



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“AISLAMIENTO DE FRACCIONES Y/O COMPUESTOS DE  
*Vernonanthura patens*, CON ACTIVIDAD FASCIOLICIDA Y SU  
EVALUACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO*”.**

**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
PRESENTA  
DULCE MARÍA MARTÍNEZ GUTIÉRREZ**

**TUTORA PRINCIPAL:**

**DRA. YOLANDA VERA MONTENEGRO. FMVZ-UNAM**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. JOSÉ LUIS OCAMPO CAMBEROS. FMVZ-UNAM**

**DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO. FES IZTACALA-UNAM**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, ENERO, 2024**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Quimioterapia Experimental de Helmintos, del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Durante la realización de este trabajo se contó con financiamiento parcial, gracias al proyecto UNAM-DGPA-PAPIIT IT202917, así como una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de CVU 858651.

## **DEDICATORIA**

**A mis padres quienes siempre me han apoyado incondicionalmente.**

**Especialmente a mi padre quien a pesar de que ya no esta con nosotros, siempre fue y sera un gran ejemplo a seguir.**

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad y el apoyo durante mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca asignada, la cual me permitió realizar mis estudios de maestría.

Al proyecto UNAM-DGPA-PAPIIT IT202917 por el financiamiento para la realización del presente proyecto.

Al laboratorio de Quimioterapia Experimental de Helminos del departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM, por facilitar sus instalaciones para realizar gran parte de este proyecto.

Al laboratorio de Malacología del departamento de parasitología de la FMVZ-UNAM, por permitirme realizar parte del presente proyecto.

Al laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM, por permitirme realizar parte del proyecto de investigación en sus instalaciones.

A mi asesora de tesis, la Dra. Yolanda Vera Montenegro y a los miembros de mi comité tutor, el Dr. José Luis Ocampo Camberos y el Dr. Guillermo Ávila Acevedo por su asesoría y sus importantes aportaciones al proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, el Lic. Gerardo Francisco y al Dr. Alonso Ezeta, por sus valiosas aportaciones y apoyo para el desarrollo de este trabajo.

# CONTENIDO

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS .....	III
ABSTRACT .....	V
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 <i>Fasciola hepatica</i> .....	2
1.2 CICLO BIOLÓGICO DE <i>Fasciola hepatica</i> .....	3
1.3 PATOGENIA Y LESIONES DE LA FASCIOSIS .....	5
1.4 DIAGNÓSTICO .....	6
1.5 PÉRDIDAS ECONÓMICAS .....	6
1.6 TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL .....	7
1.7 PLANTAS MEDICINALES .....	8
1.8 <i>Vernonanthura patens</i> .....	9
1.9 ANTECEDENTES .....	10
2. JUSTIFICACIÓN .....	13
3. HIPÓTESIS .....	13
4. OBJETIVOS .....	14
4.1 OBJETIVO GENERAL .....	14
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	15
5.1 Colecta y cultivo de caracoles del género <i>Lymnaea spp.</i> .....	15
5.2 Colecta y cultivo de alga .....	16
5.3 Infección de caracoles .....	17
5.4 Obtención de metacercarias .....	17
5.5 Obtención de fracciones y/o compuestos bioactivos del extracto crudo de <i>Vernonanthura patens</i> .....	17
5.6 Evaluación biológica <i>in vitro</i> de las fracciones y compuestos de <i>Vernonanthura patens</i> .....	18
5.7 Análisis fitoquímico de las fracciones y/o compuestos de <i>Vernonanthura patens</i> .....	20
5.8 Medición de puntos de fusión de los compuestos .....	20
5.9 Análisis estadístico .....	21
6. RESULTADOS .....	21
6.1 Obtención de fracciones y/o compuestos bioactivos del extracto crudo de <i>Vernonanthura patens</i> y determinación del grado de pureza de los compuestos. .....	21

<b>6.2 Evaluación biológica <i>in vitro</i> de las fracciones y/o compuestos de <i>Vernonanthura patens</i></b> .....	22
<b>6.3 Análisis fitoquímico de las fracciones y/o compuestos de <i>Vernonanthura patens</i></b> .....	29
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	30
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	33
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	34
<b>ANEXOS</b> .....	44

## **ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS**

**°C:** Grados centígrados

**CC:** Cromatografía en columna

**CEIEPASP:** Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrosilvopastoril

**cm:** Centímetros

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**ELISA:** Enzyme-linked Immunosorbent assay

**FMVZ:** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**FC:** Fijación del complemento

**g:** Gramos

**gpo:** Grupo

**HD:** Huésped definitivo

**HI:** Huésped intermediario

**IF:** Inmunofluorescencia

**L:** Litro

**mg:** Miligramos

**kg:** Kilogramos

**ml:** Mililitros

**nm:** Nanómetros

**núm:** Número

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**SENASA:** Servicio Nacional de Sanidad Agraria

**spp:** Especies

**T (+):** Testigo positivo

**T (-):** Testigo negativo

**UBIPRO:** Unidad de Biotecnología y Prototipos

**UNAM:** Universidad Nacional Autónoma de México

**UV:** Ultravioleta



## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar bajo condiciones *in vitro* el efecto fasciolicida de fracciones y compuestos de *Vernonanthura patens*, obtenidos a partir del extracto metanólico de la planta, mediante un sistema de cromatografía en columna abierta. La evaluación se realizó en fasciolas recién desenquistadas *in vitro*, para la obtención de las metacercarias de *Fasciola hepatica*, se realizó el cultivo e infección de caracoles del género *Lymnaea*. Se evaluaron un total de 13 fracciones y dos compuestos puros a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L, las cuales se seleccionaron de acuerdo con la polaridad en que fueron obtenidas, así como su rendimiento. La eficacia fasciolicida se midió comparando la sobrevivencia del grupo tratado con relación al grupo testigo, cuando la eficacia fue mayor al 95% se consideró que la fracción y/o compuesto presentó actividad fasciolicida, las lecturas de las pruebas *in vitro* se realizaron a las 24, 48 y 72 horas post-tratamiento con ayuda de un microscopio invertido a 40x, bajo condiciones asépticas. Los resultados obtenidos indicaron que las fracciones denominadas F24, F27 y F31 presentaron una eficacia del 100% a partir de las 24 horas post-tratamiento a la concentración de 500 mg/L, mientras que el compuesto C2, a la misma concentración de 500mg/L, mostró una eficacia del 96% a las 24 horas post-tratamiento, alcanzando el 100 % a las 48 horas. Las fracciones evaluadas que presentaron eficacia fasciolicida del 100 % (F24, F27 y F31), se analizaron mediante un perfil fitoquímico, observándose la presencia de compuestos fenólicos y triterpenos. Se concluye que las fracciones evaluadas *in vitro* de *Vernonanthura patens* presentan una eficacia fasciolicida promisoriosa.

**Palabras clave:** *Vernonanthura patens*, fracciones, compuestos, metabolitos secundarios, fasciolosis.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate under *in vitro* conditions the fasciolicidal effect of fractions and compounds of *Vernonanthura patens*, obtained from the methanolic extract of the plant, by means of an open column chromatography system. The evaluation was carried out in recently excysted fasciolas *in vitro*, to obtain the metacercariae of *Fasciola hepatica*. The culture and infection of snails of the genus *Lymnaea* were carried out. A total of 13 fractions were evaluated at concentrations of 100, 200, 300, 400 and 500 mg/L, these fractions were selected according to the polarity in which they were obtained, as well as their yield. The fasciolicidal efficacy was measured by comparing the survival of the treated group in relation to the control group, when the efficacy was greater than 95% it was considered that the fraction and/or compound presented fasciolicidal activity, the *in vitro* test readings were performed at 24, 48 and 72 hours post-treatment with the help of an inverted microscope at 40x, under aseptic conditions. The results obtained indicated that the fractions F24, F27 and F31 presented an efficiency of 100% from 24 hours post-treatment at the concentration of 500 mg/L, while the C2 (500mg/L), showed an efficacy of 96% at 24 hours post-treatment, reaching 100% at 48 hours post-treatment. The evaluated fractions that presented fasciolicidal efficacy of 100% (F24, F27 and F31), were analyzed by means of a phytochemical profile, observing the presence of phenolic compounds and triterpenes. It is concluded that the fractions evaluated *in vitro* of *V. patens* have a promising fasciolicidal efficacy.

**Keywords:** *Vernonanthura patens*, fractions, compounds, secondary metabolites, fascioliasis.

# 1. INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria provocada por la presencia y acción del trematodo *Fasciola hepatica*, esta parasitosis se distribuye a nivel mundial, sin embargo, presenta una mayor incidencia en zonas tropicales y subtropicales. La fasciolosis se considera una zoonosis importante, y es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales desatendidas (Dalton, 2021, Casulli, 2021).

Por otro lado, las características epidemiológicas y de transmisión de la fasciolosis hacen que la enfermedad tenga una distribución irregular; los focos guardan relación con su distribución geográfica la cual corresponde a la de los hospederos intermediarios, que son caracoles dulceacuícolas pulmonados de la familia *Lymnaeidae*. Los estudios sobre el terreno y en el laboratorio han demostrado que la fasciolosis tiene una gran capacidad de propagación, que guarda relación con la capacidad de ampliación de nichos ecológicos de los limneidos huéspedes intermediarios y con la considerable capacidad de colonización y adaptación del parásito. También estos trematodos han puesto en práctica distintas estrategias de adaptación que permite tasa más elevadas de transmisión del parásito (Vera, 2011).

Además de considerarse una zoonosis de importancia medica debido a que afecta a millones de personas a nivel global. En México, esta parasitosis se encuentra presente en 29 estados de la República Mexicana (Ibarra et al., 2018).

El tratamiento contra la fasciolosis está basado en numerosos fármacos antihelmínticos, sin embargo, su uso indiscriminado ha favorecido la generación de resistencia por parte del parásito, por lo que es de suma importancia la búsqueda de alternativas contra esta enfermedad (Moll et al, 2000; Olaechea et al., 2011; Rojas, 2012).

## **1.1 *Fasciola hepatica***

*F. hepatica* también denominada duela del hígado y/o conchuela del hígado es un parásito hermafrodita que pertenece al filo Platyhelminthes, clase Trematoda, subclase Digenea. Morfológicamente presenta un cuerpo aplanado dorso-ventralmente, con forma lanceolada y con simetría bilateral, cuenta con un cono cefálico bien diferenciado y dos ventosas, una oral localizada en la parte anterior y una ventral, también denominada acetábulo, la fase adulta mide aproximadamente de 2 a 3 cm de largo y 1 cm de ancho. El aparato digestivo comienza con la boca ubicada en la ventosa oral, continua con una faringe musculosa y un esófago pequeño, sigue un par de ciegos intestinales ramificados a través de los laterales del cuerpo y termina con el aparato excretor, que consiste en numerosas células en flama, con conductos que desembocan en un par de canales colectores que forman una vesícula excretora que se abre en el poro excretor. El aparato reproductor masculino consta de dos testículos ramificados y una bolsa del cirro, ubicada a un costado del acetábulo, que desemboca en el poro genital, el cual se ubica sobre el borde anterior del acetábulo; el aparato reproductor femenino consta de un ovario ramificado, ubicado del lado derecho, anterior a los testículos, no presenta receptáculo seminal. Las glándulas vitelógenas se encuentran en los laterales del cuerpo, el útero es corto y sinuoso con varios huevos. El tegumento es carnoso y blando, revestido por una cutícula gruesa que presenta espinas. Los huevos son ovalados y su tamaño oscila entre los 130 a 150 micras de largo por 60 a 90 micras de ancho, presentan un opérculo polar en uno de sus extremos y tienen una cáscara delgada de tono amarillo-dorado conferidos por los pigmentos biliares (Vera, 2011).

Este parásito se distribuye mundialmente, sin embargo, es diagnosticado en países donde se lleva a cabo como actividad principal la cría de vacas y ovejas (Carrada-Bravo, 2003).

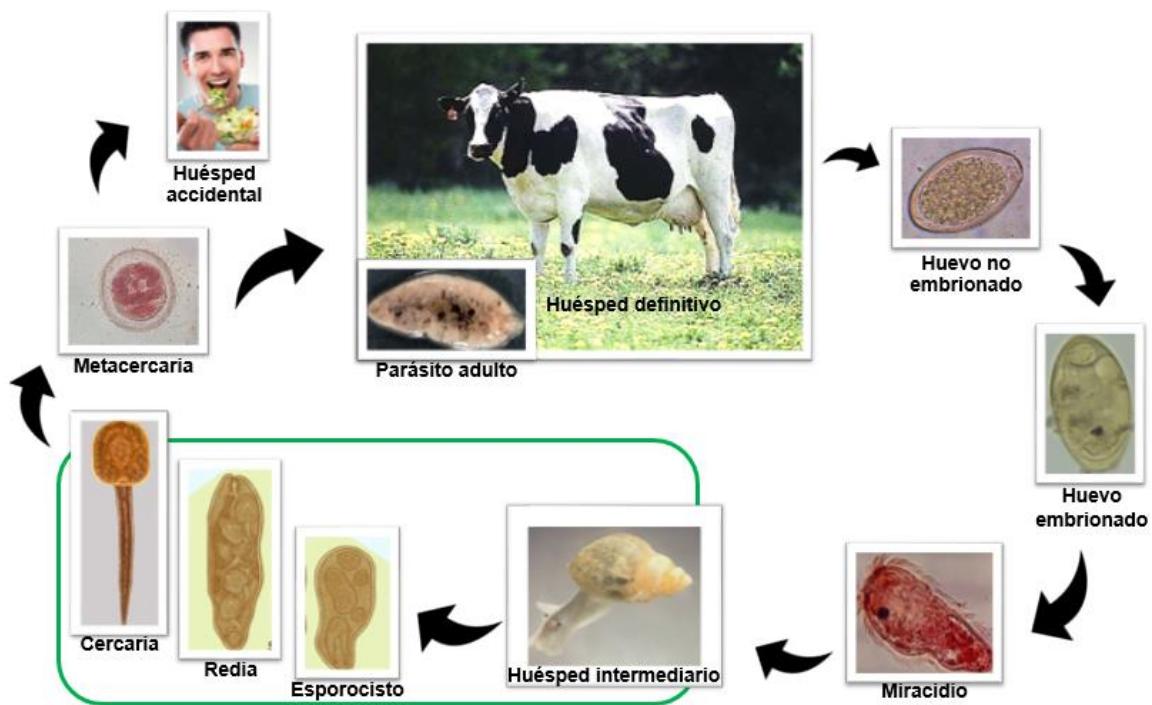
## 1.2 CICLO BIOLÓGICO DE *Fasciola hepatica*

El ciclo biológico de *F. hepatica* es de tipo indirecto, se considera así, ya que requiere de dos hospedadores, uno definitivo (vertebrados herbívoros) y uno intermediario (caracoles del género *Lymnaea* spp.) para completar su ciclo de vida (Fig. 1). El parásito adulto se localiza en los conductos biliares y el hígado del huésped definitivo, ahí deposita sus huevos y estos son expulsados junto con la materia fecal, los cuales al entrar en contacto con un cuerpo de agua son embrionados en condiciones óptimas de temperatura (26°C) y humedad (80 %), dando origen a la primera fase de larvas ciliadas denominadas miracidios, después de dos o tres semanas. Los miracidios pueden nadar libremente hasta por 24 horas, hasta encontrar al huésped intermediario (HI), caracoles del género *Lymnaea* spp. (*L. humilis*, *L. bulimoides* y *L. cubensis*), para continuar con su ciclo de vida; el ingreso a los caracoles a través del mucus se da gracias a los receptores quimiotácticos logrando penetrar a través de la cavidad respiratoria o mediante el tegumento de los caracoles (Bowman, 2011; Vera, 2011).

Dentro del caracol los miracidios se dirigen a la glándula digestiva, donde se desarrolla la segunda fase larvaria, los esporocistos, los cuales dan origen a las redias que se alojan en el hepatopáncreas, estas a su vez originan a redias hijas, denominadas de segunda generación. Cuando existen condiciones favorables, se genera la última fase larvaria dentro del caracol, las cercarías, las cuales salen del caracol después de 4 o 6 semanas a través de la abertura tocológica y finalmente del aparato respiratorio, una vez afuera, al encontrarse en un medio acuático, las cercarias se adhieren en la superficie de plantas, formando un quiste de doble pared desarrollando así las metacercarias, esta fase madura en el transcurso de 24 horas para volverse infectiva. Esta fase es ingerida por el huésped definitivo (HD) al alimentarse o beber agua contaminada (Bowman, 2011; Vera, 2011).

Una vez dentro del huésped definitivo, el parásito continúa con su desarrollo. El proceso de desenquistamiento de las metacercarias se divide en dos fases, la primera denominada fase de activación, la cual se lleva a cabo en el rumen con una atmosfera de anhídrido carbónico concentrado y una temperatura de 39°C. La

segunda fase denominada de emergencia ocurre en el tracto digestivo, específicamente en el duodeno, donde componentes de la bilis provocan la activación enzimática de las metacercarias provocando la apertura del quiste. Cuando la forma juvenil, se encuentra libre, atraviesa la pared intestinal y llega a la cavidad peritoneal, de ahí se dirige a la capsula de Glisson y la perfora para penetrar el hígado. Posteriormente migran por el parénquima hepático donde permanecen aproximadamente seis semanas y finalmente se localizan en los conductos biliares, ahí alcanzan su madurez sexual llegando al estado adulto, logran auto fecundar a partir del día 55 post infección, los huevos pasan al duodeno junto con la bilis y son evacuados con las heces, cerrando así su ciclo de vida (Bowman, 2011; Vera, 2011).



**Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.**

Tomado y modificado de: <https://www.parasite.org.au/para-site/fasciola/fasciola-clinical.html>  
 Imágenes tomadas en el Laboratorio de Quimioterapia experimental de helmintos del Departamento de Parasitología de la FMVZ, UNAM (Huevos, huésped intermediario y parásito adulto).

### **1.3 PATOGENIA Y LESIONES DE LA FASCIOLOSIS**

La patogenia de esta enfermedad se caracteriza por dos periodos, un periodo inicial, también conocido como periodo de invasión, el cual comienza con la ingestión de las metacercarias hasta la implantación de los parásitos en los conductos biliares, y un segundo periodo, también conocido como periodo de estado, abarca cuando los parásitos alcanzan su madurez sexual y comienzan la deposición de los huevos.

La patogenia depende del número de metacercarias que el animal ingiere y que tan infectivas sean, además de la especie del huésped definitivo, ya que se reporta que algunas especies son más susceptibles que otras.

La fasciolosis hepática puede presentarse de forma aguda o crónica, siendo la forma aguda la que ocasiona mayor daño al huésped definitivo, ya que se encuentra asociada con fiebre, hepatomegalia y eosinofilia. Las formas juveniles del parásito que se encuentran en el duodeno y yeyuno del huésped no producen lesiones significativas al atravesar la pared intestinal, para emigrar a la cavidad peritoneal, sin embargo, ocasionan un aumento importante de eosinófilos (Carrada-Bravo, 2003).

La fase aguda es casi exclusiva de los ovinos y es ocasionada por las fasciolas inmaduras que invaden el hígado de forma masiva, ocasionando una hepatitis traumática. La forma crónica es causada por parásitos adultos en los conductos biliares y se caracteriza por cólico biliar, ictericia, colangitis, pancreatitis y fibrosis hepática (Vera, 2011).

Las lesiones más importantes se encuentran en el parénquima hepático, durante la migración del parásito y en los conductos biliares, Las fasciolas juveniles pueden producir hemorragia peritoneal, así como lesiones necróticas en el hígado, así como engrosamiento de los conductos biliares, colangitis hiperplásica y fibrosis hepática (Vera, 2011).

## 1.4 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico para la fasciolosis, puede realizarse mediante; a) Diagnóstico clínico: Mediante la observación del estado general del animal, los signos clínicos que se presentan: diarrea, edema submandibular, emaciación, anorexia, palidez de las mucosas, anemia y abortos; b) De laboratorio: El método tradicional es la utilización de la técnica coprológica por sedimentación, la cual a pesar de ser un muy antiguo continúa siendo preciso, barato y fácil de realizar, ya que muestra la presencia de infección activa a través de la demostración de los huevos del trematodo en heces (Siles et al., 2021) ; c) Pruebas inmunológicas: existen considerables técnicas inmunológicas tales como: difusión doble en agar, inmunoelectroforesis, contra inmunoelectroforesis, hemaglutinación pasiva, aglutinación en látex, inmunofluorescencia, fijación de complemento, ELISA indirecto y coproantígenos (Vera, 2011); d) Mediante pruebas moleculares; las pruebas más utilizadas son: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real, PCR multiplex y amplificación isotérmica mediada por bucle (Ollivier et al., 2020; Carnevale et al., 2021; Davies et al., 2021); e) Por necropsia: este método es el más utilizado en los rastros, en donde el veterinario inspecciona la presencia o no de fasciolas en los conductos biliares, de los hígados de los animales que son sacrificados (Vera, 2011; Álvarez et al., 2014; Doxon, 2016; Wilson et al., 2019).

## 1.5 PÉRDIDAS ECONÓMICAS

Es considerada una de las enfermedades hepáticas de mayor importancia que afecta a más de 600 millones de animales en todo el mundo, se estima que aproximadamente 350 millones de bovinos y 250 millones de ovinos se encuentran infectados con *F. hepatica*, generando pérdidas económicas entre los 2,000 y 3,000 millones de dólares anuales en todo el mundo (Fernández et al., 2015; Mas-Coma et al., 2005; Cwiklinski et al., 2015; Ibarra et al., 2018). Las



pérdidas económicas provocadas por *F. hepatica* se dividen en directas e indirectas, las pérdidas directas son aquellas causadas por muertes o decomisos de hígados en los rastros, mientras que las indirectas son aquellas causadas por la disminución en la producción del ganado, que incluyen baja en la producción de lana, baja en la fertilidad de animales infectados y bajas en la producción de carne y leche, las pérdidas económicas indirectas son de mayor importancia, debido a que la forma sub-clínica de la enfermedad se presenta con mayor frecuencia (Vera, 2011; Cwiklinski et al., 2016). Las estimaciones sobre las pérdidas económicas están basadas en los hígados decomisados y eliminados, registrados en el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), sin embargo, datos como las pérdidas en la producción láctea, la producción de carnes, la disminución de la fertilidad, muerte por infecciones masivas, el uso de fármacos antihelmínticos, la mano de obra, entre otros, no se encuentran registrados, por lo que las estimaciones basadas en decomisos caen en una subestimación (Espinoza et al., 2010).

## **1.6 TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL**

El tratamiento contra la fasciolosis que más se ha utilizado en las últimas décadas está basado en numerosos fármacos antihelmínticos clasificados en los siguientes grupos químicos: benzimidazoles, fenoles halogenados, fenoxialcanos, salicinidas y las sulfonamidas. Los más usados pertenecen al grupo de los benzimidazoles, como el Albendazol, el Netobimín, el Albendazol sulfóxido y el Triclabendazol (Vera, 2005; Olaechea, et al., 2011).

El Albendazol es un benzimidazol de amplio espectro, que se ha utilizado de forma amplia en el ganado, se utiliza en diferentes helmintiasis y trematodosis. El Triclabendazol es el fármaco más efectivo contra *F. hepatica*, dada su alta eficacia, ya que actúa contra todos los estadios de este trematodo (Vera, 2005; Olaechea, et al., 2011).

El tratamiento contra la fasciolosis está basado en numerosos fármacos antihelmínticos, sin embargo, su uso indiscriminado ha favorecido la generación de resistencia por parte del parásito en diversas poblaciones de trematodos resistentes a TCBZ en Australia, Nueva Zelanda, Perú, Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Filipinas, Reino Unido, Irlanda y otros países europeos (Fairweather et al., 2020; Hanna et al. , 2015; Hassell y Chapman, 2012; Kelley et al., 2016; Moll et al., 2000; Olaechea et al., 2011; Ortiz et al., 2013; Romero et al., 2019; Venturina et al., 2015; Novobilsky et al., 2016; Kamaludeen et al., 2019; Kelley et al., 2020; Olaechea et al., 2011; Kaplan et al., 2012; Ceballos et al., 2019 y Romero et al., 2019)

Dada esta situación es importante la búsqueda de alternativas para el tratamiento de estas enfermedades, una de estas alternativas es el uso de plantas medicinales, que han demostrado ser eficaces para el tratamiento de diferentes patologías. Se están desarrollando u optimizando rápidamente métodos para cosechar y modificar diversos productos naturales para controlar o revertir enfermedades infecciosas o no transmisibles (Rates, 2001; Faustino et al., 2019). Este descubrimiento ayudo a la búsqueda de productos naturales de origen vegetal con actividad contra los parásitos helmintos (Liu et al., 2020). Los productos naturales investigados como antihelmínticos incluyen monofenoles o terpenoides (por ejemplo, timoles y carvacrol) y flavonoides como la quercetina y los ácidos cinámicos, (García-Bustos et al., 2019), diterpenoides y triterpenoides contra patógenos de trematodos hepáticos y sanguíneos (Edwards et al., 2015; Crusco et al., 2018, 2019; Whiteland et al., 2018).

## **1.7 PLANTAS MEDICINALES**

Las plantas medicinales se han utilizado desde hace muchos siglos, para el tratamiento de diferentes afecciones y enfermedades por lo que su uso es considera como una tradición milenaria (Evans y Hoffman, 2012).

El éxito de su uso se debe a la presencia de ciertos compuestos denominados metabolitos secundarios, ya que derivan del metabolismo secundario de las plantas, también son llamados productos naturales. Los metabolitos secundarios tienen un valor medicinal muy importante, así como un valor económico, ya que son utilizados en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Se calcula que más de 100,000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla et al., 2005).

Los metabolitos secundarios tienen una gran importancia ecológica para las plantas, ya que participan en procesos de adaptación, simbiosis y defensa, además, al contar con miles de estructuras químicas se les atribuyen diferentes actividades biológicas, siendo una alternativa la identificación de nuevos compuestos con fines terapéuticos (Sepúlveda et al., 2003).

### **1.8 *Vernonanthura patens***

La planta *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob (*V. patens*), es un arbusto poco ramificado originario de Sudamérica que pertenece a la familia *Asteraceae* y subfamilia de *Cichorioideae*, mide aproximadamente 3 metros de altura, presenta tallos surcados y hojas alternas (Blair, 2005); se distribuye desde el sur de México hasta el río de La Plata (Vega y Dematteis, 2009).

Esta planta se utiliza en la medicina tradicional para combatir el paludismo, contra dolores del parto y post parto, así como dolores estomacales en general, diarrea y como analgésico natural (Blair, 2005). También es usada como cicatrizante, para tratar erupciones en la piel y heridas, úlceras, congestión nasal, hemorragias y aliviar el espanto (Béjar et al., 2001, Kvis et al, 2006).

Estudios previos realizados en el departamento de parasitología de la FMVZ, han demostrado que el extracto metanólico de *V. patens in vitro* tiene efecto fasciolicida, por lo cual podría considerarse una alternativa para el tratamiento de la fasciolosis en rumiantes (Francisco, 2015). Sin embargo, es necesario la

identificación de las fracciones o compuestos con eficacia fasciolicida *in vitro* para determinar el verdadero potencial de la planta.

## 1.9 ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios sobre la eficacia de varios extractos de plantas para combatir diferentes tipos de parásitos, los cuales han demostrado actividad parasiticida promisorio, por ejemplo, Vera Montenegro y colaboradores en 2008, probaron diversos extractos crudos de plantas contra *F. hepatica in vitro* y mostraron que los extractos de Tila (*Tilia mexicana*), Café (*Coffea arabica*), Tila roja (*Ternstroemia pringlei*) y Níspero japonés (*Eriobotrya japonica*) presentan eficacia fasciolicida entre 95 y 100% en concentraciones de 50 a 500 mg/ L.

Ferreira y colaboradores en 2011, mostraron actividad *in vitro* de extractos crudos de plantas del género Artemisia (*A. annua*, *A. absinthium*) contra los *F. hepatica*, presentando actividad fasciolicida del 100% en organismos adultos, a las 23 y 70 horas post-exposición respectivamente, a una concentración de 2 mg/ml, determinando la presencia de artemisina y acetogeninas en los extractos con mayores eficacias.

En 2012, Hossain y colaboradores demostraron la eficacia antihelmíntica *in vitro* del extracto metanólico de las hojas de Machigua (*Dregea volubilis*) a diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100 mg/ml), contra parásitos adultos de *Paramphistomum explanatum*, el cual provoca la parálisis del parásito y su posterior muerte en cuestión de minutos, observando la máxima actividad antihelmíntica con la dosis de 100 mg/ml.

De manera similar en 2013, Hossain y colaboradores evaluaron el efecto fasciolicida, específicamente contra *Fasciola gigantica*; del extracto metanólico de las hojas de *D. volubilis* a diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 mg/ml), observando la máxima actividad con la dosis de 100 mg/ml a los 38 a 40 minutos aproximadamente, generando parálisis y posterior muerte del trematodo.

Otro estudio mostró la eficacia *in vitro* de diferentes extractos obtenidos a partir de las hojas de *Euphorbia hirta*, Guayaba (*Psidium guajava*), Ricino (*Ricinus communis*), Tamiel (*Solanum trilobatum*) y Cadillo (*Tridax procumbens*) contra *Paramphistomum cervi*, logrando mortalidad *in vitro* al 100% de parásitos adultos, a partir del fraccionamiento de este extracto, se obtuvo un compuesto denominado epicatequina, con potencial antiparasitario (Zahir et al., 2012).

Váradyová y colaboradores en 2018, evaluaron diferentes extractos metanólicos y acuosos de 13 plantas medicinales típicas de Europa Central, contra *Haemonchus contortus* (huevos y larvas), obteniendo actividad antihelmíntica más significativa de los extractos metanólicos de *Artemisia absinthium*, tanto en eclosión de huevos como en desarrollo larvario, en lo que respecta a la actividad ovicida, obtuvieron mejores resultados de los extractos acuosos.

Ibarra en 2012, demostró que los extractos obtenidos con hexano a partir de hojas y flores de Milenrama (*Achillea millefolium*), Menta (*Mentha piperita*), Orégano (*Lippia graveolens*), Epazote de zorrillo (*Chenopodium graveolens*), Muiche (*Justicia spicigera*), Álamo blanco (*Populus alba*), Estafiate (*Artemisa mexicana*), Plumajillo (*Achillea millefolium*), entre otras, mostraron eficacia fasciolicida del 100% en concentraciones de 500 mg/L a partir de las 24 horas post-exposición.

Sánchez-Peralta en 2015, mostró que los extractos de Gordolobo (*Bocconia frutescens*) y *Buddleja cordata* muestran eficacias del 98 y 83.3% respectivamente en concentraciones de 500 mg/L.

Álvarez en 2015, mostró la eficacia fasciolicida en fasciolas recién desenquistadas de extractos obtenidos a partir de solventes de diferente polaridad de Lantana (*Lantana camara*), Gordolobo (*Bocconia frutescens*), Hierba santa (*Piper auritum*), Estafiate (*Artemisa mexicana*) y Guándul (*Cajanus cajan*), los cuales mostraron eficacias del 100% a concentraciones de 125 a 500 mg/L.

Un estudio previo realizado en el laboratorio de Quimioterapia Experimental de Helminthos demostró actividad fasciolicida *in vitro* del extracto de tres plantas, Guayaba (*Psidium guajava*), Zapote blanco (*Casimiora edulis*) y *V. patens*, los

cuales mostraron eficacias del 100 % en concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L siendo *V. patens* la que presentó mayor eficacia (Francisco, 2015).

*V. patens* es una especie poco estudiada, sin embargo, es ampliamente usada en comunidades rurales y se le atribuyen varias propiedades medicinales como analgésico, anti-inflamatorio, anticancerígeno, antileishmanial, entre otras (Manzano et al., 2013).

En 2012 Manzano y colaboradores realizaron un estudio donde se mostró el tamizaje fitoquímico de *V. patens* donde se mostró la presencia de aceites esenciales, alcaloides, compuestos reductores, fenoles, taninos, flavonoides quinonas, saponinas triterpenos y esteroides; una fracción obtenida con hexano al 100% de *V. patens* y 2 compuestos puros identificados como lupeol y epilupeol presentaron actividad anti-fúngica (80-100%), con porcentajes de inhibición del 57,6 y 80,2 % frente a *Penicillium notatum*, y 64,8 y 81,5 % frente a *Fusarium oxysporum*, a los 15 días de incubación, por parte de la fracción, mientras que el compuesto epilupeol mostro inhibición del 100% del *Fusarium oxysporum*. Propusieron la estructura de 33 compuestos (hidrocarburos) como constituyentes de la fracción hexánica, además dilucidaron la estructura química de 3 compuestos: lupeol, acetil lupeol y epilupeol, compuestos reconocidos por sus diversas actividades biológicas, concluyen que *V. patens* puede considerarse como un candidato potencial para futuras investigaciones.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la resistencia generada por parte de los parásitos contra los fármacos fasciolicidas convencionales, es importante encontrar una alternativa al tratamiento y control de la fasciolosis, la cual podría ser el uso de compuestos derivados de plantas, que, al contar con una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad biológica, podrían combatir de forma eficaz esta parasitosis.

## 3. HIPÓTESIS

Debido a que el extracto crudo metanólico de *Vernonanthura patens* tuvo efecto fasciolicida, se espera que las fracciones y/o compuestos aislados de dicho extracto presenten un efecto fasciolicida *in vitro* mayor a 95% en fasciolas recién desenquistadas bajo condiciones *in vitro*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad fasciolicida *in vitro* de las fracciones y/o compuestos aislados a partir del extracto metanólico de *Vernonanthura patens*.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Colectar, cultivar e infectar caracoles limneidos para la obtención de metacercarias.
- 2) Realizar el fraccionamiento del extracto metanólico crudo de *Vernonanthura patens* mediante cromatografía en columna abierta.
- 3) Evaluar *in vitro* las fracciones y/o compuestos obtenidos del extracto metanólico de *Vernonanthura patens* contra *Fasciola hepatica*.
- 4) Identificar las posibles familias de metabolitos secundarios presentes en aquellas fracciones y/o compuestos con mayor actividad fasciolicida a través de un análisis fitoquímico cualitativo.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Colecta y cultivo de caracoles del género *Lymnaea* spp.

Para realizar los análisis de eficacia fasciolicida se requerían las fases infectantes (metacercarias) de *F. hepatica*, por lo que se llevó a cabo la colecta y cultivo de caracoles limneidos (huéspedes intermediarios). Las colectas se realizaron en diferentes salidas de campo, al municipio de Jilotepec, Estado de México y al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro Silvo Pastoril (CEIEPASP) de la FMVZ-UNAM, ubicado en el municipio Chapa de Mota, Estado de México. En ambas ubicaciones se seleccionó una zona con humedad, a un costado de los animales en pastoreo, para llevar a cabo la búsqueda y colecta de los caracoles, los cuales se colectaron de forma manual con ayuda de ciertas herramientas como pinzas y cucharas, posteriormente se colocaron en recipientes de plástico y/o bolsas con cierta cantidad de agua aireada, para su transporte hacia el laboratorio de Malacología del departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM.

Los caracoles colectados fueron identificados con ayuda de claves taxonómicas en el laboratorio de Moluscos del Instituto de Biología de la UNAM.

En el laboratorio de Malacología, los caracoles se traspasaron a macetones de barro y recipientes de vidrio (refractario) con tierra previamente esterilizada y alga sembrada, colectada del mismo sitio, para mantener una temperatura y humedad controladas. Después de una semana de adaptación con estas condiciones, las masas ovígeras que producían los caracoles eran colectadas cada tercer día con ayuda de un pincel para no dañarlas y colocadas en cajas Petri pequeñas con agua aireada, una vez eclosionados los caracoles (aproximadamente 10-12 días), se pasaban cuidadosamente en recipientes de vidrio (cajas Petri, refractarios), previamente preparados con tierra estéril y alga colectadas del mismo sitio de la colecta de los caracoles y se monitoreaban de 2 a 3 veces por semana, se alimentaban con alga y alimento comercial "Tetra Min" y se cambiaban a nuevas

cajas con tierra estéril y alga sembrada, hasta completar 3-4 semanas de edad, y poder ser infectados.

## **5.2 Colecta y cultivo de alga**

De forma simultánea a la colecta y cultivo de los caracoles, se realizó la colecta y el cultivo de alga del género *Oscillatoria* en los mismos sitios, para alimentar a los caracoles y mantenerlos en las mejores condiciones posibles. La identificación se realizó en el laboratorio de Ficología del Instituto de Biología-UNAM.

El alga colectada se transportó al Laboratorio de Malacología de la FMVZ, lugar donde se realizó la separación del alga, realizando lavados en repetidas ocasiones para quitar el exceso de ramas y basura, con ayuda de un cernidor. Una vez lavada se colocó en recipientes de plástico con agua limpia y se mantenía a temperatura ambiente y con cambios de agua cada 24 horas, transcurridos 2-3 cambios al observar el agua lo más limpia, sin exceso de tierra, se procedió a realizar la siembra en recipientes de vidrio y cajas Petri con tierra estéril.

Para la siembra del alga, se tomó una porción de alga con agua, y se licuo agregando más agua, la mezcla se sembraba sobre los recipientes de manera uniforme y estos se dejaban expuestos al sol durante 2-3 horas al día y se mantenían dentro del malacolario durante la noche, respetando el fotoperiodo del alga; para favorecer el crecimiento del alga, se realizó una solución de trabajo con diferentes nutrientes y vitaminas, como medio de cultivo, de acuerdo con la formulación descrita por Guillard y Ryther (1973), el cual se agregaba a los cultivos de alga cada semana.

La producción del alga se realizó aislando una porción del alga sembrada, utilizando una solución estéril de medio BG 11 Cianobacterias (solución de agua dulce) 50x de SIGMA-ALDRICH, lote # RNBH3657 al 4% con un sistema de aireación constante y periodos de luz sintética/obscuridad por intervalos de 12 horas para favorecer su crecimiento (Fuenmayor et al., 2009).

### **5.3 Infección de caracoles**

Para la infección experimental de los caracoles, se obtuvieron huevos de *F. hepatica* de vesículas biliares de bovinos infectados en el rastro municipal de Toluca, Estado de México, utilizando la técnica de sedimentación, estos se mantuvieron en incubación a una temperatura constante de 26°C durante 15-21 días, una vez transcurrido ese periodo de tiempo, los huevos se expusieron a luz artificial para permitir la liberación de los miracidios. Los caracoles fueron seleccionados de forma individual y expuestos a 3 a 5 miracidios cada uno, durante 2 o 4 horas para permitir la infección. Una vez pasado este lapso, los caracoles se regresaron a sus respectivas cajas de Petri y se monitorearon por 42-45 días (Flores, 2017).

### **5.4 Obtención de metacercarias**

Transcurridos los 42-45 días los caracoles infectados se colocaron en bolsas de plástico con agua destilada y se sometieron a un estrés térmico con ayuda de una bombilla eléctrica, por aproximadamente 6 a 24 horas para facilitar la liberación de las metacercarias (Alcibar et al., 1985; Flores, 2017). Una vez liberadas, se dejaron madurar durante 24 horas en el medio acuoso y finalmente se conservaron a una temperatura de 4°C hasta la evaluación *in vitro*.

### **5.5 Obtención de fracciones y/o compuestos bioactivos del extracto crudo de *Vernonanthura patens***

La separación y obtención de fracciones y/o compuestos del extracto crudo metanólico de *V. patens* se llevó a cabo en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, mediante un sistema de cromatografía de columna abierta

(CC), usando como fase estacionaria un gel de sílice (Ref. 816310.5, Lot. 822032811, Sílica gel 60 Å) y como fase móvil, solventes orgánicos de polaridad ascendente en distintas proporciones (Hexano, Hexano: Acetato de Etilo, Acetato de Etilo: Metanol, Metanol:H<sub>2</sub>O).

Una vez obtenidas alícuotas de 450 a 500 ml, se evaporaron con ayuda de un rotavapor para la eliminación eficiente de los solventes, posteriormente se agruparon en fracciones mediante un sistema de cromatografía de capa fina de acuerdo con su patrón cromatográfico: Las cromatoplasmas se revelaron con una lámpara de luz ultravioleta (UV) en longitud de onda corta (254 nm) y en longitud de onda larga (365 nm) (Wagner y Bladt, 1998).

## **5.6 Evaluación biológica *in vitro* de las fracciones y compuestos de *Vernonanthura patens***

Para la evaluación *in vitro* de la eficacia fasciolicida de las fracciones y los compuestos, se utilizaron fasciolas recién desenquistadas de forma artificial, el desenquistamiento se realizó exponiendo las metacercarias a ditionato de sodio como medio de activación durante hora y media bajo incubación a 37°C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se colocaron en un medio de emergencia formado por solución de Hank y bilis de bovino durante dos horas y media, bajo las mismas condiciones de incubación, finalmente las fasciolas desenquistadas fueron suspendidas en medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) y suero bovino, procedimiento descrito por Ibarra y Jenkins (1984).

Para la evaluación de las fracciones y compuestos obtenidos a partir del fraccionamiento del extracto metanólico de *V. patens*, se seleccionaron 11 fracciones con base en la polaridad con que fueron obtenidos y a su rendimiento. (F2, F24, F27, F31, F32, F34, F35, F37, F39, F41 y F45), y 2 compuestos aislados de la fracción F3 y F8 (C1 y C2).

Para reconstituir las fracciones y los compuestos y obtener las diferentes concentraciones a evaluar, se realizó una solución madre con una concentración de 500 mg/L de cada fracción y compuesto a evaluar en 10 mL de agua destilada, a partir de estas soluciones se realizaron las diluciones decuples para obtener las concentraciones correspondientes. Las fasciolas fueron expuestas por triplicado a las concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L.

Las lecturas de las pruebas se realizaron a las 24, 48 y 72 horas con ayuda de un microscopio invertido a 40x. Todas las evaluaciones se llevaron a cabo bajo condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar.

Cada experimento realizado *in vitro*, para evaluar la eficacia fasciolicida de las fracciones y/ o compuestos obtenidos a partir del extracto crudo de *V. patens* contenía como control positivo el Triclabendazol, un fármaco de referencia, que mostró un 100% de eficacia fasciolicida a partir de las 24 horas post-tratamiento, a las concentraciones de 10 y 50 mg; así como un control negativo que consistía en medio RPMI-1640 y suero bovino.

La eficacia se valoró utilizando la formula creada por Wood y colaboradores en 1995, donde se compara el porcentaje de mortalidad con relación al número de fasciolas vivas contra las muertas, cuando esta fue mayor al 95% se consideró que la fracción y/o compuesto posee actividad fasciolicida.

$$\text{Eficacia (\%)} = \frac{\text{Núm. de fasciolas en grupo testigo} - \text{Núm. de fasciolas en grupo tratado}}{\text{Núm. de fasciolas en grupo testigo}} \times 100$$

La evaluación se llevó a cabo en el laboratorio de Quimioterapia experimental de helmintos del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

## 5.7 Análisis fitoquímico de las fracciones de *Vernonanthura patens*

Las fracciones que presentaron una actividad fasciolicida igual o superior al 95% fueron analizadas mediante un análisis fitoquímico cualitativo, para determinar la presencia de las principales familias de metabolitos. Las pruebas realizadas fueron (Shukla et al., 2013):

Grupo de metabolito	Método o agente cromógeno	Referencia
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	Domínguez, 1973
	Reactivo de Mayer	Domínguez, 1973
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	Rivas-Morales et al., 2016
Glucósidos	Reactivo de Molisch	Foulger, 1931
Terpenos	Liebermann-Burchard	Rivas-Morales et al., 2016

## 5.8 Medición de puntos de fusión de los compuestos

Las fracciones obtenidas que presentaron precipitados y apariencia pura fueron evaluadas con un aparato Fisher-Johns para determinar sus puntos de fusión, y de esta forma comprobar su grado de pureza. Las sustancias puras se funden a una temperatura elevada y muy definida, con un intervalo de temperatura muy pequeño de 0,5 a 1 °C, mientras que las sustancias impuras y contaminadas suelen presentar un intervalo de fusión amplio.

## 5.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las pruebas *in vitro* para determinar la eficacia fasciolicida de las fracciones y/o compuestos evaluados fueron analizados por medio de la prueba de Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 95% para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos experimentales (Systat Software, Inc. 2008).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Obtención de fracciones y/o compuestos bioactivos del extracto crudo de *Vernonanthura patens* y determinación del grado de pureza.

Se obtuvieron 206 alícuotas de 450 a 500 ml cada una, a partir del fraccionamiento del extracto metanólico de *V. patens* mediante cromatografía en columna abierta; las cuales se agruparon de acuerdo con su patrón cromatográfico en capa fina (Fig. 2); obteniendo un total de 45 fracciones, de las cuales 5 (C1, C2, C3, C4 y C5) presentaron características de compuestos puros por el rango de temperatura que presentaban al fusionarse (Punto de fusión) (cuadro 1).

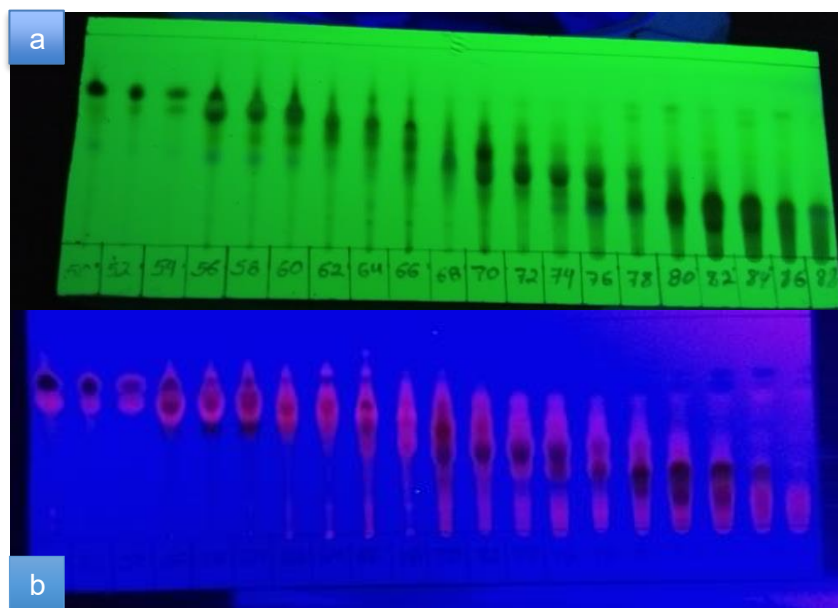


Figura 2. Patrón cromatográfico de alícuotas obtenidas a partir del extracto metanólico de *V. patens*. a) Cromatoplaqueta revelada con sulfato cérico, vista en lámpara

de luz ultravioleta a 254 nm, b) Cromatoplaça vista en lámpara de luz ultravioleta a 365 nm.

<b>CUADRO 1. PUNTOS DE FUSIÓN DE LOS COMPUESTOS</b>	
<b>COMPUESTO</b>	<b>PUNTO DE FUSIÓN (°C)</b>
C1	<b>144-145</b>
C2	<b>79-80</b>
C3	<b>75-76</b>
C4	<b>77-78</b>
C5	<b>73-74</b>

**Cuadro 1. Puntos de fusión de los compuestos.** Se muestran los puntos de fusión de los cinco compuestos. Todos los compuestos mostraron puntos de fusión con un intervalo de un grado centígrado.

## **6.2 Evaluación biológica *in vitro* de las fracciones y/o compuestos de *Vernonanthura patens***

Los resultados de la evaluación de la actividad fasciolicida de las fracciones del extracto metanólico de *V. patens*, muestran que las fracciones F24, F27 y F31 obtuvieron el 100 % de eficacia *in vitro* a las 24 horas post-exposición a la concentración de 500 mg/L. La fracción F2 mostró el 100% de eficacia a las 48 horas post-exposición a la misma concentración.

Las fracciones F32, F34, F37, F39 y F41 alcanzaron el 100 % de eficacia *in vitro* a las 72 horas post-exposición a la concentración de 500 mg/L (cuadro 2).



**Cuadro 2. Porcentaje de eficacia fasciolicida *in vitro* de fracciones de *V. patens*.**

TIEMPO (horas)	FRACCIÓN	CONCENTRACIÓN (mg/L)						
		10	50	100	200	300	400	500
24	F2			0	0	0	0	83 ± 0.144
	F24			0	0	4 ± 0.072	0	100
	F27			0	0	8 ± 0.072	4 ± 0.072	100
	F31			0	0	4 ± 0.072	4 ± 0.072	100
	F32			0	0	4 ± 0.072	4 ± 0.072	79 ± 0.088
	F34			0	0	0	0	70 ± 0.173
	F35			0	0	0	0	0
	F37			0	0	0	0	38 ± 0.125
	F39			0	0	0	0	83 ± 0.289
	F41			0	0	0	0	79 ± 0.191
	F45			0	0	0	0	0
48	TESTIGO (+)	100	100	-	-	-	-	-
	TESTIGO (-)	-	-	0	0	0	0	0
	F2			0	0	0	0	100
	F24			0	0	4 ± 0.072	0	100
	F27			0	0	17 ± 0.144	4 ± 0.072	100
	F31			0	0	4 ± 0.072	4 ± 0.072	100
	F32			0	0	4 ± 0.072	4 ± 0.072	96 ± 0.072
	F34			0	0	0	0	78 ± 0.139
	F35			0	0	0	0	0
	F37			0	0	0	0	46 ± 0.260
	F39			0	0	0	0	92 ± 0.144
F41			0	0	0	0	83 ± 0.191	
F45			0	0	0	0	0	
72	TESTIGO (+)	100	100	-	-	-	-	-
	TESTIGO (-)	-	-	0	0	0	0	0
	F2			0	0	0	0	100
	F24			0	0	4 ± 0.072	8 ± 0.072	100
	F27			0	0	21 ± 0.072	8 ± 0.072	100
	F31			0	0	4 ± 0.072	8 ± 0.072	100
	F32			0	0	4 ± 0.072	4 ± 0.072	100
	F34			0	0	0	0	100
	F35			0	0	0	0	0
	F37			0	0	0	0	100
	F39			0	0	0	0	100
F41			0	0	0	0	100	
F45			0	0	0	0	0	

T (+) = Testigo positivo (Triclabendazol) y T (-) = Testigo negativo (medio de cultivo RPMI-1640 + Suero bovino).

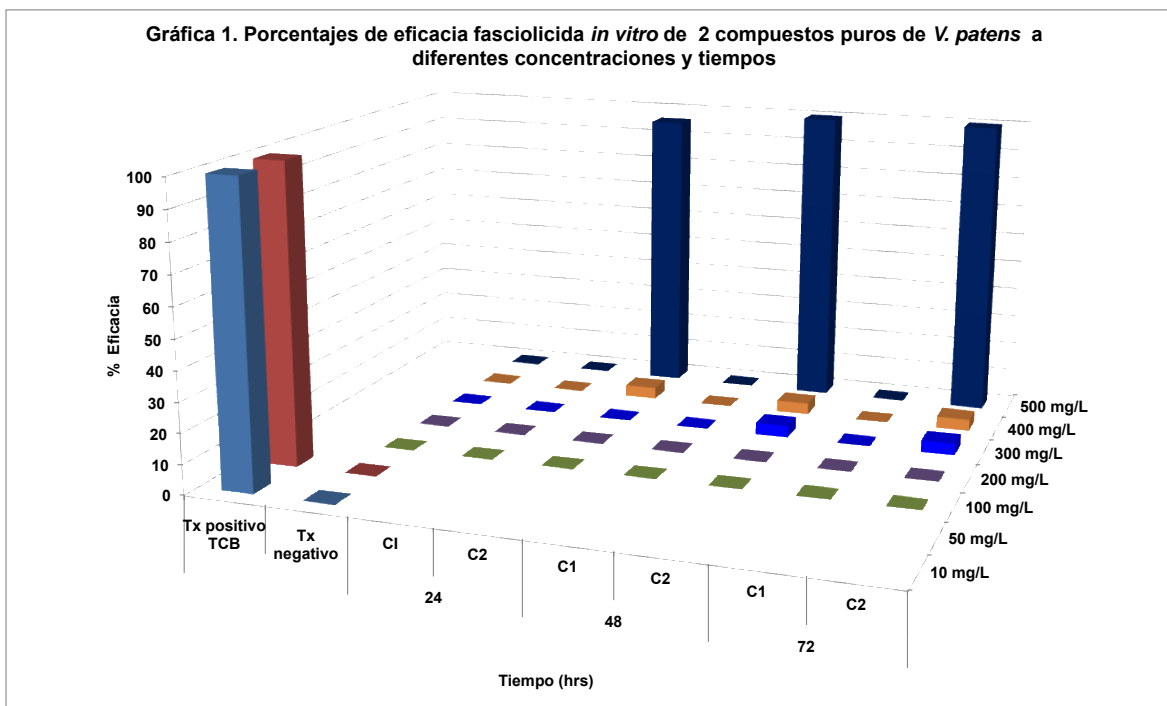
El análisis estadístico en donde se evaluaron las eficacias de las fracciones: F2, F24, F27, F31, F32, F34, F35, F37, F39, F41 y F45, a la concentración de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L, monitoreadas a las 24, 48 y 72 horas, demostró que hubo diferencias significativas entre las eficacias promedio ( $P < 0.05$ ). Estas diferencias se registraron entre la fracción F3, F35, F45 y F37 y el resto de las fracciones, a excepción de la fracción F34 (cuadro 3).

**Cuadro 3. Eficacias promedio por fracción analizada**

<b>Fracción</b>	<b>Eficacia (%)</b>
<b>F2</b>	94.33 ± 9.81 <sup>a</sup>
<b>F24</b>	100 ± 0 <sup>a</sup>
<b>F27</b>	100 ± 0 <sup>a</sup>
<b>F31</b>	100 ± 0 <sup>a</sup>
<b>F32</b>	91.66 ± 11.15 <sup>a</sup>
<b>F34</b>	82.66 ± 17.32 <sup>ab</sup>
<b>F35</b>	0 ± 0 <sup>b</sup>
<b>F37</b>	61.33 ± 33.72 <sup>b</sup>
<b>F39</b>	91.66 ± 8.5 <sup>a</sup>
<b>F41</b>	87.33 ± 11.15 <sup>a</sup>
<b>F45</b>	0 ± 0 <sup>b</sup>

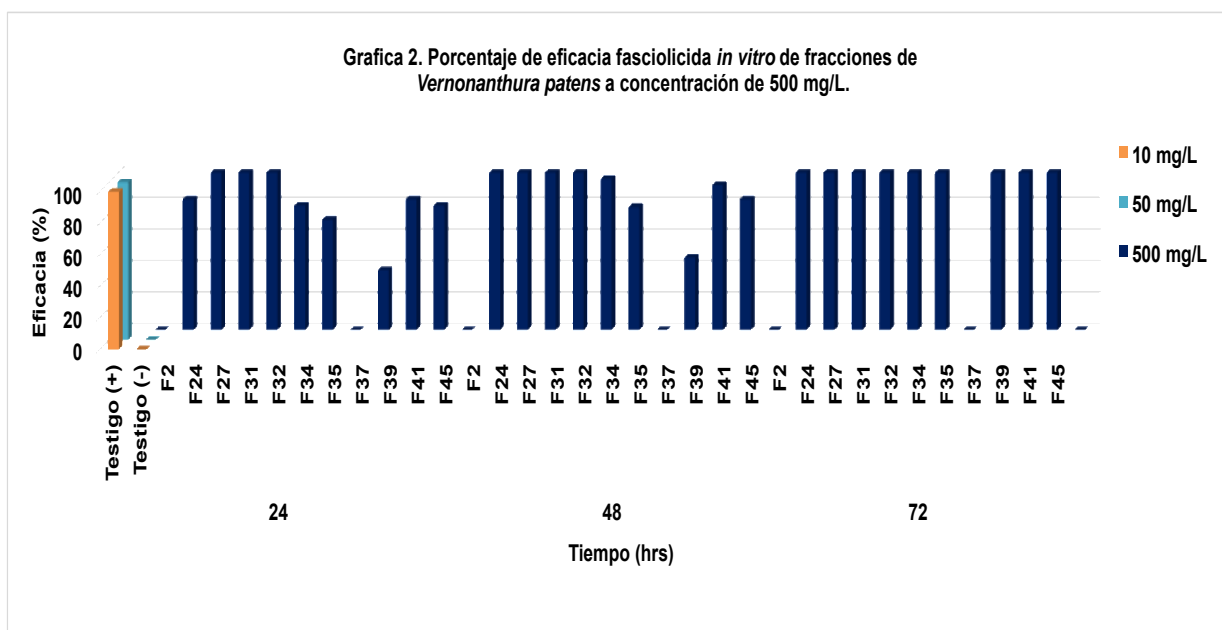
Se presentan los valores promedio de la eficacia ± la desviación estándar. Literales iguales no indican diferencias ( $P > 0.05$ ); literales diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

De los dos compuestos evaluados, C1(F3) y C2(F8), únicamente el compuesto C2 presentó eficacias del 100 % a las 48 horas post-exposición a la concentración de 500 mg/L (Gráfica 1).



**Gráfica 1. Porcentaje de eficacia fasciolicida *in vitro* de 2 compuestos de *V. patens*.** Eficacia evaluada a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L, donde C1 (F3) y C2 (F8), representan a los compuestos 1 y 2 respectivamente, T (+) el testigo positivo (Triclabendazol) y T (-) el testigo negativo (medio de cultivo RPMI-1640 + Suero bovino)

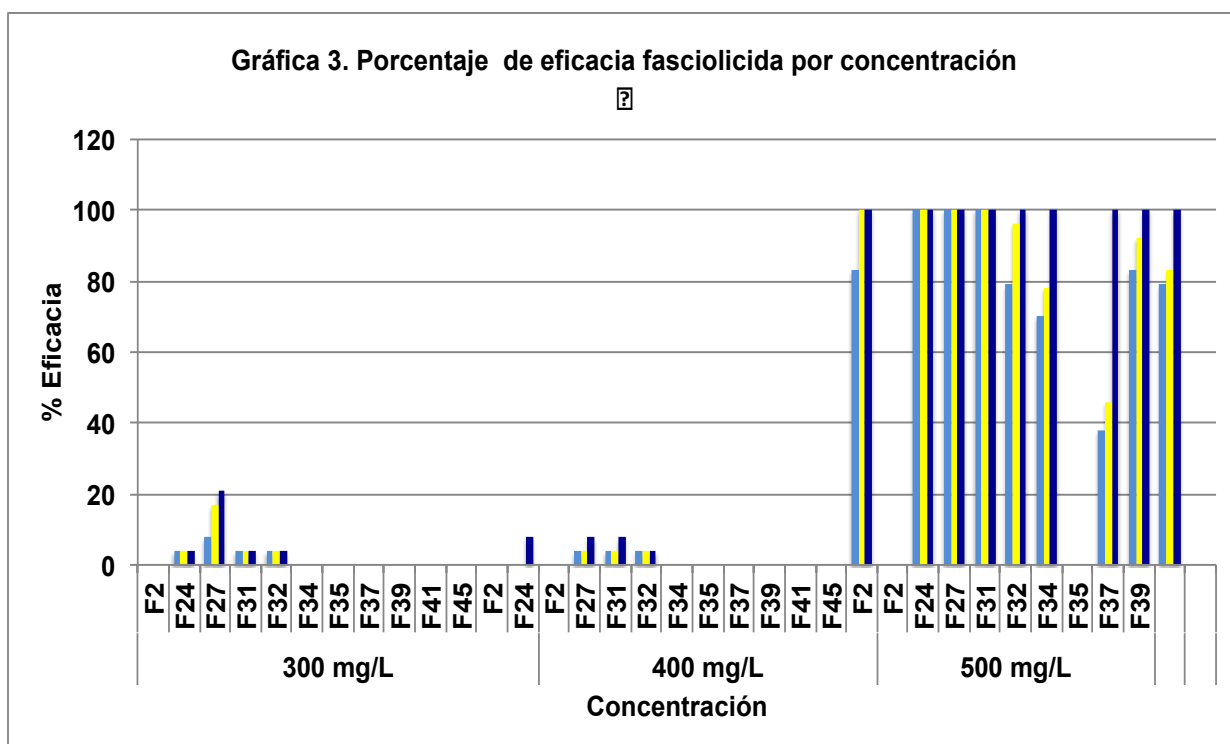
Al determinar las eficacias promedio de cada fracción analizada, resultó la fracción F37, la que registró la media más baja de todas las fracciones analizadas, así como la desviación estándar más alta, alcanzando valores máximos similares a los mínimos de la fracción F34, mientras que las fracciones con mayor eficacia son la F24, F27 y F31, las cuales mostraron eficacias del 100% solo en la concentración de 500 mg/L. Al analizar la eficacia respecto de la fracción y el tiempo, se determinaron diferencias significativas en la eficacia por fracción y la eficacia por tiempo ( $P < 0.05$ ). Las mayores eficacias se registran entre las 48 y 72 horas en todas las fracciones analizadas. Las fracciones F24, F27 y F31, registraron eficacias del 100 % en los tres tiempos de evaluación, esto se muestra en la siguiente gráfica (Gráfica 2).



**Gráfica 2. Porcentaje de eficacia fasciolicida *in vitro* de fracciones de *V. patens* a concentración de 500 mg/L.** Eficacia fasciolicida evaluada a concentración de 500 mg/L, de las fracciones obtenidas, donde T (+) = Testigo positivo (Triclabendazol) y T (-) = (medio de cultivo RPMI-1640 + Suero bovino).

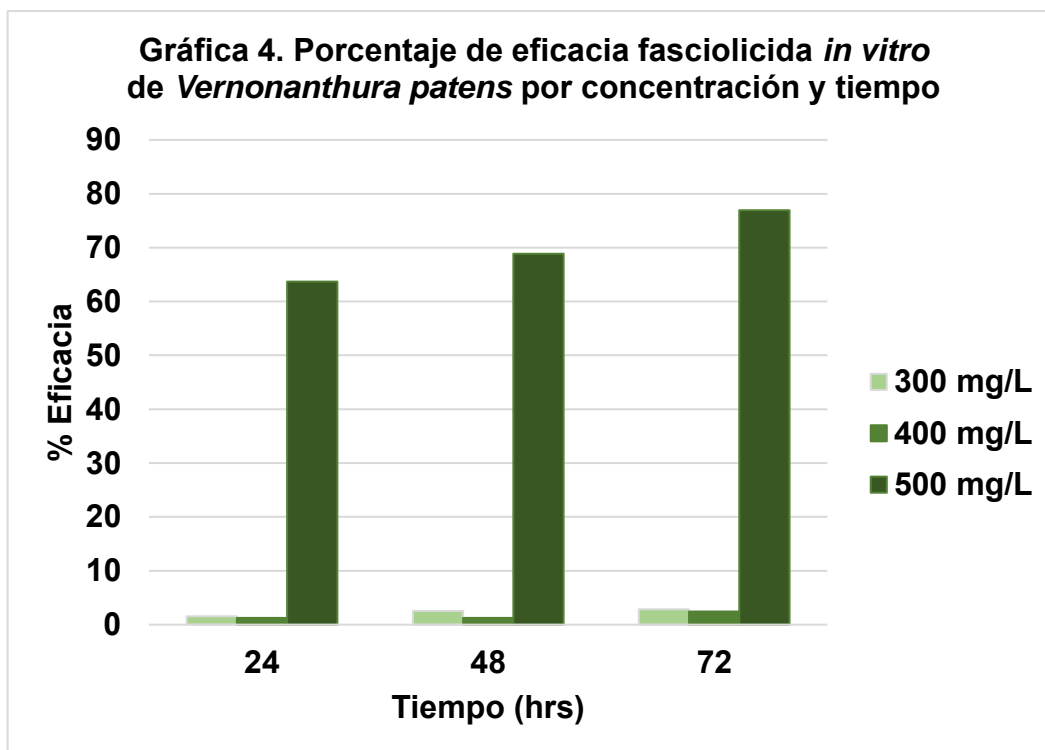
Al analizar los datos de eficacia se determinaron diferencias significativas entre la concentración de 100, 200, 300 y 400 mg/L las cuales no presentaron eficacia fasciolicida, respecto a la concentración de 500 mg/L (P > 0.05) la cual presentó el 100 % de eficacia fasciolicida.

En la gráfica 3, se observa como la concentración de 500 mg/L fue la que presentó mayores eficacias, con valores que van del 98 al 100%, siendo las fracciones F24, F27 y F31, las que mostraron eficacias del 100%.



**Gráfica 3. Porcentaje de eficacia fasciolicida a diferente concentración.** Eficacia fasciolicida de las fracciones obtenidas, evaluada a diferentes concentraciones: 300, 400 y 500 mg/L, donde T (+) = Testigo positivo (Triclabendazol) y T (-) = (medio de cultivo RPMI-1640 + Suero bovino)

En lo referente al tiempo de acción y la concentración, se determinaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), las concentraciones de 100 y 200 mg/L mostraron eficacias nulas en los tres tiempos evaluados. La de 300 y 400 mg/L registraron eficacias inferiores al 10%. Mientras que la de 500 mg/L fue la que presentó mayor eficacia en los tres tiempos evaluados, alcanzando el 77 % a las 72 hrs (Gráfica 4).



**Gráfica 4. Porcentaje de eficacia fasciolicida *in vitro* de fracciones de *V. patens* por concentración y tiempo.** Eficacia fasciolicida evaluada a concentraciones de 300, 400 y 500 mg/L, de las fracciones obtenidas, a diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 hrs), donde T (+) = Testigo positivo (Triclabendazol) y T (-) = Testigo negativo (medio de cultivo RPMI-1640 + Suero bovino)

### 6.3 Análisis fitoquímico de las fracciones y/o compuestos de *Vernonanthura patens*

En cuanto a la determinación de metabolitos secundarios presentes en las fracciones evaluadas, se observó la presencia de compuestos fenólicos y triterpenos en las fracciones F27 y F31, mientras que la fracción F24 presentó solamente triterpenos (cuadro 4).

**Cuadro 4. Perfil fitoquímico de las tres fracciones con mayor eficacia fasciolicida.**

<b>METABOLITO SECUNDARIO</b>	<b>PRUEBA</b>	<b>FRACCIONES</b>		
		<b>F24</b>	<b>F27</b>	<b>F31</b>
Alcaloides	Dragendorff			
Alcaloides	Mayer	-	-	-
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	-	+	+
Glucósidos	Reactivo de Molisch	-	-	-
Triterpenos	Liebermann- Burchard	+	+	+

## 7. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales han sido y siguen siendo una alternativa para el tratamiento de diferentes afecciones desde hace mucho tiempo, por lo que su uso es considerado como una tradición milenaria que ha permanecido a través de los años. La importancia de las plantas medicinales radica en la presencia de productos naturales que contienen y la utilidad que se les ha dado como alternativas terapéuticas para tratar diferentes afecciones, síntomas leves, como tratamiento preventivo, hasta dolencias crónicas y de mayor importancia, como la diabetes, la hipertensión, la hipercolesterolemia, así como el cáncer (López-Luengo, 2008). A pesar de la investigación que se ha realizado en el campo de los productos naturales, aun falta mucho por explorar, ya que estos representan un papel destacado al contar con una una fuente ilimitada de moléculas bioactivas que sirven de base para la generación y el desarrollo de nuevos fármacos (De las Heras, 2022). Francisco en el 2015, llevo a cabo un estudio en donde se probaron un total de 3 plantas, entre ellas *V. patens*, la cual mostró una eficacia promisoriosa, Además, se llevaron a cabo pruebas fitoquímicas cualitativas, evidenciando a grandes rasgos la presencia de alcaloides, taninos y compuestos fenólicos entre las familias de metabolitos, contenidas en el extracto de la planta, sin embargo, no se llevó a cabo el fraccionamiento del extracto ni se identificó con certeza que familias de metabolitos eran las responsables del daño al parásito.

En el presente estudio se demostró que algunas fracciones de *V. patens* presentan una eficacia fasciolicida *in vitro* del 100 % en contra de formas juveniles de *Fasciola hepatica* a partir de las 48 horas post-exposición, reafirmando el potencial antihelmíntico de la planta. Esto nos indica que la planta produce metabolitos secundarios que provocan este efecto.

Los compuestos detectados en el análisis fitoquímico de las fracciones F24, F27 y F31 de *V. patens* obtenidas a partir del extracto metanólico con mayor eficacia fasciolicida, indican que las posibles familias de metabolitos secundarios implicadas en el efecto fasciolicida son los compuestos fenólicos, y los triterpenos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Manzano et al., en el 2015



donde reporta la presencia de compuestos fenólicos en las hojas de *V. patens*. Por último, en el 2021 reporta la presencia de un triterpenoide en las hojas de la planta

Respecto a los compuestos fenólicos, son compuestos químicos entre los cuales se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles; son un grupo ampliamente distribuido en la naturaleza, se trata de una de las clases más abundantes e importantes de metabolitos secundarios presentes en las plantas, los cuales son producidos principalmente mediante dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico, y la ruta del acetato-malonato (Martín, 2018). La estructura química consiste en un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo incluyendo a sus derivados funcionales, se trata de un grupo diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos como los taninos condensados y la lignina (Martín, 2018).

Las fracciones con mayor eficacia fasciolicida de *V. patens* mostraron la presencia de compuestos fenólicos, al igual que el estudio realizado por Parola-Contreras y colaboradores en 2021, quienes reportaron la presencia de estos compuestos en extractos metanólicos de *Heliopsis longipes*, planta medicinal de la misma familia Asteracea (Parola-Contreras et al., 2021).

Respecto a la actividad biológica en contra de *F. hepatica*, Olazábal y colaboradores, en 2001 reportaron actividad fasciolicida del 100%, del extracto acuoso de *Parthenium hysterophorus* a las 24 horas de exposición, la cual pertenece a la misma familia de *V. patens*.

Un estudio realizado por Ezeta et al., en el 2020 demostró que el extracto crudo de *Artemisia ludoviciana* Nutt. Mexicana tiene una eficacia fasciolicida *in vitro* del 100% en las concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L. De igual manera algunas fracciones tienen la misma eficacia a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L sobre fasciolas recién desenquistadas. También en este estudio se demostró el efecto que tiene el extracto sobre el tegumento de fasciolas juveniles. Estos resultados son de suma importancia debido a que pertenecen a la misma familia, además concuerdan con los resultados obtenidos en las evaluaciones *in vitro* con las fracciones de *V. patens* en donde se demostró eficacias fasciolicidas a

concentraciones de 500mg/L. Francisco en el 2023 en su tesis de maestría, demostró que el extracto metanólico de *V.patens* es inocuo desde concentraciones de 125 mg/kg hasta 5000 mg/kg, además observó por microscopia electrónica de barrido que el extracto tiene un efecto sobre el tegumento del parásito. Las lesiones observadas demuestran que el extracto crudo de *V. patens* produce un daño directo sobre las dos ventosas (oral y ventral). Esto es de suma importancia debido a que la ventosa oral y la ventral son determinantes en la supervivencia del parásito, ya que brindan el soporte adecuado y los movimientos migratorios necesarios dentro de los conductos biliares. El tegumento desempeña un papel muy importante en el parásito, debido a que confiere protección y absorción de nutrientes (Dalton et al., 2004; McCusker et al., 2020). Górnjak et al., en el 2019, menciona que algunos flavonoides tienden a inhibir la formación de ATP y ADP, provocando la muerte del parásito. Por otra parte, algunos triterpenos interactúan con las funciones mitocondriales y con las glicoproteínas presentes en el tegumento de *F. hepatica* ocasionando el desprendimiento del tegumento (Halton, 2004; Ahuir et al., en el 2021; Becerro et al., 2022). Debido a que las familias de metabolitos presentes en las fracciones F24, F27 y F31 son compuestos fenólicos y triterpenos.

## **8. CONCLUSIONES**

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que las fracciones F24, F27 y F31 con una menor polaridad presentaron una eficacia fasciolicida del 100% a partir de las 24 horas post- tratamiento sólo en la concentración de 500 mg/L.

Las familias de metabolitos secundarios presentes en las fracciones con mayor eficacia fasciolicida fueron los compuestos fenólicos y triterpenos.

Se sugiere terminar de evaluar las demás fracciones para determinar el verdadero potencial de la planta, además de la identificación del principio activo.

## LITERATURA CITADA

1. Ahuir, B. A. E., Cibot, F., Llobat, L., Garijo, M. M. 2021. Anthelmintic resistance: is a solution possible? *Experimental Parasitology*. 230:108-169.
2. Alcibar, M. P., Anaya D. G. R. M., Flores C. R. 1985. Evaluación de la infectividad de miracidios y metacercarias de *Fasciola hepatica* en bovinos y ovinos con relación a su origen. *Técnica. Pecuaria de México*. 48:39-45.
3. Álvarez, M. J.M., Ibarra-Velarde F., Alonso-Díaz M.A., Vera-Motenegro Y., Ávila-Acevedo J.G., García-Bores A.M. 2015. *In vitro* antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. *BMC Veterinary Research*, 11(1):1-6.
4. Beesley, N. J., Caminade, C, Charlier J, Flynn RJ, Hodgkinson, J. E, Martinez, M. A. 2018. Fasciola and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis*. 65(1): 199-216.
5. Becerro, R. D., Serrat, J., López, G. M., Sotillo, J., Simón, F., González, M. J., Siles, L. M. 2022. Proteomics coupled with *in vitro* model to study the early crosstalk occurring between newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* and host intestinal cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*.
6. Béjar E., Bussmann R., Roa C. y Sharon D. 2001. Hierbas del Sur del Ecuador. Una guía de plantas medicinales de Vilcabamba. Latino Herbal Press. Canada. P.329.
7. Bhalla, R, Narasimhan K, Swarup S. 2005. Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Reports*. 24:526-571.
8. Blair S. 2005. Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica Colombiana. *Universidad de Antioquia*.1(347):84-7.
9. Bowman D. D. 2011. *Parasitología para veterinarios*. 9<sup>na</sup>. Ed. Elsevier. España. Pp.115-124.
10. Carnevale, S., Malandrini, J. B., Pantano, M. L., Sawicki, M., Kamenetzky, L. Soria, C. C., Velásquez, J. N. 2021. Use of the PCR in a combined methodological approach for the study of human fascioliasis in an endemic area. *Acta parasitológica*. 66:455-460.

11. Carrada, B. T. 2003. Fascioliasis. Diagnóstico, epidemiología y tratamientos. Revista Gastroenterología México. Vol. 68: 2. pp 135-142
12. Carrada, B.T. 2007. *Fasciola hepatica*: ciclo biológico y potencial biótico. Rev Mex Patol Clin, 54(1), 21-27.
13. Casulli, A., 2021. New global targets for NTDS in the WHO roadmap 2021–2030. Plos neglected tropical diseases.15, 1–10.
14. Ceballos, L., Canton, C., Pruzzo, C., Sanabria, R., Moreno, L., Sanchis, J., Suarez, G., Ortiz, P., Fairweather, I., Lanusse, C., Álvarez, L., Martínez-Valladares, M. 2019. The egg hatch test: a useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology. 271: 7-13.
15. Ceballos, L., Canto, C., Pruzzo, C., Sanabria, R., Moreno, L., Sanchis, J., Suarez, G., Ortiz, P., Fairweather, I., Lanusse, C., Álvarez, L., Martínez, V. M. 2009. The egg hatch test: a useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology. 271:7-12.
16. Crusco, A., Bordoni, C., Chakroborty, A., Whatley, K.C.L., Whiteland, H., Westwell, A.D., Hoffmann, K.F., 2018. Design, synthesis and anthelmintic activity of 7-keto-sem- pervirol analogues. European Journal of Medicinal Chemistry.
17. Cwiklinski, K., de la Torre-Escudero, E., Trelis, M., Bernal, D., Dufresne, P. J., Brennan, P. G., O'Neill, S., Tort, J., Paterson, S., Marcilla, A., Dalton, P. J., Robinson, M.W. 2015. The Extracellular Vesicles of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*: Biogenesis Pathways and Cargo Moles Involved in Parasite Pathogenesis. Molecular Cellular Proteomics. 14:3258-3273.
18. Cwiklinski, K., O'Neill, S. M., Donnelly, S., & Dalton, J. P. 2016. A prospective view of animal and human Fasciolosis. Parasite Immunology, 38(9), 558–568.
19. Dalton, J. P., Skelly, P., Halton, D. W. 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. Canadian Journal of Zoology. 82:211–232.
20. Dalton, JP. 2021. Fasciolosis. Second edition. Ed. CABI.
21. Davies, C. N. E., Slapeta, J. 2021. *Fasciola* species introgression: Just a fluke or something more? Trends in Parasitology. 1:25-34.

22. De las Heras Polo, B. 2022. Productos naturales: De la medicina tradicional a cabezas de serie para el desarrollo de nuevos fármacos del siglo XXI. *An. R. Acad. Nac. Farm. (Internet)*. 87(1): 99-104.
23. Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 208 p.
24. Doxon, O. 2016. Abattoir post-mortem conditions guide. Agriculture and Horticulture Development Board. 1:1-32.
25. Edwards, J., Brown, M., Peak, E., Bartholomew, B., Nash, R.J., Hoffmann, K.F., 2015. The diterpenoid 7-keto-sempervirol, derived from *Lycium chinense*, displays anthelmintic activity against both *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 9, e0003604
26. Espinoza, J. R., Terashima, A., Herrera, V. P. Marcos, L. A. 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: Impacto en la economía de las zonas endémicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 27(4):604-12
27. Evans, S. R., Hoffman, A. 2012. Plantas de los dioses. Orígenes y uso de los alucinógenos. EDS: Evans, S. R., Hoffman, A. 2ª. Edición. Ed. Fondo de cultura económica de España. México, D.F.
28. Ezeta, M. A., Vera, M. Y., Ávila, A. J. G., García, B. A. M., Estrella, P. E. A., Francisco, M. G., Ibarra, V. F. 2020. Efficacy of purified fractions of *Artemisia ludoviciana* Nutt. Mexicana and ultrastructural damage to newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* *in vitro*. *Veterinary Parasitology*. 285:109184.
29. Fairweather I., Brennan G. P., Hanna R. E. B., Robinson M. W., Skuce P. J. 2020. Drug resistance in liver flukes. *IJP: Drugs and drug resistance*. 12:39-59.
30. Faustino, C., Neto, Í., Fonte, P., Macedo, A., 2019. Cytotoxicity and chemotherapeutic potential of natural rosin abietane diterpenoids and their synthetic derivatives. *Current Pharmaceutical Design*. 24, 4362–4375.
31. Fernández V., Estein S., Ortiz P., Luchessi P., Solano V., Solana H. A. 2015. A single aminoacid substitution in isozyme GSTmu in Triclabendazole resistant *Fasciola hepatica* (sligo strain) can substantially influence the

- manifestation of anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology* 159:274-279.
32. Ferreira, J. F., Peadar, P., & Keiser, J. (2011). In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*: trematocidal plant alcoholic extracts. *Parasitology Research*, 109(6), 1585–1592.
33. Flores A. K. 2017. Estudio del ciclo biológico de caracoles del género *Lymnaea* infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica* para la obtención de metacercarias (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. Cuautitlán Izcalli. Estado de México.
34. Foulger, J. H. (1931). The use of the Molisch (a-naphthol) reactions in the study of sugars in biological fluids. *Journal of Biological Chemistry*, 92(2):345-353.
35. Francisco, M. G. 2015. Actividad fasciolicida *in vitro* de extractos de plantas provenientes de Amixtlán, Puebla. Tesis de licenciatura. Universidad Interserrana del Estado de Puebla- Ahuacatlán. Puebla. México.
36. Francisco, M. G. 2023. Determinación de los índices de toxicidad del extracto metanólico de *Vernonanthura patens* y evaluación del efecto sobre *Fasciola hepatica* mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM. Ciudad de México, México.
37. Fuenmayor G., Jonte L. Rosales L. N., Morales E. (2009). Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* spp MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 29:21-25.
38. García-Bustos, J.F., Sleebs, B.E., Gasser, R.B., 2019. An appraisal of natural products active against parasitic nematodes of animals. *Parasites & Vectors* 12, 306.
39. Górnjak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J. 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*.18:241-272.

40. Guillard R. R., Ryther L. (1973). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith W. L., Chanley M. H. (Eds.) Culture of marine Invertebrates Animals. Plenum Press. E. U. A. P. 26-60.
41. Halton, D.W., 2004. Microscopy and the helminth parasite. *Micron*. 35, 361–390.
42. Hanna R. E. B., Mc Mahon C., Ellison S., Edgar H. W., Kajugu P. E., Gordon A., Irwin D., Barley J. P., Malone F. E., Brennan G. P., Fairweather I. 2015. *Fasciola hepatica*: a comparative survey of adult fluke resistance to triclabendazole, nitroxynil and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. *Veterinary Parasitology*. 207, 34-43.
43. Hassell, C., Chapman, V., 2012. Case report: suspect lack of triclabendazole efficacy in liver fluke in sheep in the Taranaki. Proceedings of the Sheep and Beef Cattle Veterinarians of the New Zealand Veterinary Association. 4.14.1-144.14.2.
44. Hossain E., Chandra G., Nandy A.P., Mandal S.C., Gupta J.K. 2012. Anthelmintic effect of a methanol extract of leaves of *Dregea volubilis* on *Paramphistomum explanatum*. *Parasitology Research*; 110:809-814.
45. Hossain, E., Chandra, G., Nandy, A. P., Gupta, J. K., & Mandal, S. C. (2013). Possible fasciocidal activity of methanol extract of *Dregea volubilis* leaves. *Experimental parasitology*, 135(2), 183–187.
46. Ibarra M. S., Ibarra V. F., Ávila A. J. G. 2012. *In Vitro* Evaluation of Fasciolicide Activity with Hexane, Methanol and Ethyl Acetate with Extracts Processed and Obtained from Some Mexican Plants Used in Traditional Medicine Based on Ethno Botanical Studies. *American Journal of Plant Science*. 3:506-511.
47. Ibarra, O. F. y Jenkins, D. C. 1984. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. *Zeitschrift für Parasitenkunde*; 70:655-661.
48. Ibarra, V. F., Vera, M.Y., Flores, R.M., Cantó, A, G.J., Hernández, C.A., Alcalá, C. Y., Castillo, R. 2018. Assessment of the effective dose of an experimental intramuscular formulation against immature and adult *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*. 260: 38-44.



49. Kamaludeen, J., Graham-Brown, J., Stephens, N., Miller, J., Howell, A., Beesley, N., Hodgkinson, J., Learmont, J., Williams, D. 2019. Lack of efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* is present on the sheep farms in three regions of England, and Wales. *Vet. Res.* 184, 502-507.
50. Kaplan R. M., Vidyashankar A. N. 2012. An Inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology.* 186: 70-78.
51. Kelley J. M., Rathinasamy V., Elliot T. P., Rawlin G., Beddoe T., Stevenson M. A., Spithill T. W. 2020. Determination of the prevalence and intensity of *Fasciola hepatica* infection in dairy cattle from six irrigation regions of Victoria, South-Eastern Australia, further identifying significant triclabendazole resistance on the three properties. *Veterinary Parasitology.* 277: 109019.
52. Kvis LP, Aguirre Z, Sánchez O. 2006. Bosques montanos bajos occidentales en Ecuador y sus plantas útiles. *Botánica Económica de los Andes Centrales* La Paz: Universidad Mayor de San Andrés. p. 205-23.
53. Liu, M., Panda, S.K., Luyten, W., 2020. Plant-based natural products for the discovery and development of novel anthelmintics against nematodes. *Biomolecules* 10.
54. López, L. M.T. 2008. Plantas Medicinales. *Offarm.* 27:04; 82-87.
55. Manzano S. P., Miranda M, Quijano M. F., Monzote L. 2015. Advances in studies of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Growing in Ecuador. *Phytochemicals – Isolation, Characterisation and Role in Human Heal.* 3:81–97.
56. Manzano Santana P. I., Silva, M., Sterner, O. y Peralta, E. 2012. Phytochemical Studies of Fractions and Compounds Present in *Vernonanthura Patens* with Antifungal Bioactivity and Potential as Antineoplastic. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health.* 3: 504-518.
57. Manzano Santana, Patricia, Orellana León, Tulio, Miranda Martínez, Migdalia, Abreu Payrol, Juan, Ruíz, Omar, & Peralta García, Esther L. (2013). Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens*

- (Kunth) H. Rob. (Asteraceae) endémica de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 131-139.
58. Martín Gordo, D. A. 2018. Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104.
59. Mas-Coma, S., Valero, M. A., Bargues, D. M. 2022. Fascioliasis in Humans and Animals. *Encyclopedia of Infection and Immunity*. 2:513-531.
60. McCuster, P., Toet, H., Rathinasamy, V., Young, N., Beddoe, T., Anderson, A., Dempster, R., McVeigh, P., McCammick, E., Wells, D., Mousley, A., Maule, A. G., Spithill, W. T. 2020, Molecular characterisation and vaccine efficacy of two novel developmentally regulated surface tegument proteins of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*. 286:109244.
61. Moll, L.; Gaasenbeek C.P.H.; Vellema P. y Borgsteede F.H. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. 2000. *Veterinary Parasitology*, 91: 153-158.
62. Novobilsky, A., Solis, N. A., Skarin, M., Hoglund, J. 2016. Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardized test. *International Journal for Parasitology; Drugs and Drugs Resistance*. 6: 141-147.
63. Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo F., y Cabrera, R. 2011. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary Parasitology*. 178 (3-4), 364-366.
64. Olazábal, E., H Serrano, H., Jorge, E. Saucedo, Y. 2001. Reporte de Actividad Fasciolicida *in vitro* de Algunos Extractos de Plantas Medicinales. *SANINET*. 2-8
65. Ollivier, C. L., Eldin, C., Lambourg, E., Brouqui, P., Lagier, J. C. 2020. Case report: First diagnosis of liver abscesses due to *Fasciola hepatica* acute infection imported from Vietnam. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102:106-109.
66. Ortiz P., Scarcella S., Cerna C., Rosales C., Cabrera M., Guzmán M., Lamenza P., Solana H. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against

- Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): a clinical trial and an *in vivo* efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*. 195:118-121.
67. Parola, I., Guevara. G., Ramón G., Feregrino, P., Ana A., Reynoso, C, R., Pérez, R. I. F., Ocampo, V., Rosalía, V., R. M., Luna, V. A., Francisco, T. P., Erik, G. 2021. Phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from leaves and flowers of chilcuague (*Heliopsis longipes*, Asteraceae). *Botanical Sciences*, 99(1), 149-160.
68. Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39, 603–613.
69. Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A. & Verde-Star, M. J. 2016. Investigación en plantas de importancia médica (Spanish Edition). OmniaScience. Nuevo León, México. 436 p.
70. Rojas, J. 2012. Resistencia de *Fasciola hepatica* al Triclabendazol en Bovinos de la Campiña de Cajamarca-Perú. *Revista Veterinaria Argentina*.
71. Romero, J., Villaguala, C., Quiroz, F., Laudaeta-Aqueveque, C., Alfaro, G., Perez, R. 2019. Flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* of triclabendazole and nitroxynil in cattle of central valley of chile. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 28:164-167.
72. Sánchez-Peralta C. K. 2015. Evaluación de la eficacia fasciolicida *in vitro* de 14 extractos de plantas mexicanas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. pp. 28-30. Distrito Federal. México.
73. Sepúlveda et al. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 21., Núm. 3. 2003.
74. Shukla S., Archana M., Bajpai VK. 2013. Phytochemical screening and anthelmintic and antifungal activities of leaf extracts of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Biologically active Products from Natura*. 3(1): 56-63.
75. Siles-Lucas, M., Becerro-Recio, D., Serrat, J., González, M. 2021. Fascioliasis and fasciolopsiasis: Current knowledge and future trends. *Research in Veterinary Science*. 134:27-35.
76. Systat Software, Inc. 2008. Systat (Computer program) versión 12(32-bits) EUA. <http://www.systat.com>

77. Váradyová, Z., Pisarčíková, J., Babják, M., Hodges, A., Mravčáková, D., Kišidayová, S., Königová, A., Vadlejch, J., & Várady, M. (2018). Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. *Experimental parasitology*, 195, 71–77.
78. Vega AJ, Dematteis M. 2009. Análisis de la morfología del polen en especies del género *Vernonanthura* (Vernonieae, Asteraceae). Proyecto de Investigación y Desarrollo, Secretaría General de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional del Nordeste. PI 44/2007. UNNE-CONICET. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.
79. Venturina, V.M., Alejandro, M.A.F., Baltazar, C.P., Abes, N.S., Mingala, C.N., 2015. Evidence of *Fasciola* spp. resistance to albendazole, triclabendazole and bromofenofos in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Annals of Parasitology*. 61, 283–289.
80. Vera M.Y. 2011. Fasciolosis. En: *Parasitología Veterinaria*, Vol. II. Helminthos. Eds.: Ibarra V. F.; Figueroa C.J.A. y Quiroz R.H. 1ra. Edición. Ed. Color. México, D.F.
81. Vera M.Y. 2005. Evaluación biológica y toxicológica de un fasciolicida experimental en bovinos. Tesis de doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Distrito Federal. México.
82. Vera, M. Y., Ibarra, V. F., Ramírez, A. G., Murguía, X. J. 2008. *In vitro* Fasciolicide Activity of Some Plant Extracts against New Excysted Flukes. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences*. 1149: 180-182.
83. Wagner H., Blatt S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Wagner H., Blatt S. 2da. Edición. Ed. Springer. Berlin, Alemania. 329-332
84. Whiteland, H.L., Chakroborty, A., Forde-Thomas, J.E., Crusco, A., Cookson, A., Hollinshead, J., Fenn, C.A., Bartholomew, B., Holdsworth, P.A., Fisher, M., Nash, R. J., Hoffmann, K.F., 2018. An *Abies procera*-derived tetracyclic triterpene containing a steroid-like nucleus core and a lactone side chain attenuates *in vitro* survival of both *Fasciola hepatica* and *Schistosoma*

*mansoni*. International Journal for Parasitology: Drugs and Drugs Resistance. 8,465-474.

85. Wilson, C. C., Jenkins, D. J., Barnes, T. S., Brookes, V. J. 2019. Evaluation of the diagnostic sensitivity and specificity of meat inspection for hepatic hydatid disease in beef cattle in an Australian abattoir. Preventive Veterinary Medicine. 167:9-15.
86. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai J, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM, Vercruysse J. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A. V. P) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine and caprine). Veterinary Parasitology. 58:181-213.
87. Zahir A. A., Rahuman A. A., Bagavan A., Geetha K., Kamaraj C., Elango G. 2012. Evaluation of medicinal plant extracts and isolated compound epicatechin from *Ricinus communis* against *Paramphistomum cervi*. Parasitology Research. 111:1629-1635.

## ANEXOS

### Anexo I Pruebas para análisis fitoquímico de fracciones de *V. patens*

**Reactivo de Dragendorff:** Agregar 0.1 ml de ácido hidrociorhídrico diluido y 0.1 ml del reactivo de Dragendorff. La formación de un precipitado marrón en el fondo del tubo indica la presencia de alcaloides. Para preparar el reactivo se mezclan 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30%, con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua destilado. Se deja reposar durante 24 horas y pasado ese tiempo se decanta hasta 100 ml.

**Reactivo de Mayer:** se prepara disolviendo 1.3 g de bicloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio y se afora a 100 ml. Los alcaloides se detectan al formarse un precipitado color blanco a crema cita.

**Glucósidos (Molisch):** Se agregan un par de gotas de una solución al 15% de alfa-naftol y 2 ml de ácido sulfúrico. La presencia de un aro violeta rojizo entre las dos fases indica la presencia de glucósidos.

**Liebermann-Burchard:** Se agrega 1 ml de anhídrido acético y 2ml de ácido sulfúrico. La presencia de un anillo violeta-rojizo entre las dos fases que se forman indica la presencia de triterpenos. (Shukla et al., 2013)