

ARTÍCULOS ORIGINALES/ORIGINAL ARTICLES

EFFECTO DE *PAULLINIA CLAVIGERA* “SACHA YOCO” (SAPINDACEAE) SOBRE LA ECLOSIÓN DE HUEVOS DE *FASCIOLA HEPATICA*

EFFECT OF SOAPBERRY *PAULLINIA CLAVIGERA* (SAPINDACEAE) ON HATCHABILITY OF *FASCIOLA HEPATICA* EGGS

José Iannacone¹; Lorena Alvariano¹; Diana Pérez²

Forma de citar: Iannacone, J, Alvariano, L & Pérez, D. 2008. Efecto de *Paullinia clavigera* “Sacha yoco” (Sapindaceae) sobre la eclosión de huevos de *Fasciola hepatica*. Neotropical Helminthology, vol. 2, n°2, pp. 54-60.

Resumen

La utilización de extractos vegetales representa una alternativa para el manejo integrado de parásitos en Salud Pública, debido a su bajo costo y al menor impacto sobre el ambiente al conservar la biodiversidad. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de los extractos de la planta amazónica *Paullinia clavigera* Simpson “Sacha yoco” (Sapindaceae) sobre la eclosión de huevos de *Fasciola hepatica* L. (Trematoda: Fasciolidae). Los huevos fueron obtenidos de bovinos procedentes del camal de Yerbateros, Lima, Perú. Se realizó el tamizaje fitoquímico y se prepararon los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico a partir de la corteza y hoja de *P. clavigera*. Se realizaron bioensayos para determinar el efecto de Sacha yoco sobre la eclosión de los huevos, los cuales fueron incubados en los extractos a $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante 21 días y finalmente expuestos a la luz por 12 h. No existieron diferencias significativas entre el número de huevos de *F. hepatica* expuestos en cada una de las concentraciones en los bioensayos. Solo existió efecto en la eclosión de los huevos de *F. hepatica* por el extracto hexánico de corteza de *P. clavigera* a las dos concentraciones más altas. La toxicidad observada en el extracto hexánico de corteza de *P. clavigera* pudiera deberse a la presencia de triterpenos, flavonoides y quinonas.

Palabras claves: bioensayo - eclosión - huevos - *Fasciola* - *Paullinia* - tamizaje fitoquímico

Abstract

Employment of plant extracts represent an alternative to integrated parasite management in Public health, due to its low cost and low impact on environment to conserve biodiversity. Current research aims to determinate the effect of Amazonian plant soapberry *Paullinia clavigera* Simpson (Sapindaceae) on hatchability of *Fasciola hepatica* L. (Trematoda: Fasciolidae) eggs. Eggs were obtained from cattle processed at the Yerbateros abattoir, Lima, Peru. A phytochemical screening was done and hexane, chloroform and hydroalcohol extracts of cortex and leaves of *P. clavigera* were prepared. Bioassays to determinate the effect of soapberry on hatchability of eggs were performed; those were incubated on extracts at $22^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ during 21 days and finally exposed to light for 12 h. Significant differences between number of *F. hepatica* eggs exposed to each concentration in bioassays did not exist. The hatching of *F. hepatica* eggs was only affected by hexane extract of the cortex of *P. clavigera* to two higher concentrations. Toxicity observed on hexane extract of cortex of *P. clavigera* was noted in the presence of triterpenes, flavonoids and quinones.

Key words: bioassay – eggs – *Fasciola* – hatchability – *Paullinia* - phytochemical screening

1 Laboratorio de Invertebrados. Museo de Historia Natural. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Correo electrónico: joseiannacone@gmail.com
2 Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, IIAP-Pucallpa.

INTRODUCCIÓN

Para el mejoramiento de la salud pública y las actividades pecuarias en el nuevo milenio se deben establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto y riesgo ambiental, reduciendo significativamente el uso de sustancias químicas sintéticas, las cuales por su elevado costo, también representan una limitante en su uso (Tchounwou *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 2001).

La toxicidad aguda y la mortalidad son parámetros toxicológicos de gran importancia al evaluar los parasiticidas (Iannacone & Alvarino, 2002). En el Perú, el control químico con sustancias sintéticas es el más empleado para el control parasitario. El problema de estos compuestos sintéticos es su capacidad de bioacumulación, su poder residual prolongado, y su efecto negativo en los seres humanos (Iannacone & Alvarino, 2002).

La utilización de extractos vegetales para el control de parásitos es importante, debido a su bajo costo y al menor impacto sobre el ambiente al conservar la biodiversidad (Hansen & Johnson, 1999; Becerra, 2001; Morley *et al.*, 2001; Vinaud *et al.*, 2005). Se han evaluado las propiedades biocidas de *Paullinia clavigera* Simpson (Sapindaceae) sobre *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y Lopez 1941 (Diptera) (Pérez & Iannacone, 2004), *Rhynchophorus palmarum* L. (Pérez & Iannacone, 2006), *Daphnia magna* Strauss, 1820 (Iannacone *et al.*, 2007), *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Iannacone *et al.*, 2007), *Copidosoma koehleri* Blanchard, 1940 (Iannacone *et al.*, 2007), *Thuthillia cognatha* Hodkinson, Brown & Burckhardt, 1986 (Pérez *et al.*, 2008), *Eupalamides cyparissias* Fab (Pérez & Iannacone, 2008), *Chironomus calligraphus* Goeldi, 1905 (Iannacone & Pérez, 2008) y *Artemia franciscana* Kellog, 1906 (Iannacone & Pérez, 2008). En la especie congénica a *P. clavigera*, *Paullinia pinnata* L. se han registrado actividades molusquicidas (Abourashed *et al.*, 1999; Melendez & Carriles, 2002). En *Paullinia cupana* Kunth "Guarana" se ha evaluado su importancia como remedio herbal natural y etnobotánico, y como fuente de plaguicida biodegradable (Myerscough, 1998). Extractos acuosos de *P. cupana* han mostrado actividad genotóxica y mutagénica en *Escherichia coli* (Da Fonseca *et al.*, 1994). Altas concentraciones de cafeína se han encontrado en *Paullinia yoco* Schultes & Killip y *P. cupana* (Schultes, 1994; Cipollini 2000; Weckerle *et al.*, 2003). *Paullinia clavigera* es una planta amazónica promisoría como biocida, por lo que, para una adecuada evaluación biológica, se requiere el empleo de bioensayos toxicológicos (Hansen & Johnson, 1999; Nano *et al.*, 2002).

La fasciolosis causada por el trematodo *Fasciola*

hepatica L. en los animales domésticos, puede producir grandes pérdidas económicas que van desde el decomiso de los hígados hasta la disminución del peso, retraso del crecimiento, reducción de la producción de carne, leche o lana, descenso de la resistencia a otras enfermedades, inhibición de la reproducción, abortos e inclusive la muerte (Becerra, 2001; Romero *et al.*, 2002).

La fasciolosis humana es un problema significativo de Salud Pública a nivel mundial (Romero *et al.*, 2002). Estudios recientes indican que 2,4 a 17 millones de personas a nivel mundial están infectadas (Becerra, 2001). A pesar que la mortalidad debido a fasciolosis es relativamente baja, infecciones masivas o repetidas pueden producir una considerable morbilidad (Favennec *et al.*, 2003). Registros en humanos infectados con *F. hepatica* han incrementado significativamente a nivel mundial desde 1980. Varias áreas son realmente endémicas, con características epidemiológicas singulares. Una característica en esta enfermedad es estar asociada a regiones altitudinales muy altas, al menos en Sudamérica (Romero *et al.*, 2002). Este parásito causa severas sintomatologías y patologías en niños (Esteban *et al.*, 2002; Saba *et al.*, 2004). Los focos de transmisión de la fasciolosis están marcados por la presencia de poblaciones de caracoles limneidos en cuerpos de agua (Fuentes *et al.*, 1999). El éxito de la infección de un trematodo a un caracol de agua dulce depende de al menos tres factores principales: la edad del caracol en la exposición, la temperatura del agua en donde se localizan el caracol y el miracidio, y la nutrición del caracol (Abrous *et al.*, 2001). La producción de huevos de *F. hepatica* puede ser rítmica, la eclosión pudiera ocurrir espontáneamente en el agua, pero la luz, la presión osmótica y la temperatura parecen ser señales importantes para la eclosión (Valenzuela & Quintana, 1998; De Souza *et al.*, 2002; Sukhdeo & Sukhdeo, 2004; Hassan *et al.*, 2008).

En la lucha para el control de trematodos y de sus hospederos intermediarios se han empleado extractos vegetales con propiedades ovicidas (De Carvalho *et al.*, 1998), miracidicidas (De Carvalho *et al.*, 1998; Mohamed *et al.*, 2005; Vinaud *et al.*, 2005), cercaricidas (Frischkorn *et al.*, 1978; Monkiedje *et al.*, 1991; Rug & Ruppei, 2000; Naples *et al.*, 2005), adulticidas (Romero *et al.*, 2002; Mohamed *et al.*, 2005) y finalmente molusquicidas (Hosni *et al.*, 1999; Rug & Ruppel, 2000; Singab *et al.*, 2006).

Para la selección de las especies vegetales, una de las primeras actividades es la recopilación de las referencias bibliográficas de los vegetales empleados en el control de parásitos local e internacionalmente. Además es prometedor consultar literatura etnobotánica y de medicina popular (Pérez & Iannacone, 2006). Los bioensayos se emplean para estudiar las propiedades parasiticidas de las diferentes partes de las plantas (raíces, corteza, hojas, frutos, flores, etc.), la eficacia de

los diferentes extractos y formulaciones, y el modo de acción de los ingredientes activos; e inclusive un posterior análisis de mercado. Los bioensayos deben ser altamente sensitivos a las sustancias bioactivas, fáciles de manipular, baratos, de amplio espectro y dar rápidos resultados (Pérez *et al.*, 2008).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto antihelmíntico-ovicida de extractos de corteza y hoja de *P. clavigera* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de *F. hepatica*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los bioensayos toxicológicos se realizaron en el Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Distrito de Santiago de Surco, Lima, Perú.

Extracto botánico. Las lianas y hojas de *P. clavigera* (PC) fueron colectadas del km 83 de la Carretera Federico Basadre (CFB), Caserío “Señor de los Milagros”, jurisdicción del distrito de Irazola, Provincia de Padre Abad, Ucayali, Perú. Las lianas de PC fueron secadas directamente al sol por espacio de dos semanas aproximadamente y se trituraron en un molino de martillo. Se prepararon los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico según los procedimientos descritos en el tamizaje fitoquímico. Se prepararon cuatro concentraciones empleando un factor de dilución de 0,5, el cual es el empleado en la mayoría de los bioensayos (Iannacone *et al.*, 2007).

Tamizaje Fitoquímico. La preparación de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico y el tamizaje fitoquímico de la corteza y hoja de *P. clavigera* siguió lo descrito por Iannacone *et al.* (2007). A partir de 100 g de muestra seca y molida de *P. clavigera* se extrajo con hexano (solvente apolar) hasta agotamiento con renovación de solvente cada 48 h, después de eliminar el solvente en rotavapor a presión reducida se obtuvo los extractos hexánicos. Al residuo se le adicionó cloroformo (CHCl₃) (solvente medianamente polar) y se extrajo hasta agotamiento con renovación de solvente cada 48 h, el solvente se eliminó hasta sequedad en rotavapor a presión reducida, de esta forma se obtuvo los extractos clorofórmicos. Finalmente, al residuo se adiciona etanol-agua (70:30), solventes polares, y se procedió como en los casos anteriores, obteniéndose los extractos hidroalcohólicos.

Fasciola hepatica. Se obtuvieron hígados frescos de vacunos (*Bos taurus* L.) parasitados con *F. hepatica* procedentes del camal de Yerbatero del Lima, Perú. Los hígados infectados con adultos de *F. hepatica* fueron llevados al Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo

Palma, y los huevos fueron colectados después de una sedimentación en solución ADAM, cuyas características fisicoquímicas son las indicadas por Iannacone *et al.* (2007). Este procedimiento se repitió de 3 a 5 veces. Los huevos limpios, posteriormente, fueron suspendidos en agua de grifo de clorinada y se mantuvieron en refrigeración hasta su empleo en los bioensayos (Rug & Ruppei, 2000; Liang *et al.*, 2001).

Ensayo de inhibición de la eclosión de los huevos. La solución de huevos fueron concentrados por centrifugación hasta una concentración aproximada de 20-45 huevos por 0,1 mL (Hegazi *et al.*, 2007). 0,1 mL de la solución de huevos se agregó a 2 mL del agua de grifo de clorinada del control y en cada una de las cuatro concentraciones del extracto botánico: 0,05; 0,1, 0,2 y 0,4 mg L⁻¹ en las placas de 24 pocillos (Multiwett®). Se incluyó un control por cada uno de los tres solventes orgánicos empleados. Cuatro repeticiones de cada concentración fueron preparadas. Todas las pruebas fueron conducidas en paralelo. Los huevos fueron incubados a 22°±2°C durante aproximadamente 21 días, pero examinando el control cada tres días para verificar la embrionación y próxima eclosión evidenciada por el movimiento del miracidio en el interior del huevo, y luego por 12 h bajo luz de lámpara de tungsteno (60 W) para inducir la eclosión de los huevos y obtención de los miracidios. La proporción de huevos eclosionados fue determinada en cada concentración del extracto ensayado en 100 huevos contabilizados (Roberts *et al.*, 1978; Morley *et al.*, 2001). Por motivos logísticos no se realizó el ensayo de inhibición de eclosión de huevos con el extracto hexánico de hoja de *P. clavigera*.

Análisis de datos. Las pruebas de toxicidad de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de Sacha yoco sobre la inhibición de la eclosión de *F. hepatica* se evaluaron considerando cuatro concentraciones (tratamientos) más el control a base de agua de grifo de clorinada y del solvente, con cuatro repeticiones, en un diseño de Bloque Completo al Azar (DBCA): 6 x 4. La eficacia de los tratamientos y las repeticiones se evaluó a través de un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías, previa transformación de los datos a raíz cuadrada del arcoseno. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos y entre las repeticiones se realizó la prueba de Tukey. Los cálculos de la inhibición de la eclosión de huevos corregida se realizó mediante la fórmula de Abbott en caso que en el grupo testigo fuese menor al 25% (Macedo *et al.*, 1997). Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS, versión 15,0.

RESULTADOS

Mediante el tamizaje fitoquímico de los extractos hexánicos, clorofórmicos e hidroalcohólicos de

corteza y hoja de *P. clavigera*, se obtuvo los resultados señalados en la Tabla 1. El extracto hexánico de la corteza presentó: triterpenos, flavonoides y quinonas; su extracto clorofórmico presentó positividad: cumarinas, flavonoides, esteroides, saponinas y quinonas; en cambio el extracto hidroalcohólico presentó fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas y saponinas (Tabla 1). Respecto a la hoja, su extracto clorofórmico y hexánico presentaron positividad en esteroides y triterpenos; en cambio el extracto hidroalcohólico presentó flavonoides, cumarinas y aminoácidos (Tabla 1).

No existieron diferencias significativas entre el número de huevos de *F. hepatica* colocados en los 24 pocitos de las placas ($F = 1,1- 2,6$; $P = 0,06-0,40$). No existieron diferencias significativas entre las cuatro réplicas con relación al número de huevos de *F. hepatica* empleados en los bioensayos ($F = 0,32-0,81$; $P = 0,51-0,81$). Existió efecto en la inhibición de la eclosión de los huevos de *F. hepatica* empleando el extracto hexánico de corteza de *P. clavigera* a las dos concentraciones más altas, en comparación con el control. En el resto de extractos no existieron diferencias entre los controles con agua de grifo declorinada y el control con el solvente con las concentraciones ensayadas (Tabla 2).

DISCUSIÓN

La efectividad de un helminticida botánico es dependiente de algunos factores extrínsecos, tales como la especie y variedad de la planta, época de recolección, parte cosechada y forma de preparación, concentración y aplicación (Iannacone & Lamas 2003). Las diferencias en la toxicidad de diferentes extractos (hidroalcohólico, clorofórmico y hexánico)

de *P. clavigera* pudieran deberse a la presencia de inhibidores activos en los extractos o a la presencia de inhibidores de principios helminticidas. En el presente estudio se empleó agua de grifo declorinada como control negativo. Solo el extracto de corteza de Sacha yoco hexánico a 0,2 y 0,4 mg L⁻¹ ocasionó una disminución significativa en la eclosión de huevos: 56,1% y 50,4%, en comparación con el control que presentó 80,2 % de huevos que eclosionaron (Tabla 2). La toxicidad observada en el extracto hexánico de corteza de *P. clavigera* pudiera deberse a la presencia de triterpenos, flavonoides y quinonas.

La efectividad de un helminticida botánico también depende de factores inherentes al organismo de prueba, es de destacar la variación de la susceptibilidad de acuerdo a la edad y al estado de desarrollo (Rug & Ruppei, 2000; Mohamed *et al.*, 2005, Vinaud *et al.*, 2005). Varios autores señalan que el estado helmíntico acuático menos susceptible de los tremátodos a sustancias químicas tóxicas es el huevo en comparación con sus dos estadios de vida libre, miracidio y cercaria (De Carvalho *et al.*, 1998; Hassan *et al.*, 2008).

El latex de *Euphorbia milii* Hislopilii no produjo efectos sobre los huevos del trematodo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (De Carvalho *et al.*, 1998). Hassan *et al.* (2008) mostraron que el sulfato de cobre y la niclosamida no produjeron efectos en la eclosión de los huevos de *Fasciola gigantica* Kehlmaier, 2005. Sin embargo, el superfosfato y el sulfato de amonio presentaron un efecto inhibitorio en el desarrollo de los huevos. Hegazi *et al.* (2007) han evaluado el propoleo de abeja encontrando efectos inhibitorios en los huevos de *F. gigantica*. En el presente estudio cuatro de los cinco extractos ensayados no presentaron efectos ovicidas sobre *F. hepatica* (Tabla 2).

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de la corteza y hoja de *Paullinia clavigera* (Sapindaceae).

Pruebas fitoquímicas	Corteza			Hoja		
	hexánico	clorofórmico	hidroalcohólico	hexánico	clorofórmico	hidroalcohólico
Alcaloides	-	-	-	-	-	-
Saponinas	-	±	+	ND	ND	ND
Esteroides	-	+	-	+	+	-
Triterpenos	+	-	-	+	+	-
Taninos	-	-	-	-	-	-
Fenoles/antocianidinas	-	-	+	-	-	+
Flavonoides	+	+	+	-	-	+
Cumarinas	-	+	+	ND	ND	ND
Quinonas	±	±	+	-	-	-
Aminoácidos	ND	ND	ND	-	-	+

Leyenda: reacción - = negativa. ± = muy poco positiva. + = positiva. ND = No determinado.

Tabla 2. Efecto de *P. clavigera* sobre la eclosión de huevos de *F. hepatica*.

mg L ⁻¹	% Eclosión				
	Extracto Hexano Corteza	Extracto Cloroformo Corteza	Extracto Cloroformo hoja	Extracto Hidroalcohol Corteza	Extracto Hidroalcohol Hoja
Control H ₂ O destilada	80,2a	75,4a	78,4a	86,3a	82,0a
Control solvente	76,2a	78,5a	80,3a	89,1a	90,2a
0,05	81,3a	86,3a	77,4a	85,6a	89,2a
0,1	80,2a	73,4a	78,7a	88,6a	83,9a
0,2	56,4b	76,3a	79,7a	79,4a	84,9a
0,4	50,1b	74,9a	81,6a	83,1a	80,1a

Letras minúsculas iguales en sentido vertical indican que los porcentajes de eclosión son estadísticamente iguales.

En el caso de *F. hepatica*, el efecto del extracto hexánico de corteza de sacha yaco tendría alta utilidad como ovicida. Al evaluar si la corteza de *P. clavigera* tendría efectos en los organismos no destinatarios de la biota acuática, se ha observado resultados variables. Así el extracto clorofómico de *P. clavigera* presentó el mayor efecto en *D. magna* en comparación al extracto hexánico. El extracto hidroalcohólico de *P. clavigera* presentó el mas alto efecto en *Ch. calligraphus*. Finalmente el extracto hexánico ocasionó la mayor mortalidad en *A. franciscana* (Iannacone *et al.*, 2007; Iannacone & Pérez, 2008).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abourashed, EA, Toyang, NJ, Choinski, J Jr & Khan, I.A. 1999. *Two new flavone glycosides from Paullinia pinnata*. Journal of Natural Products, vol. 62, pp. 1179-1181.
- Abrous, M, Rondelaud, D & Dreyfuss, G. 2001. *The stress of Lymnaea truncatula just before miracidial exposure with Fasciola hepatica increased the prevalence of infection*. Experimental Parasitology, vol. 99, pp. 49-51.
- Becerra, RWM. 2001. *Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de Fasciola hepatica en Latinoamérica*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, vol. 14, pp. 28-35.
- Cipollini, ML. 2000. *Secondary metabolites of vertebrate-dispersed fruits: evidence for adaptative functions*. Revista Chilena de historia Natural, vol. 73, pp. 421-440.
- Da Fonseca CA, Leal, J, Costa, SS & Leitão, AC. 1994. *Genotoxic and mutagenic effects of guarana (Paullinia cupana) in prokaryotic organisms*. Mutation Research, vol. 321, pp. 165-73.
- De Carvalho, RR, Maldonado, A. Jr, Oliveira-Filho, EC, Ribeiro, Paumgarten, FJE & Rey, L. 1998. *Effects of Euphorbia milii látex on Schistosoma mansoni eggs, miracidia and cercariae*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 93 Suppl I, pp. 235-237.
- De Souza, CP, Magalhaes, KG, Passos, LKJ, Dos Santos, GCP, Ribeiro, F & Katz, N. 2002. *Aspects of the maintenance of the life cycle of Fasciola hepatica in Lymnaea columella in Minas Gerais, Brazil*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 97 pp. 407-410.
- Esteban, JG, González, G, Dolores-Bargues, M, Angles, R, Sánchez, C, Náquira, C & Mas-Comas, S. 2002. *High fascioliasis infection in children linked to man-made irrigation zone in Peru*. Tropical Medicine and International Health, vol. 7, pp. 339-348.
- Favennec, L, Ortiz, JJ, Gargala, G, Lopez-Chegne, N, Ayoub, A & Rossignol, JF. 2003. *Double-blind, randomized, placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of fascioliasis in adults and childrens from Northern Peru*. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, vol. 17, pp. 265-270.
- Frischkorn, CGB, Frischkorn, HE & Carrazzoni, E. 1978. *Cercaricidal activity of some essential oils of plants from Brazil*. Naturwissenschaften, vol. 65, pp. 480-483.
- Fuentes, MV, Valero, MA, Bargues, MD, Esteban, JG & Mas-Coma, S. 1999. *Analysis of climatic data and forecast indices for human fascioliasis at very high altitude*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, vol. 93, pp. 835-850.
- Hansen, LJ & Johnson, ML. 1999. *Conservation and toxicology: integrating the disciplines*. Conservation Biology, vol. 13, pp. 1225-1227.
- Hassan, AA, Shoukary, NM & Ismail, NM. 2008. *Efficacy of temperature, and two commonly used molluscicides and fertilizers on Fasciola gigantica eggs*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, vol. 38, pp. 621-634.

- Hegazi, A, Abd El Hady, FK & Shalaby, HA. 2007. *Inhibitory effect of egyptian propolis on Fasciola gigantica eggs with reference to its effect on Clostridium oedematiens and correlation to chemical composition*. Pakistan Journal of Biological Sciences, vol. 10, pp. 3295-3305.
- Hosni, HA, Basyouni, WM & El-Hanas, HA. 1999. *Thienopyrimidines. Part III. Síntesis of novel substituted thienol [2,3-d] pyrimidinone derivatives and their condensed products with molluscicidal and larvicidal activities*. Journal of Chemical Research, vol. (S), pp. 646-647.
- Iannacone, J & Alvarino, L. 2002. *Evaluación del riesgo ambiental del insecticida cartap en bioensayos con tres invertebrados*. Agricultura Técnica (Chile), vol. 62, pp. 366-374.
- Iannacone, J & Lamas, G. 2003. *Efecto toxicológicos de extractos de molle (Schinus molle) y lantana (Lantana camara) sobre Chrysoperla externa (Neuroptera: Chrysopidae), Trichogramma pintoi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y Copidosoma koehleri (Hymenoptera: Encyrtidae) en el Perú*. Agricultura Técnica (Chile), vol. 63, pp. 347-360.
- Iannacone, J, Alvarino, L, Soto, JC & Salcedo, C. 2007. *Efecto toxicológico del "Sachayoco", Paullinia clavifera (Sapindaceae) sobre Daphnia magna y sobre dos controladores biológicos de plagas agrícolas*. Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, vol. 2, pp. 15-25.
- Iannacone, J & Pérez, D. 2008. *Efectos tóxicos de cuatro plantas amazónicas sobre Chironomus calligraphus Goeldi 1905 (Diptera: Chironomidae) y Artemia franciscana Kellog 1906 (Anostraca: Artemiidae)*. Revista Brasileira de Toxicología, vol. 21, pp. 33-43.
- Liang, YS, Dai, JR, Ning, A, Yu, DB, Xu, XJ, Zhu, YC & Coles, GC. 2001. *Susceptibility of Schistosoma japonicum to praziquantel in China*. Tropical Medicine and International Health, vol. 6, pp. 707-714.
- Macedo, ME, Consoli, RA, Grande, TS, dos Anjos, AM, de Oliveira, AB, Mendes, NM, Queiroz, RO & Zani CL. 1997. *Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against Aedes fluviatilis (Diptera: Culicidae)*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 92, pp. 565-570.
- Melendez, PA & Carriles, VA. 2002. *Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, vol. 96, pp. 209-218.
- Mohamed, AM, Metwally, NM & Mahmoud, SS. 2005. *Sativa seed against Schistosoma mansoni different stages*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 100, pp. 205-211.
- Monkiedje, A, Anderson, AC & Englande, AJ. 1991. *Acute toxicity of Phytolacca dodecandra (Endod-S) and niclosamide to snails, Schistosoma mansoni cercaria, Tilapia fish, and soil microorganisms*. Environmental Toxicology and Water quality, vol. 6, pp. 405-413.
- Morley, NJ, Crane, M & Lewis, JW. 2001. *Toxicity of cadmium and zinc to miracidia of Schistosoma mansoni*. Parasitology, vol. 122, pp. 81-85.
- Myerscough, M. 1998. *Herbal remedies. How much do you know?* Australian Family Physician vol. 27, pp. 1037-1040.
- Nano, GM, Binello, A, Bianco, MA, Ugazio, G & Burdino, S. 2002. *In vitro tests to evaluate potential biological activity in natural substances*. Fitoterapia, vol. 73, pp. 140-146.
- Naples, JM, Shiff, C & Halden, RU. 2005. *Reduction of infectivity of schistosome cercariae by application of cercaricidal oil to water*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 73, pp. 956-961.
- Pérez, D & Iannacone, J. 2004. *Efecto insecticida de Sacha yoco (Paullinia clavifera var. bullata Simpson) (Sapindaceae) y oreja de tigre (Tradescantia zebrina Hort ex Bosse) (Commelinaceae) en el control de Anopheles benarrochi Gabaldon, Cova García y López, 19141, principal vector de malaria en Ucayali, Perú*. Ecología Aplicada, vol. 3, pp. 64-72.
- Pérez, D & Iannacone, J. 2006. *Efectividad de extractos botánicos de diez plantas sobre la mortalidad y repelencia de larvas de Rhynchophorus palmarum L., insecto plaga del pijuayo Bactris gasipaes Kunth en la amazonia del Perú*. Agricultura Técnica (Chile), vol. 66, pp. 21-30.
- Pérez, D & Iannacone, J. 2008. *Mortalidad y repelencia en Eupalamides cyparissias (Lepidoptera: Castniidae), plaga de la palma aceitera Elaeis guineensis, por efecto de diez extractos botánicos*. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, vol. 67, pp. 41-48.
- Pérez, D, Iannacone, J & Tueros, A. 2008. *Toxicidad de Paullinia clavifera Schlttdl. (Sapindaceae) y del Chondrodendron tomentosum Ruiz et Pav. (Menispermaceae) sobre el piojo saltador del Camu camu Tuthillia cognata Hodkinson (Hemiptera: Psyllidae)*. Gayana Botánica, vol. 65, pp. 48-56.
- Romero, JM, Olazabal, ME, Martinez, Y, Serrano, H & Monteagudo, A. 2002. *Actividad fasciolicida in vitro de Portulaca oleracea L.* Acta Farmacéutica Bonaerense, vol. 21, pp. 297-300.
- Roberts, TM, Stibbs, HH, Chernin, E & Ward, S. 1978. *A simple technique for testing behavioural response of Schistosoma mansoni miracidia to chemicals*. Journal of Parasitology, vol. 64, pp. 277-282.
- Rug, M & Ruppei, A. 2000. *Toxic activities of the plant Jathropha curcas against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes*. Tropical Medicine and International Health, vol. 5, pp. 423-430.
- Saba, R, Korkmaz, M, Inan, D, Mamikoğlu, L, Turhan, Ö, Günseren, F, Çevikol, C & Kabaalioğlu, A. 2004. *Human fascioliasis*. Clinical Microbiology and Infection, vol. 10, pp. 385-387.
- Schultes, RE. 1994. *Amazonian ethnobotany and the search for new drugs*. Ciba Found Symp, 185, pp. 106-112; discussion, pp. 112-115.

- Singab, ANB, Ahmed, AH, Sinkkonen, J, Ovcharenko, V & Pihlaja, K. 2006. *Molluscicidal activity and new flavonoids from Egyptian Iris germanica L. (var. alba)*. Zeitschrift für Naturforschung C, vol. 61, pp. 57-63.
- Sukhdeo, MVK & Sukhdeo, SC. 2004. *Trematode behaviours and the perceptual worlds of parasites*. Canadian Journal of Zoology, vol. 82, pp. 292-315.
- Tchounwou, PB, Englande, Jr AJ, Malek, EA, Creer, GJ & Anderson, AC. 1992. *The effects of bayluscide and malathion on the mortality and infectivity of Schistosoma mansoni cercariae*. Environmental Toxicology and Water Quality, vol. 7, pp. 107-117.
- Valenzuela, G & Quintana, I. 1998. *Evolución de huevos de Fasciola hepatica en el medio ambiente en Temuco, IX Región de Chile*. Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 30, pp. 109-114.
- Vinaud, MC, Santos, SC, Ferri, PH, Souza, LR Jr & Barreto, BJC. 2005. *Avaliação da atividade larvicida de plantas fitoterápicas do cerrado do género Stryphnodendron spp. sobre miracidios e cercarias de Schistosoma mansoni*. Revista de patología tropical, vol. 34, pp. 137-143.
- Weckerle, CS, Stutz, MA & Baumann, TW. 2003. *Purine alkaloids in Paullinia*. Phytochemistry, vol. 64, pp. 735-742.

Autor para correspondencia/Correspondence to author:

José Iannacone,
Laboratorio de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Ricardo Palma.
Avenida Benavides 5440. Lima 33. Lima, Perú.

Correo electrónico/E-mail:
joseiannacone@gmail.com

Teléfono/Telephone: (51)-12573227
Telefax: (51)-12573227

