



# Hallazgos histopatológicos en nematodos Anisakidae, expuestos a extractos acuosos vegetales con capacidad nematocida *in vitro*

Rafael G. Campos-Montiel<sup>1</sup> ; Lucio Castro-Parra<sup>1</sup> ;  
Fabián R. Gómez de Anda<sup>1</sup> ; Andrea P. Zepeda-Velázquez<sup>1\*</sup> .

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.  
\*Correspondencia: [andrea\\_zepeda@uah.edu.mx](mailto:andrea_zepeda@uah.edu.mx)

Recibido: November 2023; Aceptado: Mayo 2024; Publicado: Julio 2024.

## RESUMEN

**Objetivo.** Exponer nematodos de la familia Anisakidae a diferentes extractos acuosos para determinar su capacidad nematocida, mediante la identificación de sus componentes bioactivos y la actividad antioxidante. **Material y métodos.** Se identificaron las concentraciones de los compuestos bioactivos de los extractos acuosos de epazote (*Dysphania ambrosioides*), cebolla (*Allium cepa*), siempre viva (*Kalanchoe pinnata*) y xoconostle (*Opuntia oligacantha*). Se obtuvieron parásitos vivos de la familia Anisakidae de peces Lisa (Mugilidae), para ser expuestos a diferentes concentraciones de extractos acuosos. **Resultados.** *K. pinnata* y *O. oligacantha* presentaron mayor cantidad de componentes bioactivos de polifenoles, flavonoides y taninos; así como en la actividad antioxidante de DPPH y ABTS. La mortalidad de los parásitos ocurrió en la concentración de 855 mg/mL para *K. pinnata* del 100% a las 48 horas; y en pulpa y fruto entero de *O. oligacantha*, con mortalidades del 66% a las 72 horas. Los principales cambios histopatológicos causados por *K. pinnata* fueron vacuolas musculares; el fruto entero de *O. oligacantha* degeneración del epitelio intestinal y vacuolización; la semilla provocó edema, degeneración intestinal y vacuolización. **Conclusiones.** Los resultados obtenidos indican que, el uso de extractos acuosos de *K. pinnata* y *O. oligacantha* sobre nematodos de la familia Anisakidae, son una opción para su uso como agentes nematocidas.

**Palabras clave:** Anisakidae; Mugilidae; *Opuntia*; parásito; *Kalanchoe* (Fuente: CAB).

## ABSTRACT

**Objective.** Expose nematodes of the Anisakidae family to different aqueous extracts and identify the aqueous extracts with nematocidal capacity. **Material and methods.** The concentrations of the bioactive compounds of the aqueous extracts of epazote (*Dysphania ambrosioides*), onion (*Allium cepa*), siempre viva (*Kalanchoe pinnata*) and xoconostle (*Opuntia oligacantha*) were identified. Live parasites of the Anisakidae family were obtained from Lisa fish (Mugilidae), to be exposed to different concentrations of aqueous extracts. **Results.** *K. pinnata* and *O. oligacantha* presented a

### Como citar (Vancouver).

Campos-Montiel RG, Castro-Parra L, Gómez de Anda FR, Zepeda-Velázquez AP. Hallazgos histopatológicos en nematodos Anisakidae, expuestos a extractos acuosos vegetales con capacidad nematocida *in vitro*. Rev MVZ Córdoba. 2024; 29(3):e3078. <https://doi.org/10.21897/rmvz.3078>



©El (los) autor (es) 2024. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

higher concentration of bioactive components of polyphenols, flavonoids and tannins; as well as in the antioxidant activity of DPPH and ABTS. Parasite mortality occurred at a concentration of 855 mg/mL for *K. pinnata* of 100% at 48 hours, and in pulp and whole fruit of *O. oligacantha*, with mortality of 66% at 72 hours. The main histopathological changes caused by *K. pinnata* were muscle vacuoles; the whole fruit of *O. oligacantha* degeneration of the intestinal epithelium and vacuolization; the seed caused edema, intestinal degeneration, and vacuolization. **Conclusions.** The results indicate that the use of aqueous extracts of *K. pinnata* and *O. oligacantha* on nematodes of the Anisakidae family are an option for their use as nematocidal agents

**Keywords:** Anisakidae; Mugilidae; *Opuntia*; parasite; *Kalanchoe* (Source: CAB).

## INTRODUCCIÓN

Los parásitos Anisakidae que se encuentran en alimentos marinos, generan un problema de salud pública al consumidor, algunos de los productos pesqueros en los que se puede colectar al parásito en la parte del filete, incluyen a la sardina (*Sardina pilchardus*), lenguado (*Solea solea*), mero rojo (*Epinephelus morio*), el pescado lisa (Mugilidae), entre otros (1). Estos parásitos se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes organismos acuáticos marinos; en éstos y las aves acuáticas son el hospedero principal en el que se completa el ciclo de vida y la fase adulta o L4 (Larva 4), libera los huevos con la L1 en las heces al medio marino (2). La participación de pequeños crustáceos y copépodos, favorecen la muda de la L1 a la L2; cuando estos crustáceos son consumidos por los hospederos paraténicos (peces, calamares, pulpos, entre otros) ocurre la muda de la L2 a la L3. El humano adquiere el parásito cuando se consume al hospedero paraténico crudo o semicrudo, sin que el consumo de la L3 en el humano mude a la L4 (3).

La ichtiozoonosis ocasionada por estos parásitos es conocida de dos maneras: Anisakidosis (cuando es ocasionada por los géneros *Anisakis* spp., *Contracaecum* spp., y *Pseudoterranova* spp.); y Anisakiasis (cuando es ocasionada por específicamente por *Anisakis simplex*) (4). Cuando el humano consume el parásito vivo, éste tiene la capacidad de sobrevivir por un corto periodo de tiempo en el cuerpo humano, sobreviviendo a partir de la adhesión a la superficie del tracto gastrointestinal (5); el parásito vivo o muerto en el cuerpo humano puede ocasionar diferentes manifestaciones clínicas como alergias, angioedema, broncoespasmos, shock anafiláctico (6), epigastalgia, náuseas, vomito, diarrea, dolor crónico abdominal y la formación de granulomas (5). Sin embargo, no existe un antiparasitario que pueda ser administrado a los peces, previo a su consumo y que evite la presentación de la zoonosis.

Las plantas son capaces de producir algunos elementos bioactivos que son secretados como método de defensa ante los insectos que las consumen (7). El uso de extractos acuosos y sus elementos bioactivos, han sido empleados como agentes antielmínticos (8), en el caso del epazote (*Dysphania ambrosioides*) se ha reportado su efecto antiparasitario (9); la cebolla (*Allium cepa*) ha demostrado tener una actividad antihelmíntica contra el nematodo *Toxocara canis* y el nematelminto *Ancllyostoma caninum* (10); la planta siempre viva (*Kalanchoe pinnata*), presenta una capacidad antiparasitaria contra protozoarios como *Plasmodium Berghei* y *Leishmania amazonensis* (11); además se ha reportado su consumo por parte de pueblos indígenas para el tratamiento de enfermedades parasitarias (12). El consumo accidental de las larvas de la familia Anisakidae, puede favorecer al diagnóstico incorrecto, por lo que es necesario salvaguardar la salud pública, mediante la producción de productos marinos con mejores condiciones para su consumo; incrementando la exigencia para implementar nuevas formas y procedimientos que contribuyan a obtener productos inocuos de origen animal. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue exponer a nematodos de la familia Anisakidae a diferentes extractos acuosos para determinar su capacidad nematocida, mediante la identificación de sus componentes bioactivos y la actividad antioxidante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Pescado.** Pescados lisa (*Mugil curema*) fueron comprados en un local comercial de venta de pescado fresco (buen olor y consistencia de la carne, ojos brillosos, branquias rojas y aspecto general de la piel). Los pescados fueron colocados en una hielera a una temperatura de 4°C y trasladados al Laboratorio de parasitología del Instituto de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (13).

**Necropsia y manejo de los parásitos.** Se realizó la técnica de necropsia descrita por Noga (14); para la colecta de los parásitos vivos, se realizó la disección de los órganos internos, enfocándose principalmente en hígado y riñón, ya que son los sitios con mayor presencia; mientras que en músculo epiaxial, cavidad celómica y la superficie serosa de las vísceras, su presencia puede variar (13). Los parásitos fueron colectados en viales eppendorf de 1.5 mililitros (mL) con solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) al 09% (p/v), los parásitos fueron lavados 3 veces con solución estéril de NaCl a 3,000 revoluciones por minuto (r.p.m), entre cada lavado, la solución del lavado fue decantada y el vial fue llenado nuevamente con la solución (15).

**Vegetables.** Las plantas frescas de epazote (*D. Ambrosioides*), siempre viva (*K. pinnata*) y cebolla (*A. cepa*) fueron comprados en el municipio de Tulancingo de Bravo, Hidalgo, (Latitud: 20.0815, Longitud: -98.3673 20° 4' 53" Norte, 98° 22' 2" Oeste). Fueron lavados con agua y desinfectados por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio o lejía comercial en una solución de 2.5%, durante 10 minutos. Posteriormente, fueron lavados con agua destilada, se secaron y almacenaron a 4°C.

**Fruto.** El xoconostle (*O. oligacantha*) fue recolectado del municipio Ulapa Melchor Ocampo, Tetepango, Hidalgo (Altitud 2040m, Latitud 20°08'41.7"N, Longitud 99°09'59.0"W). Se lavo con agua y desinfecto por medio de inmersión en hipoclorito de sodio (lejía comercial 2.5% (v/v)), durante 5 minutos. Posteriormente, se enjuago con agua destilada (16) y fue almacenado a 4°C en un recipiente oscuro hasta su uso.

**Extracción de compuestos bioactivos.** Los extractos de hojas *D. ambrosioides*, escamas de *A. cepa* y *K. pinnata*, fueron obtenidos mediante la metodología de Soto y Rosales (17) con modificaciones. Se colocaron 150 g de muestra en un mortero para ser maceradas, se adicionaron 750 mL de agua destilada y posteriormente fueron colocadas en una licuadora industrial durante 10 min. El material licuado reposo durante 7 días, posteriormente fue colocado en una centrifuga a 10,000 rpm por 15 min a 2°C y el sobrenadante fue decantado. El material filtrado fue colocado en un evaporador rotativo a 40°C, presión de 23 mbar, el agua del refrigerante permaneció a 0°C y, posteriormente a 40°C en baño maría durante 8 h. Finalmente fue colocado en un Ultracongelador a -70°C hasta su utilización.

Los extractos *O. oligacantha*, fueron obtenidos mediante la metodología de Medina-Pérez et al (16). Se realizaron cuatro extractos: fruto completo, cáscara, pulpa y semilla. Se agitaron muestras de 1 g adicionado con 20 mL de metanol y 20 mL de agua destilada durante 30 min. La mezcla fue centrifugada a 10,000 rpm durante 20 min; el sobrenadante se colocó en un tubo de 10 mL. Posteriormente fue calentado a 65°C durante 60 min en baño maría, para la eliminación completa del metanol. La mezcla fue enfriada inmediatamente con agua fría y el extracto fue almacenado a -70°C.

**Compuestos bioactivos. Fenoles totales:** se empleó la metodología descrita por Singleton et al (18), por el método de Folin-Ciocalteu (FC) colocando 0.5 mL de cada extracto a evaluar en un tubo de ensaye, seguido de 2.5 mL de FC la reacción reposo por 7 min. Posteriormente se agregaron 2 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 7.5%, dejándose incubar durante 2 h a temperatura ambiente. Se realizó la lectura por medio de un espectrofotómetro a 760 nanómetros (nm), expresando los resultados como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EqAG).

**Flavonoides:** Fueron obtenidos con base a la metodología descrita por Thomas et al (19). Se colocaron 250 microlitros (µL) del extracto a evaluar, adicionando 1.25 mL de agua destilada y 75 µL de NaNO<sub>2</sub> al 5%. La reacción se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Posteriormente, 150 µL de AlCl<sub>3</sub> al 10% fueron agregados, la mezcla se reposo por 6 min. Finalmente, fueron adicionados 500 µL de NaOH y 275 µL de agua destilada; y se realizó la lectura a 720 nm, los resultados como miligramos equivalentes de quercetina (mg EqQ).

**Taninos:** Se determinaron mediante la metodología de Price y Butler (20). Una alícuota de 200 µL de cada extracto acuoso fue adicionando 600 µL de FeCl<sub>3</sub> a 0.1 molar (M) en 0.1 normal (N) de HCl. Posteriormente los extractos reposaron durante 5 min, se adicono 600 µL de K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub> a 0.008 M, la mezcla reposo durante 10 min para su reacción. Los resultados fueron leídos con ayuda de un espectrofotómetro 720 nm, los resultados son expresados a expresados en mg equivalentes de catequina (mg EqC).

**Actividades Antioxidantes. 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH·)** Para determinar la capacidad de los antioxidantes, se empleó la metodología de Brand-Williams et al (21), colocando 0.5 mL de cada extracto a evaluar

y 2.5 mL del DPPH<sup>•</sup>, monitoreando el cambio de absorbancia cada 5 min a 515 nm por un periodo de 30 min, determinando el porcentaje de inhibición de radicales libres mediante la ecuación:

$$\% \text{Inhibición de radicales libres} = ((Ac-As)/Ac) \times 100$$

Donde:

Ac = Absorbancia del DPPH<sup>•</sup> antes de la reacción  
As = Absorbancia de la mezcla después de la reacción.

**Ácido 2,2, azino-bis (3-etilbenzotiazolin) (ABTS<sup>+</sup>):** La prueba se realizó de acuerdo con Re, et al. (22). Colocando 100 µL en 3 mL de reactivo ABTS<sup>+</sup> dejando reaccionar a temperatura ambiente por 6 m en la oscuridad, realizando la lectura a 734 nm.

Se calculó el porcentaje de la inhibición de ABTS<sup>+</sup> conforme a la siguiente ecuación.

$$\text{Inhibición de radicales libres} = ((Ac-As)/Ac) \times 100$$

Donde:

Ac = Absorbancia del DPPH<sup>•</sup> antes de la reacción  
As = Absorbancia de la mezcla después de la reacción.

**Actividad nematocida de los extractos in vitro.** Un total de 9 larvas por caja Petri fueron colocadas para evaluar los extractos de *D. ambrosioides*, *A. cepa* y *K. pinnata* en diferentes concentraciones 285 miligramos (mg)/ mL, 570 mg/mL y 855 mg/mL (27 por extracto), mientras que para cada elemento empleado de *O. oligacantha* se emplearon 27 por cada elemento. La exposición a los extractos fue evaluada a diferentes tiempos post exposición (pe), observándose a los 30 m; 1 h 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12h, 24 h, 48 h y 72 h. Para evaluar la mortalidad de los parásitos, se realizó el estímulo táctil, con el fin de identificar si los parásitos realizaban movimientos ondulatorios y se registró el tiempo en que ya no se presentó movimiento (23). Se emplearon 2 grupos control (27 por grupo), ambos fueron expuesto a una solución de tampón fosfato salino PBS, estable. Se realizaron 3 réplicas para cada concentración y grupo control, cada concentración fue trabajada por separado.

**Histopatología.** Después de las 72 hpe o al presentarse la totalidad de mortalidad de un determinado grupo de parásitos, expuestos a los extractos acuosos, todos los parásitos

fueron colocados en formaldehído al 10% de 24 a 48 h para su fijación y evitar cambios histológicos. Posteriormente, todos los parásitos fueron colocados en casets histológicos separados por el tipo de extracto usado y la concentración empleada, posteriormente fueron deshidratados, colocados en parafina, cortados y teñidos con hematoxilina-eosina. Los cortes fueron examinados con un microscopio óptico compuesto, las lesiones fueron descritas y fotografiadas (13).

**Análisis estadístico.** Las diferencias de mortalidad entre los grupos de trabajo fueron calculadas mediante el estadístico de Tukey de comparación múltiple, así como la prueba de chi-cuadrada ( $p \leq 0.05$ ) (24).

## RESULTADOS

**Compuestos bioactivos.** Se identificaron diferencias entre los extractos que fueron significativas ( $p < 0.05$ ), entre los extractos, las concentraciones mayores de polifenoles totales se obtuvieron de *K. pinnata*, cáscara y fruto completo de *O. oligacantha*. En concentración de flavonoides y taninos, se identificaron diferencias significativas semejantes para cada elemento ( $p < 0.05$ ). Con mayores concentraciones para *K. pinnata* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Compuestos bioactivos presentes en los extractos acuosos de *Dysphania ambrosioides*, *Allium cepa*, *Kalanchoe pinnata* y de semilla, pulpa, cascara y fruto completo de *Opuntia oligacantha*.

Planta	Polifenoles mg EAG/g	Flavonoides mg EQ/g	Taninos mg EC/g
D. ambrosioides	0.4431 ±0.0081 <sup>a</sup>	0.7806 ±0.003 <sup>a</sup>	ND
A. cepa	0.0366 ±0.0006 <sup>a</sup>	0.0233 ±0.006 <sup>a</sup>	ND
K. pinnata	23.3671 ±0.0127 <sup>c</sup>	10.8197 ±0.2556 <sup>c</sup>	6.5486 ±0.0056 <sup>c</sup>
<b><i>O. oligacantha</i></b>			
Semilla	1.9808 ±0.0876 <sup>a</sup>	0.4313 ±0.0872 <sup>a</sup>	0.0098 ±0.0007 <sup>a</sup>
Pulpa	15.8623 ±0.8621 <sup>b</sup>	1.5733 ±0.0987 <sup>b</sup>	0.7176 ±0.0865 <sup>b</sup>
Cascara	18.0154 ±0.4461 <sup>bc</sup>	4.8960 ±0.9876 <sup>b</sup>	0.3168 ±0.0986 <sup>b</sup>
Fruto completo	17.7619 ±0.6652 <sup>bc</sup>	5.3190 ±0.4720 <sup>c</sup>	0.8709 ±0.0865 <sup>b</sup>

Los resultados expresan la media ± desviación estándar. Diferentes letras en cada columna son diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada extracto.

**Actividad antioxidante.** La capacidad antioxidante por DPPH<sup>•</sup> fue directamente proporcional al contenido de compuestos bioactivos. *K. pinnata* y *O. oligacantha*, presentando mayor porcentaje de inhibición con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en comparación con *D. ambrosioides* y *A. cepa*. En la determinación de actividad antioxidante con ABTS los extractos con mayor porcentaje de inhibición fue la pulpa y el fruto completo del xoconostle presentando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a los otros extractos (Tabla 2). En ambos casos el xoconostle presenta un mayor porcentaje de inhibición para DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>+</sup>.

**Tabla 2.** Actividad antioxidante (DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>+</sup>) Compuestos bioactivos presentes en los extractos acuosos de *D. ambrosioides*, *A. cepa*, *K. pinnata*, semilla, pulpa, cascara y fruto completo de *O. oligacantha*.

Planta	% de inhibición DPPH <sup>•</sup>	% de inhibición ABTS <sup>+</sup>
<i>D. ambrosioides</i>	12.0476±0.00642 <sup>a</sup>	14.7661±0.0044 <sup>a</sup>
<i>A. cepa</i>	10.7143±0.0050 <sup>a</sup>	14.8095±0.0037 <sup>a</sup>
<i>K. pinnata</i>	59.8714±0.485 <sup>b</sup>	59.9381±0.0012 <sup>b</sup>
<b><i>O. oligacantha</i></b>		
Semilla	59.0714±0.8765 <sup>b</sup>	52.3815±0.4154 <sup>b</sup>
Pulpa	64.0333±0.1752 <sup>b</sup>	70±0.1862 <sup>c</sup>
Cascara	62.5865±1.9862 <sup>b</sup>	59.4286±1.1920 <sup>b</sup>
Fruto completo	62.5033±1.9732 <sup>b</sup>	67.1861±2.2515 <sup>b,c</sup>

Los resultados expresan la media ± desviación estándar. Diferentes letras en la columna son diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada extracto.

**Mortalidad.** Se colectaron un total de 243 parásitos vivos que fueron expuestos a los extractos acuosos. El porcentaje de mortalidad fue obtenido con base al número de nematodos que presentaron nula movilidad al ser estimulados. Los parásitos expuestos a *D. ambrosioides*, registro el 33% de mortalidad a las 48 horas post exposición (hpe). El extracto *K. pinnata* ocasiono la mortalidad del 100% a las 48 h. En el caso de *O. oligacantha* fruto completo, cascara y pulpa se inactivo al 66% de los parásitos a las 72 hpe mientras que la semilla presento un 33% de mortalidad a las 72 h (Tabla 3). En la exposición al extracto *A. cepa* y a la solución bufferada no se registró mortalidad en los parásitos. Con los resultados de la mortalidad acumulada de las larvas, se realizó la prueba de  $\chi^2$  y la prueba de Tukey para determinar las diferencias estadísticas obtenidas en los grupos. El análisis de los resultados indico que se presentaron 3

grupos estadísticamente diferentes, en donde las muertes ocasionadas por el extracto de *K. pinnata* y el fruto completo de *O. oligacantha* no presentaron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.5$ ).

**Tabla 3.** Mortalidad en nematodos de la familia Anisakidae, expuestos a extractos acuosos de epazote (*Dysphania ambrosioides*), cebolla (*Allium cepa*), siempre viva (*Kalanchoe pinnata*) y xoconostle (*Opuntia oligacantha*).

Vegetal/fruta	Concentración <sup>1</sup>	%Mortalidad	Tiempo de exposición
<i>D. ambrosioides</i>	855 mg/mL	33 <sup>bc</sup>	72 h
<i>A. cepa</i>	855 mg/mL	0 <sup>c</sup>	72 h
<i>K. pinnata</i>	855 mg/mL	100 <sup>a</sup>	48 h
<b><i>O. oligacantha</i></b>			
Semilla	570 mg/mL	22 <sup>bc</sup>	72 h
	855 mg/mL	33 <sup>bc</sup>	72 h
Pulpa	285 mg/mL	33 <sup>bc</sup>	72 h
	570 mg/mL	55 <sup>ab</sup>	72 h
Cáscara	855 mg/mL	66 <sup>a</sup>	72 h
	570 mg/mL	22 <sup>bc</sup>	72 h
Fruto completo	855 mg/mL	33 <sup>bc</sup>	72 h
	570 mg/mL	66 <sup>a</sup>	72 h
	855 mg/mL	66 <sup>a</sup>	72 h

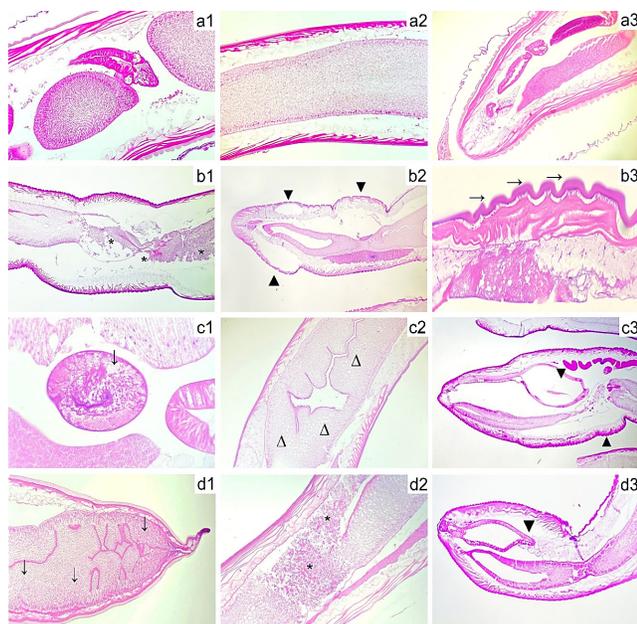
<sup>1</sup>285 mg/mL (concentración baja); 570 mg/mL (concentración media); 855 mg/mL (concentración alta)

**Histopatología.** Los parásitos expuestos a la solución PBS no presentaron cambios morfológicos (Figura 1 a1-a3). El extracto *A. cepa* y *D. ambrosioides* no presentaron cambios patológicos aparentes.

**Extracto de *K. pinnata*.** Se observó degeneración del epitelio intestinal multifocal en grado moderado a severo (Figura 1 b1); formación de vacuolas localizadas entre la cutícula y el músculo, de manera focal y multifocal y diferentes grados de severidad (Figura 1 b2), así como ondulaciones más acentuadas y degeneración del epitelio intestinal (Figura 1 b3).

**Extracto de *O. oligacantha*.** a) *Fruto completo:* Se observo la formación de vacuolas en gónadas (Figura 1 c1), licuefacción del epitelio intestinal y presencia de detritus celulares en intestino. Segmentación del tracto intestinal (Figura 1 c2). En la cutícula, se observaron ondulaciones acentuadas cerca de la región en donde se presentaron las lesiones en el tracto intestinal

(Figura 1 c3). *b) Cáscara y pulpa*: se presentaron áreas multifocales de licuefacción y degeneración del epitelio intestinal. *c) Semilla*: las lesiones se caracterizaron por la presentación de edema y vacuolización del epitelio intestinal (Figura 1 d1); una marcada ondulación de la cutícula, en las zonas cercanas a las lesiones intestinales, vacuolización y licuefacción del epitelio intestinal, degeneración, vacuolización y presencia de edema en faringe y esófago, así como vacuolización del aparato bucal (Figura 1 d3).



**Figura 1.** Comparación de hallazgos histopatológicos identificados en parásitos de la familia Anisakidae. **a1)** aparato reproductor, **a2)** intestino; y **a3)** extremo anterior del parásito (H.E. 10x). Siempre viva (*K. pinnata*) **b1)** Licuefacción del epitelio intestinal (0.5 mg/ml) (\*), **b2)** Edematización de la porción anterior (1.0 mg/ml) (▼); y **b3)** Ondulación marcada de la cutícula, hipodermis y musculatura (1.5mg/ml) (→) (H.E. 10x). Xoconostle (*O. joconostle*), fruto completo **c1)** Vacuolización, degeneración y necrosis de gónadas (0.5 mg/ml) (↓), **c2)** vacuolización del epitelio intestinal (1.0 mg/ml) (Δ); y **c3)** edema y formación de vacuolas entre la hipodermis y musculatura (1.5 mg/ml) (▼). Semilla **d1)** marcada vacuolización del epitelio intestinal (0.5 mg/ml) (↓), **d2)** licuefacción del epitelio intestinal (1.0 mg/ml) (\*); y **d3)** edematización y marcada vacuolización del esófago (▼) (H.E. 10x).

## DISCUSIÓN

Los parásitos de la familia Anisakidae son agentes ictiozoonóticos, debido a la generación de problemas en la salud pública a través de la presentación de diferentes cuadros clínicos, al ser consumidos en productos marinos en estado crudo o semicrudos (1). El uso de extractos vegetales como sustancias nematocidas contra esta familia, ha sido realizado previamente empleando diferentes tipos de plantas, entre las que se encuentra el árbol de té (*Malaleuca alternifolia*) (25); albahaca (*Nepeta Cataria*) (23), orégano (*Origanum compactum*) (15), entre otros; situación que ha demostrado que el uso de extractos vegetales son una opción viable para el control de las parasitosis. El empleo de la cuantificación de los compuestos fenolíticos en extractos vegetales proporciona información útil que puede ser empleada en el desarrollo de pesticidas, medicamentos y otras sustancias bioactivas (26), favoreciendo a la identificación de nuevos elementos vegetales que puedan ayudar al control de microorganismos, que puedan ser un problema para un determinado hospedero.

En el presente trabajo, se identificó que la mayor cantidad de compuestos fenólicos en el extracto de *K. pinnata*, obtuvo un valor similar al obtenido por Castro-Parra et al (27) que fue de  $22.98 \pm 1.10$  mg EAG/g de un extracto acuoso. Mientras que para *O. oligacantha* en la cáscara (18.0 EAG/g), fruto completo (17.7 EAG/g) y la pulpa (15.8 EAG/g) presentaron valores elevados; sin embargo, en un estudio realizado por Fernández-Luqueño et al (28) reportó un contenido superior de  $278 \pm 2.2$  mg EAG/100g de compuestos fenólicos en el extracto del fruto completo de *O. oligacantha*. La diferencia entre los valores puede estar relacionada con el tipo de extracto y el modo de preparación, ya que en extractos acuosos se obtiene una menor concentración, a diferencia de aquellos obtenidos del metanol, que es tóxico (17).

El contenido de flavonoides en el caso de *K. pinnata* fue de 10.8 EQ/g, una concentración mayor a diferencia de lo reportado por Báez et al (29), que obtuvo un  $5.07 \pm 0.05$  mg EQ/g, empleando una especie diferente del mismo género. Los extractos del fruto completo de *O. oligacantha* presentaron una concentración de 5.31 EQ/g, resultados que fueron similares a los obtenidos Fernández-Luqueño et al (28), quien a partir de una variedad de *O. oligacantha* obtuvo una concentración de  $4.77 \pm 0.10$  mg CE

100 g<sup>-1</sup> del fruto completo. Estas variaciones están relacionadas con las diferentes especies de plantas y en los compuestos fenólicos (30,31,32).

La concentración de taninos en *K. pinnata* fue mayor (6.54 EC/g) en comparación con los otros extractos, previamente se han reportado altas concentraciones de taninos como parte de sus compuestos bioactivos (33). Por otro lado, la concentración de taninos a partir del *O. oligacantha* fue de 0.00 hasta 0.87 EC/g, valores menores en comparación con lo previamente reportado por Medina-Pérez et al (34), quien obtuvo 71.067 mg CATE/100 g. La presencia de los compuestos fenólicos favorece la captación del radical DPPH•, razón por la cual se consideró conveniente evaluar la actividad antioxidante de los extractos, así como el ensayo de ABTS<sup>+</sup> (35). La actividad antioxidante por DPPH• fue mayor en los extractos de *K. pinnata* y de *O. oligacantha* comparado con los extractos vegetales de *D. ambrosioides* y *A. cepa*.

Osorio-Esquivel et al. (36) obtuvo un porcentaje de DPPH• en *O. oligacantha* en fruta entera de 51.70±0.55%, valores similares a los obtenidos en este estudio. Báez et al (29) determinaron la actividad antioxidante de extractos etanólicos de *K. daigremontiana* pertenecientes al mismo género y reportaron porcentajes de inhibición de 56.87% resultado similar a los obtenidos en este estudio. Hernández-Fuentes et al (30) analizó la actividad antioxidante de distintas variedades de frutos de xoconostle identificando a *O. oligacantha* como la especie con mayor actividad antioxidante, resultados que concuerdan con este estudio.

Los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante, se correlaciona fuerte y positivamente con el número de grupos hidroxilados a los anillos aromáticos. Así como la posición orto y para de los grupos hidroxilados mejoran la actividad antioxidante y antirradical de los compuestos fenólicos (31). La alta actividad antioxidante demostrada por los extractos de *K. pinnata* y *O. oligacantha* (pulpa y fruto completo) se debe a su gran contenido de sustancias antioxidantes (36), elementos que posiblemente estén relacionados con la presentación de la mortalidad en los nematodos.

En *O. oligacantha* los principales compuestos bioactivos son en su mayoría ácido ferúlico, quercetina, ácido 4-hidroxibenzoico, apigenina, ácido cafeico y kaempferol (16,32); mientras que para *K. pinnata* posee compuestos fenólicos

y flavonoides como rutina, quercetina, luteolina, kaempferol y taninos (33) entre otros.

Estos compuestos fenólicos y flavonoides pueden actuar a nivel de sistema nervioso central de la Clase Insecta y del Filo Nematoda, así como también los taninos también pueden ocasionar un efecto tóxico (17). Los extractos acuosos de *K. pinnata* y *O. oligacantha* (fruto completo, cáscara y pulpa) ocasionaron un mayor porcentaje de mortalidad en nematodos de la familia Anisakidae, del 100% a las 48 hpe y del 66% a las 72 hpe, respectivamente, en concentraciones de 855 mg/ml. En concentración de 285 mg/mL de todos los elementos vegetales no ocasionaron mortalidad, sin embargo, para el caso de la pulpa de *O. oligacantha* ocasiono el 33% de mortalidad a las 72 h. Otro caso particular, fue el de *D. ambrosioides*, que ocasiono un 33% de mortalidad a las 48 hpe en la concentración más alta.

El empleo del monoterpenoide conocido como geraniol, se ha empleado como un elemento nematocida en concentraciones de 250 µg/ml a las 2 hpe, ocasiono la muerte del 10% de las larvas de la familia Anisakidae del género *Contraecum* spp; mientras que a las 48 hpe el 90% de las larvas ya estaban muertas (37). Otros estudios, han empleado peppermint (*Mentha piperita*) para determinar su capacidad nematocida, en este caso a través del empleo de aceites esenciales expuesto a larvas del género *Anisakis* spp., ocasionando el 83% de mortalidad en un periodo de 8 h post exposición (hpe), en concentraciones de 187.5 µl y hasta un 100% de mortalidad a las 4 hpe en concentraciones de 250 µl (38). En la presente investigación no se realizó la determinación del género parasitario, sin embargo, los porcentajes de mortalidad y lesiones histopatológicas identificadas fueron consistentes con el grupo y réplicas realizadas a la exposición de los extractos acuosos, obteniendo un porcentaje de mortalidad elevado para *K. pinnata* y *O. oligacantha*, en comparación con *D. ambrosioides* y *A. cepa*.

En estudios previos que han empleado extractos para demostrar su actividad nematocida, indican que las concentraciones, el tiempo de exposición, la presentación del extracto (acuoso y/o aceite); el género y la especie de la familia Anisakidae pueden influir en los porcentajes de mortalidad generados a la exposición (15), como es en el caso del presente trabajo, ya que los diferentes compuestos y sus concentraciones ocasionaron en los nematodos diferentes porcentajes de mortalidad

al ser empleados como extractos acuosos, es posible que el empleo de concentraciones más elevadas de *O. oligacantha* (fruto completo, cáscara y pulpa) pueda incrementar el porcentaje de mortalidad, sin embargo es necesario la realización de estudios adicionales para corroborar esta hipótesis.

En el caso de la familia Anisakidae, su morfología general se caracteriza por poseer un cuerpo alargado y cilíndrico; extremos en forma de punta, en el extremo anterior presenta 3 labios ventrolaterales con la presencia de un diente cuticular; en ambos extremos, se presentan ondulaciones naturales del parásito, que se caracterizan por ser cortas y estar localizadas entre la cutícula y la musculatura del parásito (1) (Figura 1a3), sin embargo, la presentación de abultamientos marcados (Figura 1 b2, c3 y d3) demuestran que el daño ocasionado a la exposición de los extractos acuosos, ocasiona la deformación histológica del parásito, alterando la cutícula y la musculatura (Figura 1 b2) al incrementar el espacio entre estas dos capas, afectando la absorción de nutrientes y el movimiento.

Los parásitos expuestos a las diferentes concentraciones de los extractos acuosos de *K. pinnata*, la semilla y el fruto completo de *O. oligacantha*, ocasionaron en los parásitos hinchazón, edema, vacuolización entre la hipodermis y la cutícula; destrucción del tracto intestinal, una marcada presentación de ondulaciones; así como vacuolización de los tejidos internos, edematización y alteración del epitelio intestinal. Los daños histológicos presentados a partir de la exposición de componentes vegetales, se explica a partir de la interacción de los componentes bioactivos con la cutícula del parásito; la interacción de las glicoproteínas de la cutícula con los antioxidantes, ocasionan su oxidación y acumulación de proteínas sobre la superficie del parásito, lo que alterando su osmosis; favoreciendo la hinchazón, alteración del metabolismo, absorción de nutrientes y finalmente ocasionando la muerte (8). Otras alteraciones que se han reportado como cambios en los parásitos, consisten en la formación de espinas, rugosidades o deformaciones marcadas en la cutícula; para aquellos parásitos que de forma natural no poseen estructuras como espinas, velos y rugosidades, lo que altera su morfología (39). Sin embargo, en el presente trabajo no se observó la presencia de estructuras adicionales o deformación de la estructura que favorezca la aparición de elementos morfológicos ajenos a la morfología general descrita en el parásito.

Así mismo, algunos antioxidantes son capaces de ocasionar lesiones en la boca, el tracto gastrointestinal y ano de los parásitos expuestos, sin embargo, el daño ocasionado en estas áreas puede presentarse en diferentes grados de severidad, sin forzosamente llegar a ocasionar la muerte de los parásitos, como en el caso de la manzanilla de Castilla (*Matricaria chamomilla*) (39). Aunque los mecanismos por el cual los antioxidantes ejercen afecto sobre los nematodos no están completamente definidos, se ha hipotetizado que los antioxidantes son capaces de generar daño al sistema nervioso de los parásitos, presente en forma de anillo y que al dañarse ocasiona parálisis, además de la interferir en la absorción de la glucosa a partir del bloqueo de los receptores post sinápticos (8). Los resultados obtenidos demuestran que las lesiones se presentaron principalmente en el epitelio intestinal en donde se identificó la presencia degeneración, licuefacción, segmentación y vacuolización, así como la vacuolización de las células que conforman la gónada; estas lesiones presentan una relevancia importante debido a la afección de la parte del sistema digestivo y reproductivo del parásito.

No se identificaron reportes o investigaciones previas que refieran sobre el uso *O. oligacantha* como elemento nematocida sobre larvas de la familia Anisakidae, por lo que este el primer reporte en donde se evidencia la capacidad nematocida y las alteraciones histológicas ocasionadas por la exposición de los parásitos a extractos acuosos de *K. pinnata* y *O. oligacantha*

En conclusión, los extractos acuosos de la planta *K. pinnata* y del fruto *O. oligacantha*, poseen una actividad nematocida gracias a los compuestos bioactivos y actividad antioxidante, que ocasionan la mortalidad de los parásitos y su alteración histológica.

### Conflicto de interés

El equipo científico manifiesta no tener conflictos de interés.

### Agradecimientos

El trabajo de investigación fue realizado en el Instituto de ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Agradecemos al Maestro en Ciencias Lucio Castro Parra por el desarrollo del trabajo de investigación.

## Financiación

Este proyecto no contó con financiamiento externo y se realizó con recursos aportados por los propios investigadores

## Contribución de autores

Conceptualización (RGCM, APZV). Investigación (RGCM, APZV, FRGA). Metodología (RGCM, LCP). Escritura del borrador (APZV, FRGA). Escritura, revisión y edición (APZV).

## REFERENCIAS

1. Ángeles-Hernández JC, Gómez-de Anda FR, Reyes-Rodríguez NE, Vega-Sánchez V, García-Reyna PB, Campos-Montiel RG, et al. Genera and species of the Anisakidae family and their geographical distribution. *Animals (Basel)*. 2020; 10:2374. <https://doi.org/10.3390/ani10122374>
2. Pekmezci GZ. Occurrence of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) Larvae in Imported John Dory (*Zeus faber*) from Senegalese Coast Sold in Turkish Supermarkets. *Acta Parasitol*. 2019; 64:582–586. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00078-0>
3. Castellanos JA, Tangua AR, Salazar L. Anisakidae nematodes isolated from the flathead grey mulletfish (*Mugilcephalus*) of Buenaventura, Colombia. *IJP-PAW*. 2017; 6:265–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.08.001>
4. Tokiwa T, Kobayashi Y, Ike K, Morishima Y, Sugiyama H. Detection of Anisakid Larvae in Marinated Mackerel Sushi in Tokyo, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2018; 71:88–89. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2017.280>
5. Amir A, Ngui R, Ismail WH, Wong KT, Ong JS, Lim YA, Lau YL, Mahmud R. Anisakiasis Causing Acute Dysentery in Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2016; 95:410–412. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0007>
6. Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. Allergic reactions to *Anisakis* found in fish. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014; 14:455. <https://doi.org/10.1007/s11882-014-0455-3>
7. Cabrera-Carrión JL, Jaramillo-Jaramillo C, Dután-Torres F, Cun-Carrión J, García PA, Astudillo LR. Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. en función de su edad y altura. *Bioagro*. 2017; 29(1):53-60. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85750098006>
8. Bernal-Peralta A, Camargo-Silva A. Efecto in vitro de los taninos condensados de las plantas *Leucaena Leucocephala*, *Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophylla* sobre huevos y larvas (L3) de nematodos gastrointestinales de ovinos [Master Tesis]. Bogotá, Colombia: Universidad de la Salle; 2016.
9. Barros L, Pereira E, Calhella RC, Dueñas M, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *JFF*. 2013; 5(4):1732-1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
10. Orengo K, Maitho T, Mbaria JNM, Kitaa J. In vitro anthelmintic activity of *Allium sativum*, *Allium cepa* and *Jatropha curcas* against *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*. *Afr. J. Pharm Pharmacol*. 2016; 10:465-471. <https://doi.org/10.5897/AJPP2016.4551>
11. Alves CV, Santiago SRS da S, Soares ER, Almeida RA de, Lima BR de, Carvalho CSM de, Santiago PAL. Determination of the chemical profile extracts obtained from *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers native of municipality Tabatinga-AM. *RSD*. 2022; 11(4):e1411427103. <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/27103>
12. Trujillo W, Betancourt VHG. Plantas medicinales utilizadas por tres comunidades indígenas en el noroccidente de la Amazonía (Colombia). *Mundo Amazon*. 2011; 2:283-306. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/imanimundo/article/view/14110>

13. Reyes-Rodríguez NE, Vega-Sánchez V, Gómez-de-Anda FB, García-Reyna PB, González R, Zepeda-Velázquez AP. Species of *Anisakidae* nematodes and *Clinostomum* spp. Infecting lisa *Mugil curema* (Mugilidae) intended for human consumption in Mexico. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2020; 29(1):e017819. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612020002>
14. Noga EJ. Fish disease, diagnosis, and treatment. 2nd ed. USA: Wiley-Blackwell; 2010.
15. López V, Cascella M, Benelli G, Maggi F, Gómez-Rincón C. Green drugs in the fight against *Anisakis simplex*—larvicidal activity and acetylcholinesterase inhibition of *Origanum compactum* essential oil. *Parasitol Res.* 2018; 117(3):861-867. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5764-3>
16. Medina-Pérez G, Zaldívar-Ortega AK, Cenobio-Galindo ADJ, Afanador-Barajas LN, Vieyra-Alberto R, Estefes-Duarte JA, Campos-Montiel RG. Antidiabetic Activity of Cactus Acid Fruit Extracts: Simulated Intestinal Conditions of the Inhibitory Effects on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Applied Sciences.* 2019; 9(19):4066. <https://doi.org/10.3390/app9194066>
17. Soto M, Rosales M. Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas, Cienc Tecnol.* 2016; 18(4):701-714. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
18. Singlenton VL, Rudolf O, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folincioalceu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299:152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
19. Tommasi F, Paciolla C, Arrigoni O. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiol Plant.* 1999; 105(2):193-198. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.105202.x>
20. Price ML, Larry GB. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J Agric Food Chem.* 1977; 25:1268-1273. <https://doi.org/10.1021/jf60214a034>
21. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol.* 1995; 28(1):25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
22. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(9-10):1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
23. Giarratana F, Muscolino D, Ziino G, Lo Presti V, Rao R, Chiofalo V, Panebianco A. Activity of Catmint (*Nepeta cataria*) essential oil against *Anisakis* spp larvae. *Tropical Biomed.* 2017; 34(1):22-31. <https://www.msptm.org/files/Vol34No1/022-031-Giarratana-F.pdf>
24. Zepeda-Velázquez AP, Vega-Sánchez V, Ortega-Santana C, Rubio-Godoy M, de Oca-Mira DM, Soriano-Vargas E. Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas* sp. in immersion experimentally- infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Acta Tropica.* 2017; 169: 22–124. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.013>
25. Gómez-Rincón C, Langa E, Murillo P, Valero MS, Berzosa C, López V. Activity of tea tree (*Maleulca alternifolia*) essential oil against L3 larvae of *Anisakis simplex*. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:549510. <https://doi.org/10.1155/2014/549510>
26. Suzuki, T. y Yamato, S. Mode of action of piperovatine, an insecticidal piperamide isolated from *Piper piscatorum* (Piperaceae), against voltage-gated sodium channels Neurotoxicology. 2018; 69:288-295. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.07.021>

27. Castro-Parra L, Reyes-Munguía A, Aguirre-Álvarez G, Zepeda-Velázquez AP, Mejía-Islas AK, Almaraz-Buendía I, Espino-García JJ, Campos-Montiel RG. Efecto de los extractos acuosos de *Dysphania ambrosioides* (epazote) y *Allium cepa* (cebolla) sobre nematodos de la familia Anisakidae encontrados en peces de *Mugil curema* (Lisa). Academia Journals. 2020; 12(7):347-351. <https://static1.squarespace.com/static/55564587e4b0d1d3fb1eda6b/t/5f935efc1d206d227a5067ea/1603493649132/Tomo+03+-+Memorias+del+Congreso+Internacional+AJ+Hidalgo+2020.pdf>
28. Fernández-Luqueño F, Medina-Pérez G, Pérez-Soto E, Espino-Manzano S, Peralta-Adauto L, Pérez-Ríos S, Campos-Montiel R. Bioactive Compounds of *Opuntia* spp. Acid Fruits: Micro and Nano-Emulsified Extracts and Applications in Nutraceutical Foods. Molecules. 2021; 26(21):6429. <https://doi.org/10.3390/molecules26216429>
29. Báez M, Torres EI, Gruszycki AE, Alba DA, Valenzuela GM, Gruszycki MR. Actividad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidroalcohólicos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier. Rev Colomb Cienc Quim Farm. 2021; 50(1):86-99. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v50n1.95450>.
30. Hernández-Fuentes AD, Trapala-Islas A, Gallegos-Vásquez C, Campos-Montiel RG, Pinedo-Espinoza JM, Guzmán-Maldonado SH. Physicochemical variability and nutritional and functional characteristics of xoconostles (*Opuntia* spp.) accessions from Mexico. Fruits. 2015; 70:109-116. <https://doi.org/10.1051/fruits/2015002>.
31. Bogucka-Kocka A, Zidorn C, Kasprzycka M, Szymczak M, Szewczyk K. Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoë* species. Saudi J Biol Sci. 2018; 25(4):622-630. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.037>
32. Cenobio-Galindo AJ, Díaz-Monroy G, Medina-Pérez G, Franco-Fernández MJ, Ludeña-Urquizo FE, Vieyra-Alberto R, Campos-Montiel RG. Multiple Emulsions with Extracts of Cactus Pear Added in A Yogurt: Antioxidant Activity, In Vitro Simulated Digestion and Shelf Life. Foods. 2019; 8(10):429. <https://doi.org/10.3390/foods8100429>
33. Kolodziejczyk-Czepas J, Stochmal A. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use Phytochem Rev. 2017; 16(6):1155-1171. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9525-1>
34. Medina-Pérez G, Peralta-Adauto L, Afanador-Barajas L, Fernández-Luqueño F, Pérez-Soto E, Campos-Montiel R, Peláez-Acero A. Inhibition of Urease, Elastase, and  $\beta$ -Glucuronidase Enzymatic Activity by Applying Aqueous Extracts of *Opuntia oligacantha* CF Först Acid Fruits: In Vitro Essay under Simulated Digestive Conditions. Appl Sci. 2021; 11:7705. <https://doi.org/10.3390/app11167705>
35. Sekeroglu N, Senol FS, Orhan IE, Gulpinar AR, Kartal M, Sener B. In vitro prospective effects of various traditional herbal coffees consumed in Anatolia linked to neurodegeneration. Int Food Res J. 2012; 45:197-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.008>
36. Osorio-Esquivel O, Ortiz-Moreno A, Garduño-Siciliano L, Alvarez VB, Hernández-Navarro MD. Antihyperlipidemic effect of methanolic extract from *Opuntia joconostle* seeds in mice fed a hypercholesterolemic diet. Plant Foods Hum Nutr. 2012; 67(4):365-70. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0320-2>
37. Barros LA, Yamanaa AR, Silva LE, Vaneler MLA, Braum DT, Bonaldo J. In vitro larvicidal activity of geraniol and citronellal against *Contraecaecum* sp (Nematoda: Anisakidae). Braz J Med Biol Res. 2009; 42(10):918-20. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009005000023>.
38. Romero MC, Navarro MC, Martín-Sánchez J, Valero A. Peppermint (*Mentha piperita*) and albendazole against Anisakiasis in an animal model. Trop Med Int Health. 2014; 19(12):1430-6. <https://doi.org/10.1111/tmi.12399>
39. Romero MC, Valero A, Martín-Sánchez J, Navarro-Moll MC. Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil anisakiasis. Phytomedicine. 2012; 19(6):520-523. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.02.005>.