

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUÍZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas
obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L.
“choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica***

Elizabeth Amambal Cholán

Elvis Vega Alarcón

Asesora:

Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Co-asesores:

Med. Vet. Cristian Ángel Hobán Vergara

PhD. Pedro Luis Ortiz Oblitas

Mg. Q.F. Mayar Luis Ganoza Yupanqui

CAJAMARCA – PERÚ

ABRIL – 2017

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUÍZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas
obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L.
“choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica***

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requerimientos para optar el
Título Profesional de Químico Farmacéutico

Bach. Elizabeth Amambal Cholán

Bach. Elvis Vega Alarcón

Asesora: Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Co-asesores: Med. Vet. Cristian Ángel Hobán Vergara

PhD. Pedro Luis Ortiz Oblitas

Mg. Q.F Mayar Luis Ganoza Yupanqui

Cajamarca – Perú

Abril – 2017

COPYRIGHT © 2017 by
Amambal Cholán, Elizabeth
Vega Alarcón, Elvis
Todos los derechos reservados

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO DICTAMINADOR:

De conformidad con el reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, sometemos a su evaluación y elevado criterio profesional la tesis intitulada: **Efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica***, con la cual aspiramos optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Es propicia esta oportunidad para manifestar nuestro más sincero reconocimiento a nuestra Alma Mater y a toda su plana docente, que con su capacidad y su buena voluntad contribuyeron a nuestra formación profesional.

Señores miembros del jurado, dejamos a su disposición la presente tesis para su evaluación y sugerencias.

Cajamarca, abril del 2017

Amambal Cholán Elizabeth
BACH. EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Vega Alarcón Elvis
BACH. EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUÍZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

APROBACIÓN DE TESIS PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL

Efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*.

JURADO EVALUADOR

Mg. Blgo. Héctor Emilio Garay Montañez
PRESIDENTE

Q.F. Wálter Nelson Gutiérrez Zepa
MIEMBRO

Mg. Q.F Jéssica Nathalie Bardales Valdivia
MIEMBRO

DEDICATORIA

A DIOS: Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida y haberme dado salud para lograr mis objetivos, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles con su infinita bondad y amor, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A MIS PADRES: SANTOS AMAMBAL Y MARÍA CHOLÁN por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, quienes con sus consejos han sabido guiarme para culminar mi carrera profesional.

A MI AMIGA: DELGADO DELGADO ROSMERÝ que siempre está a mi lado brindándome su apoyo para seguir adelante y todos mis amigos, que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional hasta el final del camino y que siempre seguiremos siendo amigos.

A todos mis Docentes, gracias por su tiempo, por su apoyo así como por los conocimientos que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

ELIZABETH

DEDICATORIA

A DIOS: Quien ha sido el soporte en mi vida y por permitirme culminar con éxito todos estos años de estudio, para él mi agradecimiento infinito.

A MIS PADRES: JOSÉ R. VEGA Y ESPERANZA ALARCÓN por ser el ejemplo de esfuerzo y perseverancia, por su incondicional apoyo, consejos y comprensión constante que me han dado para seguir avanzando y lograr mis metas, gracias por su persistencia y confiar en mí.

A la memoria de mis abuelos CLODOMIRO VEGA Y ALINDOR MIREZ, por cuidarme desde el cielo.

A MI ALMA MATER Y MAESTROS DE LA FACULTAD, quienes nos transmitieron sus conocimientos durante todo este tiempo, por prepararme para un futuro competitivo, en especial a la Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia por haber compartido sus lecciones y experiencias, por ser gran apoyo en la elaboración de mi tesis.

ELVIS

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradecer a Dios por habernos dado la fortaleza en todo momento y guiado a lo largo de nuestra carrera profesional.

Agradecemos al Mg. Q.F. Mayar Luis Ganoza Yupanqui de la Universidad Nacional de Trujillo por la colaboración, paciencia y apoyo brindado con el laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

De igual manera al PhD. Pedro Ortiz Oblitas y al Médico Veterinario Cristian Ángel Hobán Vergara, docentes investigadores de la Universidad Nacional de Cajamarca por su colaboración, experiencia, conocimientos impartidos y por el apoyo brindado en el momento que más hemos necesitado.

Al Jurado evaluador de tesis, Mg. Blgo. Héctor Emilio Garay Montañez, Q.F. Wálter Nelson Gutiérrez Zerpa y Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia por sus aportes a nuestro trabajo.

A nuestra asesora Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia, quien con su experiencia ha sido nuestra guía idónea, durante el proceso que ha llevado a la realización de nuestra tesis, por habernos brindado el tiempo necesario para que llegue a culminarse.

Elizabeth y Elvis

RESUMEN

La fascioliasis es causada por el tremátodo *Fasciola hepatica* que tiene como hospedador intermediario a caracoles de agua dulce del género *Lymnaea*, así que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto molusquicida del liofilizado de las saponinas triterpénicas obtenidas a partir de las cáscaras de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a dichos caracoles, con la finalidad de interrumpir el ciclo biológico de *Fasciola hepatica*. Mediante el método de fraccionamiento en Sistema Soxhlet, a partir de los frutos de *Sapindus saponaria* L. se obtuvo un crudo de saponinas, las cuales fueron liofilizadas y luego diluidas a diferentes concentraciones para luego enfrentarlos a caracoles del género *Lymnaea* y de esta manera determinar el efecto molusquicida de las saponinas triterpénicas. Los resultados del ensayo mostraron que la eficacia de las saponinas liofilizadas es estadísticamente significativa con respecto al tiempo ($p = 0,000038$) con un porcentaje del 100% a una concentración de 220 ppm durante 48 horas, frente a caracoles criados en condiciones de laboratorio. El presente trabajo demuestra que el liofilizado de saponinas triterpénicas tienen actividad molusquicida frente al hospedador intermediario de *Fasciola hepatica* convirtiéndose en una alternativa de control de la parasitosis que este tremátodo produce.

Palabras Claves: *Sapindus saponaria* L “choloque”, *Lymnaea*, molusquicida, liofilizado.

ABSTRACT

The fascioliasis is caused by the fluke *Fasciola hepatica* has as intermediate host to freshwater snails of the genus *Lymnaea*, so that the objective of this work was to evaluate the effect of the lyophilizate of the molluscicidal triterpenoid saponins obtained from the shells of *Sapindus saponaria* L. "choloque" against these snails, with the purpose of interrupting the life cycle of *Fasciola hepatica*. Using the method of fractionation in Soxhlet System, from the fruit of *Sapindus saponaria* L. was obtained a crude saponins, which were dried and then diluted to different concentrations and then face them to snails of the genus *Lymnaea* and in this way to determine the effect of the molluscicidal triterpenic saponins. The test results showed that the efficacy of the lyophilized saponins is statistically significant with respect to time ($p = 0,000038$) with a percentage of the 100% at a concentration of 220 ppm for 48 hours, compared to snails reared in laboratory conditions. The present work demonstrates that the lyophilisate of triterpénicas saponins have activity molluscicidal in front of the intermediate host of *Fasciola hepatica* becoming an alternative control of the parasitosis that this fluke produces.

Keywords: *Sapindus saponaria* L "choloque", *Lymnaea*, molluscicide, lyophilized.

ÍNDICE

PRESENTACIÓN.....	III
JURADO EVALUADOR.....	IV
DEDICATORIA.....	V
AGRADECIMIENTO.....	VII
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE TABLAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Teorías que sustentan la investigación.....	4
2.2. Bases teóricas.....	6
2.2.1. Etiología.....	6
2.2.2. <i>Fasciola hepatica</i>	6
2.2.3. Epidemiología.....	7
2.2.4. Huésped intermediario de <i>Fasciola hepatica</i>	8
2.2.5. El género <i>Sapindus</i> (Sapindaceae).....	11
2.2.6. <i>Sapindus saponaria</i> L.....	11
2.2.7. Fitoconstituyentes.....	17
2.2.8. Descripción general de los glicósidos.....	17

2.2.9. Importancia de las saponinas.....	18
2.2.10. Saponinas.....	19
2.2.11. Saponinas triterpénicas.....	20
2.2.12. Saponinas esteroideas.....	23
2.2.13. Hemólisis.....	24
III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	27
3.1. Unidad de análisis, universo y muestra.....	27
3.2. Métodos de investigación.....	28
3.2.1. De acuerdo al fin que se persigue.....	28
3.2.2. De acuerdo a la técnica de contrastación.....	28
3.3. Técnicas de investigación.....	29
3.4. Instrumentos, equipos, materiales y reactivos.....	34
3.4.1. Instrumentos.....	34
3.4.2. Equipos.....	35
3.4.3. Materiales.....	35
3.4.4. Reactivos.....	35
3.5. Técnicas de análisis e interpretación de datos.....	38
IV. RESULTADOS.....	39
V. DISCUSIÓN.....	47
VI. CONCLUSIONES.....	52
VII. RECOMENDACIONES.....	53
VIII. REFERENCIAS BLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Usos tradicionales de <i>Sapindus spp.</i>	13
Tabla 2.	Ensayos realizados a <i>Sapindus spp.</i>	15
Tabla 3.	Estructuras de algunas saponinas triterpenoides más conocidas que se han establecido recientemente.	21
Tabla 4.	Reacciones de identificación de saponinas triterpénicas en el pericarpio crudo de frutos de <i>Sapindus saponaria</i> L.....	38
Tabla 5.	Reacciones de identificación de saponinas triterpénicas en el liofilizado del extracto etanólico del pericarpio de frutos de <i>Sapindus saponaria</i> L.....	38
Tabla 6.	Porcentaje de rendimiento de las saponinas triterpénicas liofilizadas.	39
Tabla 7.	Comparación de la mortalidad de los caracoles del género <i>Lymnaea</i> a diferentes concentraciones y tiempos.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Evaluación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas frente a caracoles del género <i>Lymnaea</i> después de dos horas de post-exposición a diferentes concentraciones.....	41
Figura 2.	Evaluación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas frente a caracoles del género <i>Lymnaea</i> después de cuatro horas de post-exposición a diferentes concentraciones.....	42
Figura 3.	Evaluación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas frente a caracoles del género <i>Lymnaea</i> después de veinticuatro horas de post-exposición a diferentes concentraciones.	43
Figura 4.	Evaluación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas frente a caracoles del género <i>Lymnaea</i> después de cuarenta y ocho horas de post-exposición a diferentes concentraciones.....	44
Figura 5.	Comparación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas a diferentes tiempos y concentraciones.	45

I. INTRODUCCIÓN

La fascioliasis causada por el tremátodo *Fasciola hepatica*, 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 del animal.^{8,14,15}

La fascioliasis humana es un problema significativo de Salud Pública a nivel mundial, en la actualidad hay entre 2,4 y 17 millones de casos humanos y 91,1 millones de personas en riesgo de infección en el mundo.^{29,39} A pesar que la mortalidad debido a fascioliasis es relativamente baja, infecciones masivas o repetidas pueden producir una considerable morbilidad.³⁹

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.^{30,34} Los focos de transmisión de la fascioliasis están marcados por la presencia de poblaciones de caracoles Lymneidos.^{11,14,30} El éxito de la infección de un tremátodo 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.² Los parásitos pueden colonizar nuevos huéspedes intermediarios y adaptarse a nuevos ambientes, añadiendo que *Fasciola hepatica*,

se puede adaptar a Lymnaeidos autóctonos.^{35,51} En Cajamarca han sido caracterizados molecularmente tres caracoles Lymneidos, *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* y *Lymnaea schirazensis*.⁷

En la lucha para el control de *F. hepatica* y de sus hospederos intermediarios se han empleado extractos vegetales con diversas propiedades,^{25,26} sobre todo aquellas con efecto molusquicidas.^{54,57}

Uno de los métodos más eficaces para la prevención y propagación de la fascioliasis es el uso de molusquicidas,^{26,44,61} los de origen vegetal están siendo de gran importancia en comparación con lo molusquicidas de origen sintético, ya que son más eficaces y más económicos.^{26,32,52,62} El control adecuado de estos hospederos repercutió muy significativamente en la transmisión de esta parasitosis es por ello la importancia de utilizar extractos vegetales además, tienen menor impacto sobre el medio ambiente ya que son biodegradables, así conservar la biodiversidad. Es por ello, que la identificación y utilización de diferentes compuestos bioactivos que tengan un mayor impacto en esta parasitosis, fortalecerán el desarrollo de diferentes tratamientos y de esta forma, se podría eliminar la enfermedad antes de que se produzcan daños en los hospederos definitivos, consecuentemente se podrían beneficiar gran número de personas en Perú y sobre todo en Cajamarca.

Además, está demostrado que el pericarpio del fruto de *Sapindus saponaria* L. tiene efectos larvicidas, actividad antimicrobiana, espermicida, insecticida, fungicida y actividad molusquicida.¹ Es así que se planteó la siguiente interrogante:

¿Tiene actividad molusquicida el liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*?

Ante lo cual se postuló la siguiente hipótesis:

El liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” tienen actividad molusquicida frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*.

Teniendo como objetivo general:

Demostrar el efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*.

Y como objetivos específicos:

- Obtener el liofilizado de saponinas triterpénicas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque”.
- Determinar la concentración más adecuada para obtener el efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Teorías que sustentan la investigación

En la investigación del potencial medicinal del género *Sapindus* (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L., se dio a conocer las propiedades deterativas de estas especies que le son conferidas por las saponinas que contiene el pericarpio, la tensioactividad característica de estos glicósidos son especialmente tóxicos para los animales de sangre fría, de ahí los efectos biocidas comprobados de una u otra forma mediante experimentos de actividad farmacológica *in vitro* o *in vivo*; y en algunos casos, encontró varios estudios y en más de una especie la acción molusquicida.¹

Así también se demostró la actividad molusquicida de los extractos obtenidos con solventes orgánicos de *Sapindus mukorossi* y *Terminalia chebula* frente a caracoles de agua dulce *Lymnaea acuminata*, además indica que los extractos etanólicos, son más eficaces que los de origen orgánico, y sus efectos son dependientes de la concentración y del tiempo.⁶¹

Al evaluar la actividad molusquicida del crudo de saponinas del pericarpio de *Sapindus saponaria* L. extraídas por fraccionamiento con etanol, se encontró dicha actividad sobre el caracol *Biomphalaria glabrata* Say desde una concentración de 10 ppm.⁵⁰

En varios estudios se demostró la toxicidad de los extractos acuosos, etanólicos y orgánicos de *Agave americana*, *Furcraea andina* (Asparagaceae) y *Sapindus saponaria* L., (Sapindaceae) sobre el caracol invasor *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), *Candida albicans* y el piojo saltador del camu camu (Hemiptera: Psyllidae), atribuyendole las propiedades molusquicidas a las saponinas triterpénicas que poseen ácido oleico y hederagenina del pericarpo del fruto y de las semillas, y también sesquiterpenos acíclicos oligoglicósidos.^{4,24-26,43,47,48,53,60}

Las especies de la familia Sapindaceae se caracterizan por la presencia de saponinas triterpénicas, sustancias que poseen propiedades farmacológicas tales como hemolíticas, antimicrobiales, insecticidas, molusquicidas y antitumorales.¹³

Todas las especies de *Sapindus* que han sido estudiadas presentan una alta actividad molusquicida, pero la que mayor efectividad alcanzó fue *Sapindus saponaria* L.¹

Un estudio realizado, en niños en edad escolar entre las edades de 2 - 18 años, de seis localidades de la provincia de Cajamarca - Perú, localizadas entre 2627 y 3061 m de altitud, demostraron que la prevalencia de fascioliasis va desde 6,7 hasta 47,7%, lo cual resultó ser el más alto registro en humanos hasta ahora en esta zona hiperendémica.²⁰

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Etiología

La fascioliasis es una enfermedad ocasionada por *Fasciola hepatica* y *Fasciola gigantica*,¹⁴ estas se encuentran distribuidas en muchas zonas de África, Asia y América.^{34,39} Para que fasciola complete su ciclo de vida necesita de dos hospederos, un intermediario, especies de caracoles de agua dulce de la familia Lymnaeidae (*Lymnaea viatrix*, *Pseudosuccinea columella*, *Galba truncatula*, *Lymnaea schirazensis*) y un hospedador definitivo que incluye muchos mamíferos herbívoros, incluyendo al hombre.^{30,36,37,51}

2.2.2. *Fasciola hepatica*

La *Fasciola hepatica* elimina huevos por medio de la bilis y las heces; que al caer en corrientes de agua se embrionan entre 10 a 15 días dando salida a una larva ciliada o miracidio nadador que posee glándulas secretoras necesarias para penetrar al hospedador intermediario. Cuando la larva encuentra un caracol de la familia *Lymnaea* adecuada, pierde los cilios transformándose en esporocisto sacciforme y se inicia la “explosión reproductiva” en cadena, es decir, las redias madres existentes dentro del esporocisto son liberadas y de inmediato comienzan a generarse las redias hijas. Este proceso multiplicador y asexual ocurre principalmente en el hepatopáncreas del molusco. Finalmente, salen las cercarias bien diferenciadas y se

adhieren a las hojas de los berros acuáticos al secretar un fluído gomoso y elástico que al solidificarse forja la metacercaria infectante.^{11,12,14}

2.2.3. Epidemiología

La fascioliasis es una enfermedad de distribución mundial, que se encuentra en las regiones subtropicales y tropicales del mundo, incluyendo América Latina, EE.UU., Reino Unido, Irlanda, Europa, Oriente Medio, Asia y África.³⁹ Además abarca factores que afectarán la prevalencia y la intensidad de la infección con el parásito y cómo éstas impactan sobre los animales, tanto en términos de enfermedad clínica y de la economía.¹⁵ La epidemiología de la enfermedad depende de factores tales como el medio ambiente y la susceptibilidad de las especies huéspedes (o individuo) a través de la resistencia innata o adquirida. Por otra parte, la disponibilidad de un gran número de huéspedes definitivos e intermedios susceptibles aumentará la capacidad del parásito para reproducirse. Para ser eficaces, las medidas de control dependen de una buena comprensión de la epidemiología de la enfermedad de modo que las estrategias de intervención pueden ser diseñadas para producir el mayor beneficio posible en términos de enfermedad o reducir al mínimo la productividad de los animales en riesgo de infección.¹⁴

En la fascioliasis humana, se han descrito situaciones de hipoendemia, mesoendemia e hiperendemia.^{16,36-39}

2.2.4. Huésped intermediario de *Fasciola hepatica*

Los caracoles que intervienen como vectores realmente son anfibios y viven tanto dentro como alrededor de zonas encharcadas o con cursos de agua permanentes (pozos, fuentes, represas, lagos, pantanos, ríos), así como en entornos con vegetales húmedos o en proximidad de bebederos, zonas periódicamente inundadas. En esos lugares y con temperatura adecuada llegan a ser enormemente prolíficos, puesto que en condiciones óptimas, un caracol puede producir hasta 100000 caracoles en un sólo año.^{11,14}

El éxito de la infección de un tremátodo 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.² Existe una diversidad de factores que provocan la extensión de las especies intermediarias de *Fasciola hepatica* como es el caso de los caracoles que actúan como vectores, como los Lymneidos que se encuentran en contacto directo con los animales porque ambos comparten hábitats similares. Esto es lo que sucede con respecto a *Galba truncatula*, un caracol que, por lo general, se encuentra en lugares encharcados y en el fango y puede ser arrastrado entre las pezuñas de los animales, y dispersados a otros

lugares, introduciéndose así de manera accidental donde no es habitual. Esto es lo que probablemente ha sucedido en las zonas de Bolivia.³⁶ En Cajamarca se ha identificado molecularmente la presencia de tres, especies morfológicamente similares, Lymnaeidos pertenecientes al grupo Galba / Fossaria: *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* y *L. schirazensis*, siendo la más abundante *Galba truncatula*.⁷

Se menciona, igualmente, que existen tres especies diferentes de caracoles intermediarios como *Galba truncatula*, *Fossaria cubensis*, y *Pseudosuccinea columella*.⁵¹ Externamente el caracol del género *Lymnaea* está constituido por un pie, dos antenas y un caparazón e internamente por hepatopáncreas, riñones, ductos glandulares digestivos, conductos hepáticos, glándula digestiva, senos venosos, ductos lagunares. Las células epiteliales de *L. truncatula* tienen un tamaño de 5 a 10 μm y el epitelio respiratorio mide alrededor de 15 - 16 μm en promedio, en cambio, las células epiteliales de *L. cubensis* miden de 10 a 14 μm y el epitelio respiratorio aproximadamente 16 μm . La sustancia intercelular de las células epiteliales del molusco está compuesta de mucopolisacáridos, con gran contenido de ácido hialurónico. Las células que configuran el tejido conjuntivo de *L. truncatula* (no así las *L. cubensis*) están representadas por células fusiformes y células en forma de estrella que con sus ramales se sujetan a la membrana basal que es muy delgada,

y no es raro observar que se acompañe de fibras elásticas de colágeno unidas dentro de paquetes robustos. Estas fibras son siempre notables por su gran durabilidad y su poca elasticidad, además son parte de la sustancia intercelular que es amorfa, viscosa e incolora, la cual no tiene diferenciación morfológica visible y no es observable mediante microscopía óptica. También está constituido por tegumentos, epitelio intertegumentario del hepatopáncreas, tejido conjuntivo del hígado, glándula digestiva, senos venosos, ductos lagunares, hígado, las fibras del tejido conjuntivo se desarrollan de manera abundante, mucopolisacáridos, ductos glandulares digestivos, hígado que consiste en numerosos tubos formados por una capa de células hepáticas con núcleo redondo u oval situado en la parte basal de la célula, y tejido elástico de sostén (células ovaladas con núcleo redondo u oval pero con superficie espiculada). La presión ejercida sobre los conductos hepáticos por los parásitos genera la desaparición de sus hendiduras; dificulta el acceso de hemolinfa, sustancia alimenticia y oxígeno, lo que genera que se produzcan depósitos adiposos en el hígado del molusco y se presente autólisis de las células digestivas; los moluscos mueren de hambre, además de pasar por un proceso tóxico al tener la hemolinfa problemas de salida hacia los riñones, por lo que se acumula junto con los productos metabólicos de los parásitos, estos productos son absorbidos por el epitelio del hígado, lo que genera profundas alteraciones fisiológicas y muerte de las células hepáticas. El hígado de los moluscos *L. truncatula* y *L.*

cubensis consiste en numerosos tubos redondos y ovalados en la sección transversal unidos a la masa compacta por tejido conjuntivo. Además están formados por una capa de células de 2 tipos: Hepático (grandes células cilíndricas con núcleo redondo u oval situado en la parte basal de la célula) y tejido elástico de sostén (células ovaladas por núcleo redondo u oval pero con superficie espiculada).^{11,14,58}

2.2.5. El género *Sapindus* (Sapindaceae)

Está formado por unas 12 especies de árboles o arbustos distribuidos por los trópicos y subtrópicos del mundo. *Sapindus saponaria* L. “choloque” es una especie nativa del Perú que existe desde épocas precolombinas, sus frutos y semillas se muestran en restos arqueológicos pertenecientes a culturales pre-incas. Cada fruto del boliche contiene saponinas triterpenoides, taninos, gomas, azúcares y aceites. En la naturaleza, las saponinas triterpénicas están ampliamente distribuidas, las pentacíclicas se encuentran con frecuencia en las monocotiledóneas, especialmente en las familias de la Dioscóreas, Amarilidáceas e Iliáceas.^{1,3}

2.2.6. *Sapindus saponaria* L.

Es un árbol tropical de mediano tamaño y es conocido vulgarmente como jaboncillo, boliche, campeche, jurupe o choloque.^{3,26,63}

- **Reino** Plantae
- **División** Magnoliophyta
- **Clase** Magnoliopsida
- **Orden** Sapindales
- **Familia** Sapindaceae
- **Género** *Sapindus*
- **Especie** *Sapindus saponaria* L.

- **Distribución geográfica:** Especie de amplia distribución desde México hasta Argentina. En las provincias de Esmeraldas, Galápagos, Guayas, Imbabura, Los Ríos, Loja y Manabí. Crece entre 0 - 2500 m.s.n.m en bosque seco y valles secos interandinos.³
- **Descripción botánica:** Árbol que alcanza entre 8 - 15 m de alto y de 45 - 50 cm de DAP. Fuste muy ramificado. Copa redonda a ovalada, estrecha. Corteza escamosa (a veces lisa), grisácea a verdosa, levemente fisurada. Ramitas terminales cilíndricas, glabrescentes. Hojas compuestas, alternas, imparipinadas con borde entero, lanceoladas, de 10 - 20 cm de longitud, foliolos 3 - 4 pares, alternos, de 5 - 10 cm de longitud, 2,5 - 4,3 cm de ancho, con láminas lanceoladas elípticas, ápice obtuso, base asimétrica, borde entero, 2 - 4 pares de nervios secundarios, glabros, tiene el raquis alado. Planta monoica; flores unisexuales, blancas, 0,5 cm de

diámetro, en inflorescencias de racimo compuesto o panoja; flores masculinas con 5 sépalos y pétalos, estambres 7 - 8; flores femeninas con periantio reducido o nulo. Fruto una drupa monospermica, castaño, de 11,5 cm de diámetro con una cáscara semitransparente, una sola semilla de color negro, lustrosa, muy dura.³ Comúnmente es conocido como jaboncillo, jaboncillo occidental, por su propiedad deterativa.¹

Tabla 1. Usos tradicionales de *Sapindus spp.*

Uso	A	B	C	D	E	Total
Abortivo		x			xxxxxx	7
Alexifármaco	x		xxx		xx	6
Amigdalitis		x				1
Antidiarréico			x			1
Antihelmíntico			x			1
Antipirético	x	xx	xx			5
Antirreumático		x	xxx			4
Antirreumático		x				1
Antitusivo		x				1
Antivenin			xxx			3
Asma bronquial			x		xx	3
Asma humoral			x			1
Astringente			xxx			3
Bactericida					x	1
Baños			x			1
Cabello, cuidado		x	x	x		3
Cataratas			x			1
Circulación			x			1
Clorosis		xxx				3
Cólera			x		x	2
Demulcente					x	1
Dentición			x			1
Detersivo		xx	xx		x	5
Dolor uterino			x		x	2

Continuación de la tabla 1.

Emenagogo	x			x	2	
Emético	x			xx	3	
Encías	x	x			2	
Epilepsia	xxx	x		xxx	7	
Escabicida	x	xx	xx		5	
Exorcismo	x				1	
Expectorante	xx	xx		xxx	7	
Halitosis	x				1	
Hemicrania				x	1	
Histeria				xxx	3	
Inconsciencia				x	1	
Ictericia		x			1	
Insecticida		x	xxx		4	
Lumbalgia				x	1	
Glándulas				x	1	
Molusquicida		x			1	
Oftalmias		xx			2	
Parto, facilitar	x			x	2	
Parálisis				x	1	
Pecas	x				1	
Pediculicida	x				1	
Piel, afecciones	xxx		xx	xx	7	
Piscida	xx	xxxxxx	xx	xxx	13	
Psoriasis		x			1	
Purgante				x	1	
Salivación	xx				2	
Soporífero		xx			2	
Riñón, enfermedades		xx			1	
Tónico		xxxx		x	5	
Veneno	x	x			2	
Úlceras		x			1	
Uterotónico				x	1	
Total reportes	2	34	54	10	41	139
Total usos	2	23	32	5	24	

A: *S. laurifolius*, B: *S. mukorossi*, C: *S. saponaria*, D: *S. rarak*, E: *S. trifoliatius*.

Fuente: Abreu O. Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. Rev Cuba Plant Med. 2005; 10: 3 - 4.¹

La parte más empleada es el fruto (pericarpio), aunque también hay referencias de uso de la hoja, ramas, corteza y semillas. La vías por las que se puede administrar son diversas tanto internas como externas se tienen la vía oral, nasal, oftálmica y vaginal. La decocción es el modo más usual de prepararla. Los países donde se ha empleado el género como medicinal son: Siria, Lanka, India, Nepal, Japón, Tailandia, específicamente *S. saponaria* se ha empleado en Egipto, Kenya, EE.UU, Perú, Brasil, Puerto Rico y Cuba.¹

Tabla 2. Ensayos realizados a *Sapindus spp.*

Ensayo biológico	A	B	C	D	E	Total
Abortivo			x		x	2
Acaricida			xx			2
Analgésico		X				1
Antiandrogénico			x		x	2
Antibacteriano		X				1
Anticonvulsivante					x	1
Antiespermatogénico					xx	2
Antiestrogénico					x	1
Antifúngico		X			x	2
Antihelmíntico					x	1
Antihemorrágico			x			1
Antiimplante					xxxx	4
Antiinflamatorio	x	X				2
Antiprotozoario			xx			2
Antiulceroso		X	x			2
Citóxico			x			1
Embriotóxico					xxx	3
Espasmolítico			x		x	2
Espermicida		xxxxxxxxxx				10

Continuación de la tabla 2.

Estimulante uterino			x		x	2
Hipotensor	X					1
Inducción ACTH	X					1
Insecticida	X		xx			3
Ionotrópico positivo					x	1
Larvicida	X					1
Molusquicida	xx		xxxxxx	x	x	10
Nematicida			x		x	2
Permeabilidad capilar, disminución	X					1
Piscida	X		xx			3
Repelente			x			0
Total reportes	1	23	22	1	21	67
Total ensayos	1	13	14	1	14	

A: *S. laurifolius*, B: *S. mukorossi*, C: *S. saponaria*, D: *S. rarak*, E: *S. trifoliatius*.

Fuente: Abreu O. Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. Rev Cuba Plant Med. 2005; 10: 3 - 4.¹

Esta planta es conocida en algunos países como tóxica. Las conocidas propiedades deterativas de estas especies se la confieren las saponinas que contienen en el pericarpio. La tensioactividad característica de estas puede estar relacionada con su acción sobre el Sistema Respiratorio, estos glicósidos son especialmente tóxicos para los animales de sangre fría, de ahí los efectos biocidas conspicuamente referidos. Muchas saponinas por vía oral presentan toxicidad, irritan las mucosas bucofaríngeas y digestivas, ocasionando dolor abdominal, vómitos y diarreas. Pero también pueden ejercer una amplia actividad biológica y farmacológica: Antiedematosa, venotónica, broncolítica, citotóxica frente a varias neoplasias, antiinflamatoria, hipocolesterolémica, entre otras.¹

2.2.7. Fitoconstituyentes

Los estudios fitoquímicos han planteado la presencia de glicósidos triterpénicos del tipo hederagenina en el pericarpio en 5 especies estudiadas y en el endocarpio de *S. mukorossi*, *S. saponaria* y *S. trifoliatus* la presencia de diferentes triterpenos y ácidos grasos. También se han dilucidado la presencia de otros metabolitos como flavonoides en todos los estudios realizados a las hojas: luteolina y 4-metoxiflavona en *S. saponaria*, kamferol y quercetina en *S. trifoliatus*, rutina en ambas especies y en *Paullinia clavigera* (Sapindaceae) triterpenos, flavonoides y quinonas. En estudios cualitativos no se informa la presencia de alcaloides ni taninos en ninguna parte de la planta para *S. saponaria*.¹

2.2.8. Descripción general de los glicósidos

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos.⁶

2.2.9. Importancia de las saponinas

Antes de que el hombre creara la industria del jabón, se usaban jabones naturales, conocidos por los mexicanos como amole entre los cuales se incluyen a las saponinas. Los pueblos prehispánicos del centro de México, llamaban amole a las plantas que tiene la propiedad de hacer espuma con el agua, como es el caso de la parota, por lo que se han utilizado desde la antigüedad para lavar ropa. Aún en la actualidad en muchas comunidades rurales se emplea el amole tanto para lavar ropa fina, como para evitar que se deteriore, ya que es un detergente neutro perfectamente degradable.¹⁹

Las saponinas son altamente tóxicas a peces y a otros animales acuáticos de sangre fría o que respiran por branquias, sin embargo, su efecto dañino en animales superiores es variable.^{31,42} En la actualidad se ha realizado un notable incremento en el conocimiento de este tipo de compuestos, porque aparte de que manifiestan ciertas propiedades tóxicas, también se les han reconocido otras cualidades tecnológicas y medicinales.⁴⁶

Entre las saponinas de naturaleza esteroidal, son muy importantes los glicósidos cardíacos, como el obtenido de la (*Digitalis purpurea*). El extracto obtenido de las semillas contiene una mezcla de saponinas y es muy útil en el tratamiento de enfermedades del corazón.²³

Debido a que las saponinas sólo son absorbidas en cantidades ínfimas por el intestino, actúan especialmente en la luz del tracto gastrointestinal. Se les atribuye un efecto protector del cáncer de estómago e intestino. Las saponinas presentes en las legumbres ejercen, así mismo, una influencia sobre diversos factores inmunitarios, actúan sobre determinados tipos de célula haciendo que se produzcan más anticuerpos. Las saponinas son capaces de captar y combinarse con el colesterol alimentario en el intestino, e impedir así que pueda llegar a la sangre. Además, pueden captar también ácidos biliares primarios y facilitar su eliminación del cuerpo.⁴⁶

2.2.10. Saponinas

Las saponinas son glicósidos que se encuentran distribuídos ampliamente en las plantas y están formadas por una aglicona de origen terpénica, esteroideal o alcaloide; Algunas saponinas tienen adicionalmente un azúcar, el cual es generalmente glucosa, unido al carbono 26 ó 28.²¹ Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en monocotiledóneas, mientras que las saponinas triterpénicas se encuentran especialmente en dicotiledóneas.⁴⁹ La gran diversidad estructural de las saponinas se refleja en sus diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas.⁶³ Los dos tipos de saponinas presentan ciertas propiedades distintivas que sirven de base para su identificación rápida: a) sabor amargo, b) producción de espuma al ser agitadas en soluciones acuosas, c) producción de

hemólisis de los glóbulos rojos, d) toxicidad en animales de “sangre fría”, en especial los peces (sapotoxinas), a los cuales les provocan parálisis de las agallas, e) la mayoría de las saponinas son solubles en diferente grado en soluciones de alcohol - agua, propiedad que se emplea en diversas técnicas para su extracción y purificación, f) producción de una reacción positiva en la prueba de Liebermann-Burchard, por lo general, las saponinas esteroidales en esta prueba, manifiestan colores que varían desde el azul hasta el verde y las triterpénicas, rosado, rojo o violeta.²⁸ Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada sapogenina, la cual puede tener un esqueleto esteroideal o triterpénico.²³ A pesar de su gran aplicación industrial y farmacéutica, las saponinas glicoalcaloides, en determinadas concentraciones, son tóxicas para microorganismos, insectos, animales y humanos, y por ello cuando están presentes en los alimentos se consideran como factores antinutricionales. Recientemente, las investigaciones se han centrado en desarrollar técnicas para remover las saponinas de los alimentos.¹⁸

Las saponinas, ya sean esteroidales o triterpénicas, son sintetizadas a partir de la vía de los isoprenoides.^{6,9}

2.2.11. Saponinas triterpénicas

Las saponinas triterpénicas, son ácidas debido a la presencia de grupos carboxilos que se encuentran unidos en la posición 3 de la aglicona, que por lo general son oleanano y más raramente ursano o damarano. Los grupos de carbohidratos usualmente contenidos son unidades de 1 - 6 monosacáridos, siendo los más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, fucosa, xilosa, ácido galacturónico y ácido glucurónico. Las saponinas triterpénicas, abundan en muchas familias de las dicotiledóneas, especialmente en Caryophyllaceae, Sapindaceae, Polygalaceae y Sapotaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Linaceae. Actualmente se han clasificado en tres grupos, representados por α -amirina, β -amirina y lupeol (esterol unido a una cadena corta de uno o más azúcares).^{31,63}

Las plantas contienen frecuentemente cantidades considerables de saponinas triterpénicas, la raíz de primula contiene alrededor de 5 - 10%; la raíz de regaliz entre 2 - 12%, la corteza de quilaya contiene hasta 10% de la mezcla conocida por el nombre de “saponina comercial” y las semillas de castaño de Indias, hasta el 13%.^{27,31,33,46}

Tabla 3. Estructuras de algunas saponinas triterpenoides más conocidas que se han establecido recientemente.

Saponina	Genina	Componentes glucosídicos	Fuentes
Aescina	Aescigenina	2 - glucosa. 1 ácido glucurónico. 1 ácido tíglico	<i>Aesculus hippocastanum</i>
Aralina	Aralidina	2 arabinosas, 1 ácido glucurónico	<i>Aralia japonica</i>
Caléndula - saponina A	Ácido oleanólico	2 glucosa, 1 galactosa 1 ácido glucurónico	<i>Calendula officinalis</i>
Ácido glicirrícico	Ácido glicirretínico	2 ácido glucurónicos	<i>Gilicirrizia spp.</i>
Gualanina	Ácido noroleanólico	1 ramnosa, 1 glucosa, 1 arabinosa	<i>Guaiacum spp.</i>
Gipsófila	Gipsogenina	1 galactosa, 1 xilosa, 1 arabinosa, 1 fucosa, 1 ramnosa	<i>Gipsophila spp.</i>
Hederacósido A (hederina)	Hederagenina	1 glucosa, 1 arabinosa	<i>Hedera helix</i>
Prímula – saponina	Primulgenina	1 ramnosa, 1 glucosa, 1 galactosa, 1 ácido glucurónico	<i>Prímula spp.</i>
Quilaya – saponina	Ácido quiláyco	1 Ácido glucurónico, 6 azúcares y restos acilo	<i>Quillaia saponaria</i>
Salko - saponina A	Saikogenina	1 glucosa, 1 fructosa	<i>Bupleurum spp</i>

Fuente: García M. Extracción y determinación de propiedades de saponinas a partir del fruto de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb (“parota”). [Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo]. México: Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo; Facultad de Biología. [En internet] 2008.¹⁹

Todas las saponinas triterpénicas poseen actividad hemolítica, la cual puede ser débil a fuerte dependiendo del tipo de sustituyentes.⁵⁵

El uso potencial de plantas para el control de los vectores, específicamente de caracoles, tiene un gran potencial biológico, lo cual ha recibido considerable atención.⁴¹

El uso de saponinas ha contribuido a la reducción de polutantes ambientales por el riesgo causado a los humanos, por residuos químicos en alimentos y resistencia antibiótica de patógenos humanos. Los metabolitos secundarios de las plantas están generalmente asociados con su mecanismo de defensa, pero también han sido asociadas con un amplio rango de propiedades biológicas, Las concentraciones de los metabolitos secundarios de las plantas y sus actividades en sistemas biológicos varían con la madurez de las plantas, las partes de las plantas, las condiciones del suelo, disponibilidad de agua y luz y otras condiciones ambientales en donde la planta crece.³²

Actualmente se reportan estos compuestos en especies de otras familias de plantas como *Quillaja saponaria* (Rosaceae), *Zizyphus jujuba* var. *sapinosay*, y el hongo *Ganoderma atrum*.⁵⁵

2.2.12. Saponinas esteroideas

Las sapogeninas esteroideas, son principalmente derivados de espirostano y furostano, que son normalmente convertidas en espirostanoles durante el aislamiento. Estas sapogeninas no tienen grupos carboxilo y pocas unidades de azúcar; la mayoría de los

compuestos de este grupo, están presentes en las plantas como glucósidos en forma de antrona y usualmente se encuentran unidos al C-1, C-8 y C-6, entre los glicósidos encontrados están la glucosa, ramnosa y apiosa.^{31,40}

Los estudios fitoquímicos han demostrado su presencia en muchas familias de las monocotiledóneas, especialmente en Dioscoreaceae y Liliaceae. Entre las dicotiledóneas, en Leguminosae y Solanaceae. Las saponinas esteroidales son de gran interés e importancia por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D y heterósidos cardíacos. Algunas son utilizadas como material de partida para la síntesis de estos compuestos.^{46,64}

La producción industrial de estas sustancias requiere una serie de procesos microbiológicos de fermentación y una serie de conversiones químicas relativamente complejas y en su gran mayoría patentadas por los grandes laboratorios farmacéuticos.^{33,56}

2.2.13. Hemólisis

Una característica muy importante que presentan las saponinas, es la capacidad de provocar hemólisis como consecuencia de la capacidad que poseen para alterar la permeabilidad de las membranas. La capacidad de las saponinas para romper la membrana de los eritrocitos está vinculada a la capacidad de las saponinas para fijar

los esteroides de la membrana como resultado de ello, la membrana estalla, provocando un aumento en la permeabilidad.^{22,28} Una situación fisiológica se define en relación con la concentración de soluciones en ambos lados de una membrana, si la presión osmótica es igual a un lado y otro de la membrana, se habla de soluciones isotónicas; si la solución tiene menor presión se denomina hipotónica.⁵

2.2.14. Sulfato de cobre (Cu_2SO_4)

El sulfato de cobre es el molusquicida más antiguo de los que aún siguen empleándose, ya que cristalizado es muy estable y se conserva durante mucho tiempo. Tóxico para los moluscos, inocuo para el hombre y los mamíferos, a las dosis usuales, y su toxicidad para los peces es menor que la de los demás molusquicidas empleados. El sulfato de cobre, en las concentraciones a las que se emplea como molusquicida, tiene un efecto ovicida bastante potente. El sulfato de cobre apenas tiene efecto letal sobre las cercarias y su acción depende mucho de la composición química y del pH del agua. El sulfato de cobre es muy soluble en aguas con pH bajo y precipita rápidamente en forma de compuestos insolubles que se depositan en el lecho del canal o del curso de agua cuando el pH es elevado.⁴⁴

La solución concentrada, tal como se aplica en los habitats de moluscos, tiene un efecto fuertemente corrosivo sobre muchos

materiales de construcción, recipientes, bombas, etc., por lo que conviene elegir cuidadosamente los aparatos y bombas de distribución y enjuagarlos con agua abundante inmediatamente después de usarlos. El sulfato de cobre no parece ser en absoluto sensible a la acción de los rayos ultravioletas, por eso puede aplicarse sin reserva alguna en cualquier momento del día. En las aguas muy turbias conviene usar concentraciones fuertes, pues de lo contrario no es muy eficaz.⁴⁴

Aunque en el laboratorio el sulfato de cobre es letal para los moluscos en concentraciones muy bajas, en la práctica se ha comprobado que, para obtener ese efecto molusquicida, es necesario emplear desde el principio concentraciones elevadas por lo menos de 30 partes por millón (30 ppm) incluso en condiciones favorables.⁴⁴

III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Unidad de análisis, universo y muestra

- **Unidad de análisis**

Sapindus saponaria L. “choloque”, proveniente del centro poblado Yamaluc, distrito de Huambos, provincia de Chota, departamento de Cajamarca.

- **Universo**

Frutos maduros de *Sapindus saponaria* L “choloque”, provenientes de la Región Cajamarca.

- **Muestra**

Liofilizado, que se extrajo a partir de 5 kg del pericarpio de los frutos maduros de *Sapindus saponaria* L. “choloque”, proveniente del centro poblado Yamaluc, distrito de Huambos, provincia de Chota, departamento de Cajamarca.

- ✓ **Criterios de inclusión y exclusión**

- **Inclusión:** Se seleccionaron los frutos enteros y frescos.

- **Exclusión:** Frutos deteriorados y afectados por picaduras de insectos o alguna enfermedad (hongos, bacterias, etc.)
- **Especie de experimentación**
 - ✓ Caracoles del género *Lymnaea* de zonas endémicas de la provincia de Cajamarca.
 - ✓ **Criterios de inclusión y exclusión**
 - **Inclusión:** Se seleccionaron los caracoles del género *Lymnaea* del mismo tamaño.
 - **Exclusión:** Caracoles que muestran signos de estar enfermos.

3.2. Métodos de investigación

3.2.1. De acuerdo al fin que se persigue

Básica, la investigación estuvo encaminada a ampliar el conocimiento científico, explorando nuevas teorías y transformar las ya existentes.

3.2.2. De acuerdo a la técnica de contrastación

Experimental, de tipo transversal, realizándose la manipulación de variables con el fin de observar los efectos acaecidos de como consecuencia de dicha manipulación.

3.3. Técnicas de investigación

El presente trabajo de investigación fue orientado a comprobar el efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las

cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*. Para lo cual se utilizó un diseño experimental consistente en la aplicación de diecisiete concentraciones diferentes del liofilizado de saponinas triterpénicas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” (Sapindaceae) en comparación con la solución de Cu_2SO_4 ; éstas soluciones se aplicaron directamente en los caracoles del género *Lymnaea*.

a) Obtención de la muestra vegetal

Los frutos fueron colectados en forma manual del centro poblado de Yamaluc, Distrito de Huambos, Provincia de Chota, Departamento de Cajamarca.

b) Preparación de la muestra

La separación de la cáscara del fruto de *Sapindus saponaria* L. “choloque” se realizó en forma manual. Posteriormente se secó en estufa a una temperatura de 35°C por 24 horas, una vez seco se procedió a moler en un mortero, luego se tamizó y se pesó.

c) Método de extracción de las saponinas triterpénicas

La extracción de las saponinas se realizó según el método descrito por G Thomas modificado por los tesisistas.

Se pesó 170 gramos de la muestra de cáscara de choloque y se maceró en 250 mL de cloroformo durante 72 horas. Luego se filtró y se separó el extracto clorofórmico. El residuo vegetal se llevó a la estufa a 35 °C durante 24 horas. Después se llevó a extracción en Soxhlet con etanol hasta agotamiento. El extracto etanólico se concentró a sequedad. Posteriormente el extracto seco se disolvió en una mezcla de 200 mL de agua y 100 mL de n-butanol. Este extracto hidrobutanólico se llevó a reflujo en 200 mL de n-butanol por tres horas. Se trasvasó en una pera de decantación y dejó reposar por 24 horas, donde se tomó el extracto butanólico para luego filtrarlo sobre sulfato de sodio anhidro. Una vez filtrado se llevó a sequedad en un rotaevaporador obteniéndose un residuo de color rojo oscuro siendo este el crudo saponinas. Luego con la ayuda de un sonicador se resuspendió en 50 mL de H₂O destilada para luego ser congelado a menos 30 °C por 24 horas. Después se esparció en una placa liofilizadora y se llevó a congelación a -80 °C por 72 horas. Al término de la congelación se colocó en un liofilizador y después de 48 horas se obtuvo un polvo amarillento. A esta sustancia se le hicieron todas las pruebas para determinar la presencia de saponinas triterpénicas dando positivas para todas las pruebas.^{17,59}

d) Análisis cualitativos

Los análisis cualitativos como reacciones de identificación de las saponinas triterpénicas fueron la prueba de la espuma, la prueba con el

reactivo de Salwosky, la reacción de Liebermann-Burchard y la reacción del ácido sulfúrico.²⁷

- **Prueba de la espuma**

Se colocó en un matraz Erlenmeyer 10 g de muestra del fruto de *Sapindus saponaria* L. “choloque” con 75 mL de agua destilada a 40 °C aproximadamente, inmediatamente se agitó vigorosamente por 5 minutos. La prueba se consideró positiva ya que la espuma perduró por más de 5 minutos. Esta prueba fue realizada con el fin de determinar saponinas.²⁷

- **Prueba de Liebermann-Burchard**

La prueba de Liebermann-Burchard fue utilizada como una herramienta de identificación del tipo de saponinas en las cáscaras del fruto de *Sapindus saponaria* L. “choloque” (Sapindaceae).

Se mezcló 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfrió a 0 °C y se añadió 2 mL de la solución a analizar, observándose una coloración rojo y/o anaranjado, que cambian con el tiempo, indicando la presencia de saponinas triterpénicas por lo tanto la prueba fue considerada positiva.²⁷

e) Identificación de los huéspedes intermediarios

Para la identificación se utilizó los criterios diagnósticos basados en la característica de la conchilla, para esto los caracoles fueron lavados y

colocados en una placa Petri luego fueron identificados bajo el estereoscopio.³⁰

f) Crianza de caracoles

Se recolectaron caracoles (dextrógiros) del campo y fueron llevados al laboratorio donde se los colocó en un tamiz para lavarlos con agua corriente por unas tres o cuatro veces, luego puestos en placas Petri para identificación bajo el estereoscopio, una vez identificados fueron separados en grupo de 20 a 25 caracoles posteriormente se colocó en cajas de plástico de 5 litros previamente preparadas con agua y con un sistema de aireación.⁴⁵

g) Preparación de las concentraciones del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque”

Se preparó una solución madre de 320 ppm, de la cual se prepararon las concentraciones 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 ppm por diluciones sucesivas con agua destilada.¹⁰

h) Efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas

Los caracoles fueron divididos al azar en grupos de 20 individuos de los mismos tamaños y posteriormente expuestos a cada una de las concentraciones por un tiempo de 20 minutos, luego los caracoles fueron enjuagados en agua destilada y dejados en cajas de plástico con agua para

su recuperación y evaluación. De manera similar se tuvieron dos grupos de veinte caracoles para ser utilizados como grupo control y blanco. Al grupo control se lo sumergió en una solución de Cu_2SO_4 por veinte minutos, luego fueron enjugados con agua destilada y dejados en cajas de plástico con agua para su recuperación y evaluación, al grupo blanco solo se lo mantuvo en agua destilada.

Posteriormente se evaluó la mortalidad a las 2, 4, 24 y 48 horas, la mortalidad de los caracoles fue probada por la retracción del cuerpo dentro de la concha; la falta de respuesta a una sonda de agua fue tomada como evidencia de muerte.¹⁰

i) Distribución de grupos

Los caracoles fueron distribuidos al azar en 19 grupos. La distribución de los grupos fue de la siguiente:

- **Grupo Blanco:** Se colocaron 20 caracoles del género *Lymnaea* en 20 mL de agua destilada durante 48 horas. A este grupo no se sometió a las concentraciones del liofilizado de saponinas triterpénicas.
- **Grupo patrón:** Se colocaron 20 caracoles del género *Lymnaea* en 20 mL de la solución de Cu_2SO_4 a una concentración de 15 000 ppm los caracoles fueron expuestos por un tiempo de 20 minutos.

Después de exponerlos a la sustancia en estudio, los caracoles fueron enjugados en agua destilada y dejados en cajas de plástico con agua por 48 horas, la mortalidad fue evaluada 2, 4, 24 y 48 horas.

- **Grupos problemas:** Se formaron 17 grupos problemas de 20 caracoles del género *Lymnaea* los cuales fueron expuestos a diferentes concentraciones (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300 y 320 ppm) del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de la cáscara de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque”, los cuales fueron expuestos por un tiempo de 20 minutos.

Después de exponerlos a la sustancia en estudio, los caracoles fueron enjuagados en agua destilada y dejados en cajas de plástico con agua por 48 horas, la mortalidad fue evaluada 2, 4, 24 y 48 horas.

3.4. Instrumentos, equipos, materiales y reactivos

3.4.1. Instrumentos

- ✓ Software Microsoft Office Excel.
- ✓ SSPS (Statistical Package for the Social Sciences).

3.4.2. Equipos

- ✓ Rotaevaporador: Ika
- ✓ Liofilizador: Labconco
- ✓ Sonicador: Elma
- ✓ Congeladoras: Arctiko
- ✓ Estufa: Memert
- ✓ Peceras: Blau aquaristic

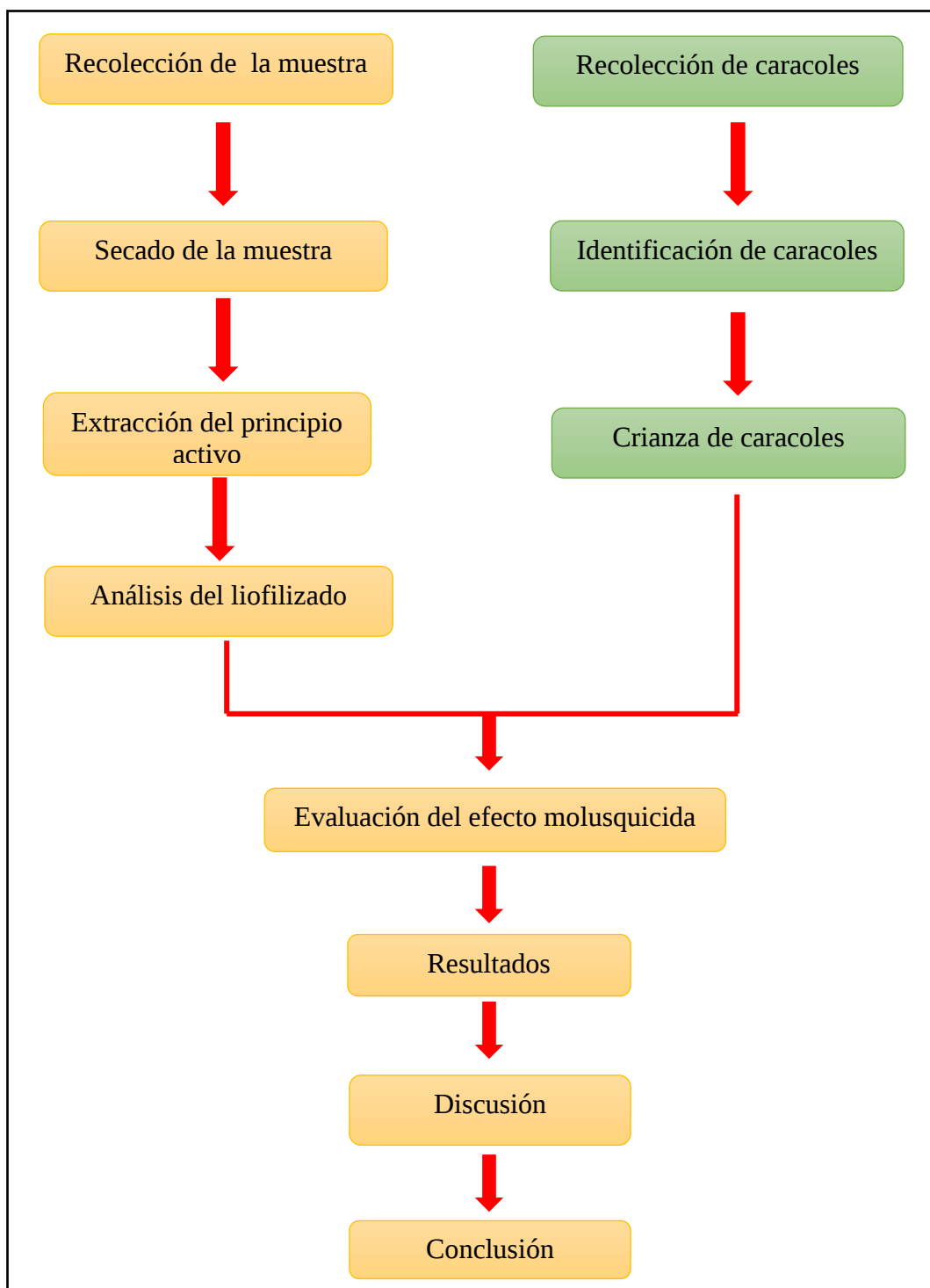
3.4.3. Materiales

- ✓ Materiales de vidrio y otros de uso común en el laboratorio de Química General e Inmunología.

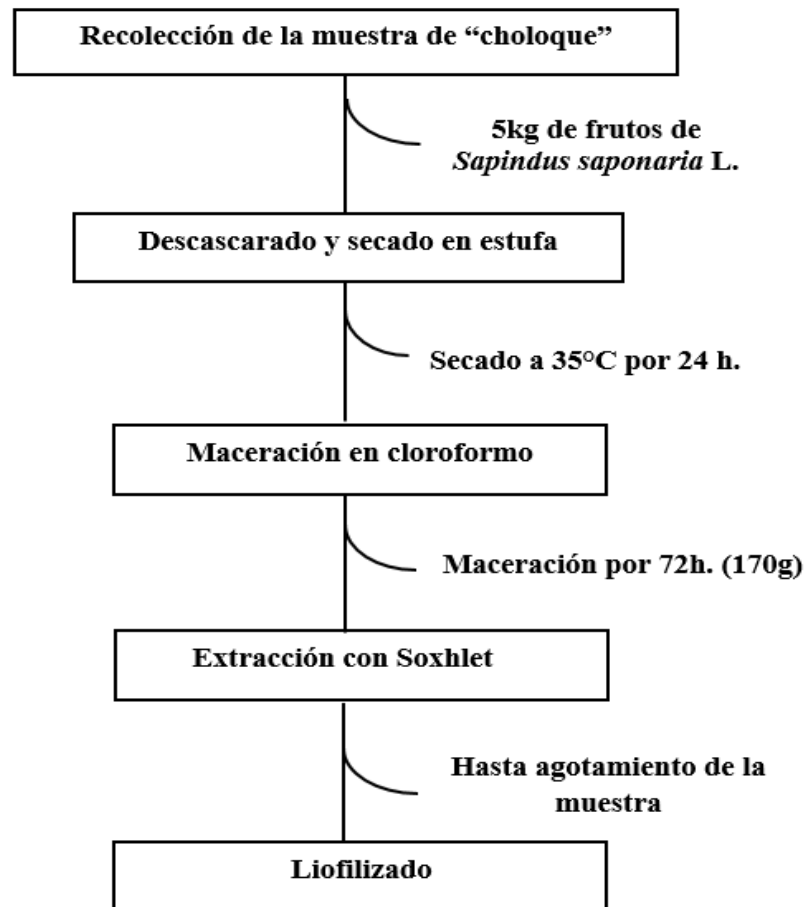
3.4.4. Reactivos

- ✓ Ácido clorhídrico 2 N
- ✓ Agua destilada
- ✓ Anhídrido acético 20%
- ✓ Cloroformo 37%. Laboratorio Merck
- ✓ Etanol 96° GL. Comercial
- ✓ Ácido sulfúrico 2 N.
- ✓ N-butanol. Laboratorio Sigma
- ✓ Sulfato de sodio anhidro. Laboratorio Sigma

Flujograma del diseño experimental



Flujograma de la Extracción de las saponinas



3.5. Técnicas de análisis e interpretación de datos

Para el análisis de las comparaciones estadísticas se utilizó el programa SSPS (Statistical Package for the Social Sciences), en el cual se determinó la media aritmética y desviación estándar de las variables cuantitativas realizándose una comparación entre las concentraciones y los tiempos a través de ANOVA que permitió la comparación más de dos grupos.

Tenemos la siguiente base de interpretación del valor p:

- * Si $p > 0,05$; la diferencia no es significancia, IC = 95%.
- * Si $p \leq 0,05$; la diferencia es significativa, IC = 95%

IV. RESULTADOS

Tabla 4. Reacciones de identificación de saponinas triterpénicas en el pericarpio crudo de frutos de *Sapindus saponaria* L.

REACCIONES	RESULTADOS
Prueba de Salwosky	+ (color rojizo)
Prueba de Liebermann-Burchard	+ (color rojizo a lila)
Prueba del ácido sulfúrico	+ (color rojo)
Prueba de la espuma	+

Tabla 5. Reacciones de identificación de saponinas triterpénicas en el liofilizado del extracto etanólico del pericarpio de frutos de *Sapindus saponaria* L.

REACCIONES	RESULTADOS
Prueba de Salwosky	+ (color rojizo)
Prueba de Liebermann-Burchard	+ (color rojizo a lila)
Prueba del ácido sulfúrico	+ (color rojo)
Prueba de la espuma	+ (más de 5 minutos)

Tabla 6. Porcentaje de rendimiento de las saponinas triterpénicas liofilizadas

RENDIMIENTO SAPONINAS TRITERPÉNICAS (%)	
Saponinas liofilizadas	4,35%

- Se obtuvo un rendimiento neto de 4,35% saponinas triterpénicas liofilizadas.

Tabla 7. Comparación de la mortalidad de los caracoles del género *Lymnaea* a diferentes concentraciones y tiempos.

GRUPOS		TIEMPO DE IMMERSIÓN	TIEMPO POST IMMERSIÓN			
		20 MIN	2 H	4 H	24 H	48 H
G. blanco	Agua destilada	0	0	0	0	0
G. control	Sulfato de cobre	20				
G. problema 1	10 ppm	0	0	0	0	0
G. problema 2	20 ppm	0	0	0	0	0
G. problema 3	40 ppm	0	1	1	3	7
G. problema 4	60 ppm	0	1	1	4	8
G. problema 5	80 ppm	0	3	6	9	10
G. problema 6	100 ppm	0	0	2	6	9
G. problema 7	120 ppm	0	1	1	6	11
G. problema 8	140 ppm	0	1	2	14	17
G. problema 9	160 ppm	0	2	2	11	17
G. problema 10	180 ppm	0	2	4	14	19
G. problema 11	200 ppm	0	3	7	15	19
G. problema 12	220 ppm	0	7	13	20	20
G. problema 13	240 ppm	0	5	11	19	20
G. problema 14	260 ppm	0	8	14	19	20
G. problema 15	280 ppm	0	7	17	19	20
G. problema 16	300 ppm	0	7	16	19	20
G. problema 17	320 ppm	0	9	17	20	20

MIN: Minutos; H: Horas

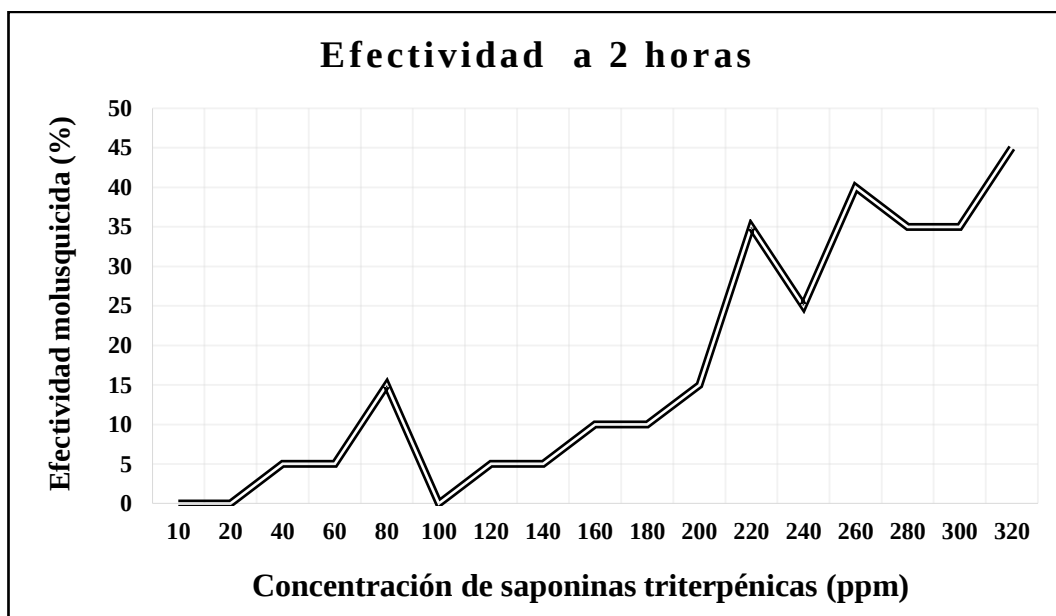


Figura 1. Evaluación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas frente a caracoles del género *Lymnaea* después de dos horas de post-exposición a diferentes concentraciones.

- Al evaluar la actividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” después de dos horas de post-exposición, se observó que presenta actividad molusquicida siendo los porcentajes más altos de efectividad molusquicida 45% a la concentración de 320 ppm.

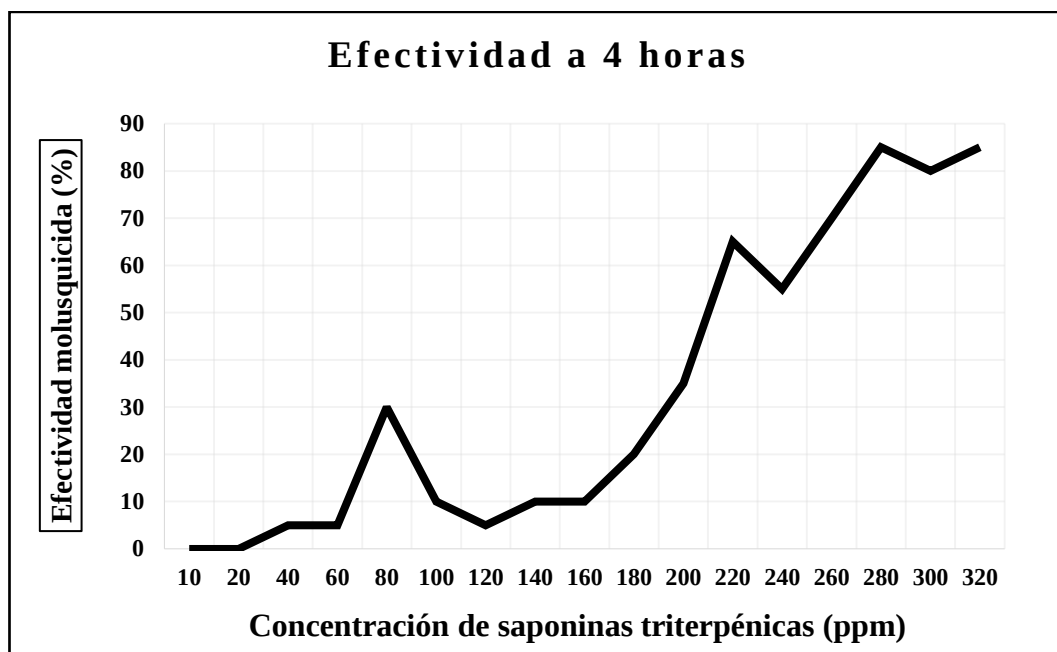


Figura 2. Evaluación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas frente a caracoles del género *Lymnaea* después de cuatro horas de post-exposición a diferentes concentraciones.

- Al evaluar la actividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” después de cuatro horas de post-exposición, se observó que presenta actividad molusquicida, siendo los porcentajes más altos de efectividad molusquicida 85% a la concentración de 320 ppm.
- Además se puede observar que las concentraciones mayores a 220 ppm tienen una efectividad por encima del 50%.

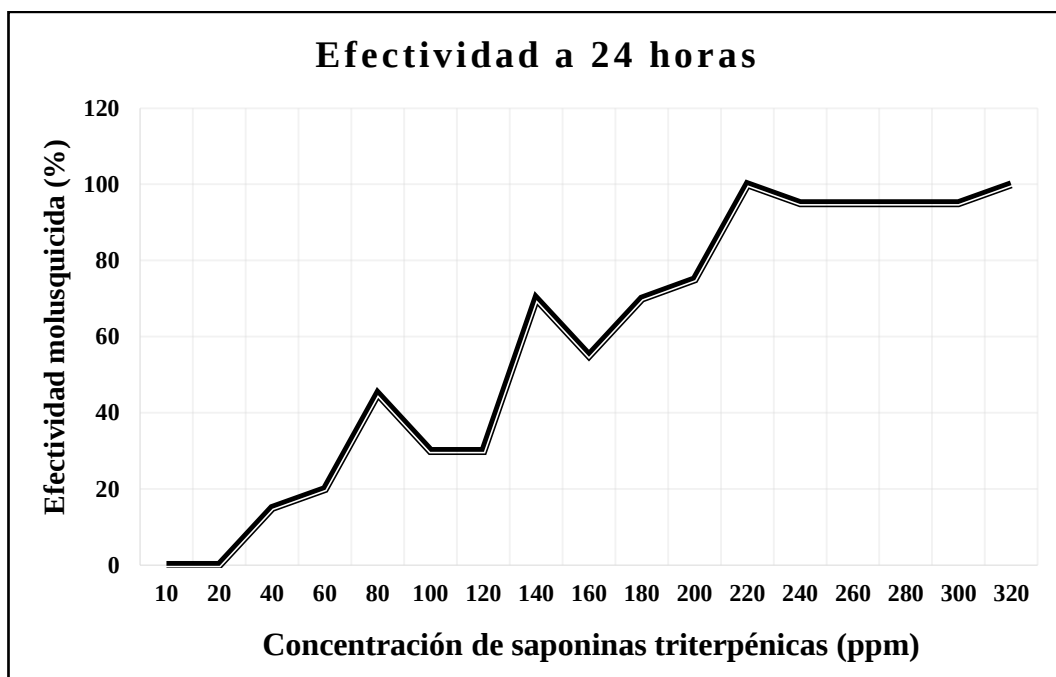


Figura 3. Evaluación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas frente a caracoles del género *Lymnaea* después de veinticuatro horas de post-exposición a diferentes concentraciones.

- Al evaluar la actividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” después de veinticuatro horas de post-exposición, se observó que presenta actividad molusquicida, siendo los porcentajes más altos de efectividad molusquicida 100% a la concentración de 320 ppm.

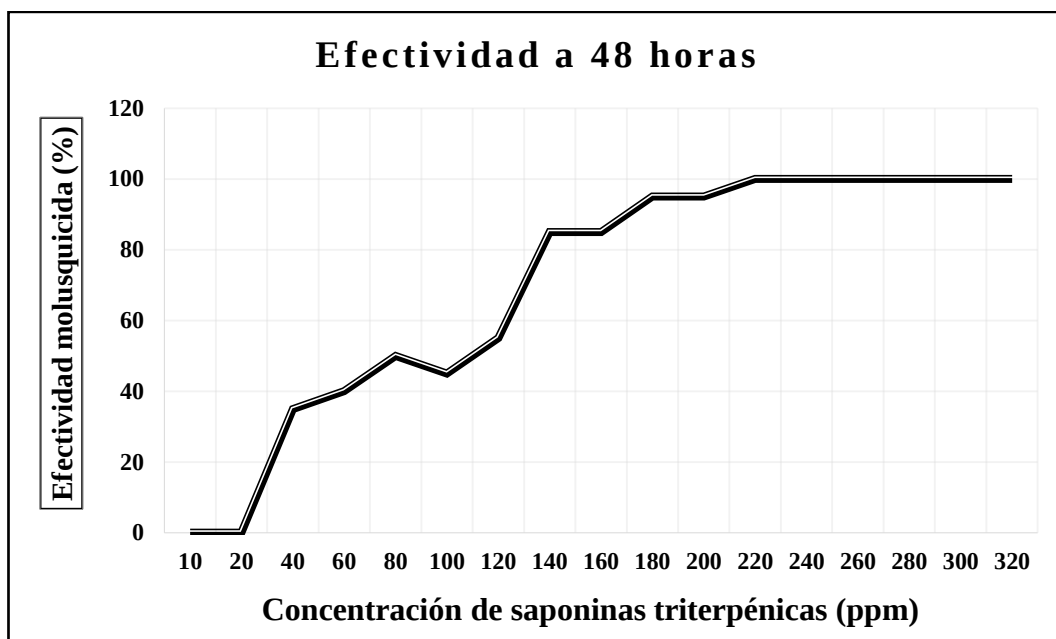


Figura 4. Evaluación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas frente a caracoles del género *Lymnaea* después de cuarenta y ocho horas de post-exposición a diferentes concentraciones.

- Al evaluar la actividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” después de cuarenta y ocho horas de post-exposición, se observó que presenta actividad, siendo los porcentajes más altos de efectividad molusquicida 100% a la concentración de 220 ppm.

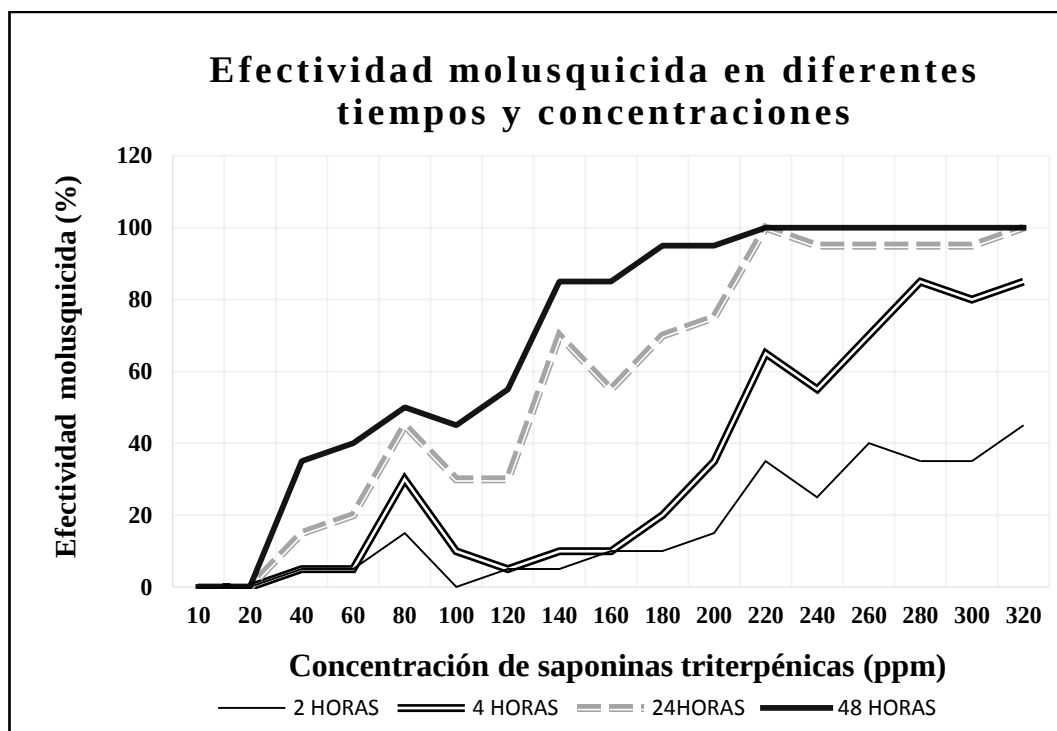


Figura 5. Comparación de la efectividad molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas a diferentes tiempos y concentraciones.

- Al evaluar la actividad molusquicida del liofilizado de las saponinas triterpénicas de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” se observó que a 24 horas la concentración de 320 ppm tiene una efectividad de 100% mientras que este mismo porcentaje fue alcanzado en 48 horas a una concentración de 220 ppm.
- Al realizar la comparación entre las concentraciones y los tiempos de post-inmersión, en el programa estadístico ANOVA, se obtuvo que no hay diferencia significativa entre las concentraciones ya que el valor de $p = 0,21969841$, a diferencia de los tiempos, donde el valor de $p = 0,0000380$, indicando que si hay una diferencia significativa.

V. DISCUSIÓN

La fascioliasis es un problema de salud pública por la alta prevalencia de infección en humanos, especialmente en niños.¹⁵ debido a que la transmisión ocurre al consumir vegetales frescos o crudos en los que se han enquistado metacercarias del parásito.¹¹ Para que esto ocurra es necesario que los huevos *Fasciola hepatica*, se hayan convertido en miracidios y encontrado al huésped intermediario, que es un caracol de agua dulce del género *Lymnaea*.¹⁴ es así que en busca de soluciones para controlar a esta parasitosis optaron por la eliminación del huésped intermediario, en un inicio con agentes molusquicidas de origen sintéticos y actualmente se está buscando plantas con efectos molusquicidas, cortando de esta manera el ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.^{26,44,61}

La actividad molusquicida se puede encontrar en muchas especies vegetales. En nuestro trabajo de investigación el liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” presentó actividad molusquicida, con un porcentaje máximo de 100% de efectividad a una concentración de 220 ppm en 48 horas. Además los resultados obtenidos fueron contrastados con sulfato de cobre Cu_2SO_4 , utilizado como control positivo y agua destilada como patrón o control negativo.

En la familia sapindaceae existen varias especies que tienen múltiples utilidades siendo una de ellas la actividad molusquicida,^{4,43,53} dentro de esta familia se ha

estudiado al género *Sapindus saponaria* L.,^{1,26,50} *Sapindus mukorossi*,⁶¹ encontrando una actividad molusquicida muy acentuada en la especie *Sapindus saponaria*,¹ sobre el caracol *Lymnaea acuminata*,⁶¹ *Biomphalaria glabrata* Say,⁵⁰ *Melanoides tuberculata*,²⁶ atribuyéndole dicha actividad a las saponinas triterpénicas.^{13,24,48,60}

Rouquayrol M, 2012: Para investigar la actividad molusquicida de diversas plantas del noroeste brasileño preparó diversos extractos tanto acuosos como etanólicos, encontrando 82 especies con dicha actividad, siendo una de ellas *Sapindus saponaria* L.⁵³

Ojewole J, 2004: Estudió 41 plantas autóctonas de Sudáfrica con actividad molusquicida para el control de la esquistosomiasis, encontrando 14 plantas con actividad molusquicida, teniendo como principios activos saponinas, taninos, quinonas y glucósidos.⁴³

Pelegri D et al, 2008: Investigó la actividad biológica de los compuestos aislados en *Sapindus saponaria* L. y otras plantas del género *Sapindus*, esta investigación se basa en datos y referencias disponibles sobre especies de este género, esta revisión encontró que los extractos crudos y sustancias aisladas tienen muchas propiedades biológicas como farmacológicas (antimicrobiana, espermicida, antiulcerosa, molusquicida, antifúngicas y antiinflamatorias), teniendo como principales sustancias bioactivas saponinas de naturaleza triterpénicas.⁴⁸

Uphadhyay A et al, 2011: Determinó la actividad molusquicida de *Sapindus mukorossi* y *Terminalia chebula* en contra del caracol de agua dulce *Lymnaea acuminata*, en este estudio se evaluaron dos tipos de extractos para cada especie en estudio, teniendo como resultado que los extractos etanólicos eran más tóxicos que los de origen orgánico, estableciendo una CL₅₀ a 18,37 mg/L (18,37 ppm) al exponerlos continuamente a los caracoles, encontrando así que los efectos tóxicos de las saponinas triterpénicas aumentan con el tiempo.⁶¹

Iannacone J et al, 2013: Al estudiar la toxicidad de los bioplaguicidas *Agave americana*, *Furcraea andina* (Asparagaceae) y *Sapindus saponaria* (sapindaceae) sobre el caracol invasor *Melanoides tuberculata* (Thiaridae), en este estudio se evaluó la toxicidad aguda de los extractos de las hojas de *A. americana*, *F. andina* y de los frutos de *S. saponaria* sobre *M. tuberculata*, la mortalidad se evaluó a las 24 horas de exposición y 24 horas de recuperación en agua destilada. Los resultados mostraron que existe diferencia significativa con relación a los grupos controles a partir de concentraciones de 0,5 mL/L. Además este estudio concluyó que los extractos estudiados pueden sustituir al molusquicida niclosamina, en forma segura para el control de caracoles.²⁶

Ribeiro A et al, 1995: Estudió el efecto molusquicida de las saponinas extraídas del pericarpio de *Sapindus saponaria* L., las saponinas se extrajeron con hexano y metanol en un equipo Soxhlet, los ensayos se realizaron utilizando el crudo de saponinas a una concentración de 100 ppm, evaluando la mortalidad a las 24 horas

de exposición y las 72 horas post exposición, encontrando una efectividad del 100% a 72 horas post exposición.⁵⁰

Chan P, 2007: Investigó las saponinas triterpénicas con una cadena trisacárida unida en el C3 de la aglicona, para estudiar la actividad con relación a la estructura, se realizó la separación de los hidratos de carbono de la genina, encontrando que los hidratos de carbono sin la genina suprimen en totalidad su actividad, mientras que en la genina no se abolió en su totalidad. Concluyendo que la presencia de hidratos es indispensable para que la aglicona tenga una actividad muy significativa.¹³

Los estudios citados, si bien algunos de ellos no mencionan los principios activos y no fueron realizados en liofilizados, si no en extractos acuosos, etanólicos y orgánicos, permiten rescatar que los principios activos con actividad molusquicida son las saponinas, flavonas, taninos, quinonas, triterpenoides y oligoglicósidos. En nuestro trabajo de investigación se utiliza las saponinas triterpénicas liofilizadas extraídas de los pericarpios de *Sapindus saponaria* L. Encontrando la actividad antes mencionada con un porcentaje del 100% de efectividad, en 24 horas a una concentración de 320 ppm y a 220 ppm en 48 horas (tabla 4), además teniendo en cuenta los porcentajes de efectividad calculados para cada una de las concentraciones se puede establecer como concentración letal media (CL₅₀) a las 48 horas a una concentración 80 ppm (tabla 4) después de 20 min de exposición al liofilizado de saponinas triterpénicas. Dicha actividad podría estar relacionada a que las saponinas triterpénicas tienen una cadena de azúcares unida al carbono tres

presentando múltiples actividades, se cree que las saponinas forman complejos con los esteroides de las membranas celulares produciendo grandes poros alterando su permeabilidad, esta interacción cambia dependiendo de la estructura del esteroide, es así que no solo puede causar la lisis de la célula sino también cambios en la morfología haciendo que la membrana se separe y desintegre para una posterior degradación total de los componentes celulares, además las saponinas también pueden inducir a una muerte celular programada por activación de la vías de señalización a través de la tirosina quinasa y la proteína G, la cual lleva a una acumulación de Ca^{++} y a la producción de oxígeno reactivo como el peróxido de hidrógeno.²⁸

Los ensayos *in vitro* realizados en esta investigación comprueban la efectividad de las saponinas triterpénicas obtenidas de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*, teniendo la probabilidad de utilizarse como un biomolusquicida, frente a dichos caracoles *Lymnaea*.

VI. CONCLUSIONES

- Se logró obtener el liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque”, obteniendo un rendimiento neto del 4,35% de saponinas liofilizadas.

- Se demostró que la concentración más adecuada es de 220 ppm a 48 horas con efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica*.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar más estudios a las saponinas triterpénicas de *Sapindus saponaria* L., para observar el efecto en otros especímenes de sangre fría.
- Incentivar el estudio toxicológico de las saponinas presentes en el choloque.
- Promover el uso de las saponinas triterpénicas de *Sapindus saponaria* L., por ser de origen natural con buenos efectos molusquicidas.

VIII. REFERENCIAS BIOGRÁFICAS

1. Abreu O. Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. Rev Cuba Plant Med. 2005; 10: 3 - 4.
2. Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. The Stress of *Lymnaea truncatula* Just before Miracidial Exposure with *Fasciola hepatica* Increased the Prevalence of Infection. Experimental Parasitology. 2001; 99 (1): 49 - 51.
3. Aguirre Z. Especies forestales de los bosques secos del Ecuador. Guía dendrológica para su identificación y caracterización. Proyecto Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático. MAE/ FAO - Finlandia, Quito, Ecuador. 2012; p. 140.
4. Alfonso M, Fuentes V, Avilés R, Gonzáles N, Villasana R, Hernández M, *et al.* Plantas molusquicidas de Cuba y su utilización. Revista de Protección Vegetal. 2000; 15 (2): 118 - 124.
5. Augustin J, Kuzina V, Andersen S, Bak S. Molecular activites, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. Phytochemistry. 2011; 72 (6): 435 - 57.

6. Ávalos A, Pérez E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca Biología. Serie Fisiología Vegetal. [Revista en Internet] 2009; 2 (3): 119 - 145. [citado el 10 de Agosto del 2016]. Disponible en:
<http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>.
7. Bargues M, Artigas P, Khoubbane M, Ortiz P, Naquira C, Mas - Coma S. Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Perú and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. Parasit Vectors. 2012; 5: 174.
8. Becerra M. Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de *Fasciola hepatica* en Latinoamérica. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2001; 14 (1): 28 - 35
9. Cammareri M, Consiglio M, Pecchia P, Corea G, Lanzotti V, Ibeas J, *et al.* Molecular characterization of β -amyrin synthase from *Aster sedifolius* L. and triterpenoid saponin analysis. Plant Science. 2008; 175 (3): 255 - 261.
10. Cardona E, Torres F, Echeverri F. Evaluación in vitro de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* sobre hembras ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Science Technica. 2007; 1 (33): 51- 54
11. Carrada T, Martínez J. Fasciolosis. Revista Mexicana de Patología Clínica. 2005; 52 (2): 83 - 96.

12. Carrada T. Fascioliasis. Diagnóstico, epidemiología y tratamientos. Revista Gastroenterol México. 2003; 68 (2): 135 - 142.
13. Chan P. Acylation with diangeloyl groups at C21–22 positions in triterpenoid saponins is essential for cytotoxicity towards tumor cells. Biochemical Pharmacology. 2007; 73 (3): 341 - 50.
14. Dalton J. Fasciolosis. Editor. Wallingford, UK ; New York, NY, USA: CABI Pub; 1999. 544 p.
15. Espinoza J, Terashima A, Herrera P, Marcos L. Fasciolosis humana y animal en el Perú: Impacto en la economía de las zonas endémicas. Rev Perú Med Exp. Salud Pública. 2010; 27 (4): 604 - 612.
16. Esteban J, Bargues M, Mas - Coma S. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: A Review *Parasitology*. [Revista en Internet] 1998; 58 (1): 13 - 42. [citado el 4 de Agosto del 2016]. Disponible en: http://bibliotecavirtual.ranf.com/i18n/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1002097.
17. Flores T, Huamán J, Tomás G. Estudio comparativo de tres metodologías cuantitativas de extracción de saponinas de la *Melisa Officinalis* “toronjil”. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. 2013; 16 (2): 47 - 51.

18. Friedman M. Potato Glycoalkaloids and Metabolites: Roles in the Plant and in the Diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006; 54 (23): 8655 - 8681.
19. García M. Extracción y determinación de propiedades de saponinas a partir del fruto de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq) Griseb (“parota”). [Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo]. México: Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo; Facultad de Biología. 2008. [Tesis en Internet]. Disponible en:
<https://es.scribd.com/document/215374594/extraccionydeterminaciondepropiedadesdesaponinasobtenidasapa>.
20. González L, Esteban J, Bargues M, Valero M, Ortiz P, Náquira C, *et al*. Hyperendemic human fascioliasis in Andean valleys: An altitudinal transect analysis in children of Cajamarca province, Perú. Acta Tropica. 2011; 120 (1 - 2): 119 - 129.
21. Guzmán B, Tenorio R, Cruz D, Espinal C, Alvarado J, Mollinedo P. Saponins from *Chenopodium Quinoa Willd* and *Chenopodium Pallidicaule Aellen* as biocontrollers of phytopathogen fungi and hemolysis agents. Revista Boliviana de Química. 2015; 32 (1): 8 - 14.

22. Hernández G, Fariñas M. Propiedades biológicas de extractos acuosos de órganos de cuvier, piel y músculo de *Brandenburgia impatiens* (forskal, 1776) (echinodermata: holothuroidea). Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad del Oriente. 2005; 17 (2): 118 - 124.
23. Hernández R. Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium quinoa* Willd. Revista Cubana de Medicina Militar. 1997; 26 (1): 55 - 62.
24. Herrera N, Correa E, Cardona D, Archbold R, Torres F, Quiñones W, *et al.* Estructura y actividad de sapogeninas triterpénicas. Scientia Et Technica [Revista en Internet] 2007; 1 (33): 87 - 90. [citado el 26 de Julio del 2016]. Disponible en:
<http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/5779>.
25. Iannacone J, Alvariño L, Pérez D. Efecto de *paullina clavigera* "sacha yoco" (Sapindaceae) sobre la eclosión de huevos de *Fasciola hepatica* Neotropical Helminthol. 2008; 2 (2): 54 - 61.
26. Iannacone J, La Torre M, Alvariño L, Cepeda C, Ayala H, Argota G. Toxicity of biopesticides *Agave americana*, *Furcraea andina* (Asparagaceae) and *Sapindus saponaria* (Sapindaceae) on invader snail *Melanoides tuberculata* (Thiaridae) Neotropical Helminthology. 2013; 7 (2): 231 - 241.

27. Jaramillo V. Determinación cuantitativa de saponinas totales y su actividad cicatrizante presentes en doce especies vegetales medicinales. [Tesis para optar el Título Profesional de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador: Universidad Técnica de Machala; Unidad Académica de Ciencias Química y de la Salud Carrera de Bioquímica y Farmacia. 2014. [Tesis en Internet]. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/1398>.
28. Jaramillo M. Introducción al Estudio Fitoquímico de Chloroleucon Mangense. [Resumen de Tesis para optar el Grado de Doctor en Farmacia]. Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas. 1969; 1 (2): 111- 135
29. Keiser J, Utzinger J. Emerging foodborne trematodiasis. Emerg Infect Dis. 2005; 11(10): 1507 - 1514.
30. Londoño P, Chávez A, Li E, Suárez F, Pezo D. Presencia de caracoles Lymnaeidae con formas larvarias de *Fasciola hepatica* en altitudes sobre los 4000 m.s.n.m en la sierra sur del Perú. Rev. Investig. Vet. Perú. 2009; 20 (1): 58 - 65.

31. López T. Saponósidos. Fitoterapia. [Revista en Internet] 2001; 124- 128.

[citado el 8 de Agosto del 2016]. Disponible en:

http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pid=articulo=13015492&pid_usuario=0&pid_revista=4&fichero=4v20n06a13015492pdf001.pdf&ty=169&accion=L&origen=doymafarma&web=www.doymafarma.com&lan=es

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

http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1751731107000298.

33. Martínez A. Saponinas Esteroidales. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, 2001.

34. Mas - Coma S, Funatsu I, Bargues M. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. Parasitology. 2001; 123 (7): 115 - 127.

35. Mas - Coma S, Valero A, Bargues M. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. Rev. sci. tech. Off.int. Epiz. 2008; 27 (2): 443 - 452.

36. Mas - Coma S, Bargues M, Valero M. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*. 2005; 35 (11 - 12): 1255 - 1278.
37. Mas - Coma S, Bargues M, Valero M. Plant-borne Trematode Zoonoses: Fascioliasis and Fasciolopsiasis In: *Food-Borne Parasitic Zoonoses, Fish and Plant-Borne Parasites*. World Class Parasites New York: Springer Verlag. (Darwin Murrell, Bernard Fried Eds.). 2007; 11: 293-334.
38. Mas - Coma S, Valero M, Bargues M. Effects of climate change on animal and zoonotic helminthiasis. *Rev. Sci. Tech.* 2008; 27 (2): 443 - 452.
39. Mas - Coma S, Esteban J, Bargues M. Epidemiology of human fascioliasis: A review and proposed new classification. *Bulletin of the World Health Organization*. 1999; 77 (4): 340 - 6.
40. Mastrogiovanni M. Extracción, purificación y caracterización primaria de saponinas de *Quillaja brasiliensis*. [Tesina de Grado para Licenciatura en Bioquímica]. Uruguay: Universidad de la Republica de Montevideo; Facultad de Ciencias. 2012. [Tesina en Internet]. Disponible en:
<http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-16066.pdf>.

41. Mezghani R, Hammami H, Ayadi A, Damak M. Molluscicidal activity of *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin leaf extracts and the principal alkaloids isolated from them against *Galba truncatula*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (7): 1035 - 1038.
42. Nonato L, Nina E, Villacrés J. Estudio toxicológico del extracto total y fracciones cromatográficas de las hojas de *Clibadium asperum* en animales de experimentación, Iquitos, 2009. Conoc Amazónico. 2011; 2 (2): 103 - 114.
43. Ojewole J. Indigenous plants and schistosomiasis control in South Africa: Molluscicidal activity of some Zulu medicinal plants. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. [Revista en Internet]. 2004; 3 (1): 8 - 22. [citado el 26 de Julio del 2016]. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85630104>.
44. Organización Mundial de la Salud. Los molusquicidas. Segundo informe del comité de expertos en Bilharziasis. 1961; 214. [citado el 26 de julio del 2016]. Disponible en:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37666/1/WHO_TRS_214_spa.pdf
45. Ortiz P. Humoral immune response to *Fasciola hepatica* in experimentally infected calves and in cattle naturally exposed to fasciolosis in Cajamarca, Perú. PhD Thesis, University of Liverpool, England. 1998.

46. Palencia Y. Sustancias Bioactivas en los Alimentos. Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo, Guerrero. México. 2003; 148 - 162.
47. Palioto G, Sugioka D, Coda J, Zampar R, Lazarin M, Loyola M, *et al.* Fenología de espécies arbóreas no Campus da Universidade Estadual de Maringá. Revista Brasileira de Biociências. 2008; 5 (1): 441 - 443.
48. Pelegriini D, Tsuzuki J, Amado C, Cortez D, Ferreira I. Biological Activity and Isolated Compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. Latin American Journal of Pharmacy. 2008; 27 (6): 922 - 927.
49. Puentes L. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: Saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Revista de Estudios Transdisciplinarios. 2009; 1 (2): 32 - 55.
50. Ribeiro A, Zani C, Almeida T, Mendes N, Hamburger M, Hostettmann K. Molluscicidal Saponins from the Pericarp of *Sapindus Saponaria*. International Journal of Pharmacognosy. 1995; 33 (3): 177 - 80.
51. Rojas L, Vázquez A, Domenech I, Robertson L. Fascioliasis: Can Cuba conquer this emerging parasitosis? Trends Parasitol. 2010; 26 (1): 26 - 34.

52. Romero M, Olazábal E, Martínez Y, Serrano H, Monteagudo A. Actividad fasciolicida *in vitro* de *Portulaca oleracea* L. Acta Farmacéutica Bonaerense. 2002; 21 (4): 297 - 300.
53. Rouquayrol M. Atividade Moluscicida de Plantas do Nordeste Brasileiro. Revista do Centro do Ciencias da Sauce. 1984; 1 (1): 24 - 6.
54. Rug M, Ruppei A. Toxic activities of the plant *Jathropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of *schistosomes*. Tropical Medicine and International Health. 2000; 5 (6): 423 - 430.
55. Sharma A, Sati S, Sati O, Sati D, Maneesha and Kothiyal S. Chemical constituents and bio activites of genus sapindus. International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy. 2011, 2 (2): 403 - 409 [Revista en Internet]. [citado el 25 de Agosto del 2016]. Disponible en:
<http://www.ijrap.net/vol2/issue2/15.pdf>.
56. Siller D. Extracción y purificación de saponinas del residuo del tallado del *Agave lechugilla* Torrey (guishe) y su aplicación potencial. [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero en Ciencias y Tecnología de Alimentos]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; División de Ciencia Animal Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2012. [Tesis en Internet]. Disponible en:
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/518>.

57. Singab A, Ahmed A, Sinkkonen J, Ovcharenko V, Pihlaja K. Molluscicidal activity and new flavonoids from Egyptian *Iris germanica* L. (var. *alba*). Zeitschrift für Naturforschung C. 2006; 61: 57 - 63.
58. Sokolina F, Zamaquero J, Ignatiev G, Villaseñor C, Sánchez J, Cabrera H, *et al.* Estudio de los tejidos de moluscos *Lymnaea truncatula* y *Lymnaea cubensis* infectados por miracidios de *Fasciola hepatica*. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM. 2012; 55 (6): 4 - 10.
59. Tomas G, Huamán J, Aguirre R, Barrera M. Extracción y clasificación de la saponina del *Sapindus saponaria* L., “boliche”. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. 2010; 13 (2): 36 - 39.
60. Tsuzuki J, Svidzinski T, Shinobu C, Silva L, Rodrigues E, Cortez D, *et al.* Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. Anais da Academia Brasileira Ciencias. 2007; 79 (4): 577 - 583.
61. Upadhyay A, Singh D. Molluscicidal activity of *Sapindus mukorossi* and *Terminalia chebula* against the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. Chemosphere. 2011; 83 (4): 468 - 74.

62. Vinaud M, Santos S, Ferri P, *et al.* Avaliacao da atividade larvicida de plantas fitoterápicas do cerrado do género *Stryphnodendron* spp. sobre miracídios e cercárias de *Schistosoma mansoni*. Revista de patología tropical. 2005; 34 (2): 137 - 143.
63. Vincken J, Heng L, de Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry. 2007; 68 (3): 275 - 97.
64. Waller G, Yamasaki K, Saponins used in traditional and modern medicine. Advances in experimental medicine and biology. Editorial. New York: Plenum Press 1996; 606 p.

ANEXOS

Anexo 1. Caracol del género *Lymnaea*.



Fuente: Carrada T, Escamilla J. Fasciolosis. Revista Mexicana de Patología Clínica. 2005; 52 (2): 83 - 96.

Anexo 2. Cálculo del rendimiento de saponinas.

- % De rendimiento de saponinas triterpénicas liofilizadas.

M.V 170 g.....100%

L 7,4 g.....x%

$$X = 4,35\%$$

Anexo 3. Cálculos para preparar las soluciones del liofilizado de saponinas a diferentes concentraciones.

- Preparación de la solución de patrón a 320 ppm

320 mg de saponina → 1000 mL de H₂O destilada

- Pesar 320 mg del liofilizado de saponinas y vaciar a una fiola de 1000 mL, disolver agregando 500 mL H₂O destilada, teniendo cuidado de no formar espuma, luego aforar hasta los 1000 mL.
- Para la preparación de las demás concentraciones se utilizó la siguiente fórmula.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

- $320 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V_1 = 0,64 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V_1 = 3,125 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V_1 = 40 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V_1 = 6,25 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V_1 = 60 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V_1 = 9,375 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL

- $320 \text{ ppm} \times V1 = 80 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V1 = 12,5 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V1 = 100 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V1 = 15,625 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V1 = 120 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V1 = 18,75 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V1 = 140 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V1 = 21,875 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V1 = 160 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V1 = 25 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V1 = 180 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V1 = 28,125 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V1 = 200 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V1 = 31,25 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL
- $320 \text{ ppm} \times V1 = 220 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$
 $V1 = 34,375 \text{ mL}$ agregar H₂O destilada c.s.p 50 mL

- $320 \text{ ppm} \times V1 = 240 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$

$V1 = 37,5 \text{ mL}$ agregar H_2O destilada c.s.p 50 mL

- $320 \text{ ppm} \times V1 = 260 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$

$V1 = 40,625 \text{ mL}$ agregar H_2O destilada c.s.p 50 mL

- $320 \text{ ppm} \times V1 = 280 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$

$V1 = 43,75 \text{ mL}$ agregar H_2O destilada c.s.p 50 mL

- $320 \text{ ppm} \times V1 = 300 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL}$

$V1 = 46,875 \text{ mL}$ agregar H_2O destilada c.s.p 50 mL

Anexo 4. Galerías fotográficas



Foto 1. Recolección y descascarado la muestra de *Sapindus saponaria* L. “choloque”.



Foto 2. Secado de la pulpa de *Sapindus saponaria* L., en estufa a 35 °C durante 24 horas.



Foto 3. Filtrado y secado de la muestra molida, después de 72 horas de maceración.



Foto 4. Extracción con Soxhlet hasta el agotamiento de la muestra.



Foto 5. Concentración del extracto etanólico a sequedad en un rotaevaporador.



Foto 6. Separación del extracto butanólico después de 24 horas de reposo en una pera de decantación.



Foto 7. Proceso de liofilización de las saponinas triterpénicas de *Sapindus saponaria* L.



Foto 8. Pruebas de identificación para saponinas triterpénicas.



Foto 9. Recolección de caracoles del género *Lymnaea* del campo.



Foto 10. Lavado y reconocimiento de los caracoles bajo el estereoscopio.



Foto 11. Acondicionamiento de los caracoles del género *Lymnaea*.



Foto 12. Preparando las soluciones del liofilizado de saponinas triterpénicas a diferentes concentraciones.



Foto 13. Clasificación de los caracoles por tamaño.



Foto 14. Inmersión de los caracoles en las diferentes concentraciones de saponinas triterpénicas por 20 minutos.



Foto 15. Haciendo la observación en diferentes tiempos 2, 4, 24 y 48 horas de post-exposición.