUSCOS UTILIZADOS	43
5.1.1 Establecimiento del ecosistema artificial de los Lymneidos	47
5.2 ENSAYO BIOLÓGICO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN LETAL (DL 50).....	48
5.2.1 Colecta del Material Vegetal.....	48
5.2.2 Bioensayos	50
5.2.3 Tratamiento de datos. Cálculo de la relación Dosis-efecto	52
5.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO	58
5.3.1 Fraccionamiento del látex por extracción sucesiva líquido-líquido y seguimiento de perfiles cromatográficos por C.C.D.....	58

5.3.2 Tamizaje fitoquímico. Pruebas de precipitación y por cambio de color.....	59
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Resultados obtenidos de la actividad biológica del látex total de <i>Euphorbia laurifolia</i> sobre <i>L. columella</i>	52
Tabla 2. Mortalidad de <i>Lymnaea columella</i> expuestos por 24 horas a diferentes concentraciones acuosas del látex natural de <i>E. laurifolia</i> .	53
Tabla 3. Sistema de elusión	60

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Fasciola hepatica</i> . Verme adulto	21
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i>	23
Figura 3. Distribución del género <i>Lymnaea</i> en Colombia	28
Figura 4. Concha dextral y masa visceral de <i>Lymnaea</i>	28
Figura 5. Estructuras químicas de algunos flavonoides	31
Figura 6. Estructura base de un éster de forbol	33
Figura 7. Algunas especies de <i>Euphorbia</i> con propiedad molusquicida	34
Figura 8. Ubicación área de estudio	38
Figura 9. Ubicación sitio recolección de moluscos	39
Figura 10. Tanque bebedero para el ganado	44
Figura 11. Pantano sobre la margen de la carretera	44
Figura 12. Zona de desagüe de los estanques piscícolas	45
Figura 13. Planta de <i>Nastartium officinale</i> (berros)	46
Figura 14. Márgenes del río Agoyán	46
Figura 15. <i>Lymnaea columella</i> utilizados en los ensayos biológicos	47
Figura 16. Ecosistema artificial de <i>L. columella</i>	48
Figura 17. Extracción del látex de <i>Euphorbia laurifolia</i>	49
Figura 18. Arbusto de <i>Euphorbia laurifolia</i>	50
Figura 19. Tamaño de los moluscos <i>L. columella</i> utilizados en los bioensayos	51

Figura 20. Exposición de <i>L. columella</i> en las diferentes concentraciones	51
Figura 21. Mortalidad de <i>L. columella</i> a las 24 horas de exposición por la acción del látex de <i>E. laurifolia</i> (n=30 por dilución).	54
Figura 22. Extracción líquido-líquido	59
Figura 23. Placa cromatográfica con el mejor sistema de elusión	60
Figura 24. Detección de compuestos nitrogenados. Dragendorff	61
Figura 25. Detección positiva de terpenos y similares. Liebermann-Burchard	62
Figura 26. Detección positiva de esteroides y terpenos. Anisaldehído	62
Figura 27. Fluorescencia antes y luego de la prueba. Tricloruro de aluminio	63
Figura 28. Prueba positiva en la detección de Saponinas. $\text{NH}_4\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$	64
Figura 29. Prueba negativa para detección de taninos. FeCl_3	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt: acetato de etilo

bmh –MB: bosque muy húmedo montano bajo

CCD: cromatografía de capa delgada

ET: extracto total

EVA: extracto verde amarillo

LC50: concentración letal 50

PB: precipitado blanco

PECET: Programa de Estudios y Control de Enfermedades Tropicales

POT: Plan de Ordenamiento Territorial

QCB: Química de Compuesto Bioactivos

RESUMEN

En el presente trabajo se evalúa la actividad molusquicida en condiciones de laboratorio del látex de *Euphorbia laurifolia* (Euphorbiaceae), para el control del caracol del género *Lymnaea*, hospedador intermediario de *Fasciola hepatica*, como parte de la estrategia dirigida a la regulación de la fasciolosis. Considerando que la fasciolosis es una enfermedad parasitaria, reconocida como un gran problema en la Salud Pública y veterinaria al provocar en el ganado disminución en la calidad y cantidad de la producción e importantes pérdidas económicas. También el hombre puede enfermarse de forma accidental convirtiéndose en un problema zoonótico de importancia.

Para las diferentes pruebas de la actividad biológica con los moluscos se recogió muestras del material vegetal en zona rural del municipio de Popayán (Cauca), en el kilómetro 5 salida al Huila. Para el fraccionamiento se llevó el látex de *E. laurifolia*, al laboratorio donde se fraccionó en acetato de etilo (AcOEt), bajo la metodología del grupo de investigación de Química de Compuestos Bioactivos (QCB), de la Universidad del Cauca.

En los ensayos biológicos de la actividad molusquicida se experimenta con ejemplares del molusco *Lymnaea columella*, colectados en zona rural del municipio de Silvia (Cauca), establecidos en laboratorio en colonias artificiales. En una solución acuosa del látex recién colectado de la planta, tomado de los tallos de la especie vegetal, se procede a colocar los moluscos en 10 diferentes concentraciones según la metodología descrita por Vasconcellos y Amorim (2003). Luego de 24 horas se determinó la mortalidad de los especímenes y se calculó la concentración letal media (LC50). Los lymneidos utilizados en los ensayos miden entre 5-7 mm.

Se realizó el estudio fitoquímico del extracto del látex de *E. laurifolia* con la intención de determinar los metabolitos secundarios presentes en esta planta. Para la obtención de las muestras se realizaron extracciones sucesivas con AcOEt y en el tamizaje fitoquímico se emplearon técnicas sencillas de análisis cualitativo mediante reacciones coloridas para la determinación de los constituyentes mayoritarios. Con los resultados obtenidos se comprobó la alta diversidad de metabolitos presentes en *E. laurifolia* como alcaloides, terpenos, esteroides, flavonoides, saponinas, fenoles y taninos.

La dosis letal obtenida (CL50= 0.964 mg/L), con un intervalo de confianza del 95%, evidencia una importante acción molusquicida de *Euphorbia laurifolia* sobre *L. columella*.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, *Lymnaea* sp, control biológico, *Euphorbia laurifolia*, tamizaje fitoquímico, Colombia.

INTRODUCCIÓN

La Fasciolosis es una enfermedad transmitida por las larvas de los caracoles acuáticos de la familia Lymnaeidae (MOLLUSCA: Gasterópoda), causando grandes perjuicios al hombre y a su animales domésticos. Constituye en diversas regiones ganaderas una fuente importante de pérdidas económicas y cuando se descuidan las medidas de control de los moluscos hospedadores intermediarios, junto a condiciones ecológicas favorables, pueden ocurrir igualmente casos de fasciolosis humana.

En los últimos años se han ejecutado estudios dirigidos a controlar sus poblaciones, fundamentalmente por los daños que provoca *Fasciola hepaticatanto* en animales como en humanos. Dentro de los variados métodos de control utilizados se encuentra el empleo regular de drogas que son altamente eficaces tanto contra las formas larvarias como adultas de *Fasciola hepatica*; con productos como el Albendazol o el Triclabendazole, entre otros (EDDiet *al.* 1998). Sin embargo, se observa la presencia de residuos de Triclabendazol y de sus metabolitos en los tejidos (músculos, hígado, riñón y grasa), así como en la leche (EDDiet *al.* 1998).

En Colombia se observa que los antihelmínticos han venido presentando una gran ineficacia contra el trematodo, como lo demuestran los decomisos diarios de hígados infectados por el parásito en los mataderos, lo que prueba la poca actividad farmacológica que ejercen estas sustancias fasciolicidas contra el parasito, aumentando la morbilidad y mortalidad en las fincas ganaderas.

En el departamento del Cauca la enfermedad se presenta en zonas frías y templadas donde se ha reportado la presencia de *Fasciola hepatica* en los municipio de Silvia (Cauca) y Puracé- Coconuco (LONGO, 2004). Se observa en la zona ganadera de Malvaza municipio de Totoró, bovinos contaminados, siendo caracoles del género *Lymnaea* los principales vectores infectados con cercarías de *F. hepatica* (ARBOLEDA & LÓPEZ, 2006), igualmente hubo un decomiso total de 1627 hígados infestados en el matadero de Popayán entre el año 2005 – 2006, provenientes de estas zonas.

LONGO (2004), reporta la observación de múltiples hígados de ganado infestados proveniente de fincas ganaderas de la región de Puracé y Coconuco; además de la presencia de caracoles *Lymnae columella* y *L. truncatula*. Para el municipio de Silvia se reporta un decomiso de 181 hígados con la distomatosis de un total de

1071 bovinos sacrificados en el año 2008, siendo la patología de mayor frecuencia en la región (Alcaldía de Silvia-Secretaría de Desarrollo, 2009).

El control del vector es una parte integral de la prevención de esta enfermedad, solo así se logra la interrupción en el ciclo de vida de *Fasciola hepatica*. Un método para acabar los caracoles hospederos intermediarios es la utilización de molusquicidas (MALEK, 1985). Sin embargo, el amplio y generalizado uso de molusquicidas sintéticos, se ha encontrado que afecta los cuerpos de agua debido a su alta toxicidad, la bioacumulación y el largo tiempo de persistencia en el ambiente pueden ser mutagénicos (WHO, 1985; VASCONCELLOS, *et al.*, 2002).

Los extractos vegetales constituyen una alternativa para controlar los moluscos, los cuales han ganado relevancia en comparación con los sintéticos, por ser ecológica y culturalmente más aceptados, no producir efectos nocivos y resultar más baratos, lo que contrasta con la rápida degradación. El empleo de este método está más acorde con las actuales condiciones económicas, sobre todo en países en vía de desarrollo donde se requiere interrumpir la transmisión del parásito con la perspectiva de que llegue a ser un adecuado y efectivo método en el control de caracoles que actúan como hospederos de tremátodos y así reducir la transmisión de la parasitosis (MÉNDEZ, *et al.*, 1997). Los estudios sobre las propiedades molusquicidas de plantas, reportados desde la década de 1930, han demostrado sus posibilidades reales en el control de importantes parasitosis de relevancia médico-veterinaria.

En el presente trabajo se evalúa una alternativa de origen vegetal para el control de especies de caracoles intermediarios de tremátodos en el departamento del Cauca, a través de la experimentación en condiciones de laboratorio, donde se observa la acción molusquicida del extracto de la especie *Euphorbia laurifolia* (Euphorbiaceae), comúnmente conocida como “Lechero”, en el control de *Lymnaea* sp, principal vector de la fasciolosis. *Euphorbia laurifolia* es una planta presente en la región muy utilizada por campesinos e indígenas, fácilmente cultivada en las áreas donde se encuentra el caracol hospedero intermediario; además, produce una mayor cantidad de látex en comparación con *Euphorbia splendens*, utilizada en estudios en Brasil, adicionalmente, entre otras propiedades que presenta el látex de esta especie.

El estudio propuesto del látex de *Euphorbia laurifolia* se convierte en una herramienta interesante, orientada en desarrollar la búsqueda de nuevas sustancias de actividad biológica con propiedades molusquicidas, considerando que *E. laurifolia* se encuentra ampliamente distribuida en regiones de clima frío del departamento del Cauca, en áreas donde se presenta la distomatosis hepática.

1. ANTECEDENTES

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por el estudio de extractos o productos aislados de plantas para su empleo como molusquicidas, ya que presentan ventajas en su uso, debido a que los compuestos vegetales no persisten mucho tiempo en el medio y provocan menos daños al ambiente (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985; HERNÁNDEZ, Alfonso-*et al.*,2008). Sus parámetros farmacocinéticos los hacen muy poco tóxicos a organismos superiores, son selectivamente efectivos, biodegradables y se aplican con técnicas simples y fácilmente disponibles en las áreas afectadas (PÉREZ, *et al.* 1998). Por otra parte, estudios recientes han demostrado que la utilización de molusquicidas sintéticos afecta seriamente el hábitat de los moluscos, actuando como biocidas residuales que eliminan flora y fauna asociados con los caracoles que se desean eliminar; igualmente, el elevado costo de estos productos, en muchas de las zonas afectadas hace que el proceso de la aplicación pueda resultar inoperable (WHO, 1983 citado por: VASCONCELLOS & SCHALL, 1986; WHO, 1985; BECERRA-ROZO, 2001).

En 1974 Emile A. Malek, en su libro 'Medical and Economic Malacology' cita la importancia del control para reducir considerablemente los caracoles hospederos de la *F. hepatica*, para lo cual menciona ciertos métodos químicos en los cuales ha sido usado comúnmente el sulfato potásico de aluminio, y diferentes compuestos de arsénico; reportados por ser muy efectivos contra los caracoles de agua dulce. Sin embargo, se debe tener cuidado por que resultan ser perjudiciales en su manipulación y venenosos para la vegetación, siendo algunos altamente tóxicos. De igual forma analiza los medios de control ecológicos con la desecación de los hábitats; y el control biológico mediante la utilización de competidores y predadores del molusco.

CRUZ-REYES,*et al.*,1989, plantea que los estudios sobre molusquicidas, tanto sintéticos como naturales, han sido orientados solo para el control de los caracoles vectores de *Schistosomamansonii* y sobre la utilización de estas sustancias para el control de vectores de fasciolosis no existe información, solo pocos autores han puesto atención al control de caracoles *Limneidos*, utilizando extractos vegetales.

Dentro del control químico con molusquicidas diversos autores (JURBERG, *et al.*, 1995; VASCONCELLOS, *et al.* 2002), han descrito la efectividad *Bayluscide®*, marca comercialmente utilizada en muchos países tropicales para combatir los moluscos hospederos intermediarios de tremátodos. Sin embargo, entre los principales problemas que enfrentan se encuentran su toxicidad inespecífica, elevado costo, una biodegradación lenta y la necesidad generalmente de ser

importados, por lo que existe una buena tendencia a buscar sustancias de extractos vegetales con actividad molusquicida, como método de control alternativo (PÉREZ, *et al.*, 1998). En este sentido la WHO, 1983, ha estimulado investigaciones a nivel mundial sobre extractos de plantas con actividad molusquicida, debido a su bajo costo, generalmente porque la materia prima se obtiene en el propio país; se sugiere además, que través del uso de extractos vegetales se crea un control auto-sostenible para la biota, que podría suplantar costosos productos sintéticos siendo más baratos, efectivos y menos contaminantes (VASCONCELLOS & AMORIM, 2003).

De acuerdo a SCHALL, *et al.*, (1998), más de 1400 especies de plantas han sido estudiadas, de las cuales el extracto de 20 especies han sido hallados por tener un alto potencial molusquicida a bajas concentraciones y aproximadamente han sido aislados más de 50 compuestos incluyendo saponinas, terpenoides, flavonoides, naftoquinonas, taninos y alcaloides.

Estudios realizados en Brasil por Vasconcellos (1986, 1998, 2003a, 2003b), han demostradola acción letal del extracto acuoso del látex de *Euphorbia splendens* - La Corona de Cristo, (Euphorbiaceae), con resultados excelentes contra varias especies de caracoles del género *Biomphalaria* (*B. glabrata*, *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. pfeifferi*) y *Lymnaeacolumella*, hospederos de *Schistosomasp* y *Fasciolasp* respectivamente, donde la actividad molusquicida pudiera deberse a la presencia de saponinas, las cuales han sido descritas con una notable acción molusquicida (PILE, *et al.*, 2001; SCHALL, *et al.*, 1998; VASCONCELLOS & AMORIM, 2003). Los autores demuestran la alta efectividad del látex en el laboratorio y en pruebas de campo a bajas concentraciones, menor de 0,5 mg/L; concentraciones aceptadas para el uso ya que no exceden los 1-2 mg/Lde concentración, según lorecomendado por la Organización Mundial de la Salud (WHO), para la utilización de plantas con actividad molusquicida. El efecto a bajas concentraciones y la poca o ninguna toxicidad en las concentraciones utilizadas, representan una ventaja en términos de aplicación que cumple con los requisitos fundamentales para ser considerado como un molusquicida natural de uso práctico, indicando así su potencial y la posibilidad de la utilización del látex de esta planta en programas de control estratégico de moluscos vectores (VASCONCELLOS & SCHALL, 1986).

De igual forma se ha demostrado que el látex de *E. splendens*, no es mutagénico en células de mamíferos y su utilización como molusquicida no representa un peligro mutagénico para los seres humanos (ZAMITH, PAUMGARTTEN y SPEIT, 1996). En contraste con productos químicos como *niclosamida*, que si es tóxico para ranas, caracoles y crustáceos planctónicos, el látex no es tóxico para algas, larvas de insectos o bacterias, entre otros.

Sobre la utilización de sustancias vegetales para el control de parásitos y de forma particular de vectores de fasciolosis, en nuestro país no existe mucha información; hasta el momento los únicos reportes conocidos para Colombia son los trabajos realizados por ARANGO-ACOSTA, *et al* (2004), quienes observaron la actividad molusquicida sobre *Lymnaea columella* la toxicidad de seis plantas de diferentes géneros de la familia *Euphorbiaceae*, en el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia.

En este contexto se ha planteado que las plantas con mayores propiedades molusquicidas son las especies de la familia *Euphorbiaceae*, familia botánica que comprende 8.000 especies, muchas de las cuales han sido de gran utilidad para el tratamiento de diversas enfermedades, por lo que varios estudios se han enfocado en la evaluación de sus efectos, demostrando su potencial antiviral, antitumoral, antibacteriano y antioxidante. En el género *Euphorbia* han encontrado terpenoides, flavonoides, alcaloides, cumarinas, glicósidos cianogénicos y taninos de algunas especies, con propiedades pesticidas (RIZK, 1986 citado en ARANGO-ACOSTA, *et al*, 2004).

Sin embargo, la familia *Euphorbiaceae* aún permanece desconocida y amerita que se desarrollen trabajos que se centren en la investigación de sus propiedades, considerando que existe una limitada bibliografía en donde se reporten estudios de su actividad biológica (GONZÁLEZ, 2010). Varias especies de plantas de esta familia han mostrado un gran potencial como fuente de moléculas bioactivas, alrededor de 400 diterpenoides han sido aislados de plantas del género *Euphorbia*, con un amplio espectro de actividades biológicas como irritantes de la piel y de los ojos (FREITAS, *et al.*, 1991), apoptosis celular, efectos citotóxicos y propiedades de inducción de la proliferación celular (BLANCO-MOLINA, 2001, citado en ÁVILA *et al*, 2010).

De acuerdo a TABARES *et al.* (2007), en Colombia, con el látex de diferentes especies del género *Euphorbia* vienen realizando estudios dirigidos en detectar extractos con propiedades antivirales, citotóxicas e inmunomoduladoras, como nuevas alternativas farmacológicas contra infecciones causadas por diferentes tipos de virus, tales como influenza y rinovirus.

En el 2010, ÁVILA *et al.*, presentan los resultados de sus investigaciones quienes han reportado compuestos diterpénicos de actividad biológica, del extracto del látex y hojas de plantas de *E. láctea* y *E. laurifolia*, sobre formas latentes del VIH que activaron significativamente del ciclo replicativo del virus; estos estudios son de gran importancia, ya que la identificación de la latencia del VIH es un reto científico para profundizar en los mecanismos de almacenamiento del virus.

2. MARCO CONCEPTUAL

La Distomatosis hepática, o fascioliasis es una enfermedad parasitaria producida por tremátodos del género *Fasciola*. La especie más común es *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea) la cual se localiza en los conductos biliares como su hábitat final, principalmente de los mamíferos herbívoros, y también del hombre (OMS, 1995; MAS-COMA, ESTEBAN & BARGUES, 1999; Min-Salud, 1999; CARRADA-BRAVO, 2003, 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 & ROMERO, 2001; FERREIRA, 2003, BOTERO & RESTREPO, 2003).

La *Fasciola hepatica*, también llamada “mariposa del hígado” o “duela hepática” es un gusano plano (Platelminto), que en su forma adulta mide alrededor de 2.53 cm de largo y 1.3 cm de ancho que reside en los conductos biliares del huésped definitivo. Es de color café–pardusco de forma lanceolada semejante a una hoja y tiene un cono cefálico bien diferenciado (Figura 1). El tegumento carnoso y blando está revestido por una cutícula gruesa con salientes espinosas, posee dos ventosas: una anterior y otro ventral acetábulo. Las duelas adultas se localizan en los conductos biliares, son hermafroditas, y presentan un ciclo biológico con dos generaciones (digénica) en dos hospederos, un molusco gasterópodo anfibio y un mamífero (CARRADA-BRAVO, 2003).

Figura 1. *Fasciola hepatica*. Verme adulto



Fuente: Laboratorio de macología–PECET (Universidad de Antioquia)

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

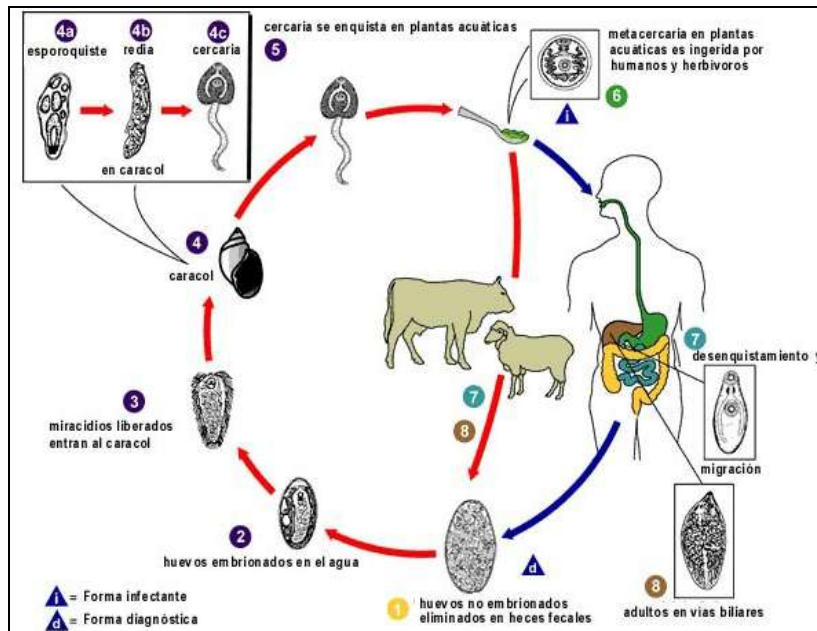
(CARRADA-BRAVO, y FERREIRA, 2003; Min-Salud, 1999), y donde existen, además, las especies de moluscos dulceacuícolas que funcionan como sus hospederos intermediarios (OMS, 1995; MALEK & CHENG, 1974).

La amplia distribución del parásito obedece a diferentes factores, uno de ellos es el ciclo de vida de *F. hepatica* (Figura 2), que involucra dos fases reproductivas, aumentando las posibilidades de establecerse y colonizar nuevas localidades, incrementando el área de distribución. 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: se ha estimado que 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 dístoma 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 hepatica*



Fuente. *Fasciolosis hepatica* en Humanos. www.monografias.com. Consultado 09/01/2012.

2.1 IMPORTANCIA ZONÓTICA DE LA FASCIOLASIS

En Medicina Veterinaria la importancia se refleja en los resultados económicos adversos que se producen en muchos países en la industria de lana, carne y leche, causando pérdidas significativas estimadas en más de \$2000 millones de dólares por año en la producción pecuaria mundial con más de 600 millones de animales infestados (BECERRA-ROZO, 2001). Las mayores pérdidas se registran por la inversión en antihelmínticos, el menor aprovechamiento del alimento, la disminución en la producción láctea, baja fertilidad y abortos, debido a la anorexia, inflamación hepática y la anemia con grandes pérdidas en la conversión de nutrientes que provoca la fascioliasis bovina (BORAY, 2007); no obstante sin dejar de incidir, se producen pérdidas por el decomiso total o parcial de hígados al estar afectados en el momento del sacrificio (GONZÁLEZ, *et al*, 2007; BORAY, 2007).

En Colombia la situación sobre las pérdidas económicas son de \$12.483 millones de pesos anuales (BECERRA-ROZO, 2001), donde se ha observado que la fascioliasis es un serio problema veterinario para el país, con una prevalencia del 20 al 25% en bovinos de clima frío y solo del 1% en bovinos de clima medio (Min-Salud, 1999), sin disponer de una estrategia para su control.

Por otro lado, la infección en humanos ha cobrado importancia a nivel mundial en las últimas décadas y recientemente ha sido reconocida como una enfermedad de transmisión vectorial con amplios rangos de distribución latitudinal, longitudinal y altitudinal (MAS-COMA, 2004; OMS, 1995). Ha sido descrita en 51 países durante los últimos 25 años y se estima que existen aproximadamente 17 a 40 millones de personas infectadas alrededor del mundo, debido a la alta adaptabilidad del parásito y el poder de colonización del molusco como vector (MAS-COMA, 2004).

En América Latina la distribución de la parasitosis es amplia, donde la infección por fasciola en el Centro y Sur América es la más alta del mundo (MAS-COMA, 2004). Entre los países más afectados se encuentran Argentina, Uruguay, Bolivia, Venezuela y Perú, la cual es endémica en la población infantil; en el Caribe hay prevalencia en Cuba y México. En varios pueblos de Perú y Bolivia es un problema de Salud Pública, cuyo grupo de alto riesgo son personas con regímenes dietéticos basados en vegetales crudos, el consumo de agua bebida de forma directa (Min- Salud, 1999; FUENTES, BARCELO y BORAY, 2007), la falta de instalaciones adecuadas para la eliminación aguas residuales, o por el consumo de hígados crudos infectados por trematodos inmaduros (MAS-COMA, 2004).

En Colombia, hasta 1990 se han registrado 216 casos de personas infectadas (MINISTERIO DE SALUD, 1999), con mayor índice en las zonas rurales, principalmente aquellos que están en contacto con el ganado de la región, por conductas de riesgo como manipulación de pastos para la ganadería (47%), o por beber agua de quebradas aledañas a las zonas de pastoreo (44%).

Dada la importancia de esta parasitosis, tanto a nivel veterinario como humano, para el control y prevención de la distomatosis hepática se utilizan estrategias que con llevan a destruir las poblaciones de *Fasciola hepatica*. De igual forma por la importancia del molusco vector en el ciclo de vida de *F. hepatica* también se considera la erradicación de la población de caracoles.

2.1.1 Control de *F. hepatica* en el huésped definitivo. El uso regular de antihelmínticos o fasciolidas es la práctica más común empleada por los ganaderos, drogas que son altamente eficaces tanto contra las formas larvianas como adultas del parásito (EDDIet *al.* 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. Algunos de los antihelmínticos disponibles en el mercado y el espectro de eficiencia sobre los diferentes estadios de los trematodos se observan en el Cuadro 1, los cuales deben ser tenidos en cuenta para un adecuado uso en los programas de control.

Sin embargo, la presencia de residuos de los antihelmínticos y de sus metabolitos en los tejidos (músculos, hígado, riñón y grasa), así como en la leche, no deben enviarse los bovinos al matadero antes de los 14 días pos-tratamiento (EDDI *et al.* 1998).

Cuadro 1. Actividad de diversos antihelmínticos contra los diferentes estadios de *Fasciola hepatica*

Fasciolicidas	Edad de la Fasciola en relación a la eficiencia del fasciolicida		
	> de 12 semanas	6-12 semanas	< de 6 semanas
Oxiclosamida	++	+	-
Nitroxinil	++	++	+
Rafoxanida	++	++	+
Triclabendazol¹	++	++	++
Albendazol	++	-	-
Closantel	++	++	-
Clorsulón	++	++	-
Dianfenetida	-	-	++
Netobimin, Niclofolan	++	-	-
Bromofenofosfato	++	-	-
Hexacloroetano	++	-	-
CCl4	++	-	-

2.1.2 Control del caracol intermediario. Los caracoles *Lymnaeidos* son los principales hospedadores intermediarios de *Fasciola hepatica*, donde se reproducen los estadios juveniles para completar su ciclo de vida (MALEK, 1985; MAS-COMA, ESTEBAN y BARGUES 1999, BORAY, 2007). El rol esencial de estos caracoles en la transmisión de los trematodos, implica que su eliminación resultaría en la eliminación de la enfermedad. Algunas alternativas de control son el uso de molusquicidas, la implementación de medidas ecológicas y el control biológico para la reducción de las poblaciones de caracoles y consecuentemente las larvas de *F. hepatica* que lo parasitan.

Según MALEK (1985), la utilización de molusquicidas sintéticos es un método sencillo para disminuir las poblaciones de caracoles, sin embargo hay que tener en cuenta el impacto ambiental que estos productos causan, provocando serios daños debido a su toxicidad y en muchas de las zonas afectadas el proceso de la

¹El Triclabendazol, es el fasciolicida con más amplio espectro sobre todas las formas larvianas de *Fasciola sp.*

aplicación del tratamiento puede ser costoso, lo cual no evita las pérdidas económicas asociadas a la distomatosis (EDDiet *al.* 1998).

Para el control de *Lymnaea* sp, se utilizan compuestos como Niclosamida, pentaclorofenato de sodio y N-tritylmorpholine, y comúnmente se ha sugerido el uso del sulfato de cobre en épocas de actividad del caracol; sin embargo, la utilización de estos molusquicidas involucra riesgos tales como la acumulación de residuos tóxicos en agua y suelo, disminución de pastos y esto tiene un efecto negativo en la fauna del área tratada.

Una práctica común de los ganaderos es la de evitar las pasturas húmedas durante ciertas épocas del año para impedir el acceso de los animales a las zonas distomatósicas, logrando así la reducción de las posibilidades de infestación de los rumiantes pero se reduce el área de pastoreo(MALEK, 1985). También se realiza la limpieza de los canales de regadío dando buenos resultados ya que se disminuye las poblaciones de moluscos pero es dispendioso.

En la actualidad ha ganado gran importancia el control biológico. Se ha experimentado con algunas bacterias, hongos, algas y nematodos parásitos, logrando reducir el crecimiento y reproducción de los caracoles. Una opción de control es el caracol *Marisa cornuarietis*, que es un competidor excelente del genero *Lymnaea* y los predadores como el anélido *Chaetogasterlimnaei*, o la mosca *Sciomycid* sp(OLAECHEA, 2005).

La investigación de alternativas de origen vegetal se considera que es un método ecológicamente sano y culturalmente más aceptados que los sintéticos (BECERRA-ROZO, 2001). En este contexto las *Euphorbiaceae* es la familia botánica tiene un gran número de especies con efectivo potencial molusquicida (MELLO-SILVA *et al.* 2006).

2.1.3 Métodos alternativos de control.El estímulo de resistencia contra *F. hepatica* ha sido intentado en bovinos a través de infecciones experimentales con metacercarias llegando a porcentajes de protección a sucesivas infecciones con muy buenos resultados, estimulando una resistencia con la aplicación de extractos somáticos de *F. hepatica*. Los mecanismos de resistencia aún no están claramente elucidados, pero de hecho, se han obtenido grandes adelantos y es evidente que la resistencia es producida inmunológicamente. Con los avanzados medios actuales para el aislamiento, purificación y caracterización de los antígenos como candidatos vacunales, una vacuna podría ser conseguida en un futuro no muy distante (REDEVET, 2008).

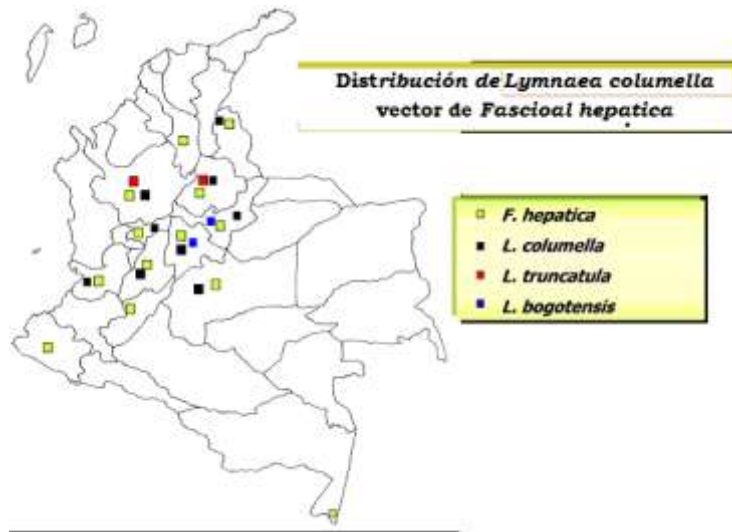
2.2 MOLUSCOS DE LA FAMILIA *LYMNAEIDAE*

Los moluscos en general son animales de cuerpo blando, que tienen un pie musculoso que les permite reptar o cavar, un manto y una estructura membranosa en forma de lengua con hileras de dientes transversales utilizados para raspar el alimento llamado rádula (MALEK & CHENG, 1974). La gran mayoría tienen importancia económica porque son fuente de alimentación para el hombre, son hospedantes intermediarios de parásitos (platelmintos y nematodos) de mamíferos y animales domésticos (BORAY, 2007); son indicadores de contaminación por su tolerancia y adaptabilidad (BAQUEIRO-CÁRDENAS, 2007), y algunas especies, constituyen plagas de numerosos cultivos (FUENTES & BARCELO, 2007).

El género *Lymnaea* pertenece al **Phylum Mollusca**, grupo más rico en especies después de los artrópodos (alrededor de unas 130.000 especies). Clase **Gasterópoda**, 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 & CHENG, 1974; MALEK & CONGSWELL, 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 & CHENG, 1974). De las tres especies del género *Lymnaea* registradas para Colombia, *L. ubaquensis*, *L. columella* (Say, 1817) y *L. bogotensis*, sinónimo de *L. cousini* (SALAZAR, et al, 2006), solo *Lymnaeabogotensis* y *Lymnaeacolumella*, son identificadas como intermediarios hospederos de *Fasciola hepatica* (MALEK, 1974; MALEK & CONGSWELL, 1980; LONGO, 2004), con amplia distribución en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Meta, Nariño, Cauca, Valle del Cauca y Tolima (MALEK & CONGSWELL, 1980; LONGO, 2004) (Figura 3).

Figura 3. Distribución del género *Lymnaea* en Colombia



Fuente: Longo, 2004

2.2.1 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).

Figura 4. Concha dextral y masa visceral de *Lymnaea*



Fuente. Propia

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. Los *Lymnaea* son hermafroditas y tienen un **sistema reproductor** similar al de otros pulmonados, pero en ellos los poros femenino y masculino están separados; el poro genital masculino abre detrás del tentáculo derecho, mientras que el femenino lo hace debajo del collar del manto cerca de la cavidad respiratoria. El **riñón** u órgano excretor es grande y piriforme. El **uréter** es muy corto pero ancho y pasa derecho donde se abre, no lejos del ano. El **corazón**, está formado por una aurícula y un ventrículo; se localiza en el lado izquierdo del ápice del pulmón, próximo al estómago (MALEK & CHENG, 1974).

Los *Limneidos* son ovíparos y depositan sus **Huevos** envueltos en una masa gelatinosa, que por la forma y número de huevos que contiene, tiene valor taxonómico (MALEK & CHENG, 1974). La masa ovígera de *Lymnaeacolumella* 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.

2.3 LA FAMILIA EUPHORBIACEAE

Con aproximadamente 322 géneros y alrededor de 8910 especies, esta familia botánica 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.

Algunas euforbiáceas son árboles altos de bosques lluviosos, pero la mayoría de los taxos son de corta duración, árboles del sotobosque, arbustos o hierbas que crecen en bosques secundarios, los cuales se caracterizan por contener un látex altamente irritante para la piel y los ojos (FREITAS *et al.*, 1991). Las flores son unisexuales y generalmente apétalas, en su mayoría pequeñas e incóspuas; 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: *Crotón* (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 sp (36 exclusivas), la región pacífica con 110 spp. (14 exclusivas) y la Orinoquia con 88 sp. (9 exclusivas) (Murillo, 2004).

En cuanto a la distribución altitudinal, las *Euphorbiaceae* se encuentra principalmente en zonas bajas, el 63% sólo crece en alturas menores que 1500 m, mientras que el 8.5% crece a más de 1500 m. *Euphorbiaorbiculata* y *Dysopsispaucidentata* son las únicas especies que pueden alcanzar alturas superiores a los 3500 m (MURILLO, 2004).

Esta familia es sumamente importante, ya que muchos de sus miembros se cultivan para uso medicinal, industrial, alimenticio y/o ornamental; además, cumplen un uso medioambiental con varias funciones ecológicas. Las especies más conocidas son el árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), fuente principal del látex natural; la yuca (*Manihotutilissima*), una de las plantas alimenticias más importante a nivel mundial; el ricino (*Ricinuscommunis*) y la corona del Inca o rosa de navidad (*Euphorbiapulcherrima*), especie cultivada como ornamental.

Algunas especies son usadas ampliamente en medicina popular por sus múltiples efectos. En América Latina son usadas por curanderos, homeópatas e inclusive médicos. Las aplicaciones específicas forman parte del acervo cultural de cada región. Por ejemplo, los géneros *Croton* y *Euphorbia* se usan como remedio local para gran variedad de enfermedades y dolores (BITTNER, *et al.* 2001).

Especies de *Croton* se han utilizado para tratar problemas de la próstata, congestión nasal, fiebre, reumatismo, dolores de estómago, enfermedades de la piel, sífilis y neumonía, como expectorante y en el tratamiento de heridas. Tal variedad de propiedades farmacológicas se atribuye a la presencia de alcaloides y la alta diversidad química que este grupo de plantas presenta (BITTNER *et al.* 2001).

2.3.1 Química y actividad biológica de las *Euphorbiaceae*. Muchas especies poseen látex que contienen caucho, aceites, taninos, resinas y sustancias gomosas (BITTNER *et al.* 2001). Los compuestos químicos de algunos géneros como *Acalypha*, *Croton*, *Euphorbia*, *Jatropha*, *Sapium*, *etc.*, son responsables de producir efectos cáusticos, como mecanismo de defensa contra herbívoros y patógenos, que poseen sustancias tóxicas como esteroides de alcoholes diterpénicos, forbal, resiniferonol e ingenol, extremadamente potentes irritantes sobre la piel de los mamíferos (PASCUAL & CORREAL, 1992; SALAMANCA, 2000);

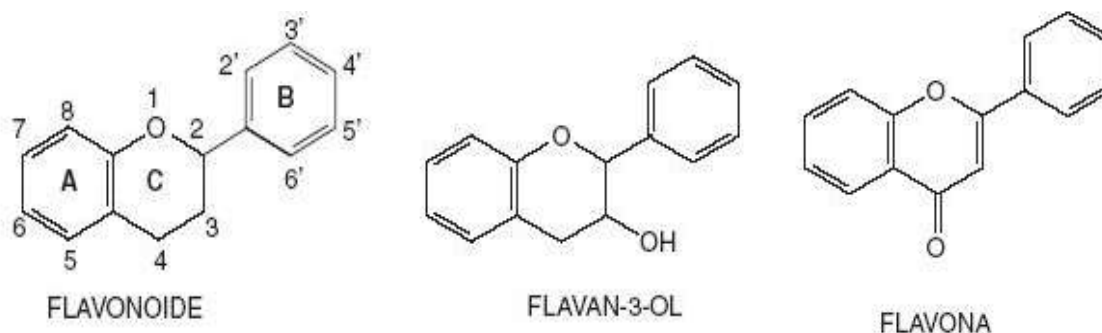
en algunos casos el látex llega a ser venenoso como en la subfamilia *Phyllantoideae*. A través de numerosos estudios se ha demostrado que la acción tóxica del látex puede ser atribuida a una clase de diterpenos (tiglianos, ingenanos y dafnanos), capaces de causar efectos irritantes, así como de promover algunos tipos de cáncer y de eliminar otros (BITTNER *et al.* 2001).

Entre las actividades biológicas más importantes presentes en esta familia botánica es la actividad antiviral reguladora del ciclo celular y la actividad antitumoral. Varias especies han mostrado actividad antiviral contra virus como *Herpes simplex*, Polio, Hepatitis B y Virus de la Inmunodeficiencia Humana entre otros (ÁVILA *et al.* 2010). La actividad antiviral ha sido reportada en los extractos de las especies *Euphorbiatirucalli* y *Euphorbiacotinifolia*, que presentan una fuerte actividad contra el virus del *Herpes simplex* tipo 2 (BETANCUR-GALVIS *et al.* 2002).

Adicionalmente, tres diterpenos aislados de *Euphorbiaofficinarum* tienen la propiedad de detener el ciclo celular e inhibir la latencia del Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo-1 en una línea celular de leucemia (LLANES, 2009). Otros extractos o compuestos tienen actividad antitumoral como es el diterpeno aislado de *Euphorbiapositionii* que presenta actividad citotóxica sobre la línea celular del carcinoma hepático humano o el éster de forbol aislado del *Crotonalnifolius* que presenta citotoxicidad contra la leucemia (LLANES, 2009).

La familia *Euphorbiaceae* es rica en flavonoides, principalmente flavonas y flavonoles en forma de glicósidos y metilésteres (PASCUAL & CORREAL, 1992; SALAMANCA, 2000) (Figura 5).

Figura 5. Estructuras químicas de algunos flavonoides.



Fuente. Wikipedia, la enciclopedia libre

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos constituidos por dos anillos aromáticos conectados entre sí por una cadena de tres

átomos de carbón; se clasifican en función de su estructura química, donde se incluyen flavonoles, flavonas, flavanonas, catequinas e isoflavonas (LORENTE, 2003). La actividad biológica reportada para este grupo de compuestos es su capacidad antiinflamatoria, debida a propiedades antioxidantes para prevenir la formación de úlceras y facilitar su regeneración una vez se hayan instaurado; también presentan actividad antitumoral en la detención de las células en diferentes fases del ciclo celular (LLANES, 2009).

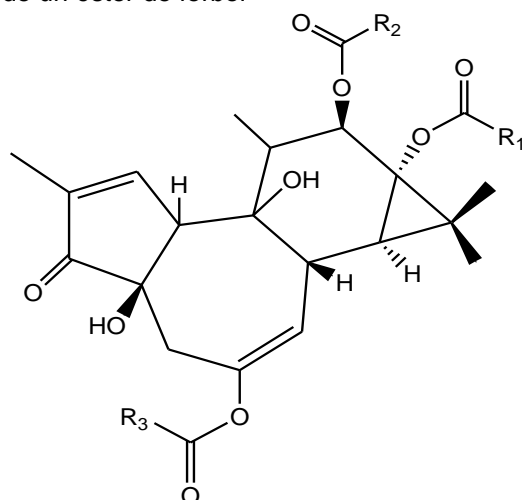
Las lectinas son otra clase de compuestos aislados de esta familia, que son glicoproteínas con afinidad por residuos de carbohidratos. Esta propiedad les da a algunas de estas moléculas capacidad aglutinante y/o la propiedad de activar células del sistema inmune al inducir un entrecruzamiento de sus receptores glicosilados de superficie. Por ejemplo, la lectina aislada del látex de *Euphorbia nerifolia*, induce aglutinación de todos los grupos sanguíneos humanos (LLANES, 2009). Los alcaloides no son comunes en las Euphorbiaceae.

2.3.2 Terpenoides presentes en las Euphorbiaceae. Los diterpenoides son compuestos tetra cíclicos, como los esteroides de forbol presentes en los látex de diferentes géneros de estas plantas, especialmente en *Crotón* y *Euphorbia*, son responsables del efecto irritante de la piel y de la actividad promotora del crecimiento de tumores *in vivo* y activan *in vitro* la transformación de células malignas, por lo que son conocidos como agentes carcinogénicos (FREITAS *et al.*, 1991, GONZÁLEZ, 2010).

En general, la mayoría de los diterpenos están presentes en resinas, látex y aceites, encargándose de hacer tóxicas o indigestibles a las plantas 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).

Los esteroides de forbol, exhiben un amplio rango de propiedades bioquímicas ya que inducen alteraciones en la morfología celular, mitosis en leucocitos y agregación plaquetaria (Figura 6).

Figura 6. Estructura base de un éster de forbol



Fuente. González 2010

2.3.3 Las *Euphorbia* en el control biológico de caracoles. El género *Euphorbia*, es el más grande de la familia *Euphorbiaceae* (con aproximadamente 1600 especies), algunas de sus especies son carcinogénicas o producen fuerte irritación en la piel llegando a ser tóxicas; tienen como característica un látex lechoso (SALAMANCA, 2000). Entre los principales compuestos químicos se han encontrado triterpenoides, flavonoides y alcaloides, pero también contienen cumarinas, glucósidos cianogénicos y taninos (SALAMANCA, 2000; BITTNER *et al.* 2001).

En medicina tradicional, diferentes especies de *Euphorbia* han sido utilizadas contra el asma, tumores, cáncer, bronquitis, infecciones de la piel y como antiinflamatorio. Por ejemplo *E. peplus*, es empleada en el tratamiento de cáncer de estómago, útero e hígado. Sin embargo, algunos extractos son tóxicos como el de las hojas de *E. tathyris*, que puede producir envenenamiento al ser ingerido o son irritantes como el látex de *E. tirucalli*, que puede ocasionar conjuntivitis aguda (SALATINO *et al.* 2007). El extracto acuoso de *E. hyrta* muestra actividad contra *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonasaeruginosa* y *Staphillococcus aureus* (ARANGO-ACOSTA *et al.* 2004). *Euphorbia splendens* y *Euphorbia lactea* tienen propiedades curativas contra “granos enconados” y otros problemas de la piel, principalmente para eliminar verrugas y mezquinos. *Euphorbia prostrata*, se emplea para “quemar” “nubes” en los ojos y otros problemas oculares y/o para problemas cutáneos y como purgante.

La actividad *molusquicida* de *Euphorbia*, ha sido evaluada en varias especies (Figura 7). En Sur América el país que más ha indagado al respecto es Brasil

obteniendo resultados promisorios con las especies investigadas. *Euphorbia pulcherrima*, *Euphorbia hyrta* y *Euphorbia splendens* (la “Corona de Cristo”), tienen actividad molusquicida en bajas dosis (0.5 mg/L), como lo demuestran los trabajos realizados por VASCONCELLOS & SCHALL, (1986); MÉNDEZ, *et al.*, (1997); SCHALL, *et al.*, (1998), en los que se reporta la acción letal del látex de *Euphorbia splendens* contra varios caracoles de las especies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea*, *B. pfeifferi*, *Bulinus sp* y *Lymnaea columella* con efecto en bajas concentraciones y la poca o ninguna toxicidad en las concentraciones utilizadas, presentando ventajas en términos de aplicación (VASCONCELLOS & AMORIM, 2003).

De algunas especies de *Euphorbia* estudiadas se aislaron los diterpenos llamados **miliaminas**, un potente molusquicida identificado hasta ahora responsable de la acción irritante (MATA *et al.*, 2001, BITTNER *et al.* 2001). Este grupo de compuestos se ha estudiado extensamente debido a su acción co-cancerígena. Que ocurren en varias otras especies de esta familia, especialmente en el género *Euphorbia* (MARSTON & HOSTETTMANN, 1985). Los miliaminas han sido probadas en *B. glabrata*, en un CL90 de 1 g/l, que muestra a ser 100 veces más fuerte que Niclosamida (ZANI *et al.* 1993). También se han reportado diferentes núcleos químicos con actividad molusquicida de tipo diterpeno, con núcleo jatropano, tigliano, forbol e ingenol principalmente (ARANGO-ACOSTA *et al.* 2004).

Figura 7. Algunas especies de *Euphorbia* con propiedad molusquicida



Euphorbia mili var. *Splendens*



Euphorbia pulcherrima Willd. Ex Klotzsch

Fuente. Arango-Acosta.2004

2.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Con el tamizaje fitoquímico se obtiene la caracterización de extractos vegetales mediante pruebas químicas que consisten en reacciones que producen la alteración rápida en la estructura molecular del compuesto, por ejemplo la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un producto o de un complejo, que origina un cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas; es posible entonces detectar la presencia de metabolitos como: Flavonoides, alcaloides, quinonas, esteroides, triterpenos, saponinas, taninos, etc. Cada uno de los anteriores núcleos mencionados contiene grupos funcionales característicos de sus estructuras químicas, por consiguiente es posible reconocerlos mediante reacciones coloridas, algunas de estas son: Lieberman, Dragendorf, Mayer, Vasler, reinekato de amonio, gelatina sal, hemólisis, Keller, cianidina, etc. (GONZÁLEZ, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad molusquicida en condiciones de laboratorio del látex de *Euphorbia laurifolia* (Euphorbiaceae), sobre caracoles del género *Lymnaea*, hospederos de trematodos de importancia en salud pública.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración efectiva (Dosis Letal – DL₅₀), para el control de caracoles hospederos de trematodos utilizando el látex de *Euphorbia laurifolia*.
- Realizar el tamizaje fitoquímico del látex total de *Euphorbia laurifolia* para las fracciones con mayor actividad biológica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 DESCRIPCIÓN DEL SITIO DE RECOLECCIÓN DE LOS MOLUSCOS

4.1.1 Localización. Los sitios de recolección específicos de los moluscos gasterópodos para los bioensayos se realiza en el municipio de Silvia (Cauca), el cual se encuentra ubicado al nordeste del departamento del Cauca, al sur occidente de Colombia entre los 2°47'37" y 2°31'24" de latitud norte y entre los 76°10'40" y 76°31'05" de longitud oeste del meridiano de Greenwich, sobre el flanco occidental de la cordillera central (Figura 8).

El municipio tiene una extensión aproximada de 662 km² y dista a 59 kms de la ciudad de Popayán por la vía panamericana que conduce hacia el norte del país, hasta el cruce de Piendamó. Su cabecera municipal está ubicada entre el río Piendamó y la quebrada Manchay (Plan de Ordenamiento Territorial-POT, 2001).

4.1.2 Clima. El municipio de Silvia posee un clima ecuatorial de montaña, sobre los pisos térmicos frío y de páramo entre 2.000 y 3.800 msnm, correspondiente a los pisos bioclimáticos según Cuatrecasas como sub andino, andino, alto andino y de páramo y a la zona de vida según Holdridge (1978), de bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB), la temperatura promedio es de 15°C y posee una precipitación media anual de 1.297 mm. En las zonas altas de ladera de la cordillera la humedad del ambiente es superior y las temperaturas bajas favorecen las abundantes precipitaciones, dando origen a la rica red hídrica del municipio representada por río, quebradas, riachuelos y lagunas (POT, 2001).

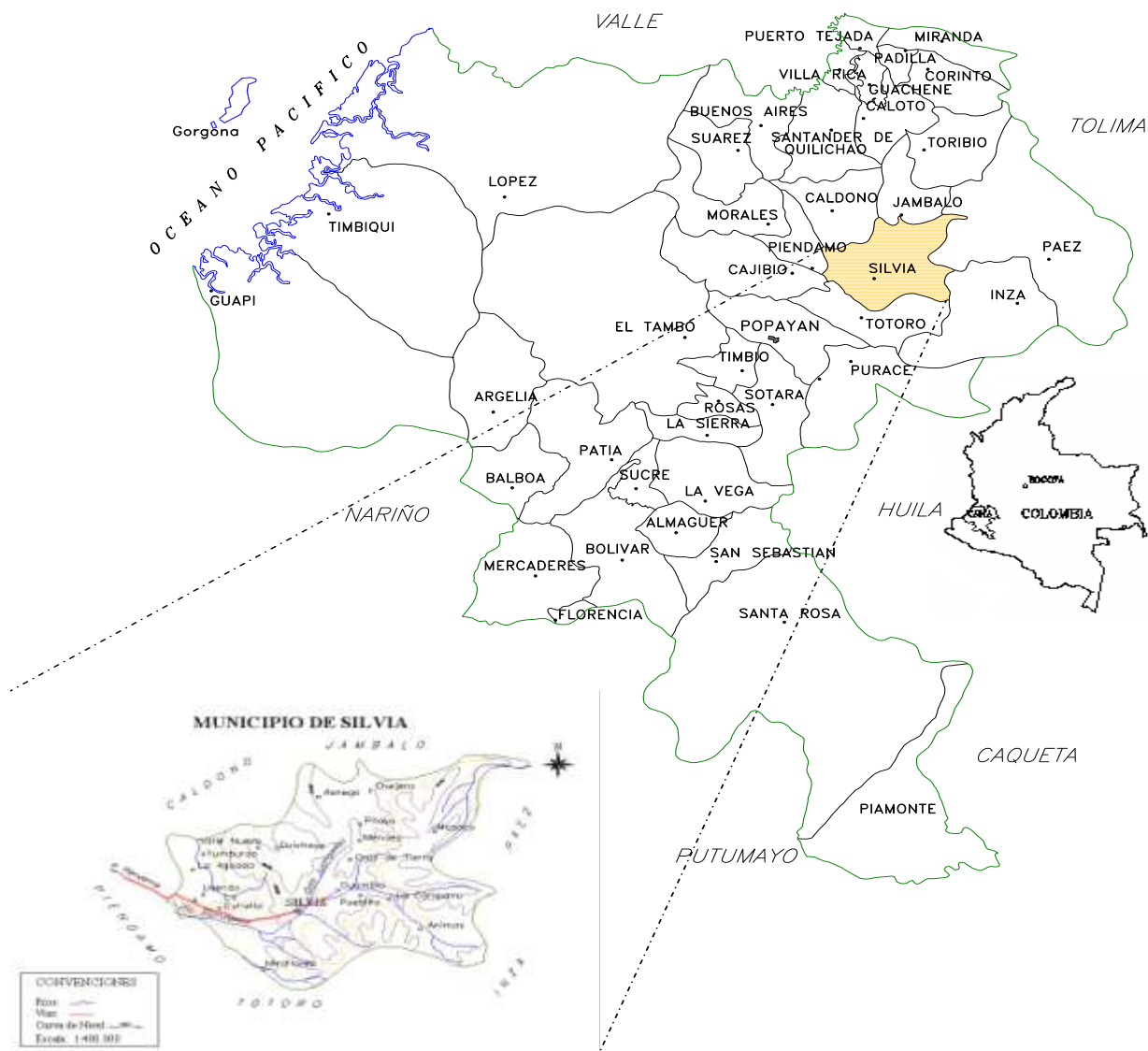
4.2 MÉTODOS DE CAMPO

4.2.1 Colecta y transporte de material biológico. Se ubicaron tres zonas de muestreo diferentes (Figura 9), donde se identificó previamente la presencia de los moluscos dulceacuícolas del género *Lymnaea*; con especial preferencia para la colecta la zona de la Quebrada Manchay. Los moluscos se muestrearon en las fuentes hídricas, utilizando redes de malla fina (nazas) o un cedazo con 20 cm de diámetro por 3 cm de profundidad, en piedras, palos, vegetación riparia, hojarasca y canales de desagüe de potreros.

Siguiendo las indicaciones de MALEK (1985), los moluscos extraídos en cada barrida fueron depositados en viales plásticos etiquetados con las indicaciones

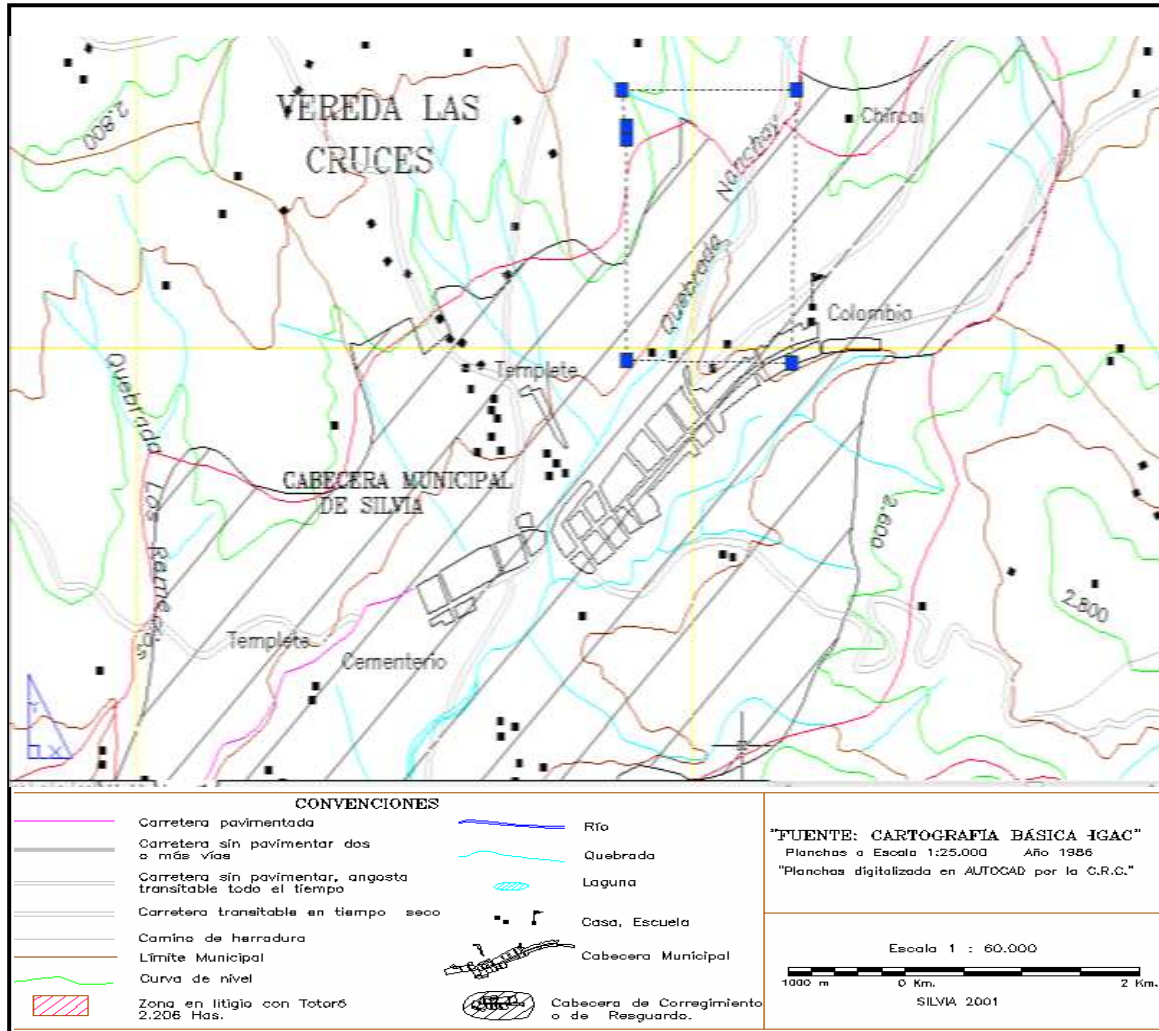
ecológicas y de localización de los sitios de muestreo, acondicionados con agua fresca y plantas del lugar; luego, las muestras fueron transportadas en recipientes con aislantes térmicos para evitar la variación de la temperatura, garantizando su supervivencia y así lograr realizar en el laboratorio el establecimiento del material colectado en ecosistemas artificiales.

Figura 8. Ubicación área de estudio



Fuente: Planeación Departamental Gobernación Del Cauca, 2009

Figura 9. Ubicación sitio recolección de moluscos



Fuente: Planeación Departamental Gobernación del Cauca 2009

4.3 MÉTODOS DE LABORATORIO

4.3.1 Identificación de especímenes. Para la identificación de los especímenes a utilizar se emplearon las guías taxonómicas de MALEK & CHENG (1974), MALEK (1985), y con la colaboración de la Mg. Luz Elena Velásquez del Instituto de Investigaciones PECET (Universidad de Antioquia).

Los moluscos colectados en campo fueron depositados en acuarios para mantenerlos en condiciones de laboratorio. Se colectaron específicamente

Gasterópodos del género *Lymnaea*, especies identificadas como principales transmisoras de *Fasciola hepatica*.

4.3.2 Establecimiento de colonia de caracoles en ecosistemas artificiales. El establecimiento de las colonias se realiza en el laboratorio, donde se colocan los caracoles en acuarios acondicionados con agua de clorada, a temperatura ambiente promedio, y con las condiciones adecuadas para su mantenimiento como sustrato lodoso estéril y aireación artificial.

4.3.3 Ensayos de actividad biológica. La preparación del látex se realiza mediante el método descrito por VASCONCELLOS & AMORIM (2003), y los lineamientos recomendados por el grupo de Compuesto Bioactivos del departamento de química de la Universidad del Cauca.

Las concentraciones usadas en los ensayos biológicos son preparadas del látex crudo (látex total), en sucesivas diluciones con agua destilada. Se hace la preparación de la solución madre con la cual se obtienen las concentraciones finales de 10, 5, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.4, 0.2 hasta 0,1 mg/L.

Los bioensayos para la determinación de la concentración letal (LC50) se realizan mediante tres series experimentales con 100 moluscos del género *Lymnaea* en cada prueba; los moluscos son expuestos al extracto acuoso del látex de *Euphorbia laurifolia*, a temperatura ambiente durante el tiempo total del ensayo. Para cada prueba, se utiliza un grupo control expuestos únicamente a agua destilada pura, sin látex.

Caracterización de la muerte de los caracoles. La muerte de los animales durante las pruebas es definida por la letalidad mostrada con el cambio en el color de la concha y la ausencia de contracciones musculares de la masa cefalopodal.

4.3.4 Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50). En términos generales un bioensayo puede ser definido como cualquier prueba que involucra organismos vivos, a su vez se puede señalar como cualquier método por medio del cual alguna propiedad de una sustancia o material, es medido en términos de la respuesta biológica que produce. Los datos obtenidos de un bioensayo no pueden ser analizados con la metodología estadística tradicional que se usa en los ensayos de campo sino que se debe utilizar lo que se llama estadística cuantil. La cual se caracteriza por la respuesta a un estímulo de n unidades experimentales, donde r unidades responden y $n - r$ no lo hacen.

Este procedimiento se llevó a cabo con el objetivo de evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como DL50 por dosis letal media. El periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas DL50, esto con el fin comparar y estimar la potencia relativa del estímulo².

Este estudio es de tipo experimental controlado el cálculo para encontrar la capacidad molusquicida de las fracciones obtenidas del látex o la concentración mínima letal (DL50) serán realizadas mediante un software que permita el empleo del Análisis Probit, el cual incluye la prueba de Chi cuadrado de Pearson (X²).

4.3.5 Análisis Fitoquímico. El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico, consistente en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación, es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación.

a. Fraccionamiento del látex de *E. laurifolia* por extracción sucesiva Líquido-Líquido y seguimiento de perfiles cromatográficos por cromatografía de capa delgada (CCD). Una vez encontrada la acción biológica molusquicida de *E. laurifolia*, se desarrolla el fraccionamiento del látex por extracción líquido-líquido que permite convenientemente la obtención de fracciones con diferentes polaridades, realizando un adecuado seguimiento por perfiles en CCD, para identificar los grupos de metabolitos de características estructurales más similares y mejor diferenciadas de resto de subfracciones.

b. Identificación de núcleos estructurales mediante tamizaje fitoquímico (Pruebas de precipitación y por cambio de Color). Con el tamizaje fitoquímico se obtiene la caracterización del látex utilizado, mediante pruebas químicas que consisten en reacciones que producen la alteración rápida en la estructura molecular del compuesto, por ejemplo la modificación de un grupo funcional, la apertura de un

²<http://www.monografias.com/trabajos14/dosis-letal/dosis-letal.dos>

sistema anular, la formación de un producto o de un complejo, que origina una manifestación de un cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, es posible entonces determinar la presencia de metabolitos como: Flavonoides, Alcaloides, Quinonas, Esteroides, Triterpenos, Saponinas, Taninos, etc. Cada uno de los anteriores núcleos mencionados contiene grupos funcionales característicos de sus estructuras químicas, por consiguiente es posible reconocer dichos núcleos mediante reacciones coloridas. Algunas de las reacciones a realizar son: LibermanBurschard, Dragendorf, Mayer, Vasler, Reikenato de amonio, Gelatina sal, Hemólisis, Keller, Cianidina (BILBAO, 2000; DOMÍNGUEZ, 1973).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE LOS MOLUSCOS UTILIZADOS

El municipio de Silvia se ubica según el sistema de clasificación de Holdridge, como Bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB), De acuerdo a estas características de temperatura, humedad y altura sobre el nivel del mar, las temperaturas bajas favorecen las abundantes precipitaciones dando origen a la rica red hídrica del municipio representada por río, quebradas, riachuelos, lagunas (POT, 2001).

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: Zona aledaña a la Quebrada Manchay.

Los Lymneidos colectados en esta zona corresponden específicamente a *Lymnaea columella*, los cuales se encontraron adheridos sobre las paredes o sobre el agua de los estanques, utilizados como bebederos para el ganado, lugares donde abunda *Nastartiumofficinale*; también son abundantes sobre el sustrato lodoso y canales de desagüe de los potreros que están sobre la margen de la carretera, zona de pantano, debido a que el molusco por ser anfibio prefiere el barro en lugar del agua libre y corriente (Figura 10, 11).

Figura 10. Tanque bebedero para el ganado



Fuente. Propia

Entre la vegetación ribereña sobresalen *Pennisetum clandestinum* (kikuyo), *Equisetum sp* (cola de caballo) y ***Nastartium officinale*** (berros) entre otros. La temperatura promedio del agua es de 14°C. La zona presenta un asiento de ganadería extensiva; aquí los moluscos se muestrearon adheridos a berros y sobre el sustrato arcilloso.

Figura 11. Pantano sobre la margen de la carretera



Fuente. Propia

Sitio 2: Puente Real

Zona de estanques para el criadero de trucha. Presenta vegetación principalmente herbácea, con alguna gramíneas, entre ellas *Nastartium officinale*(berros), *Eleocharis sp* (gramínea), *Eichhorniacrassipes*(buchón de agua) y *Pennisetum clandestinum* (Kikuyo).

Los lagos presentan canales de regadío que aportan agua a la zona. Los moluscos que aquí predominan es una especie no identificada de *Lymnaeae*, anteriormente nombrada como *Lymnaea truncatula* por LONGO (2004).

Con una temperatura hídrica promedio de 18°C, los caracoles *Lymnaea sp*, se muestrearon en los márgenes del lago, sobre zonas de desagüe de los estanques. Se encontraron sumergidos, adheridos sobre berros (*N.officinale*) principalmente y en el sustrato arcilloso sobre la pradera inundada con agua dulce de corriente lenta (Figura 12 y 13).

Figura 12. Zona de desagüe de los estanques piscícolas



Fuente.Propia

Figura 13. Planta de *Nastartium officinale* (berros)

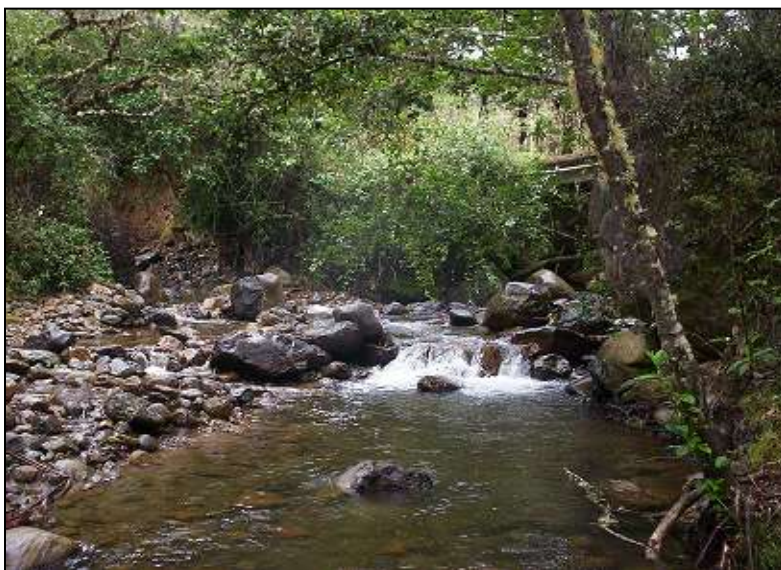


Fuente. Propia

Sitio 3: Río Agoyán

El sustrato del río es arenoso, presenta una temperatura promedio de 17°C. Los *Lymnaea* se encontraron adheridos a las piedras, en palos, en la vegetación riparia o sobre hojarasca sobre la margen del río y en charcas. De los especímenes colectados son principalmente *L. columella* (Figura 14).

Figura 14. Márgenes del río Agoyán



Fuente. Propia

Los especímenes seleccionados para cada prueba pertenecen a la especie *Lymnaea columella*, los cuales fueron identificados en el laboratorio de Moluscos Vectores del PECET-Universidad de Antioquia, basados en los caracteres macroscópicos y microscópicos de la concha y la masa visceral. Se identificaron por la apertura elongada, ovalada y dextrógira de la concha, ocupando alrededor de los dos tercios de la longitud total; la penúltima voluta voluminosa y expandida ocupando alrededor de la tercera parte de la longitud total y tentáculos cortos, anchos y triangulares (Figura 15).

Figura 15. *Lymnaea columella* utilizados en los ensayos biológicos



Fuente. Propia

Estos moluscos son anfibios que viven en barro húmedo o lugares de aguas poco profundas y no estancadas, se adaptan a condiciones de sequía penetrando en el barro, donde tanto el caracol como los estadios intermedarios disminuyen su actividad metabólica pudiendo sobrevivir varios meses para reaparecer cuando las condiciones les resulten favorables.

5.1.1 Establecimiento del ecosistema artificial de los *Lymneidos*. Los especímenes de *L. columella*, después de su colecta, son transportados en viales plásticos al laboratorio para el establecimiento de las colonias, para lo cual se adecuan acuarios con agua de clorada, sustrato lodoso estéril y aireación artificial; la temperatura promedio a la cual se mantienen es la del ambiente de 22-24°C (Figura 16).

Figura 16. Ecosistema artificial de *L. columella*



Fuente. Propia

Después del establecimiento del ecosistema artificial, a los 15 días se observan las primeras masas ovígeras, las cuales eclosionan 17 días después obteniendo como resultado los primeros ejemplares con un tamaño promedio de 1 mm de largo.

La limpieza del agua del ecosistema artificial se realiza tres veces por semana, previamente tratada con anticloro, para evitar la muerte de los caracoles; los moluscos *Lymnaea columella* son alimentados libremente con *Nastartium officinale* (berros), planta propia del micro hábitat de *Lymnaea* o con hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.), previamente lavada con abundante agua antes de aprovisionarla como alimento, exceptuando en la fase de experimentación.

5.2 ENSAYO BIOLÓGICO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN LETAL (DL 50)

5.2.1 Colecta del material vegetal. La investigación se realiza con el látex obtenido de la especie *Euphorbia laurifolia*, perteneciente a la familia de las Euphorbiaceae, colectada en zona rural del municipio de Popayán (Cauca), a la altura del kilómetro 5 por la vía Popayán-Huila. Muestras de la planta fueron identificadas en el Herbario del Departamento de Botánica de la Universidad del Cauca.

El látex es recogido a partir de plantas adultas, en perfecto estado de desarrollo, a simple vista son plantas sanas, sin exposición a plagas o insecticidas o cualquier otra sustancia química de acción biológica tóxica. La obtención se hizo realizando cortes profundos a lo largo del tallo de la planta, colectando el látex directamente en recipientes de vidrio (Figura 17).

Las muestras del látex fueron dirigidas al laboratorio de biología de la Universidad del Cauca para la preparación y posteriores bioensayos de la capacidad molusquicida.

Figura 17. Extracción del látex de *Euphorbia laurifolia*



Fuente. Propia

Euphorbia laurifolia es una planta característica de los valles interandinos, se presenta como arbustos o árboles con presencia de un látex lechoso. Tiene hojas glabras, estípulas ausentes. Inflorescencia sin ciatio formado de cinco lóbulos carnosos alternando con glándulas y con brácteas, con numerosas flores masculinas rodeando una flor femenina central. Flores masculinas caducas, en cimas 4-5, pecado perianto, sin estambre con antera ditecal, divergente, globosa. Flor femenina pecado perianto, un óvulo en cada lóculo, 3 Estilos bifurcados en el ápice del ovario, fruto tricoco. El látex se emplea comúnmente para curar verrugas de la Piel.

Esta especie se encuentra en estado silvestre y es conocida en la región Caucana como “lechero”, comúnmente usada en las fincas para la construcción de cercas viva; su cultivo es simple, lo cual no requiere de agua frecuente o la aplicación de pesticidas o fertilizantes. (Figura 18).

Figura 18. Arbustos de *Euphorbia laurifolia*



Fuente. Propia

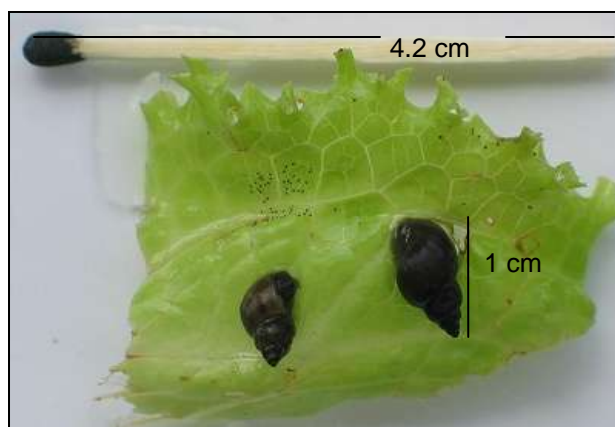
5.2.2 Bioensayos.

Preparación de la solución acuosa del látex de *Euphorbia laurifolia* -La colecta de las muestras del látex 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.

Con el látex total de *E. laurifolia* se prepararon sucesivas diluciones en un balón volumétrico, utilizando 1 gr del látex puro se lleva hasta 1000 ml con agua destilada, lo que permitió obtener una solución madre de una concentración de 1000 mg/L. A partir de la solución madre se prepararon las concentraciones finales de 10, 5, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.4, 0.2 hasta 0,1 mg/L para utilizar en los bioensayos.

Período de exposición - Siguiendo el método descrito por VASCONCELLOS & AMORIM (2003), se ensayaron las diferentes diluciones correspondientes a 10, 5, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.4, 0.2 hasta 0,1 mg/L, colocadas simultáneamente con un grupo control (solo con agua destilada), durante 24 horas. Los bioensayos se realizaron en vasos de precipitado de 500 ml de capacidad en los que se colocaron 500 ml de cada una de las diluciones. Se utilizaron 10 caracoles por recipiente, adultos de la especie *Lymnaea columella* con edades comprendidas entre 60 y 80 días cuando alcanzan la madurez sexual; en total se analizaron 330 caracoles. Los especímenes utilizados midieron entre 5 y 10 mm de longitud de la concha (Figura 19).

Figura 19. Tamaño de los moluscos *L. columella* utilizados en los bioensayos



Fuente. Propia

Cada recipiente se cubrió con tela enmallada sostenida por una banda elástica. Las observaciones de mortalidad se llevaron a cabo a las 24 horas con períodos alternados de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, periodo de exposición sin manipulación adicional de los animales. Durante todo el tiempo de exposición de las muestras biológicas a las diferentes concentraciones, se mantuvieron temperatura ambiente, aproximadamente entre 21 y 23 °C. Para cada dilución utilizada se realizaron tres (3) ensayos con sus respectivos controles en agua destilada. Figura 20.

Figura 20. Exposición de *L. columella* en las diferentes concentraciones



Fuente. Propia

Al final de cada experimento, los caracoles se retiraron de las diluciones en el extracto acuoso del látex, se enjuagaron con abundante agua destilada para la eliminación de los residuos de la solución y así poder contabilizar los animales muertos y vivos. La identificación de los moluscos muertos se hizo con base en la inmovilidad de los especímenes y el color de las partes blandas.

5.2.3 Tratamiento de datos.Cálculo de la relación Dosis-efecto. La Dosis letal media (DL50), es el parámetro más ampliamente utilizado para medir la toxicidad de un compuesto, en un periodo de tiempo sobre una especie determinada.

En la Tabla 1. Se presentan los resultados obtenidos a partir de los bioensayos de la actividad biológica con los extractos acuosos del látex de *Euphorbia laurifolia*, sobre moluscos de la especie *Lymnaeacolumella*. El número de individuos por dilución en cada experimento fue de 10. A continuación se detalla el número de individuos que sobrevivieron por ensayo, entre paréntesis se indica el porcentaje.

Tabla 1. Actividad biológica del látex total de *E. laurifolia* sobre *L. columella*

Concentración (mg/L)	Número de supervivientes (%de supervivencia)*		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Grupo control	10 (100)	10 (100)	9 (90)
0.1	10 (100)	9 (90)	8 (80)
0.2	9 (90)	9 (90)	10 (100)
0.4	10 (100)	10 (100)	8 (80)
0.8	7 (70)	9 (90)	7(70)
1.0	6 (60)	7 (70)	7 (70)
1.5	4 (40)	3 (30)	4 (40)
2.0	0 (0)	1 (10)	0 (0)
2.5	1 (10)	0 (0)	1 (100)
5.0	0 (0)	0 (0)	0 (100)
10	0 (0)	0 (0)	0 (100)

* %Supervivencia= No. Individuos sobrevivientes x 100% / No. Total de individuos

En los moluscos colocados en agua destilada (grupo control), se registró un (1) caracol muerto, el cual quizá no estuvo en óptimas condiciones para la experimentación. Debido a la presencia de este caracol muerto, se hizo la corrección de las mortalidades mediante la fórmula de Abbott.

La fórmula de esta corrección es la siguiente:

$$\%M = \left(1 - \frac{n \text{ en T después de tratamiento}}{n \text{ en Co después de tratamiento}} \right) * 100$$

Dónde:

M = Mortalidad. n = número de individuos
T = tratados Co = control

En la Tabla 2, se registran los datos de mortalidad corregidos y agrupados de los tres (3) bioensayos realizados, prueba inicial y replicas. Los datos obtenidos fueron procesados por el programa de Hans Dahnert (1992), con un intervalo de confianza del 95%. Se calculó la dosis letal (DL50) en un periodo de 24 horas, para un total de 30 moluscos por concentración.

Tabla 2. Mortalidad de *L. columella* expuestos por 24 horas a diferentes concentraciones acuosas del látex natural de *E.laurifolia*

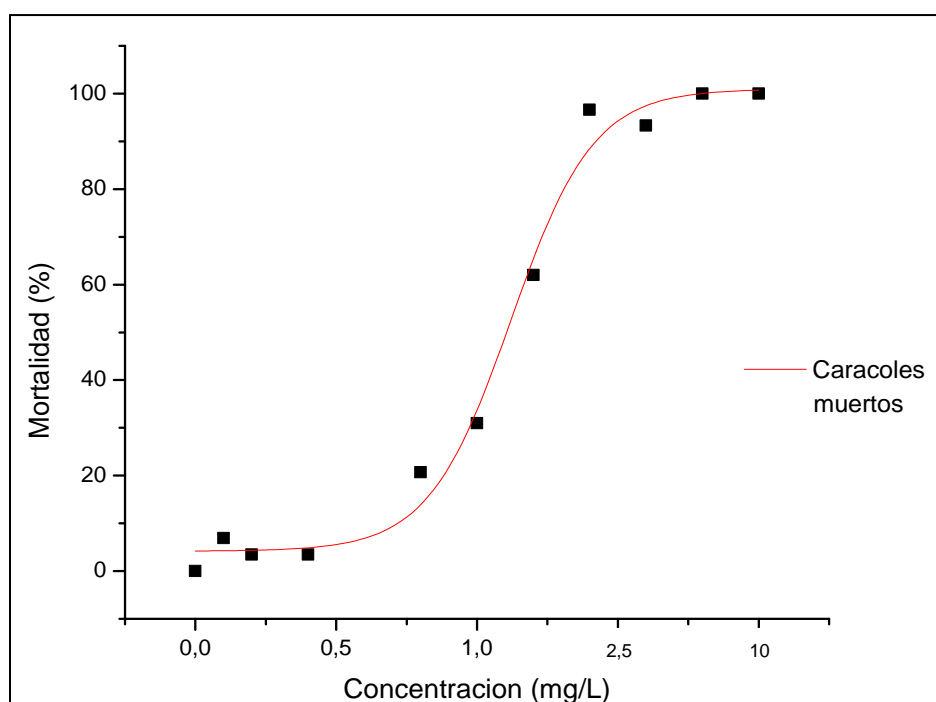
Concentración (mg/L)	Mortalidad (%)	
	Caracoles expuestos	Caracoles muertos
Grupo control	30	0 (0)
0.1	30	3 (6.90)
0.2	30	2 (3.45)
0.4	30	2 (3.45)
0.8	30	7 (20.7)
1.0	30	10 (31.0)
1.5	30	19 (62.0)
2.0	30	29 (96.6)
2.5	30	28 (93.3)
5.0	30	30 (100)
10	30	30 (100)
LD50	0.964	
Intervalo de Confianza del 95%	0.947 – 0981	

La mortalidad de los caracoles *Lymnaea columella* fue usada como un bioensayo, en condiciones de laboratorio, para monitorear la actividad molusquicida. En la Figura 21 se presenta el efecto del extracto acuoso de *Euphorbia laurifolia* sobre los caracoles en estudio.

Para determinar el efecto que producen los diferentes compuestos químicos de *E. laurifolia* sobre los individuos de *L. columella*, fue necesario seleccionar los organismos utilizados en el bioensayo, los cuales se mantuvieron en adaptación durante un periodo de tiempo de tres meses, con el fin de identificar y separar nuevos ejemplares a los cuales se les iba a suministrar la dosis letal del látex. Este procedimiento se realizó para garantizar su buena condición y comprobar que los moluscos no hayan sufrido daños durante el transporte ni por el cambio de las condiciones ambientales.

Los resultados observados en la experimentación y mostrados en la Figura 21, indican que el extracto acuoso del látex de *Euphorbia laurifolia* produce mortalidad en los moluscos en cada una de las concentraciones, se produce un gran aumento en la mortalidad de los caracoles con un aumento relativamente pequeño en la concentración de la sustancia tóxica. Es claro que el látex de *Euphorbia laurifolia* tiene excelentes propiedades molusquicidas contra *Lymnaea columella*, siendo los compuestos activos de la planta, al parecer, muy efectivos contra la especie de molusco a controlar.

Figura 21. Mortalidad de *L. columella* a las 24 horas de exposición por la acción del látex de *E. laurifolia* (n=30 por dilución).



Pasados 5 a 10 minutos después de iniciada la exposición de los moluscos al látex, aparece un cambio en el comportamiento, observándose un agitado desplazamiento de escape de los moluscos encada una de las concentraciones a la que fueron expuestos, con mayor agitación a partir de las concentraciones de 0.8mg/L. Se observa 30 minutos después que hubo un periodo de hiperactividad durante el cual, los moluscos se movieron rápidamente con lo que se aprecia una intensa producción de moco en ellos. Este movimiento de escape se asocia a las fuertes propiedades tóxicas e irritantes del molusquicida, quizá se muestra un intento de los caracoles de huir de un entorno cuyas condiciones amenazan su supervivencia. Después de algún tiempo ellos empiezan una marcha lenta.

En los ensayos expuestos las concentraciones de 5.0 y 10 mg/L, no hubo la posibilidad de que los moluscos presentaran el mismo comportamiento de escape, debido a que las soluciones son demasiado fuertemente tóxicas haciendo que se produzca una alta mortalidad de forma inmediata. Los moluscos que estuvieron en agua destilada como grupo control, no presentaron este comportamiento de huida, mostrando un comportamiento similar al de los acuarios donde se criaron.

La mortalidad comenzó a ocurrir desde las concentraciones de 0,1 mg/L, hasta las concentraciones más altas de 5 mg/L y 10 mg/L, donde ya no hubo sobrevivientes, es posible que a estas concentraciones puedan aparecer lesiones en los órganos de *L. columella*, por lo que sería importante esclarecer la acción fisiológica del látex sobre la especie estudiada siendo un aspecto interesante de profundizar en estudios futuros. La dosis letal 50 (DL50) fue de 0,964 mg/L (en 24 horas).

Después de la exposición al molusquicida, los caracoles se retraen en su concha y su movilidad se observa reducida; probablemente, esta respuesta se debe a un alto nivel de intoxicación que afecta la capacidad de movimiento, desencadenando en los moluscos procesos de estrés fisiológico que provocan convulsiones, parálisis pudiendo inmovilizar el animal y finalmente la muerte de los caracoles; sin embargo, anterior a esto el cuerpo es completamente desprendido del interior de su concha, lo que indica el envenenamiento. Pasadas 24 horas después de la experimentación, son enjuagados con abundante agua destilada y algunos de los caracoles colocados en las dosis más bajas regresaron a un comportamiento normal.

JURBERG, *et al.*, (1995), encontraron que el comportamiento de dejar el agua se observa con menor frecuencia cuando los caracoles son expuestos a concentraciones más cercanas a las dosis letales; ellos también observaron que los caracoles expuestos al molusquicida químico *niclosamida*, se encontraron fuera del agua en todas las concentraciones, indicando la alta repelencia del molusquicida incluso a bajas concentraciones. En este estudio, la respuesta de escape se presentó cuando los caracoles se mantuvieron en concentraciones alrededor de la dosis letal (LD 50 = 0.964 mg/L); comportamiento que posiblemente les favoreció la supervivencia.

La acción letal del extracto acuoso del látex de *Euphorbia laurifolia*, sometido a ensayo en condiciones de laboratorio, tiene una alta actividad molusquicida similar a los molusquicidas sintéticos como carbamatos y organofosforados, además considerando que la WHO plantea que un buen molusquicida de origen vegetal debe ser letal a una concentración de menos de 20 mg/L (MOTT, 1987). En la literatura sólo 20 especies de plantas entre las 1.426 especies probadas muestran dosis letales por debajo de este valor recomendado (MOTT, 1987). En este sentido *E. laurifolia* tiene muy buenas posibilidades para ser considerado como un

excelente molusquicida, por lo que se deben realizar investigaciones de la posibilidad de ser utilizado en campo.

La concentración de la dosis letal de los bioensayos ($DL_{90}=0,55$ mg/L), reportadas por VASCONCELLOS & AMORIM (2003a,b), en condiciones de laboratorio de los extractos de *Euphorbiasplendens* var. *hisloppi*, con actividad molusquicida contra *Lymnaea columella*, se encuentran en un rango similar con los resultados arrojados en el presente estudio; sin embargo se resalta que *Euphorbia laurifolia* es una planta con una amplia distribución geográfica en nuestro departamento, de fácil cultivo en comparación con *Euphorbia splendens*, por lo que se considera que tiene un amplio potencial para el uso como molusquicida contra *Lymnaea*. Se recomienda continuar investigando sobre este extracto para determinar su acción sobre los moluscos en condiciones naturales, así como sobre otros organismos acuáticos. Cabe destacar que el trabajo de campo se debe realizar con el fin de evaluar los efectos tóxicos y la variación de las propiedades molusquicidas temporal y espacialmente de los extractos.

Se conoce que las medidas de control sobre los hospederos intermediarios pueden ser químicas, físicas o biológicas; sin embargo, el uso de derivados vegetales con actividad molusquicida probablemente provocan menos daños al medio ambiente y así evitar el uso de sustancias químicas, las cuales perjudican los ecosistemas, considerando que hay dos problemas fundamentales ante el uso de molusquicidas sintéticos: su alto costo y la toxicidad inespecífica, por lo que se eleva el interés sobre la acción molusquicida con la utilización de sustancias naturales extraídas de plantas, además, tienen bajo costo, pues la materia prima se obtiene en la región.

Los molusquicidas químicos tales como sulfato, cloruro de cobre y niclosamida ($LC_{50}= 11,8$ mg/L) (Singh D.K, 2004), se sabe que tienen un fuerte efecto letal sobre las especies de moluscos; sin embargo, se ha observado que estos molusquicidas son tóxicos para la biota acompañante y tienen un efecto perjudicial a largo plazo en el medio acuático. JURBERG, *et al.*, (1995), indica que los compuestos vegetales no persisten mucho tiempo en el medio y que sus parámetros farmacocinéticos los hacen muy poco tóxicos a organismos superiores.

Varios productos vegetales con actividad molusquicida contra el género *Lymnaea* han sido reportados. Según BAPTISTA *et al* (1994), los compuestos activos de *Phytolaccadodecandra* (Endod), *Jatropha curcas*, *Ambrosia* sp, *Anarcadium occidentale* (KLOOS & MCCULLOUGH 1987, JURBERG *et al.*, 1995), *Euphorbiasplendens* var. *Hislopii* (VASCONCELLOS y SCHALL 1986); han sido las

especies de plantas más evaluadas por la actividad que presentan, mostrando un alto potencial molusquicida. A partir del látex de *Euphorbiamillii* var. *Hislopii*, se aislaron ocho miliaminas, que son diterpenos las cuales son el principio activo tóxico de la planta (ZANI *et al.* 1993).

De la familia Compositae CRUZ-REYES (1989), probaron el jugo proveniente de *Piquieriatrinervia* sobre *Lymnaeacubensis* de México y *Pseudosuccineacolumella* de Brasil con una elevada mortalidad a las 24 horas sin recuperación, mientras que VASCONCELLOS *et al.*(2002), brindan importantes resultados probando el extracto acuoso de *Euphorbiasplendens* var. *Hislopiicon* resultados alentadores sobre *Lymnaea columella*, cuya actividad biológica pudiera deberse a la presencia de saponinas, las que han sido descritas con una notable acción molusquicida. En algunos miembros de la familia Meliaceae se han aislado y caracterizado con una amplia acción plaguicida por los terpenoides que posee.

Por otro lado el conocimiento sobre la real distribución de las poblaciones de moluscos *Lymnaea*, es de vital importancia para las acciones de prevención y sobre todo a la hora de introducir alguna estrategia de control resulta muy importante conocer los sitios de existencia de los moluscos para así lograr diseñar e implementar estrategias que contribuyan realmente a disminuir la incidencia de las parasitosis por ellos transmitidas.

LONGO (2004) y FERNÁNDEZ (2011), indicaron que La especie *Lymnaea columella*, se encuentra en la mayoría de los ecosistemas donde la actividad ganadera es elevada, se registra principalmente en los municipio de Silvia, Totoró y Coconuco (Cauca), como el principal hospedero intermediario de *Fasciola hepatica*. Sin embargo, la fasciolosis en sentido general y sobre todo en nuestro país, no ha recibido una importante atención, en donde esta patología tiene una marcada influencia que puede favorecer el incremento del riesgo en las zonas ganaderas de clima frío.

Es importante señalar que el control de los moluscos vectores sigue siendo uno de las estrategias más viables para tratar esta parasitosis, esto es particularmente relevante en las zonas donde la falta de conocimiento del problema, asociado a prácticas inadecuadas en el manejo de los potreros hacen que se siga observando una alta prevalencia de ganado infectado por *Fasciola hepatica* y se continúe con el decomiso de hígados en los mataderos, produciendo pérdidas representativas para los ganaderos de la región.

Los resultados del presente estudio con el látex natural de *E. laurifolia* demuestran una dosis eficaz letal de 0,96 mg/L para *Lymnaea columella*, lo que puede abrir posibilidades para su uso cuando se tiene en cuenta 1) la alta prevalencia de *Fasciola hepatica* en el departamento del Cauca, especialmente en las regiones ganaderas de clima frío (20-25%) (LONGO, 2010), y 2) el hecho de que la planta utilizada se encuentra fácilmente disponible, presente como arbustos del sotobosque o empleada en la construcción de cercas vivas en las fincas ganaderas de la región. Esto indica que para adelantar proyectos tendientes a un control de la población de *L. columella*, se podría pensar en aplicaciones con concentraciones bajas en mg/L del extracto vegetal de *E. laurifolia*, como bioplaguicida, lo que se traduciría en un ahorro de dinero en la actividad ganadera; así, el cultivo, la extracción y la aplicación por las comunidades de las zonas afectadas es factible.

Sin embargo, se considera necesario llevar a cabo una evaluación toxicológica posterior del látex de *E. laurifolia* en otras especies menores de la biota circundante, para observar mejor las relaciones de dosis-respuesta del látex como molusquicida, según lo recomendado por la OMS (MOTT, 1987). Diferentes estudios realizados con el género *Euphorbia* indican que las soluciones acuosas de látex no son irritantes para la piel de los conejos a concentraciones de menos de 0,5% y a los ojos de conejos en concentraciones inferiores a 0,35% (FREITAS, *et al.*, 1991). Además, no hay reportes de efectos embriotóxicos, ni citotóxico observado con la utilización del látex de estas plantas y tampoco ningún efecto mutagénico.

En conclusión se deben realizar estudios *in vivo* para establecer la posibilidad de utilizar látex en condiciones de campo. Vasconcellos (2004), ha demostrado una fotodegradación del látex de *E. splendens*, que evita los efectos acumulativos, y cuyos resultados obtenidos como molusquicida confirman la acción del látex en un ambiente natural.

5.3 ANÁLISIS FITOQUÍMICO

5.3.1 Fraccionamiento del látex por extracción sucesiva líquido-líquido. En el laboratorio de Química de Compuestos Bioactivos de la Universidad del Cauca, se desarrolló el fraccionamiento del látex total de *E. laurifolia*, por extracción líquido-líquido utilizando como solvente acetato de etilo (AcOEt), el cual permitió la obtención de una fracción que contiene los metabolitos secundarios constituyentes del látex.

Con el fraccionamiento se obtuvo un precipitado blanco (PB), o fracción insoluble en AcOEt que se depositó en el fondo del embudo de decantación, y una fracción soluble en AcOEt, o extracto de color verde amarillo (EVA), la cual se deposita en la parte superior del embudo de decantación. Figura 22. Estas son las fracciones con las cuales se desarrolla el seguimiento por perfiles en cromatografía de capa delgada (C.C.D).

Figura 22. Extracción Líquido-Líquido



Fuente: propia

5.3.2 Tamizaje Fitoquímico: Seguimiento de perfiles cromatográficos por C.C.D. Pruebas de precipitación y por cambio de color.

Las pruebas de precipitación y por cambio de color tienen una alta especificidad cualitativa, capaz de determinar una amplia gama de metabolitos secundarios presentes en el látex de *Euphorbia laurifolia*.

Para el desarrollo del tamizaje, inicialmente se experimenta con diferentes sistemas de elusión, buscando el adecuado, en el cual el látex se eluye mediante Cromatografía de Capa Delgada (CCD), en sílica gel y eluentes como mezclas de los solventes n-hexano-acetona-acetato de etilo (AcOEt), con variación de la polaridad según el aumento o disminución en la proporción de los solventes en cada sistema empleado hasta obtener el mejor sistema de elusión 10:1:2 denominado H. Ver Tabla 3, Figura 23. Este sistema de elusión fue escogido por la mejor resolución de bandas en la cromatografía.

Tabla 3. Sistema de elusión

Sistema	Hexano (ml)	Acetona (ml)	AcOEt (ml)
A	10	4	0
B	10	2	0
C	10	3	0
D	5	5	0
E	10	10	0
F	10	0	3
G	10		1
H	10	1	2

Figura 23. Placa cromatografía con el mejor sistema de elusión



1 2 3

1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del látex
 2= extracto verde amarillo (EVA), ó fracción soluble en AcOEt.
 3= extracto total (ET), Látex total.

Se observó que hubo una mejor resolución en la fracción(EVA), mostrada en el embudo de decantación en la parte superior, y se eligió el sistema de elusión **H** de la tabla 5, para el desarrollo de la detección de los núcleos fitoquímicos.

Cada placa cromatográfica obtenida se reveló con reactivos de identificación por cambio de color mediante aspersion del reactivo, lo que permitió la detección preliminar de algunos de los metabolitos constituyentes del látex (GONZÁLEZ, 2010).

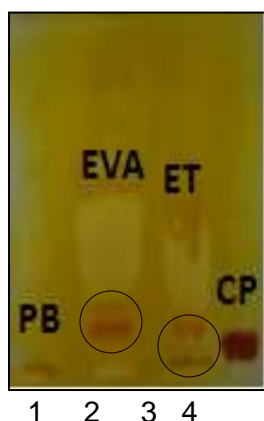
A. Detección dealcaloides- Prueba de Dragendorff

Los alcaloides son compuestos básicos nitrogenados, su presencia en el látex se detectó cuando al adicionar el reactivo gota a gota se observan manchas rojo

naranja sobre el fondo de la cromatoplaaca, lo cual es considerado como prueba positiva.

La prueba de Dragendorff se utilizó en la fracción precipitado blanco (PB) o fracción inferior, en la fracción extracto verde amarillo (EVA) o fracción superior y en el extracto total (ET) o extracto sin fraccionar. Como control positivo (CP) se utilizó el alcaloide Papaverina. Ver Figura 24.

Figura 24. Detección de compuestos nitrogenados. Dragendorff



- 1= precipitado blanco (PB), o fracción insoluble en AcOEt.
- 2= extracto verde amarillo (EVA), ó fracción soluble en AcOEt.
- 3= extracto total (ET), Látex total.
- 4= Control positivo.

En la fracción EVA y ET se detectaron dos bandas de elusión, las cuales revelaron color naranja frente al reactivo de Dragendorff, Figura 24, lo que permitió considerar la presencia del núcleo estructural alcaloide o compuestos nitrogenados, dentro de los metabolitos constituyentes del látex de *E. laurifolia*. Con el sistema de elusión empleado Hexano-Acetona-AcOEt (10:2:1), los alcaloides revelados son los metabolitos de mayor polaridad presentes en la fracción EVA.

B. Detección de esteroides y terpenos - Prueba de Liebermann-Burchard

Los esteroides se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos mediante el ensayo de Liebermann-Burchard. En esta prueba, a una solución clorofórmica de la muestra que se analiza, se le agrega un volumen igual de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado (98%). Gota a gota se añade este reactivo a la muestra o solución clorofórmica.

En la detección del núcleo estructural propio de esteroides, terpenos y similares, si existe la presencia de formación de manchas verde, rojo, violeta, anaranjado o

amarillo fluorescente los que cambian con el tiempo, la prueba es tomada como prueba positiva. Figura 25. Se utilizó el compuesto Estigmasterol como control positivo.

Figura 25. Detección positiva de terpenos y similares. Liebermann-Burchard



1 2 3 4

- 1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del Látex.
- 2= extracto verde amarillo (EVA), ó fracción soluble en AcOEt.
- 3= extracto total (ET), Látex total.
- 4= Control positivo.

En esta prueba se obtuvo un resultado positivo, donde se aprecia un revelado de color rojo y amarillo tenue en la mayoría de bandas de elusión de la cromatoplaqa. Se considera que los sistemas PB, EVA, ET, están constituidos principalmente por compuestos de núcleo tipo terpénicos.

C. Detección de esteroides- Prueba de Anisaldehido- H_2SO_4

Detecta también el núcleo estructural terpénico. La presencia de manchas verde-rojo-amarillo-purpura, fluorescentes se considera como prueba positiva. Se utilizó como control positivo el compuesto Hecogenina. Figura 26.

Figura 26. Detección positiva de esteroides y terpenos. Anisaldehido



1 2 3 4

- 1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del Látex.
- 2= extracto verde amarillo (EVA), ó fracción soluble en AcOEt.
- 3= extracto total (ET), Látex total.
- 4= Control positivo.

En el revelado de la cromatoplaque se obtuvo, luego de someterla a calentamiento, que la mayoría de las bandas en las fracciones eluidas tomaron un color azul, el cual gradualmente cambio a púrpura intenso y algunas bandas tomaron coloración verde, rojo.

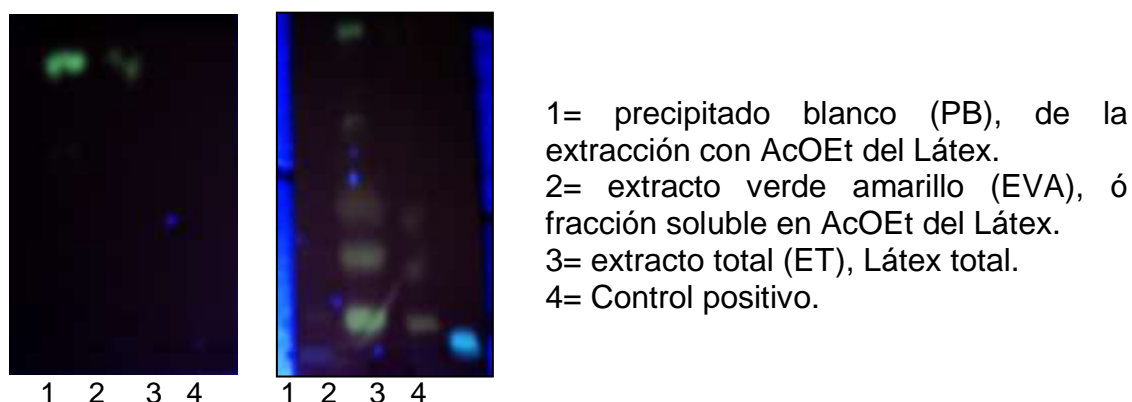
D. Detección de flavonoides - Prueba de tricloruro de aluminio (AlCl_3)

Los flavonoides pueden detectarse en una cromatografía en capa delgada por el color que desarrollan en el espectro Visible (Vis) o en Ultravioleta (UV), debido a la relación que existen entre los colores y la posible estructura del flavonoide.

Bajo luz UV-365 nm los flavonoides fluorescen, dependiendo del tipo de estructura, ya sea de color amarillo, azul o verde. En esta prueba se detectó la presencia de flavonoides por la fluorescencia color amarillo bajo luz de longitud de onda larga de 360nm. Se utilizó como control positivo, Quercitina. Figura 27.

Se obtuvo un resultado positivo, solo en las fracciones EVA y ET, en las cuales se observa luego del revelado con AlCl_3 , la fluorescencia de algunas bandas a lo largo de la cromatoplaque.

Figura 27. Fluorescencia antes y luego de la prueba. Tricloruro de aluminio



E. Detección de saponinas - Prueba de $\text{NH}_4\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$

Las saponinas son metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en las plantas superiores, en las que se presentan en forma de glucósidos (combinación de azúcares y agliconas osapogeninas), que están presentes en gran diversidad de plantas y se caracterizan por su capacidad para formar una espuma estable y abundante en soluciones acuosas.

La presencia de manchas rojas, amarillas fluorescentes, sobre el fondo de la cromatoplaca se considera como prueba positiva. Figura 28.

Figura 28. Prueba positiva en la detección de Saponinas. $\text{NH}_4\text{SO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$



- 1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del Látex.
- 2= extracto verde amarillo (EVA), ó fracción soluble en AcOEt del Látex.
- 3= extracto total (ET), Látex total.
- 4= Control positivo.

F. Detección de fenoles y taninos - Prueba de FeCl_3 :

La reacción con cloruro férrico, implica presencia de taninos y compuestos fenólicos. La presencia de manchas azul oscuro sobre el fondo de la cromatoplaca es considerado como prueba positiva. En este caso la prueba fue negativa para todas las muestras, solo se observa coloración en el control positivo. Figura 29.

Figura 29. Prueba negativa para detección de taninos. FeCl_3



- 1= precipitado blanco (PB), de la extracción con AcOEt del Látex.
- 2= extracto verde amarillo (EVA), ó fracción soluble en AcOEt del Látex.
- 3= extracto total (ET), Látex total.
- 4= Control positivo.

Debido a que los metabolitos secundarios producidos por las plantas son de gran interés por su amplia diversidad funcional, el tamizaje fitoquímico, mediante la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y por precipitación, constituyó una de las etapas iniciales de la investigación sobre el látex de *Euphorbia laurifolia*, permitiendo determinar cualitativamente los

principales grupos químicos presentes en ella para así orientar, en un futuro la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

Bioquímicamente, la familia *Euphorbiaceae* es muy diversificada y ha mostrado tener un gran potencial como fuente de moléculas bioactivas interesantes, entre las que se encuentran terpenoides, flavonoides, taninos, lignanos y otros compuestos polifenólicos, cumarinas, lectinas, glicósidoscianogénicos, ácidos grasos, glucosinolatos y péptidos, los cuales presentan un rango de actividad biológica que incluye inducción tumoral y proliferación celular, activación, inflamación epidérmica y estimulación o degradación de neutrófilos (PASCUAL & CORREAL, 1992; SALAMANCA, 2000; LLANES, 2009).

Las especies de la familia *Euphorbiaceae* son especialmente ricas en compuestos terpenoides, los cuales representan la mayor diversidad de clases de metabolitos secundarios (GONZÁLEZ, 2010). En las que 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 antibacteriana, anti-cancerígena, anti-parasitaria, anti-viral, anti-inflamatoria y actividad analgésica los cuales han sido aislados principalmente de diferentes especies de *Euphorbia*.

Los estudios químicos y de actividad biológica del género *Euphorbia* está en progreso, el cual ha llamado más la atención y ha sido estudiado por su contenido en diterpenos biológicamente activos (BITTNER *et al.* 2001). Ha sido motivo de estudios fitoquímicos, debido principalmente a las posibilidades terapéuticas que han podido ser identificadas en estas plantas. Algunos estudios como los realizados por ÁVILA *et al.* (2010), han revelado que el látex de *E. laurifolia* contiene compuestos con actividad anti-inflamatoria, así como compuestos anticancerígenos, también se ha reportado que *E. laurifolia* tiene una actividad biológica importante contra formas latentes del VIH que activan significativamente el ciclo replicativo del virus; estos estudios indican que se puede considerar que existen varios núcleos estructurales constituyentes del látex de gran importancia que pueden convertirse en el objetivo de futuras investigaciones, en la búsqueda de diferentes metabolitos.

En el presente estudio para la detección preliminar de algunos de los constituyentes del látex de *E. laurifolia*, se tuvo en cuenta la literatura científica reportada en investigaciones del látex de varias *Euphorbia*, sobre la identificación

de metabolitos secundarios constituyentes de las plantas. El tamizaje químico de *Euphorbia laurifolia*, por cromatografía en capa delgada, reveló cinco sustancias positivas como metabolitos secundarios presentes en esta especie de Euphorbiaceae, derivados de la fracción activa, entre las que se encuentran alcaloides, terpenos, esteroides, flavonoides y saponinas. Los resultados de los extractos del látex de *E. laurifolia* indican un alto potencial molusquicida, lo cual es importante realizar estudios para aislar el o los metabolitos activos, ya que la presencia de estos metabolitos la hace interesante como una especie promisoría en la búsqueda de nuevos medicamentos con capacidad molusquicida contra la especie de molusco *L. columella*.

6. CONCLUSIONES

- El valor de DL50 (0,96 mg/L en 24 h), obtenido en los bioensayos en condiciones de laboratorio, permiten afirmar que los metabolitos constituyentes del látex de *Euphorbia laurifolia* presentan actividad molusquicida siendo un recurso promisorio para el control *Lymnaea columella*, principal hospedero de *Fasciola hepatica*.
- En los moluscos *Lymnaeacolumella* se observó un rápido comportamiento de escape al ser introducidos en las concentraciones con la solución acuosa de *E. laurifolia*, debido al efecto altamente tóxico e irritante de los constituyentes del látex, comportamiento que no se observó en el grupo control.
- El tamizaje fitoquímico permitió la detección preliminar de algunos de los metabolitos constituyentes del látex. Se observa una amplia gama de compuestos químicos en *E. laurifolia*, donde se evidencia la presencia de flavonoides, esteroides, taninos, saponinas, terpenos y alcaloides, algunos de los cuales podrían ser las responsables de la actividad tóxica provocada en *Lymnaea columella*.
- El extracto de *E. laurifolia*, en solución acuosa, produjo muy buenos resultados, para ser considerado como un excelente molusquicida, con todas las ventajas que representa por ser un compuesto natural, por lo que sería importante realizar investigaciones de la posibilidad de ser utilizado en medio natural, en las fincas ganaderas de la región.
- Se hace necesario, extender y profundizar este estudio en condiciones naturales, para evaluar el impacto toxicológico que pudiera producir el extracto vegetal de *E. laurifolia*, fundamentalmente sobre la fauna acompañante.
- La especie *Euphorbia laurifolia*, es una planta común de la región caucana, ampliamente utilizada por los campesinos, lo que permitiría que se disminuyan los costos, por ser de fácil consecución, para adelantar proyectos tendientes a un control de la población de *Lymnaea columella* en campo.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar posteriores ensayos con las fracciones obtenidas del látex de *E. laurifolia* para la selección de la fracción con mayor capacidad molusquicida, como también la purificación de los compuestos activos del látex.
- Evaluar la posibilidad de implementar planes de control utilizando el extracto de *Euphorbia laurifolia* en medio natural, en fincas de la región ganadera caucana donde la fasciolosis es un problema veterinario.
- Ampliar el estudio del látex de *E. laurifolia*, con el objetivo de observar las lesiones causadas a nivel histológico de los moluscos *Lymnaea columella* en las concentraciones utilizadas.
- La infestación de un individuo por *F. hepatica* dar lugar a que la posibilidad de transmisión sea elevada. Se recomienda continuar con la investigación de los tipos de hábitat y la distribución de los moluscos dulceacuícolas, para realizar un mejor control en las regiones ganaderas.
- Capacitar a los ganaderos para mostrar las ventajas de esta alternativa ecológica y su viabilidad económica.

BIBLIOGRAFÍA

ÁVILA, Liliana. *et al.* Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on Human Immunodeficiency Virus type 1 reactivation. *Phytochemistry* 2010.71.pp 243–248.

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

ALFONSO-HERNÁNDEZ, Margarita.*et al.* Molusquicidas naturales de origen botánico. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT). *Revista Agrotecnia de Cuba*. La Habana Cuba.2008. p 15.

ARANGO-ACOSTA, Gabriel Jaime.*et al.* Actividad molusquicida sobre *Lymnaea columellay* toxicidad de plantas de diferentes géneros de la familia Euphorbiaceae. Corporación Académica para el Estudio en Patologías Tropicales. Universidad de Antioquia.2004.

ARBOLEDA, Daniel; LÓPEZ, Carlos; VASQUEZ, Luis Reinel; SALAZAR, Harold. 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.2006. p 79.

BAQUEIRO-CÁRDENAS, Erick Raúl, *et al.* Los moluscos y la contaminación. Una revisión. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Altamira, Tamaulipas, México.2007. p7.

BECERRA-ROZO, Wilda Margarita. Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepatica* en Latinoamérica. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 2001. 14:pp 28-35.

BENAVIDES, Efraín y ROMERO, Álvaro. Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades en Explotaciones Ganaderas. El control de los parásitos internos del ganado en sistemas de pastoreo en el trópico colombiano. Carta Fedegan. Federación Colombiana De Ganaderos.2001. pp. 88-111.

BETANCUR-GALVIS L.A, *et al.* Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002. Jun; 97(4):541-6.

BILBAO, M.R. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad de Quindío, Armenia. 2000. pp. 181.

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

BORAY, Joseph. Flukes of domestic animals.In: Gaafar S.M, Howard W.E and Marsh R.E. (Eds) *Parasites, pest and predators*. Elsaevier. New York. 1985. pp179 – 218

----- . Disease in sheep and cattle.Primefact 446. 2007. p10

BOTERO, David; RESTREPO, M. Parasitosis humana. Corporación para investigaciones biológicas. Medellín – Colombia. 2003.4 ed. pp. 340 – 343.

CARRADA–BRAVO, Teodoro. Fascioliasis. Diagnóstico, epidemiología y tratamientos. *Rev.GastroenterolMex.*2003. 8: pp135–142.

----- . Fasciola hepatica: Ciclo biológico y potencial biótico. *Rev. Méx. Patol Clin*, Enero – Marzo. 2007.Vol. 54, Núm. 21-. pp 21 -27.

CRUZ-REYES, Alejandro. *et al.*. Actividad molusquicida del piquerol aislado de *Piqueriatrinervia* (Compositae), sobre 8 especies de caracoles pulmonados. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*1989. 84:pp 35-40.

DOMINUEZ, X. Métodos de investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México.1973. pp. 217-219.

EDDI. *et al.* Epidemiología y control de la fascioliasis bovina. *Vet. Arg.*, 15(141):1998.pp 38-43.

FERNANDEZ, Ninfa Andrea. Caracterización taxonómica y limnológica hospederos de tramatodos de importancia de Salud Publica en el municipio de Silvia Cauca. Trabajo de grado de Biología Universidad del Cauca. 2012.

FERREIRA, Gloria. Patología Veterinaria. Ciencia y tecnología. Ed. Universidad de Antioquia. 2003

FREITAS, J.et al. Toxicol study of the Molluscicidal latex of *Euphorbia splendens*: irritant action on skin and eye. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1991. pp86: 87-88.

FUENTES, Ferrer y BARCELO, M.E. Parásitos en Alimentos: un problema de Salud Pública. *Revista Digital CENIAP HOY* N° 11 mayo-agosto. 2007.

GONZÁLEZ Ricardo, et al. Fasciolosis bovina. Evaluación de las principales pérdidas provocadas en una empresa ganadera. Rev Salud Anim 2007. 29(3): pp167-175.

GONZÁLEZ, Luis Alberto. Determinación de las señales características del núcleo estructural diterpénicos por espectroscopia de RMN, en fracciones con actividad antiviral del látex de *Euphorbia laurifolia* (Euphorbiaceae). Trabajo de grado de Química. Universidad del Cauca. 2010.

JURBERG, Pedro. et al. 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, 1995. Vol. 90(2): mar. pp 191-194

LONGO, Magnolia. Estudio Taxonómico y Ecológico de Lymnaea (Mollusca: Lymnaeidae) hospedero intermediario de *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Fasciolidae). Trabajo de Grado de Biología. Universidad del Cauca. Popayán. 2004. p67.

LORENTE Lamarca. Estudio farmacognóstico de *Euphorbia hirta* L. Tesis doctoral. Universidad de Granada. 2003

LLANES, Doris Susana. 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. 2009. p 93

MALEK, Emile & CHENG, T.C. .Medical and economic malacology. Academic Press, INC. New York and London (1974). ISBN 0-12-466150-5. 1974. p382.

MALEK, Emile & CONGSWELL, F.B. Lymnaea (Pseudosuccinea) columellain Colombia. Nautilus. 1980. 94, pp 112–114..

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

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

MARSTON, A. y HOSTETTSMANN, K. Review plant molluscicides. *Phytochemistry*. 1985. Vol.34. pp639-652

MAS-COMA, S., ESTEBAN, J.G., y BARGUES, M.D. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. Bull. Wld. Hlth. Org.1999.77, pp340-346.

----- 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 2.2004. pp. 305-322

-----Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas.J. Helminthol.2005. 79(3), pp 207-16.

-----, BARGUES, M.D., VALERO, M.A.Fascioliasis and other plant-borne TrematodeZoonoses.Int. J. Parasitol., 2005. 35,pp 1255–1278.

MENDES, Nelymar. *et al.* Evaluation of the molluscicidal properties of *Euphorbia splendens* var. *hislopii*(N.E.B.) latex: experimental test in an endemic area of Minas Gerais, Brazil. *MemInst Oswaldo Cruz*;1997. 92:719-24.

MELLO-SILVA, Clelia, *et al.* Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata*exposed to *Euphorbiasplendens* var. *hislopii*latex. February. 2006.Vol. 101(1):.pp 3-8.

MINISTERIO DE SALUD COLOMBIA. 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. 1999. pp 89-92.

MOTT, K.E. molusquidas vegetales, el PNUD / Banco Mundial / OMS, John Wiley&Sons Ltd., New York, 1987.p326

MURILLO- A. José. Las Euphorbiaceae de Colombia. Biota Colombiana 5 (2): 2004.pp183-200.

OLAECHEA, Fermín. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. *Fasciolahepatica* y *Paramphistomum*. Argentina.2005. Cap.10. p 213-232.

OMS. Lucha Contra las Trematodiasis de Transmisión Alimentaria. Serie de informes técnicos 849 Ginebra. 1995.

PÉREZ, Marlene. *et al.* Actividad molusquicida del Paraiso (*Meliaazedarach* L.) (Meliaceae) sobre *Lymnaeacubensis*, molusco vector de Fasciolosis. Rev. Saúde.1998. Pública. 32 (3).p262-6.

PILE, Edwin. *et al.* Bovine Fascioliasis: control with Christ's crown latex (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*). Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, 2001.v. 38, N°. 6, p. 288-289.

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

POINTIER, Jean-Pierre. 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. 2000. p 12.

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

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

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. pp 77–83

SCHALL, Virginia. *et al.* 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.* 1998 58: pp 7-10.

TABARES, Paula. *et al.* Metabolitos secundarios y efectos antivirales de algunas especies de la familia Euphorbiaceae. *Scientia et Technica*, 2007. Vol, XII, No. 33, pp 107 - 110.

VASCONCELLOS, Mauricio. *et al.* The Molluscicidal Activity of Niclosamide (Bayluscide WP70®) on *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), a Snail Associated with Habitats of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, July. 2002. Vol. 97(5): pp 743-745,

-----y AMORIM, Alziro. 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, 2003. Vol. 98(4): pp557-563.

-----y AMORIM, Alziro. **b.** 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, 2003. Vol. 98(7): pp981-985.

-----y SCHALL, Virginia. Latex of "Coroa-de-Cristo" (*Euphorbia splendens*): an effective molluscicide. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986. 81: 475-6.

PASCUAL Villalobos, M. J. y CORREAL Castellanos E. 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. 1992. Vol. 43 Faso. 1, pp 39-44. Disponible en internet: [http:// grasas y aceites. revistas.csic.es](http://grasas_y_aceites.revistas.csic.es).

WHO-World Health Organization. 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, Mauricio y AMORIM, Alziro. 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. 1983. Vol. 98(4): pp557-563.

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

WILCHES, Christian et al. Presencia de infestación Por *Fasciola hepatica* en Habitantes del valle de San Nicolás, oriente antioqueño. Infect. , Bogotá. V 13, N 2 de junio de 2009. Disponible en Internet: [http:// www. scielo. org.co/ scielo.php ?script=sci_ arttext&pid=S0123-93922009000200004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922009000200004&lng=en&nrm=iso)>. Acceso el 10 de septiembre de 2012.

ZAMITH Helena P.S; PAUMGARTTEN Francisco J.R.; SPEIT Gunter. Evaluation of the mutagenicity of the molluscicidal latex of Christ's Crown (*Euphorbia mili* var. *hislopii*) in mammalian cells in vitro and in vivo, Mutation Research. 1996. 368. pp15 - 20.

ZANI, C.L. et al. Milliamines molusquicidas de *Euphorbia mili* var. *hislopii*. Fitoquímica 1993. 34: pp 89-95.