



ARTÍCULO ORIGINAL

Actividad antihelmíntica del extracto de *Peumus boldus* comparada con la piperazina citrato sobre el huevo y larva de *Ascaris suum*

Anthelmintic activity of *Peumus boldus* compared with piperazine citrate on egg and larvae of *Ascaris suum*

Guillermo Delgado Díaz¹ y César A. Jara²

¹Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. ²Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo

RESUMEN

La ascariasis, enfermedad causada por *Ascaris* es una de las enfermedades con mayor prevalencia en cerdos domésticos de sistemas de producción masiva, siendo responsable de grandes pérdidas económicas. La presente investigación tiene como finalidad comparar el efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus* "Boldo" con el de la piperazina citrato, droga utilizada como antihelmíntico en algunos países, sobre: (i) la embrionación de huevos (formación de la larva), (ii) supervivencia *in vitro* de larvas L2 y (iii) infectividad *in vivo* de *A. lumbricoides* var. *suum* en ratón, *Mus musculus* BALB/c. Las hojas de "Boldo" utilizadas fueron importadas de Curicó, (Chile) y el extracto hidroalcohólico se obtuvo mediante el método de maceración. Los huevos de *A. lumbricoides* var. *suum* fueron obtenidos de parásitos hembras recolectadas en el Camal de Trujillo (Perú). La investigación se diseñó en tres sistemas: grupo experimental (extracto), control positivo (piperazina) y control negativo (SSF para el sistema de embrionación y la prueba *in vivo* y medio Minimun Esential Medium (MEM) para la prueba *in vitro*). El porcentaje de eficacia hallado en cada experimento fue: (i) para la embrionación, 11% en el grupo experimental (1.5mg del extracto), 10% con piperazina (1.5 mg) y 90% en el grupo control (SSF), (ii) para la acción *in vitro* frente a la L2, 03% en el grupo experimental (0.5 mg/mL del extracto), 02 con piperazina (0.5 mg/mL) y 99% en el grupo control (MEM) y (iii) para la eficacia *in vivo*, 0.05% en el grupo experimental (2 mg/kg de extracto), 0.05 en el control positivo (1.65 mg/kg de piperazina) y 91% en control (SSF). En todos los casos el porcentaje del grupo experimental y el control positivo no se diferenciaron estadísticamente ($p < 0,05$) por lo que se concluye que tienen efecto similar.

Palabras clave: Ascariasis, Piperazina citrato, antihelmíntico.

ABSTRACT

Ascariasis, a disease caused by *Ascaris*, is one of the diseases with the highest prevalence in domestic pigs of mass production systems, being responsible for large economic losses. The purpose of this research is to compare the effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Peumus boldus* "Boldo" with that of piperazine citrate, a drug used as an anthelmintic in some countries, on: (i) egg embryo (formation of the larva), (ii) *in vitro* survival of larvae L2 and (iii) *in vivo* infectivity of *A. lumbricoides* var. *suum* in mouse, *Mus musculus* BALB / c. The "Boldo" leaves used were imported from Curicó, (Chile) and the hydroalcoholic extract was obtained by the maceration method. The eggs of *A. lumbricoides* var. *suum* were obtained from female parasites collected in the Camal de Trujillo (Peru). The research was designed in three systems: experimental group (extract), positive control (piperazine) and negative control (SSF for the embryo system and the *in vivo* test and medium Minimun Esential Medium (MEM) for the *in vitro* test). The efficacy found in each experiment was: (i) for embryo, 11% in the experimental group (1.5 mg of the extract), 10% with piperazine (1.5 mg) and 90% in the control group (SSF), (ii) for *in vitro* action against L2, 03% in the experimental group (0.5 mg / mL of the extract), 02 with piperazine (0.5 mg / mL) and 99% in the control group (MEM) and (iii) for the efficacy *in vivo*, 0.05% in the experimental group (2 mg / kg extracta), 0.05 in the positive control (1.65 mg / kg piperazine) and 91% in control (SSF). In all cases the percentage of the experimental group and the positive control did not differ statistically ($p < 0.05$), so it is concluded that they have a similar effect.

Keywords: Ascariasis, Piperazine citrate, anthelmintic.

INTRODUCCIÓN

En cerdos de producción masiva, *Ascaris lumbricoides* var. *suumes* uno de los parásitos con mayor prevalencia, siendo la forma de diagnóstico el hallazgo de huevos en heces o de la forma adulta¹⁻⁶. Rara vez afecta otros animales como perros, ovejas, y vacas, aunque bajo condiciones de laboratorio se han podido obtener adultos en algunos especímenes como es el caso de conejos^{7,8}.

La ascariasis causa pérdida de peso y retención de hígados de los cerdos en el matadero, ya que usualmente suelen encontrarse entre 5 a 10 individuos adultos en el intestino delgado e hígado de los cerdos¹⁰⁻¹⁴. Esta parasitosis aumenta en zonas de producción que poseen un sistema obsoleto de engorde y donde los animales tienen mayor contacto con material fecal¹⁵.

El control de la ascariasis se ha convertido en dependiente del tratamiento masivo con antihelmínticos sintéticos, liderado principalmente por la Administración Masiva de Fármacos de la Organización Mundial de la Salud la cual distribuye antihelmínticos tales como el Albendazol, Mebendazol, Levamisol y el Pirantel¹⁶⁻¹⁸. Sin embargo, el uso periódico de antihelmínticos puede conllevar la adquisición de resistencia a dichas drogas por parte del parásito, lo cual es muy grave ya que se trata de un parásito con fuerte potencia biológica^{10,14,19-22}.

La piperazina, que no figura entre los antihelmínticos más usados, ha demostrado ser también eficaz contra la ascariasis, debido a que paraliza a los adultos en lugar de matarlos y, potencialmente, dañarlos; así, éstos son expulsados intactos en el intestino por peristaltismo^{23,24}. La piperazina, bajo el nombre comercial de piperazina citrato o citrato de piperazina, según la Organización Mundial de la Salud, es efectivo en el tratamiento contra *A. lumbricoides* y *E. vermicularis*. En el organismo se absorbe fácilmente, una parte se metaboliza en el hígado y el resto se elimina sin transformar a través de la orina. La dosis recomendada contra la ascariasis es ingerirla como dosis única²⁵. Como contraindicaciones, no se recomienda en pacientes con disfunción renal²⁶; puede producir mareos, alergias o irritación gastrointestinal, la sobredosis puede dar lugar a convulsiones, depresión respiratoria y paresia transitoria de los miembros. Nunca debe administrarse junto al pirantel, ya que son de acción antagonista, pudiendo aumentar el riesgo de convulsiones.²⁵

Debido a la resistencia que el parásito pueda crear frente al uso de antihelmínticos, es que como alternativa se plantea el uso de extractos vegetales, los que poseen principios activos con comprobada actividad antihelmíntica²⁷⁻³², tales como el ascaridol, carvacrol y el timol³³⁻³⁵. Diferentes plantas han demostrado poseer capacidad antihelmíntica, estudios revelan que el extracto acuoso de *Carica papaya* es efectivo contra *A. lumbricoides* y *Ascaridia galli*. Los extractos acuosos, etanólicos y alcohólicos de *Curcubita mexicana* demostraron significativamente la actividad antihelmíntica contra *Moniezia expansa*, *Fasciolopsis buski*, *Ascaris lumbricoides* e *Hymenolepis diminuta*. Así mismo el extracto hidroalcohólico de *Helleborus niger*, *Zingiber officinale*, *Carum copticum*, *Agati gratifolia* y *Magnifera indica* demostraron también tener actividad antihelmíntica contra *Ascaris lumbricoides*.^{36,37}

Dentro de las plantas consideradas como antihelmínticas, se encuentra *Peumus boldus* 'Boldo' el cual se usa ampliamente como digestivo, y como medicina alternativa para afecciones al hígado. Análisis fitoquímicos demuestran los principios activos presentes en sus hojas como hidrocarburos, monoterpenos, ascaridol, cineol y linalol^{35,38,39}. Siendo dentro de estos el más importante y en mayor concentración (21.3%)⁴⁰, el ascaridol, por sus propiedades antibacterianas y antihelmínticas contra *A. lumbricoides*, *Trichuris trichuria* y *Ancylostoma duodenale*⁴¹.

Se han realizado pruebas *in vitro* de diferentes tipos de extractos vegetales de hoja y semillas sobre la formación de la larva L2 de diferentes parásitos, entre los cuales destacan los extractos de *Ficus carica*⁴², *Coriandrum sativum*⁴³, *Eucalyptus globulus*⁴⁴, entre otros; inhibiendo la formación de la larva L2 de nematodos como *T. muris*⁴⁵, *Toxocara canis*⁴⁶, *Haemonchus contortus*⁴⁴ y *A. suum*⁴⁷.

El presente trabajo tiene como finalidad el de comparar el efecto antihelmíntico del extracto de las hojas de *Peumus boldus* con el de la piperazina citrato, sobre la formación de la larva dentro del huevo (embrionación), la viabilidad de la L2 *in vitro* y la capacidad o no de infección de los huevos conteniendo las L2 de *A. lumbricoides* var. *suum*, para que en un futuro pueda usarse como alternativa al tratamiento químico convencional para la ascariasis. Dados los antecedentes, se espera que el efecto entre ambos sea similar en todos los casos y demostrar que el extracto de boldo tiene poder antihelmíntico, por lo que podría utilizarse para tal fin.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico:

En la presente investigación se utilizó: (i) hojas de *P. boldus* secas, las que fueron importadas desde la ciudad de Curicó, provincia de Curicó, en Chile, a cargo de la importadora FRUTOS Y ESPECIAS SAC., bajo el número de lote No. 1211-15324, (ii) huevos de *Ascaris lumbricoides* var. *suum* los que fueron obtenidos de úteros de especímenes hembras, recolectadas de cerdos infectados naturalmente y sacrificados en el camal El Porvenir, distrito de El Porvenir, provincia de Trujillo, departamento de La Libertad, Perú y (iii) ratones *Mus musculus* BALB/c machos, de 21 a 23 días de edad, procedentes del Bioterio del Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud del Perú, con el número de lote No. M-22-2016.

Obtención del extracto hidroalcohólico de *Peumus boldus*

Para obtener el extracto hidroalcohólico se seleccionó las hojas que no presentaran abolladuras, luego se colocaron en estufa a 40°C por 24 horas. Las hojas fueron pulverizadas mediante molino de mano, se tamizaron hasta obtener un tamaño de partícula apropiado (entre uno y dos milímetros). Se dejó macerar en alcohol y agua en proporción 1:3, durante una semana, con agitación diaria. Tras una semana de maceración, se realizó el filtrado, el producto obtenido fue concentrado, exponiéndolo a corriente de aire por al menos 24 horas.

Obtención de huevos de *A. lumbricoides* var. *suum*.

Se eligió el camal de El Porvenir, de la provincia de Trujillo, como lugar de muestreo. Se seleccionó hembras vivas de *A. lumbricoides* var. *suum*, las que fueron colocadas en frascos de vidrio con tapa, conteniendo suero fisiológico, para ser transportadas al laboratorio. Se escogió hembras adultas. Se disectó 2 cm de la parte terminal de los úteros. Se retiró la masa de huevos, que se colocaron en placas de Petri pequeñas con 3 mL de suero fisiológico. Se tomó una pequeña porción de los huevos de cada frasco y se observó al microscopio las características morfológicas y el estadio de maduración.

Determinación del efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus* y la piperazina citrato sobre la embrionación de huevos de *A. lumbricoides* var. *suum*.⁴⁸

Para disgregar los huevos se usó la técnica descrita por Fairbairn, recopilada por Mac Innis y Vogue⁴⁹, la cual consiste en añadir NaOH 0.5 N a la masa de huevos y agitar, como resultados los huevos perderán la cubierta externa. El grupo experimental estuvo compuesto por tres tubos con 3mL de SSF, un mililitro de SSF conteniendo aproximadamente 2000 huevos y 1.5 mg del extracto de boldo. El control positivo, conformado por tres tubos con 3mL de SSF, 1.5 mg de piperazina citrato y 1mL de SSF con 2000 huevos aproximadamente. Por último, el control negativo estuvo formado por tres tubos con 3mL de SSF y 2000 huevos aproximadamente contenidos en 1mL de SSF. Los tubos fueron incubados durante 21 días a temperatura ambiental, terminado este período, se realizó un recuento de huevos no embrionados de cada tubo del grupo experimental y de los grupos controles, se obtuvo el porcentaje de embrionación y se comparó los resultados. Se consideró como huevo embrionado a aquellos que presentaron la larva formada en su interior.

Obtención de L2 de *A. lumbricoides* var. *suum*

Los huevos de *A. lumbricoides* var. *suum* fueron concentrados por centrifugación. Se los lavó con agua destilada y fueron colocados a embrionar en SSF durante 21 días, hasta la observación microscópica de huevos larvados. Se consideró que los estadios larvales pertenecen al primer y segundo estadios (L1 y L2)⁴⁹. Se centrifugó y el sedimento con los huevos larvados, se lavó con agua destilada y se removió la cubierta de los huevos con hipoclorito de sodio al 1% a 37°C por treinta minutos. Posteriormente se lavó con formol SSF. Los huevos larvados se colocaron en medio de eclosión, agitando constantemente de una a dos horas hasta la liberación de las larvas.

Determinación del efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus* y la piperazina citrato sobre las L2 de *A. lumbricoides* var. *suum*.

Se acondicionó tres tubos para el grupo experimental y para cada uno de los grupos control, cada uno con 3mL de medio MEM; a cada tubo se le adicionó 200 larvas L2 contenidas en 1mL de medio MEM, adicional el grupo experimental tuvo 0.5mg/mL del extracto de boldo, el control positivo 0.5mg/mL de piperazina citrato y el control negativo no tuvo ningún aditivo adicional. La

concentración usada de boldo es de acuerdo a referencia de estudios realizados con *Chenopodium ambrosioides*^{50,51}, con el cual comparte mismo principio activo. Los tubos fueron incubados hasta notar un cambio de color en los grupos control. Se realizó observaciones microscópicas y se obtuvo el porcentaje de larvas L móviles, los resultados fueron comparados.

Determinación del efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus* y la piperazina citrato en ratones *Mus musculus* BALB/c, infectados experimentalmente con *A. lumbricoides* var. *suum*.

Se usó tres ratones para cada grupo control y experimental respectivamente. A cada ratón se le inoculó 0.5mL de una suspensión conteniendo 2000 huevos infectivos de *A. lumbricoides* var. *suum* en una sola dosis. Los especímenes serán mantenidos en jaulas y se les proporcionará alimento controlado para evitar la transmisión de otros parásitos. Se les dio 2mg/Kg del extracto hidroalcohólico a cada ratón, del grupo experimental, en ayunas durante tres días seguidos, y 1.65g/Kg de piperazina citrato a cada ratón del grupo control positivo, en dosis única. El grupo del control negativo estuvo conformado solo por ratones infectados con ascariasis. Tras una semana se sacrificó los especímenes, disectando el hígado para observar la carga larvaria presente. Se compararon los resultados de cada grupo.

Análisis estadístico de datos.

Los datos obtenidos serán analizados mediante la prueba estadística, Test de Proporciones, con un valor de significancia $p < 0.05$, usando el programa estadístico SPSS.

RESULTADOS

En la prueba de eficiencia del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus* sobre la embrionación *in vitro* de huevos de *Ascaris lumbricoides* var. *suum*, de los huevos expuestos al tratamiento con el extracto hidroalcohólico, el 11% de huevos se encontraron embrionados. En el grupo control expuesto al tratamiento con la piperazina citrato, tan solo un 10% estuvieron embrionados sin embargo la larva no presentaba movimiento alguno. Mientras que en el grupo control negativo, el 90% de huevos se encontraron embrionados. No existe diferencia significativa entre los datos obtenidos. **(Fig. 1)**

En la prueba *in vitro* de eficacia del extracto hidroalcohólico sobre las larvas L2 de *A. lumbricoides* var. *suum*, de las larvas expuestas solo el 03% presentaron movimiento letárgico, en su mayoría se encontraron sin movimiento alguno. Las del grupo de control positivo con tratamiento de piperazina citrato, el 02% de larvas sobrevivieron al tratamiento presentando movimiento. En el control

negativo, el 99% de larvas se encontraron viables. No hay diferencia significativa entre los datos obtenidos. (Fig. 1)

En ratones BALB/c infectados experimentalmente con ascariasis y la disección de hígados de los especímenes, muestra un 0.05% de larvas móviles en el grupo experimental tratado con el extracto de boldo, mientras que el grupo de control negativo, el 91% de larvas L2 estaban móviles. En el grupo tratado con la piperazina citrato, no se encontró larvas viables en los hígados de los especímenes. No hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos. (Fig. 1)

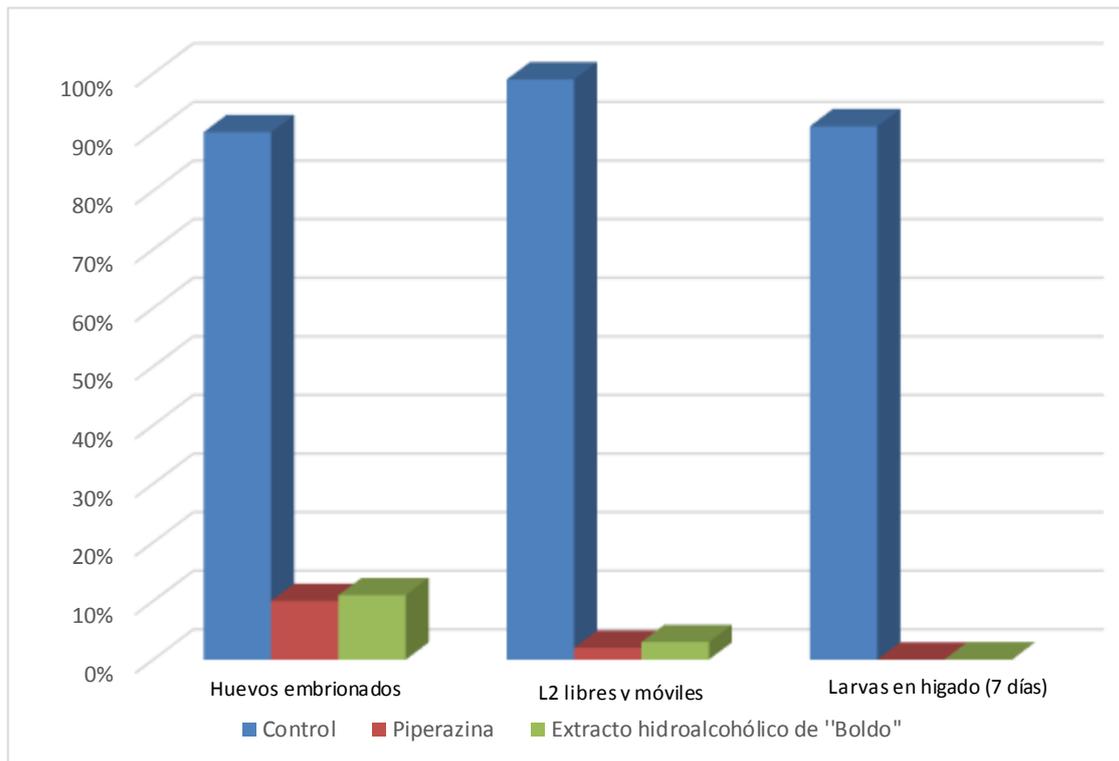


Fig 1. Efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus* sobre (1) la embrionación, (2) larvas L2 *in vitro* e (3) infectividad *in vivo* de *Ascaris lumbricoides* var. *suum* en relación al efecto de la piperazina citrato y solución control (SSF).

DISCUSIÓN

Para medir el efecto sobre el embrionamiento se obtuvieron huevos, se eliminó los detritus, y se puso en contacto tanto con el extracto de *Peumus boldus*, como con la piperazina citrato y solución salina fisiológica, dejando incubar por 21 días. Usando este proceso se logró determinar la eficacia del extracto hidroalcohólico de 'Boldo' en relación a la de la piperazina. Esto se debe a que, en solución salina, los huevos desarrollan normalmente⁴⁸, mientras que, con algún tipo de antihelmíntico, sea natural^{36,37} o químico⁵², la embrionación se ve afectada, reduciendo notablemente la cantidad de huevos embrionados.

Para medir el efecto sobre las L2, se usó el medio mínimo esencial para realizar los ensayos *in vitro* tanto para el extracto hidroalcohólico como para la piperazina citrato; ya que este medio es el de uso preferencial, contiene más aminoácidos y en mayor concentración que otros⁵³, convirtiéndolo en uno de los más apropiados para cultivos celulares y de parásitos.

Para la prueba sobre la infectividad *in vivo* en ratones *Mus musculus* BALB/c, a cada grupo respectivo se le administró dosis única de piperazina y durante tres días, del extracto de 'Boldo', esto se debe a que estas dosis son en caso de la piperazina la recomendada por la OMS²⁵, y en caso del extracto de boldo, es la dosis experimental en base a su principio activo, el ascaridol⁵⁴. El efecto de ambos contra *Ascaris lumbricoides* var. *suum* es descrito más adelante.

Peumus boldus 'Boldo', planta originaria de Chile y Argentina, tiene como principios activos al ascaridol, cineol, linalol, flavonoides, entre otros; tal cual lo citan ciertos autores, basando en el estudio fitoquímico de los distintos extractos obtenidos de dicha planta^{34,35,38}. Sin embargo, de todo este grupo de compuestos, el más importante contra parasitosis es el ascaridol, ya que estudios revelan que es eficaz contra una gran gama de parásitos, dentro de ellos *Ascaris lumbricoides* var. *suum*³⁹.

Uno de los antihelmínticos más reconocidos de origen vegetal es el ascaridol, un monoterpene bicíclico, y principio activo de las hojas de *Peumus boldus* es muy útil en el control de nematodos parásitos ya que reduce la viabilidad de los huevos de *A. lumbricoides* var. *suum*, así mismo actúa, como muchos otros terpenoides, paralizando y narcotizando al endoparásito intestinal y facilitando su desprendimiento del tejido al que se adhieren, facilitando su expulsión por el peristaltismo intestinal⁵⁵.

Esto explica la razón por la cual en los ensayos realizados *in vitro* al someter las larvas a una solución con el extracto hidroalcohólico de *P. boldus*, las larvas L2 quedan inmóviles y en muchos de los casos, en posición rígida, así mismo en el ensayo *in vivo* las larvas halladas en los hígados de los especímenes infectados experimentalmente con ascariasis, presentaron falta de movimiento y del mismo modo rigidez a lo largo de toda la larva, lo que se explica por lo anteriormente mencionado.

La piperazina citrato actúa sobre la unión mioneural o placa motriz del áscaris, produciendo parálisis y expulsión del parásito por peristaltismo, al igual que con el ascaridol. Su selectividad por los helmintos se debe a que los vertebrados solo emplean el receptor GABA en el sistema nervioso central, además de que el receptor en las membranas de los parásitos es una isoforma diferente al de los vertebrados. La piperazina actúa como agonista del receptor GABA del parásito, el cual está ligado a un canal de cloro y se localiza en las membranas sinápticas y extrasinápticas de los músculos. Tanto el GABA como la piperazina incrementan la apertura de los canales de cloro de la membrana del músculo, hiperpolarizando la membrana, incrementando su conductancia lo que desencadena la parálisis neuromuscular. El resultado final es un efecto narcótico y paralizante del verme, el cual

pierde su motilidad y por lo tanto su capacidad de mantener su sitio preferencial de alimentación en el tracto gastrointestinal^{56,57}.

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *P. boldus* demostró ser tan efectiva como el antihelmítico de uso comercial, piperazina citrato, ambos redujeron significativamente la viabilidad de huevos de *A. lumbricoides* var. *suum*, así mismo la movilidad de las larvas L2 del parásito, por los mecanismos ya mencionados.

Se conoce el mecanismo de acción de la piperazina citrato, pero no se describe a perfección el modo de actuar del ascaridol. Por lo que aún deben hacerse más investigaciones al respecto. Se concluye que: (i) el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus*, a la concentración de 0.5 mg/mL, tiene un efecto similar al de la piperazina citrato, sobre la embrionación de huevos en las larvas L2 de *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. (ii) a la concentración de 0.5mg/mL, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus*, tiene un efecto similar al de la piperazina citrato sobre las larvas L2 de *Ascaris lumbricoides* var. *Suum* y (iii) en ratones BALB/c la eficacia del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus* a la concentración de 2mg/Kg, como antihelmítico contra la ascariasis, tiene una eficiencia similar al de la piperazina citrato, antihelmítico usado contra dicha enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sánchez J. Etiología y epidemiología de la ascariosis porcina. *Mundoganadero*. 2002; 145: 42-48.
2. Roepstorff A, Nansen P. Epidemiology and control of helminth infections in pig under intensive and nom-intensive production systems. *Vet. Parasitol.* 1994; 54:69-85.
3. Ortega LM. Las parasitosis en la producción porcina actual (I): etiología y principales factores epidemiológicos implicados en el control. *Rev. Anaporc*, 1998; 182:157-187.
4. Stewart TB, Bidner TD, Southern LL, Simmons LA. Efficacy of fenbendazole against migrating *Ascaris suum* larvae in pigs. *Am J Vet Res* 1984; 45(5):984e6.
5. Thienpont D, Vanparijs O, Niemegeers C, Marsboom R. Biological and pharmacological properties of flubendazole. *Arznei-Forschung* 1978; 28(4):605e12.
6. Kennedy T, Lucas MJ, Froe DL. Comparative efficacy of pyrantel tartrate, ivermectin and fenbendazole against experimentally induced immature *Ascaris suum* in pigs. *Agri-Practice* 1987; 8(2):19e21.
7. Oakley GA. Activity of levamisole hydrochloride administered subcutaneously against *A. suum* infections in pigs. *Vet Rec* 1974; 95(9):190e3.
8. Ortega Q.F. E, Jirón L.O. Medicamentos antihelmínticos. *Atención Med.*, 32. 1978.
9. Goth. A.; *Farmacología Médica*; 8a. Edición, España; Ediciones DOYMA.S.A.; 1979. Pág. 625. 630-633.
10. Modelo OMS de Información sobre Prescripción de Medicamentos, Medicamentos utilizados en las
11. Tagboto S. and Townson S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Adv Parasitol* 2001; 50: 199-295.
12. Akhtar M.S, Iqbal Z., Khan M.N. and Lateef M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. *Small Ruminant Research* 2000; 38: 99-107.
13. Athansiadou S., Githior J. and Kyriazakis I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal* 2007; 1:1392-1400.

14. Mali R.G. and Mehta A.A. A review of anthelmintic plants. *Natural Product Radiance* 2008; 7: 466-475.
15. Restrepo M, Isaza D. Estudio comparativo de flubendazol, oxantel-pirantel, albendazol y mebendazol en el tratamiento de helmintos transmitidos por el suelo. *Acta Médica Colombiana*. 1987. Vol. 12 No. 5 (344-352).
16. Moreno FC, Gordon IJ, Wright AD, Benvenuti MA, Saumell CA. Efecto antihelmíntico in vitro de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Arch Med Vet*. 2010. 42, 155-163.
17. Dhar R.N., Garg L.C. and Pathak R.D. Anthelmintic activity of *Carica papaya* seeds. *Indian J Pharm*. 1965; 27: 335-336.
18. Gómez JR. Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat*. Vol.7 (1) 2008.
19. Del Valle J M, Rogalinski T, Zetzel C, Brunner G. Extraction of boldo (*Peumus boldus* M.) leaves supercritical CO and hot pressurized 2 water. *Food Research International* 2005; 38 (2): 203-213.
20. Shukranul Mawa, Khairana Husain, Ibrahim Jantan. *Ficus carica* L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. *Review*. 2013; 2-5.
21. Eguale T, Tilahun G, Debella A, Feleke A, Makonnen E. In vitro and in vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *J Ethnopharmacol* 2007; 110 (3): 428-33.
22. Kanojija D, Shanker D, Sudan V, Jaiswal AK, Parashar R. In vitro and in vivo efficacy of extracts of leaves of *Eucalyptus globulus* on ovine gastrointestinal nematodes. *Parasitol Res*. 2015; 114(1):141-8.
23. Macedo LTF, Bevilacqua CML, B. de Oliveira LM, Camurça-Vasconcelos ALF, Vieira L da S. et al. Atividade ovicida e larvicida in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal. 2009; 18(3) 62-64.
24. Sven Klimpel, Fathy Abdel-Ghaffar, Khaled AS, Al-Rasheid, Gülenem A, Fischer K, et al. The effects of different plant extracts on nematodes. *Parasitol Res*. 2011; 108:1047-1050.
25. Siccha Aguilar K, Terán V, Jara CA. Efecto del extracto etanólico de *Ficus carica* (Moraceae) sobre la formación de la larva 2 de *Ascaris suum* y *Trichuris ovis*, en condiciones de laboratorio. *REBIOL* 2015; 35(2): 62-68
26. Fairbairn, D., 1970 Physiological hatching of *Ascaris lumbricoides* eggs. In MAC INNIS, A. and VOGUE. 1970. *Experiments and techniques in Parasitology* W. N. Freeman and Co. San Francisco, pp. 21-23.
27. Degenhardt RT, Farias IV, Grassi LT, Franchi Jr GC, Nowill AE, Da S. Bittencourt CM, Wagner TM, De Souza MM, Cruza AB, Malheiros A. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2016;26(1):56-61.
28. Monzote L, Montalvo AM, Almanonni S, Scull R, Migdalia M, Abreu J. Activity of the Essential Oil from *Chenopodium ambrosioides* Grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy*. 2006;52(3):130-6
29. Lara Massara C, Salgado Ferreira R, Leonardo Guerra H, Dos Santos Carvalho O. In vitro study on thiabendazole action on viability of *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758) eggs. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;34(4): 319-322.
30. Lopez De Guimaraes D, Neyra Llanos RS, Romero Acevedo, JH. Ascariasis: comparación de la eficacia terapéutica entre paico y albendazol en niños de Huaraz. *Rev. gastroenterol*. 2001. 21(3): 212-219
31. López-Sáez José Antonio, Pérez-Soto Josué. Etnobotánica medicinal y parasitosis intestinales en la Isla de Ometepe, Nicaragua. *Polibotánica*. 2010; (30): 137-161.
32. Calderón CN, Jara CC. Actividad anti-helmíntica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peumus boldus* (Monimiaceae) sobre larvas L2 de *Ascaris suum*. *Peruv j parasitol*. 2016; 24(1):e15-e23