

Fasciola hepatica

Imagen tomada de: Canva educativo

Uso de plantas medicinales como una alternativa para el tratamiento de la fasciolasis

Use of medicinal plants as an alternative for the treatment of fasciolasis

Joseline Licona-Hernández, José Ignacio Olave-Leyva, Deyanira Ojeda-Ramírez*

RESUMEN

La fasciolasis es una enfermedad causada por gusanos planos, parásitos de la clase trematoda y género *Fasciola*, que afecta a animales y humanos. A pesar de su considerable impacto en la salud pública y el sector pecuario, así como a su frecuente reaparición, se encuentra entre las enfermedades tropicales desatendidas. Aunado a ello, el uso indiscriminado de fasciolicidas sintéticos en el ganado ha propiciado resistencia de este trematodo a los antihelmínticos disponibles en el mercado, por lo que es necesario contar con nuevas alternativas de tratamiento. El objetivo de este trabajo fue analizar los avances recientes a nivel mundial sobre las plantas medicinales con efecto sobre *Fasciola*, reportadas en las bases de datos PubMed, Scopus, SciFinder y Google Scholar, entre enero de 2019 y julio de 2023. Se encontraron reportes sobre el potencial fasciolicida de 32 plantas, 7 de ellas con actividad sobre huevos, 3 sobre los estadios larvales, 1 sobre juveniles y el resto sobre el estadio adulto del parásito. Dentro de los metabolitos secundarios responsables de la actividad farmacológica, se han identificado monoterpenos, alcaloides, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), artemisinina y compuestos fenólicos; destacando la curcumina y la timoquinona. Los resultados encontrados ponen de manifiesto el potencial uso de las plantas como fuente de nuevos principios activos fasciolicidas.

ABSTRACT

Fasciolasis is a disease produced by parasitic flatworms of the class trematoda and genus *Fasciola* that affects animals and humans. Despite its considerable impact on public health and the livestock, as well as its frequent re-appearance, it is among the neglected tropical diseases. Furthermore, the indiscriminate use of synthetic fasciolicides in livestock has led to resistance of this trematode to the anthelmintics available on the market. For that, it is necessary to have new treatment alternatives. The aim of this work was to analyze recent advances worldwide on medicinal plants with an effect on *Fasciola*, reported in PubMed, Scopus, SciFinder and Google Scholar databases, between January 2019 and July 2023. We found information of 32 fasciolicide plants: seven of them with activity on eggs, three on larval stages, one on juveniles, and the rest on the adult stage of the parasite. Among the secondary metabolites responsible for the pharmacological activity, monoterpenes, alkaloids, polyunsaturated fatty acids (PUFA's), artemisinin and phenolic compounds have been identified, highlighting curcumin and thymoquine. The findings reveal the potential use of plants as a source of new fasciolicidal active ingredients.

KEYWORDS: *Fasciola*, medicinal plants, extracts, secondary metabolites.

PALABRAS CLAVE: *Fasciola*, plantas medicinales, extractos, metabolitos secundarios.

*Correspondencia: dojeda@uaeh.edu.mx/Fecha de recepción: 8 de noviembre de 2023/Fecha de aceptación: 6 de marzo de 2024/Fecha de publicación: 30 de marzo de 2024.

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Área académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, rancho Universitario avenida Universidad km 1, Ex-Hacienda de Aquetzalpa, Tulancingo, Hidalgo, México, C. P. 43600.

INTRODUCCIÓN

La fascioliasis es una zoonosis de alta prevalencia causada por gusanos planos, parásitos de la clase trematoda y género *Fasciola* (Lalor y col., 2021). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que al menos 2.4 millones de personas están infectadas en más de 70 países en todo el mundo y otros 180 millones tiene riesgo de infección (Lalor y col., 2021; Opio y col., 2021).

En el ámbito económico, la incidencia de *fascioliasis* ocasiona pérdidas en el rendimiento de carne (ovinos, caprinos y bovinos) (Encinas-García y col., 2020). La presencia de parasitosis en estos organismos, provocados por dos especies del género *Fasciola*, identificados como los agentes causales de la enfermedad *F. hepatica* y *F. gigantica* (Machado-Pereira-da-Silva y col., 2020), produce mermas en el rendimiento de la carne estimadas entre el 8 % y 28 %, pérdidas por decomiso de los hígados en los rastros y una disminución en la producción láctea (20 % a 80 %) (González-Garduño y col., 2019).

La estimación global de las pérdidas anuales sufridas por la industria ganadera en México en el año 2013, debido a hígados confiscados como resultado de la fascioliasis causada por *F. hepatica* fue de \$ 55 076 671 pesos; y sumándole el efecto que provocaron las pérdidas a los productores ganaderos de carne y leche en México, la pérdida total ascendió a \$ 1 701 786 489 pesos (Rodríguez-Vivas y col., 2017).

F. hepatica predomina en América y regiones de clima templado, y *F. gigantica* en regiones tropicales de Asia y África (Machado-Pereira-da-Silva y col., 2020; Opio y col., 2021). A pesar de su considerable impacto en la salud pública y el sector pecuario, la fascioliasis se encuentra entre las enfermedades tropicales desatendidas (Lalor y col., 2021).

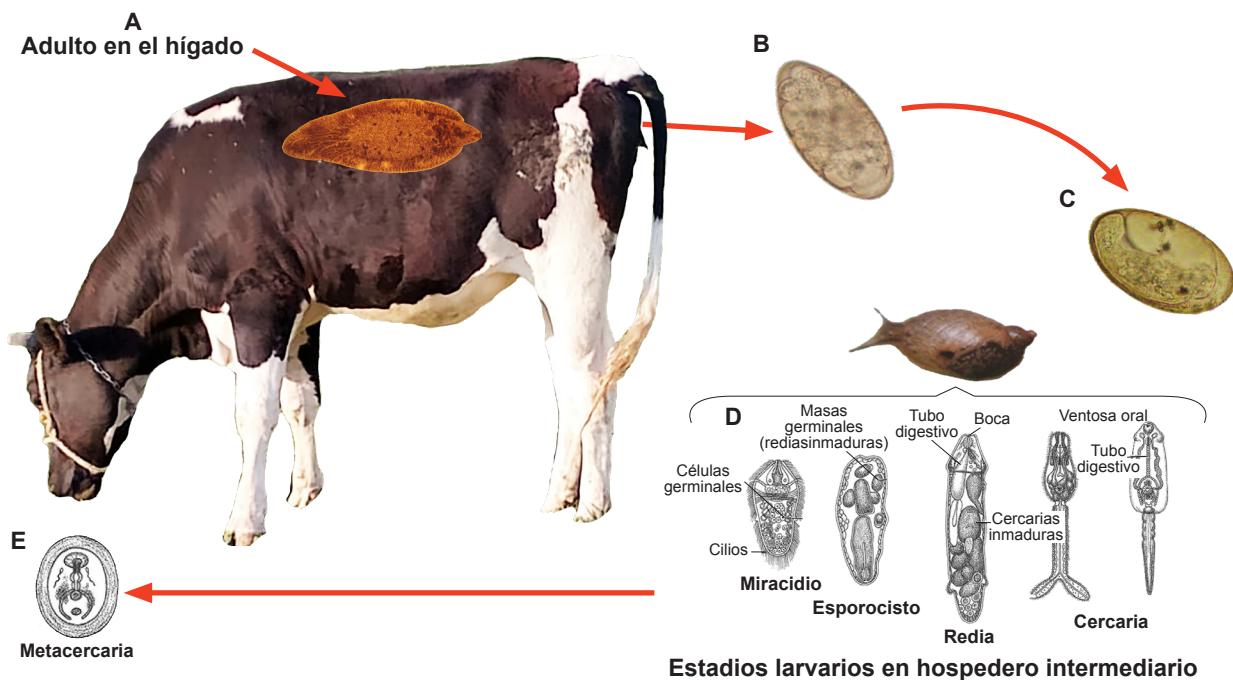
La infección de los seres humanos se produce a través del consumo de pescado de agua dulce, crustáceos y plantas acuáticas, ingeri-

dos crudos o insuficientemente cocidos (Vale y col., 2020); mientras que la principal fuente de transmisión de estos parásitos en los animales es el pasto contaminado por las heces de animales infectados; además, dentro del ciclo biológico intervienen los caracoles de agua dulce del género *Lymnaea* spp como hospedadores intermediarios, los cuales liberan la forma infectante denominada metacercaria (Figura 1) (Pinilla y col., 2020; Lalor y col., 2021).

En los animales, este parásito causa lesiones principalmente en hígado y la signología clínica es gastrointestinal, secundaria a la afectación hepática por la presencia de los estadios juveniles y adultos. En el ser humano los síntomas, en caso de que se produzcan, son múltiples y variados, como disminución en la absorción de alimentos, colangitis, colecistopatía crónica, dolor abdominal localizado en el epigastrio, meteorismo, fiebre, hepatomegalia, náuseas, anorexia e ictericia (López-Villacís y col., 2017).

La prevención de la fascioliasis se basa en el control del hospedador intermediario; mientras que el tratamiento farmacológico para los humanos y animales infectados se basa en el uso de fasciolicidas sintéticos (benzimidazoles, fenoles halogenados, salicilanidinas y sulfonamidas) (Castro-Hermida y col., 2021); sin embargo, el uso indiscriminado de éstos en los animales ha generado mecanismos de resistencia en ambas especies del género *Fasciola*, provocando que los tratamientos convencionales sean menos efectivos.

Existen reportes de resistencia de *F. hepatica* y *F. gigantica* a benzimidazoles (albendazol, triclabendazol) y salicilanilidas (closantel y rafoxanida) en ovinos y bovinos (Mas-Corma y col., 2019; Machado-Pereira-da-Silva y col., 2020; Abdel-Fatah y col., 2022). Aunque no se ha determinado aún con certeza el mecanismo de la resistencia de *F. hepatica* al triclabendazol, los hallazgos científicos apuntan a cambios en la estructura de la tubulina en los individuos resistentes, que hacen



Fuente: modificado a partir de Bowman (2014).

Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*: (A) parásito adulto en hígado, (B) huevos blastomera-dos salen junto con las heces, (C) se desarrolla el miracidio y eclosiona, (D) miracidio penetra al hos-pedero intermediario (caracol acuático) y se desarrollan los estadios larvarios, (E) eliminación de la cercaria por el hospedero intermediario y se enquista para formar la metacercaria (forma infes-tante).

Figure 1. Biological cycle of *Fasciola hepatica*: (A) adult parasite in liver, (B) blastomere eggs emerge along with feces, (C) miracidium develops and hatches, (D) miracidium penetrates the intermediate host (water snail) and the larval stages develop, (E) elimination of the cercaria by the intermediate host and it encysts to form the metacercaria (infesting form).

que el triclabendazol o el albendazol no logren actuar sobre ella como lo hace en los individuos susceptibles (Mas-Coma y col., 2019). Además, estos fármacos sintéticos tienen la desventaja de generar residuos en la carne y leche, así como en el medio ambiente (López-Villacís y col., 2017; Machado-Pereira-da-Silva y col., 2020).

Las plantas medicinales y sus metabolitos secundarios son candidatos prometedores para el tratamiento y control de parasitosis en el reino animal, y que además pueden tener ciertos beneficios sobre los tratamientos veterinarios contemporáneos, como la susceptibilidad reducida a la resistencia parasitaria, la asequibilidad, la falta de efectos adversos, la fácil accesibilidad y la disminución de

residuos en productos animales y el medio ambiente (Ahmed y col., 2023; Štrbac y col., 2023). Gamulo y col. (2022), realizaron una revisión y metaanálisis de plantas tropicales con efecto *in vitro* sobre *Fasciola*, en éste se incluyeron 10 especies vegetales del trópico (*Areca catechu*, *Berlinia confusa*, *Buchholzia coriaceae*, *Capparis decidua*, *Cleome rutidosperma*, *Dioscorea bulbifera*, *Dregea volubilis*, *Gynandropsis gynandra*, *Moringa oleifera* y *Zingiber officinale*), dejando de lado la información referente a la actividad fasciolícida *in vivo* de estas plantas, así como el potencial efecto fasciolícida de plantas del resto del mundo.

El objetivo del presente trabajo fue establecer los avances recientes a nivel mundial sobre

plantas medicinales y sus componentes con actividad sobre tremátodos del género *Fasciola*, evaluadas en modelos *in vitro* e *in vivo*, que no fueron incluidas en el estudio de Gamulo y col. (2022).

Datos colectados

Se consultaron las bases de datos PubMed, Scopus, SciFinder y Google Scholar. Se usaron las palabras clave “*Fasciola hepatica*”, “*Fasciola spp*”, “*Fasciola gigantica*”; “plantas”, “plants”, “extractos”, “extracts”, “componentes” y “compounds”. Se encontraron 30, 35, 47 y 254 artículos, respectivamente, publicados entre enero de 2019 y julio de 2023. De ellos, 54 fueron elegibles de screening (examinación) considerando el título. Después, se revisó el abstract. Se detectaron 15 artículos repetidos y 20 no cumplieron con los criterios de elegibilidad. Finalmente, se incluyeron 19 artículos en la revisión. Los criterios de inclusión de los artículos fueron: publicaciones en las que se evaluará la actividad de extractos de plantas sobre *F. hepatica* y/o *F. gigantica* en ensayos *in vitro* o *in vivo*, y artículos en los que se reportara el efecto de metabolitos secundarios obtenidos de plantas con actividad contra *F. hepatica* y/o *F. gigantica*. Los criterios de exclusión fueron: artículos donde se reportara el efecto fasciolícida *in vitro* de las especies reportadas en el metanálisis publicado por Gamulo y col. (2022); y artículos donde no se mencionara las concentraciones o dosis empleadas.

Identificación de especies

Se encontró que 32 plantas de 21 familias botánicas (Tabla 1) poseen efecto sobre alguna de las dos especies del género *Fasciola*, en uno o varios de sus estadios, lo cual pone de manifiesto la eficacia y potencial uso de las plantas medicinales para tratar dicha zoonosis. El efecto de estas plantas sobre *F. hepatica* y *F. gigantica*, se dividió en tres categorías: plantas con actividad fasciolícida *in vitro*, plantas medicinales evaluadas *in vivo* y metabolitos secundarios puros aislados de plantas con efecto fasciolícida. A su vez, dentro de la primera, se elaboró una clasificación

de acuerdo con el estadio del parásito en el cual se realizó el ensayo.

Plantas medicinales con actividad fasciolícida *in vitro*

Actividad sobre huevos

Cuminum cyminum y *Helianthus annuus* han sido reportadas sobre huevos de *F. hepatica*. En dos estudios realizados en Brasil (Machado-Pereira-da-Silva y col., 2020; Brauner-de-Mello y col., 2023), el aceite esencial obtenido de semillas de *C. cyminum* L. (AECc) fue capaz de disminuir el 100 % de la eclosión de los huevos a concentración de 0.031 mg/mL y superiores, tras 14 d de exposición. Mientras que el aceite esterificado obtenido de semillas de *H. annuus* L. (AEHa) mostró su máximo efecto sobre la inhibición (58 %) de la eclosión a una concentración de 2.3 mg/mL. Un análisis por cromatografía de gases reveló que el AECc se encontraba constituido principalmente por los monoterpenos [cuminaldehído (26.8 %), γ -terpineno (15.24 %), β -pineno (10.75 %) y *p*-cimeno (5.56 %)], así como 2-caren-10-al (22.17 %) y 1-fenil-1-butanol (19.47 %) (Figura 2) (Machado-Pereira-da-Silva y col., 2020; Brauner-de-Mello y col., 2023); mientras que el AEHa contenía a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's, por sus siglas en inglés: poly unsaturated fatty acids) linoleico (53.64 %), oleico (35.80 %), palmítico (5.79 %) y esteárico (4.11 %) (Figura 3), como componentes mayoritarios (Machado-Pereira-da-Silva y col., 2020).

El mecanismo de acción antiparasitario de los aceites esenciales y sus terpenos constituyentes está poco estudiado. Sin embargo, se ha estipulado que al ser moléculas lipofílicas y relativamente pequeñas pueden atravesar la membrana del parásito e interactuar con las proteínas, inactivar enzimas y afectar la actividad celular (Morais y col., 2020). Se ha observado que los aceites esenciales son capaces de inhibir la enzima acetilcolinesterasa en nemátodos parásitos, generando un incremento en los niveles del neurotransmisor de acetilcolina (Ach), provocando así una estimulación excesiva de los receptores nicotíni-

■ Tabla 1. Plantas medicinales con actividad sobre tremátodos Fasciola.

Table 1. Medicinal plants whit activity against Fasciola flukes.

Nombre científico	Familia	Ensayo	Referencia
<i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt. Mexicana	Asteraceae	<i>In vitro</i>	Ezeta-Miranda y col., 2020
<i>Asparagus racemosus</i>	Asparagaceae	<i>In vitro</i>	Vishwakarma y Kumar, 2021
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	<i>In vitro</i>	Ibekwe, 2019; Yamson y col., 2019
<i>Calatropis procera</i>	Aselepiadaceae	<i>In vitro</i>	Okeke y col., 2022
<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	<i>In vitro</i>	Abbas y col., 2020
<i>Cassia fistula</i>	Fabaceae	<i>In vitro, in vivo</i>	Abbas y col., 2020; Sen y col., 2022
<i>Citrullus colocynthis</i>	Cucurbitaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Combretum indicum</i>	Combretaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Cuminum cyminum</i>	Apiaceae	<i>In vitro, in vivo</i>	Abbas y col., 2020; Machado-Pereira-da-Silva y col., 2020; Brauner-de-Mello y col., 2023
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	<i>In vitro</i>	Ullah y col., 2017; Rehman y col., 2020
<i>Ellingeria eliator</i>	Zingiberaceae	<i>In vitro</i>	Wulandari y col., 2023
<i>Eugenia uniflora</i>	Myrtaceae	<i>In vitro</i>	Marques y col., 2020
<i>Foeniculum vulgare</i>	Apiaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Glycine soja</i>	Fabaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pedaliaceae	<i>In vitro</i>	Marques y col., 2020
<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	<i>In vitro</i>	Machado-Pereira-da-Silva y col., 2020
<i>Leonotis nepetifolia</i>	Lamiaceae	<i>In vitro</i>	Ssenkuba y col., 2022
<i>Lepidium sativum</i>	Brassicaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Leptadenia reticulata</i>	Apocynaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Linum usitatissimum</i>	Linaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Mentha spicata</i>	Lamiaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Moringa oleifera</i>	Moringaceae	<i>In vivo</i>	El-Shanawany y col., 2019
<i>Nigella sativa</i>	Ranunculaceae	<i>In vitro</i>	Ullah y col., 2017; Rehman y col., 2020
<i>Peganum harmala</i>	Nitrariaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Potentilla fulgens</i>	Rosaceae	<i>In vitro</i>	Kumar, 2021
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	<i>In vitro</i>	Marques y col., 2020
<i>Rosa sericea</i> Linn	Rosaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Sansevieria trifasciata</i>	Asparagaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Solanum surattense</i>	Solanaceae	<i>In vitro</i>	Kumar, 2020
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Fabaceae	<i>In vitro</i>	Marques y col., 2020
<i>Terminalia chebula</i>	Combretaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020
<i>Trachyspermum ammi</i>	Apiaceae	<i>In vivo</i>	Abbas y col., 2020

cos de Ach; asimismo un alto nivel de Ach causa contracción muscular y parálisis espástica de algunos nemátodos a través de la entrada de Na^+ , K^+ o Ca^{2+} y la despolarización de la membrana (Lam y col., 2020). Por otra par-

te, se ha evidenciado que los PUFA's pueden afectar la integridad de la membrana superficial de trematodos y los receptores de neurotransmisores ionotrópicos de helmintos (Bonde y col., 2021).

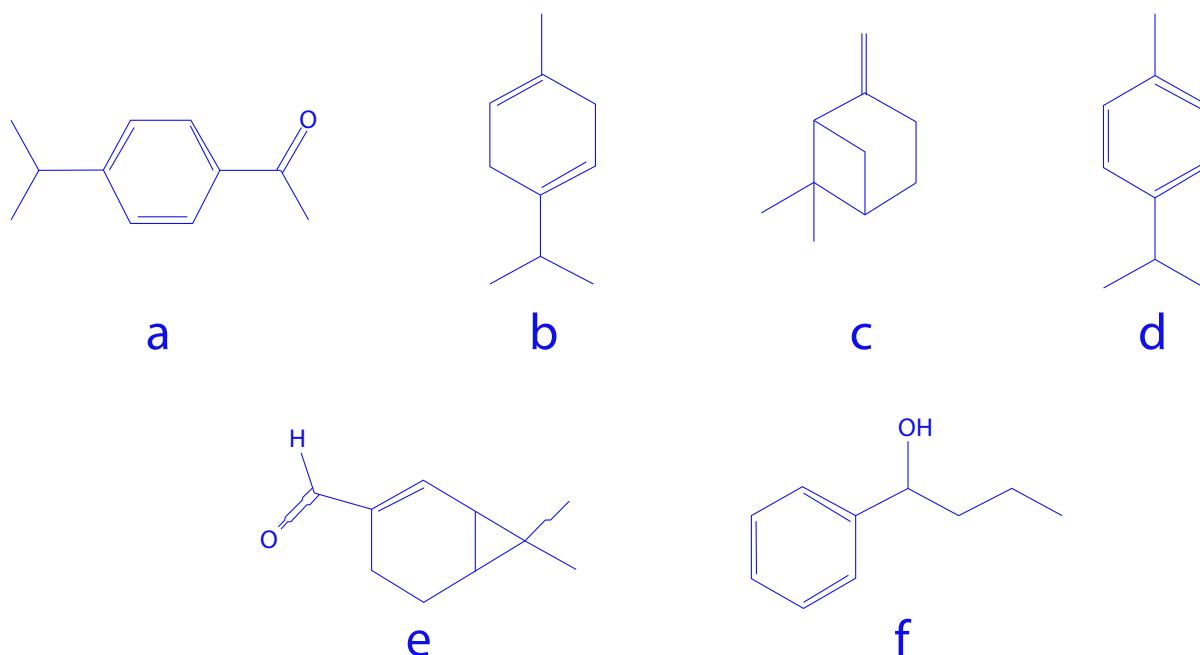


Figura 2. Monoterpenos identificados en el aceite esencial de *Cuminum cyminum* L. a) cuminaldehído, b) γ -terpineno, c) β -pineno, d) p -cimeno, e) 2-caren-10-al, f) 1-fenil-1-butanol.

Figure 2. Monoterpene identified in oil essential from *Cuminum cyminum* L. a) cumaldehyde, b) γ -terpinen, c) β -pinene, d) p -cymene, e) 2-carene-10-al, f) 1-phenyl-1-butanol.

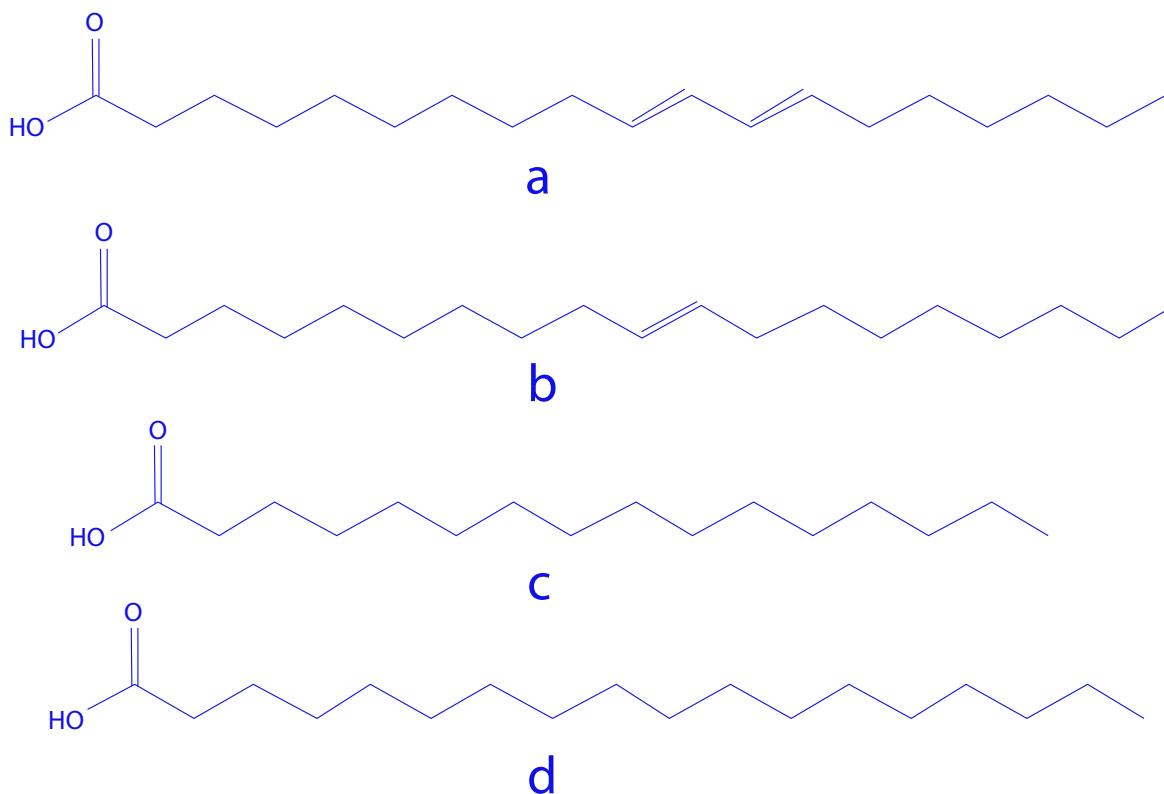


Figura 3. Ácidos grasos presentes en el aceite de semillas *Helianthus annuus* L. a) ácido linoleico, b) ácido oleico, c) ácido palmítico, d) ácido esteárico.

Figure 3. Fatty acids in oil of seeds of *Helianthus annuus* L. a) linoleic acid, b) oleic acid, c) palmitic acid, d) stearic acid.

En otro estudio, realizado también en Brasil, se evalúo el efecto de extractos etanólicos obtenidos de hojas de *Eugenia uniflora* y *Psidium guajava*, raíz de *Harpagophytum procumbens* y corteza de *Stryphnodendron adstringens*, a concentraciones de 1 mg/mL, 2.5 mg/mL y 5 mg/mL, sobre huevos de *F. hepatica*. Todos los extractos mostraron un impacto sobre los huevos, algunos inhibieron la eclosión y otros la formación de miracidio (cría). La mayor eficacia (100 %) se obtuvo con los extractos de *S. adstringens* y *E. uniflora* a 1 mg/mL. Los autores atribuyeron la inhibición de eclosión, así como la alteración del miracidio, a la presencia de taninos en las plantas, ya que estos compuestos pueden unirse a proteínas u otras macromoléculas, o bien a algunos cofactores enzimáticos (Marques y col., 2020). Dicho efecto fue mayor al observado en Nigeria para el extracto hidroalcohólico (EtOH:H₂O 70:30 v/v) de hojas de *Calotropis procera* y nanopartículas de plata funcionalizadas con este extracto, donde el mismo inhibió la eclosión de huevos de *Fasciola* spp ($CL_{50} = 1.49$ mg/mL y $CL_{90} = 8.42$ mg/mL) pero no tuvo impacto sobre el miracidio; mientras que las nanopartículas fueron efectivas en ambos casos ($CL_{50} = 0.47$ mg/mL y $CL_{90} = 3.34$ mg/mL sobre la eclosión de huevos; $CL_{50} = 0.30$ y $CL_{90} = 0.84$ mg/mL sobre el miracidio) (Okeke y col. ,2022). Los autores adjudicaron la actividad de reacción del extracto a la presencia de saponinas y taninos que pudieron haber penetrado en los huevos y detener la eclosión; mientras que el mayor efecto de las nanopartículas pudo deberse a una mayor dispersión y liberación del extracto en los huevos.

Finalmente, en Indonesia se evalúo el efecto ovicida del extracto hidroalcohólico (EtOH:H₂O 96:04 v/v) de flores de *Etlingera elatior* sobre huevos de *F. gigantica* (Wulandari y col., 2023). En ese estudio se demostró que dicho extracto a una concentración de 50 mg/mL, inhibe el desarrollo de los blastómeros, propiciando una incompleta formación del miracidio; además de dañar la membrana del huevo. Esta consecuencia se observó a los 11 d postra-

tamiento. Los autores atribuyeron el efecto farmacológico a la presencia de ácido tánico, alcaloides, saponinas y flavonoides en el extracto; sin embargo, no ha sido demostrado.

Las diferencias en los efectos observados en los estudios analizados pueden ser atribuidas al contenido metabólico en las plantas, así como a la capacidad de extracción de estos compuestos por el solvente utilizado para la obtención de los extractos (Kapadia y col., 2022).

Actividad sobre esporocito, redia y cercaria

Recientemente, se demostró el efecto sobre el esporocito, redia y cercaria de *F. gigantica* de las hojas de *Solanum surattense* (Kumar, 2020), así como de la raíz de *Asparagus racemosus* (Vishwakarma y Kumar, 2021) y *Potentilla fulgens* (Kumar, 2021). En esos trabajos, se evaluó el potencial fasciolicida del material vegetal (hoja o raíz) pulverizado, así como de 5 extractos orgánicos obtenidos de ambos, utilizando éter, cloroformo, acetona, etanol o metanol). También usaron una fracción etanólica extraída de hojas pulverizadas de *S. surattense* o la raíz pulverizada de *A. racemosus* o *P. fulgens*, la que sometieron a un proceso de purificación mediante cromatografía en columna abierta, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y etanol como fase móvil. Posteriormente, el etanol fue eliminado del eluato a través de evaporación a presión reducida, y el sólido resultante se consideró como una fracción menos compleja para cada una de las 3 plantas. Todos los tratamientos mostraron toxicidad sobre el tratamendo en sus 3 estadios larvales de forma dependiente de la dosis y del tiempo de exposición, pero el mejor efecto se observó con los extractos y fracciones polares donde se utilizó etanol como solvente. Las 3 plantas presentaron un efecto similar con valores de $CI_{50} = 44.5$ mg/mL a $CI_{50} = 79.93$ mg/mL, y la máxima eficacia se obtuvo tras 8 h de exposición del parásito a los tratamientos. Para *S. surattense* y *P. fulgens* la mayor actividad farmacológica sobre los 3 estadios (esporocito, redia y cercaria) se obtuvo con la fracción etanólica menos compleja ($CL_{50} = 48.25$ mg/mL,

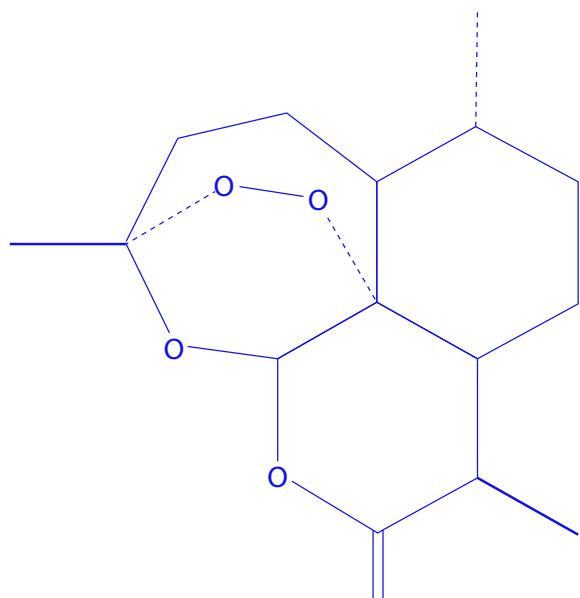
47.61 mg/mL y 44.15 mg/mL; y $CL_{50} = 54.20 \text{ mg/mL}$, 49.37 mg/mL y 38.13 mg/mL, respectivamente); mientras que para la especie *A. racemosus*, el extracto etanólico fue el más eficaz ($CL_{50} = 51.9 \text{ mg/mL}$, 48.05 mg/mL y 49.76 mg/mL sobre larva esporocistica, redial y cercaria, respectivamente). La extracción etanólica (directa o por cromatografía en columna) mostró mayor actividad fasciolítica, lo que sugiere que este solvente facilita la disolución de compuestos capaces de difundirse en el parásito, hasta acumularse a concentraciones tóxicas; o bien, a la transformación de dichos compuestos en otras especies tóxicas por las enzimas del parásito. Sin embargo, esto no ha sido confirmado.

Actividad sobre estadio juvenil y adulto

Se han utilizado extractos íntegros producidos mediante el uso de solventes polares independientes, como metanol, etanol o mezclas alcohol: agua; o bien a través de procedimientos de extracción secuencial del material vegetal con solventes de polaridad creciente ($n\text{-hexano} < \text{acetato de etilo (AcOEt)} < \text{acetona} < \text{etanol(EtOH)} < \text{metanol}$), para obtener así extractos menos complejos y con metabolitos secundarios afines al solvente utilizado. Además, los modelos farmaco-

lógicos empleados se basan en determinar el efecto de los extractos sobre la motilidad, muerte y/o daños generados al tegumento del parásito (Ezeta-Miranda y col, 2020; Sen y col., 2022; Wulandari y col., 2023).

Artemisia ludoviciana Nutt. Mexicana, es una planta medicinal con actividad sobre estadio juvenil de trematodos *Fasciola*. En un estudio realizado en México por Ezeta-Miranda y col. (2020), en el que se hizo una extracción secuencial de las hojas de esta planta mediante maceración, utilizando hexano como primer disolvente, seguido de acetato de etilo y metanol, los extractos más polares (metanol y acetato de etilo) fueron los más activos sobre juveniles recién exquistados de *F. hepatica* (100 % de eficacia a 0.125 mg/mL y 24 h de exposición); mientras que el extracto hexánico mostró su máximo efecto a las 72 h. Además, el extracto de acetato de etilo causó una disruptión de la ventosa oral y discontinuidad de las espinas circundantes en la superficie del parásito. Mediante un estudio químico biodirigido, del extracto de acetato de etilo, establecieron a la lactona sesquiterpénica artemisina (Figura 4) como el principio fasciolicida presente en las hojas de *A. ludoviciana*.



■ Figura 4. Estructura química de la artemisina.

Figure 4. Chemical structure of artemisinin.

El efecto farmacológico exhibido por los extractos está influenciado por el solvente utilizado para la extracción, el lugar de colecta del material vegetal, así como la concentración empleada en el ensayo. Prueba de ello, es el efecto trematocida de las hojas de *Azadirachta indica* sobre *F. hepatica*. En un estudio realizado en Filipinas se evalúo un extracto hidroalcohólico (EtOH:H₂O 80:20 *v/v*) obtenido de esta especie vegetal, el cual no mostró actividad sobre el trematodo a las concentraciones evaluadas (100 mg/mL a 400 mg/mL) (Yamson y col., 2019); mientras que en un estudio realizado en Nigeria, el extracto acuoso de estas hojas tuvo una CL₅₀ = 1.44 mg/mL tras 5 h de exposición (Ibekwe, 2019).

Otra planta con actividad sobre parásitos *Fasciola* adultos es *Cassia fistula*, cuyo extracto hidroalcohólico (EtOH:H₂O 70:30, *v/v*) administrado a una concentración de 50 mg/mL y 15 h de exposición, generó alteraciones (hinchazón, vacuolización y pérdida de espinas) en el tegumento de estos parásitos, provocando así su muerte. Sen y col. (2022) mencionaron que dicho efecto puede deberse a un desequilibrio iónico e hídrico causado posiblemente por el contenido de saponinas y alcaloides en la planta. Un efecto similar se observó en Indonesia para *Ellingeria elatior*, donde parásitos adultos de *F. gigantica*, tratados con un extracto hidroalcohólico (EtOH:H₂O 96:04 *v/v*) de flores de esta especie, a una concentración de 200 mg/mL y 80 h de exposición, mostraron daño en el tegumento, separación de éste con la cutícula, plegamiento del acetáculo y ventosa ventral, erosión completa y pérdida de la columna en las partes ventral y dorsal, así como pérdida de epitelio en los intestinos del parásito (Wulandari y col., 2023).

Parásitos con el tegumento dañado son más susceptibles a los tratamientos antiparasitarios, pues los fármacos pueden percolar afectando diversos tejidos y procesos internos de las fasciolias. En general, se ha establecido que la disrupción del tegumento puede afec-

tar el transporte de Na⁺ y K⁺ dependiente de energía, incrementando así los niveles de Na⁺ y agua, lo que conduce a la inflamación del sincitio en el parásito, reduciendo así su motilidad. Además, el daño tegumentario afecta los procesos excretores/secretores, la captación transtegumentaria, altera las vías de señalización y perturba los procesos metabólicos en el parásito (Faixová y col., 2021).

Los extractos hidroalcohólicos (EtOH:H₂O 70:30, *v/v*) y acuosos, obtenidos de hojas de *Leonotis nepetifolia*, poseen toxicidad sobre *F. gigantica* adultos. Siendo el extracto acuoso el más activo (CL₉₀ = 4.435 mg/mL, tras 5.51 h de exposición). Los autores atribuyeron este efecto a una mayor concentración de taninos en el extracto acuoso comparado con el etanólico (0.236 ± 0.002 mg/mL y 0.005 ± 0.001 mg/mL, respectivamente) (Ssenkuba y col., 2022). El efecto antihelmíntico de los taninos, se ha asociado con su capacidad de formar complejos con proteínas y alterar la alimentación, la motilidad, la fecundidad; además de una variedad de funciones bioquímicas mediadas por enzimas en los nemátodos. También, pueden causar daños físicos a las estructuras internas y externas de los parásitos, induciendo su muerte (Acedo-Ramírez y col., 2019).

Se ha evaluado el efecto adulticida de aceites esenciales sobre trematodos del género *Fasciola*. Brauner-de-Mello y col. (2023), reportaron que el aceite esencial de *C. cymatum*, a una concentración de 0.062 mg/mL y 15 h de exposición, inactivó a la totalidad de parásitos adultos de *F. hepatica* tratados. Además, dañó el tegumento en toda la superficie del trematodo, generando una marcada vacuolización cerca de la lámina basal del sincitio tegumentario, y una gran cantidad de microvesículas alrededor de las espinas. Los autores atribuyeron dicho efecto a la presencia del monoterpeno cuminaldehído (Figura 2a), principal constituyente de este aceite esencial, que induce daño físico mediado por estrés oxidativo y conduce a la muerte de otros helmintos.

Plantas medicinales con actividad fasciolicida *in vivo*

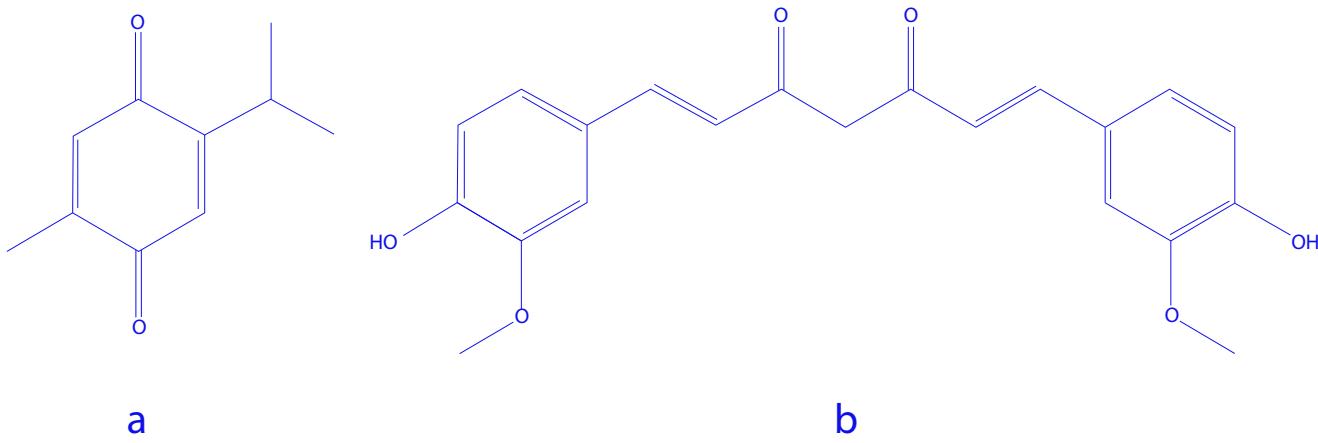
El efecto de plantas medicinales sobre tremitados del género *Fasciola*, en modelos *in vivo* ha sido poco estudiado. En este trabajo sólo se encontraron dos reportes, el primero realizado por El-Shanawany y col. (2019), donde el extracto acuoso de hojas de *Moringa oleifera* fue administrado vía oral a una dosis de 150 mg/kg cada 48 h durante 21 d, a ovejas coinfectadas naturalmente con *F. gigantica* y *Clostridium novyi*. El extracto logró el 99 % de disminución de presencia de huevos, en las heces de los animales con alta carga parasitaria, al día 21. Además, propició una degeneración de los huevos y la presencia de un embrión oscuro después de la primera dosis de tratamiento; y al final del experimento, el huevo se mostró vacío, sin células ni embrión. De igual manera, se observó una mayor ganancia de peso (\pm 4 kg), así como una disminución de los niveles séricos de IgG, IL-2, IL-7 e IL-10 en los animales que recibieron el extracto, comparado con el grupo control. Los autores adjudicaron dichos efectos, a la presencia de saponinas, taninos y flavonoides en el extracto; sin embargo, esto no ha sido demostrado.

Abbas y col. (2020), evaluaron en cabras infectadas naturalmente con *F. hepatica*, la eficacia de una mezcla de 17 plantas molidas: *Mentha spicata*, *Combretum indicum*, *Ter-*

nalia chebula, Rosa sericea, Foeniculum vulgare, Trachyspermum ammi, Cuminum cyminum, Glycine soja, Sansevieria trifasciata, Cassia fistula, Swertia L, Linum usitatissimum, Peganum harmala, Leptadenia reticulata, Camellia sinensis, Lepidium sativum y Citrullus colocynthis. La mezcla herbal fue suministrada vía oral en 3 dosis distintas según el grupo de estudio (1 g/kg, 1.2 g/kg, y 1.4 g/kg) los días 0, 7, 14 y 21. Todos los tratamientos redujeron la cantidad de huevos en las heces, siendo la dosis más alta, la más activa (82.33 % de reducción a los 30 d). Además, las cabras de este grupo no mostraron signos de toxicidad y tuvieron una ganancia de peso del 4.05 % (5 veces más comparado con el grupo control), así como un incremento en el conteo de eritrocitos, llenando capilar y concentración de hemoglobina.

Metabolitos secundarios puros obtenidos de plantas con actividad sobre *Fasciola gigantica*

Timoquina y curcumina (Figura 5), han demostrado actividad *in vitro* sobre *F. gigantica*. El primero es un derivado monoterpélico y componente principal del aceite esencial de semillas de *Nigella sativa*; mientras que la curcumina es el principal curcuminoide del rizoma de *Curcuma longa* (Ullah y col., 2017). Ambos compuestos inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en los parásitos, de forma dependiente de la concentración, siendo mayor el efecto observa-



■ Figura 5. Principios activos fasciolicidas aislados de plantas medicinales. a) timoquina, b) curcumina.
Figure 5. Active fasciolicide principles isolated from medicinal plants. a) timoquin, b) curcumin.

do para la timoquinona, al duplicar la concentración de ERO, comparado con el control. Además, ambos compuestos a una concentración de 60 µM incrementaron la condensación de la cromatina en las células un 60 % y 20 %, respectivamente. El nivel de condensación de la cromatina, así como la fragmentación del ADN en el núcleo celular, son marcadores claves de inducción a la apoptosis (Rehman y col., 2020). En el mismo estudio se evidenció que la curcumina es capaz de fragmentar el ADN en las células del trematodo, e inhibir en un 80 % la expresión del gen GST, el cual está involucrado en el proceso de desintoxicación, al ayudar a la conjugación del glutatión con compuestos xenobióticos.

CONCLUSIONES

Las plantas medicinales representan actualmente una alternativa potencial para el control de la fascioliasis. Sus metabolitos secundarios, son capaces de producir varios efectos contra los parásitos, como reducción en la eclosión del huevo, fertilidad y alimentación, interrupción del desarrollo y daños estructurales, que inducen su muerte. Sin

embargo, en algunos casos, como *E. uniflora*, *S. adstringens*, *P. fulgens*, *A. racemosus* y *C. fistula* aún faltan realizar estudios químicos para identificar los principios activos responsables de la actividad trematocida. Además, en la mayoría de los estudios, se encontró que la actividad antiparasitaria de los extractos depende del lugar de colecta de la planta, tipo de extracto, la concentración, así como del tiempo en que se exponen las fasciolas. La evidencia de la actividad fasciolicida *in vivo* es reducida respecto a las investigaciones del efecto de los extractos de plantas y/o compuestos puros sobre *F. hepatica* y *F. gigantica* en modelos *in vitro*, por lo que es necesario el desarrollo de protocolos para determinar su seguridad y eficacia terapéutica previo al desarrollo de fitomedicamentos seguros y eficaces que reemplacen el uso de fasciolicidas sintéticos en el tratamiento de esta enfermedad, lo que constituye un gran reto para la comunidad científica internacional.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declararon no tener conflictos de intereses de ningún tipo.

REFERENCIAS

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Sindhu, Z. U. D., Sharif, M., Rafique, A., Saeed, Z., Rehman, T. U., Siddique, F., Zaheer, T., Khan, M. K., Akram, M. S., Chattha, A. J., Fatima, U., Munir, T., & Ahmad, M. (2020). Anthelmintic effects and toxicity analysis of herbal dewormer against the infection of *Haemonchus contortus* and *Fasciola hepatica* in goat. *Pakistan Veterinary Journal*, 40(4), 455-460. <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2020.083>
- Abdel-Fatah, O. R., Arafa, W. M., Wahba, A. A., & El-Dakhly, K. M. (2022). Tegumental alterations and resistance of *Fasciola gigantica* adult worms exposed to flukicides in Egypt. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11, 106. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00287-z>
- Acevedo-Ramírez, P. M. D. C., Hallal-Calleros, C., Flores-Pérez, I., Alba-Hurtado, F., Mendoza-Garfías, M. B., Castro-Del-Campo, N., & Barajas, R. (2019). Anthelmintic effect and tissue alterations induced *in vitro* by hydrolysable tannins on the adult stage of the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 266, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.12.008>
- Ahmed, H., Kilinc, S. G., Celik, F., Kesik, H. K., Simsek, S., Ahmad, K. S., Afzal, M. S., Farrakh, S., Safdar, W., Pervaiz, F., Sadia, L., S., Zhang, J., & Cao, J. (2023). An inventory of anthelmintic plants across the globe. *Pathogens*, 12, 131. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010131>
- Bonde, C. S., Bornancin, L., Lu, Y., Simonsen, H. T., Martínez-Valladares, M., Peña-Espinoza, M., Mejer, H., Williams, A. R., & Thamsborg, S. M. (2021). Bio-guided fractionation and molecular networking reveal fatty acids to be principal anti-parasitic compounds in Nordic seaweeds. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 674520. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.674520>
- Bowman, D. D. (2014). Georgis' Parasitology for

- Veterinarians. (Ninth edition). Elsevier. 77 Pp.
- Brauner-de-Mello, A., Baccega, B., Obelar-Martins, F., Ignês-de-Santi, I., Islabão, Y. W., de-Giacometti, M., Pereira-Soares, M., da-Rosa-Farias, N. A., & Belmonte-Oliveira, C. (2023). Activity of cumin essential oil to control fascioliasis: Efficacy and changes in the tegument of *Fasciola hepatica*. *Experimental parasitology*, 252, 108587. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108587>
- Castro-Hermida, J. A., González-Warleta, M., Martínez-Sernández, V., Ubeira, F. M., & Mezo, M. (2021). Current challenges for Fasciolicide treatment in ruminant livestock. *Trends in Parasitology*, 37(5), 430-444. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.12.003>
- El-Shanawany, E. E., Fouad, E. A., Keshta, H. G., Hassan, S. E., Hegazi, A. G., & Abdel-Rahman, E. H. (2019). Immunomodulatory effects of *Moringa oleifera* leaves aqueous extract in sheep naturally co-infected with *Fasciola gigantica* and *Clostridium novyi*. *Journal of Parasitic Diseases*, 43, 583-591. <https://doi:10.1007/s12639-019-01130-6>
- Encinas-García, R., Quiroz-Romero, H., Guererro-Molina, C. y Ochoa-Galván, P. (2020). Frecuencia de fasciolasis hepática e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería, México, D.F. *Veterinaria México OA*, 7(3), 928. <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2020.3.928>
- Ezeta-Miranda, A., Vera-Montenegro, Y., Avila-Acevedo, J. G., García-Bores, A. M., Estrella-Parra, E. A., Francisco-Marquez, G., & Ibarra-Velarde, 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, 109-184. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109184>
- Faixová, D., Hrčková, G., Kubašková, T. M., & Mudroňová, D. (2021). Antiparasitic effects of selected isoflavones on flatworms. *Helminthologia*, 58, 1-16. <https://doi.org/10.2478/helm-2021-0004>
- Gamulo, J. V., Bolina, M. P., Brion, J. S., Rosa, V. C. N. D., Maglaya, R. F., Tan, C. L., & Chang, A. C. (2022). Fascioliasis phytotherapy using tropical plant extracts: a systematic review with meta-analysis. *The Journal of Advances in Parasitology*, 9(1), 12-28. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.jap/2022/9.1.1.2.28>
- González-Garduño, R., Hernández-Hernández, J. D. C., Torres-Hernández, G. y Ortiz-Pérez, D. O. (2019). Comportamiento hematológico de bovinos infectados por trematodos en un clima cálido húmedo de México. *Pastos y Forrajes*, 42(3), 197-201.
- Ibekwe, H. A. (2019). In vitro anthelmintic activities of aqueous crude extract of *Azadirachta indica* on *Paramphistomum cervi* and *Fasciola hepatica*. *International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry*, 4(1), 14-18.
- Kumar, P. (2020). Helminth control: *In vitro* anthelmintic and larvicidal activities of *Solanum surattense* against *Fasciola gigantica* (Sporocyst, Redia, and Cercaria) larvae. *International Journal of Medical Parasitology and Epidemiology Sciences*, 1(4), 85-90. <https://doi.org/10.34172/ijmpes.2020.24>
- Kapadia, P., Newell, A. S., Cunningham, J., Roberts, M. R., & Hardy, J. G. (2022). Extraction of highvalue chemicals from plants for technical and medical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10334. <https://doi.org/10.3390/ijms231810334>
- Kumar, P. (2021). Medicinal plant *Potentilla fulgens* and its effect *in vitro* against *Fasciola gigantica*. *Insights Clin Cell Immunology*, 5, 4-7. <https://doi.org/10.29328/journal.icci.1001018>
- Lam, N. S., Long, X., Su, X. Z., & Lu, F. (2020). *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its monoterpenes constituents in treating protozoan and helminthic infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110624. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110624>
- Lalor, R., Cwiklinski, K., Calvani, N. E. D., Dorey, A., Hamon, S., Corrales, J. L., Dalton, J. P., & De-Marco Verissimo, C. (2021). Pathogenicity and virulence of the liver flukes *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* that cause the zoonosis Fasciolosis. *Virulence*, 12(1), 2839-2867. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996520>
- López-Villacís, I. C., Artieda-Rojas, J. R., Mera-Andrade, R. I., Muñoz-Espinoza, M. S., Rivera-Guerra, V. E., Cuadrado-Guevara, A. C., Zurita-Vásquez, J. H. y Montero-Recalde, M. A. (2017). *Fasciola hepatica*: aspectos relevantes en la salud animal. *Journal of the Selva Andina Animal Science*. 4(2), 137-146.
- Machado-Pereira-Da-Silva, M. A., Zehetmeyr, F. K., Pereira, K. M., Pacheco, B. S., Freitag, R. A., Pinto, N. B., Machado, R. H., Villarreal-Villarreal, J. P., de-Oliveira-Hubner, S., Aires-Berne, M. E., & da-Silva-Nascente, P. (2020). Ovicidal *in vitro* activity of the fixed oil of *Helianthus annus* L. and the essential oil of *Cuminum cyminum* L. against

- Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). *Experimental Parasitology*, 218, 107984. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107984>
- Marques, L. T., Guedes, R. A., Rodrigues, W. D., Archanjo, A. B., Severi, J. A., & Martins, I. V. F. (2020). Chemical composition of various plant extracts and their *in vitro* efficacy in control of *Fasciola hepatica* eggs. *Ciência Rural*, 50(5), e20190363. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190363>
- Mas-Coma, S., Valero, M. A., & Bargues, M. D. (2019). Fascioliasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1154, 71-103. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18616-6_4
- Morais, M. C., Souza, J. V., da-Silva-Maia-Bezerra-Filho, C., Dolabella, S. S., & Sousa, D. P. (2020). Trypanocidal essential oils: A review. *Molecules*, 25(19), 4568. <https://doi.org/10.3390/molecules25194568>
- Okeke, I. J., Oyeyemi, O. T., & Morenikeji, O. A. (2022). Ovicidal and miracicidal activities of *Calotropis procera* and its green-synthesized nanotized derivative: A quest for new antifasciola agents. *Acta tropica*, 236, 106700. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106700>
- Opio, L. G., Abdel-Fatah, E. M., Terry, J., Odongo, S., & Okello, E. (2021). Prevalence of Fascioliasis and associated economic losses in cattle slaughtered at Lira municipality Abattoir in Northern Uganda. *Animals* (Basel), 11, 681. <https://doi.org/10.3390/ani11030681>
- Pinilla, J. C., Florez-Muñoz, A. A., & Uribe-Delgado, N. (2020). Prevalence and risk factors associated with liver fluke *Fasciola hepatica* in cattle and sheep in three municipalities in the Colombian Northeastern Mountains. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 19, 100364. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100364>
- Rehman, A., Ullah, R., Gupta, D., Khan, M. A. H., Rehman, L., Beg, M. A., Khan, A. U., & Abidi, S. M. A. (2020). Generation of oxidative stress and induction of apoptotic like events in curcumin and thymoquinone treated adult *Fasciola gigantica* worms. *Experimental Parasitology*, 209, 107810. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107810>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez-de-León, A. A., Silva-Villela, H., Torres-Acosta, J. F. D. J., Fragoso-Sánchez, H., Romero-Salas, D., Rosario-Cruz, R., Saldíerna, F., & García-Carrasco, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8, 61-74. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>
- Sen, H., Raj-Narayan-Damor, R. D., & Swarnakar, G. (2022). *In-vitro* anthelmintic effects of medicinal plant *Cassia fistula* extract on the tegument of *Fasciola gigantica* by light microscope. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)*, 12, 6736-6743. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12\(12\).6736-43](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.12(12).6736-43)
- Ssenkuba, F., Komujuni, C., & Tumusiime, J. (2022). *In vitro* anthelmintic activity of *Leonotis nepetifolia* ethanolic and aqueous leaf extracts on *Fasciola gigantica*. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 14(4), 82-90. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2022.1011>
- Štrbac, F., Krnjajić, S., Stojanović, D., Novakov, N., Bosco, A., Simin, N., Ratajac, R., Stanković, S., Crnogolić, G., & Rinaldi, L. (2023). Botanical control of parasites in veterinary medicine. *One Health Triad*, 3(31), 215-222. <https://doi.org/10.47278/book.oht/2023.98>
- Ullah, R., Rehman, A., Zafeer, M. F., Rehman, L., Khan, Y. A., Khan, M. A., Khan, S. N., Khan, A. U., & Abidi, S. M. (2017). Anthelmintic potential of Thymoquinone and Curcumin on *Fasciola gigantica*. *PLoS One*, 12, e0171267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171267>
- Vale, N., Gouveia, M. J., Gärtner, F., & Brindley, P. J. (2020). Oxysterols of helminth parasites and pathogenesis of foodborne hepatic trematodiasis caused by *Opisthorchis* and *Fasciola* species. *Parasitology Research*, 119, 1443-1453. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06640-4>
- Vishwakarma, K. & Kumar, P. (2021). *In vivo* anthelmintic activity of medicinal plant *Asparagus racemosus* against larva of *Fasciola gigantica*. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 12(2), 675-680.
- Wulandari, A. R., Nurlaelasari, A., Nugroho, H. A., Cahyadi, M., Kurniawan, W., & Hamid, P. H. (2023). Ethanolic extract of *Etingera elatior* flower exhibits anthelmintic properties to *Fasciola gigantica* *in vitro*. *Open Veterinary Journal*, 13(5), 576-587. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2023.v13.i5.10>
- Yamson, E. C., Tubalinal, G. A. S., Viloria, V. V., & Mingala, C. N. (2019). Anthelmintic effect of betel nut (*Areca catechu*) and neem (*Azadirachta indica*) extract against liver fluke (*Fasciola* spp.). *Journal of Advanced Veterinary Research*, 6, 44-49. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.e310>