

Acción ovicida *in vitro* del extracto hidro-alcohólico crudo de la semilla de *Pouteria sapota* (mamey colorado) contra huevos de *Haemonchus contortus*. Primer reporte

Anay Delgado**, Olimpia Núñez**, Lester Aguilera-Valle**, Danays Palacio*, Josmel Salas-Romero*, Gisell Bebert**, Misleidi González*, Noemí Fernández*

* Departamento de Veterinaria, Universidad de Camagüey, Cuba

** Departamento de Morfofisiología, Universidad de Camagüey, Cuba

lester.aguilera@reduc.edu.cu

RESUMEN

El extracto alcohólico crudo de la semilla de *Pouteria sapota* se usa tradicionalmente en Cuba como pediculicida. Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto hidro-alcohólico crudo de la semilla de *Pouteria sapota* sobre huevos de *Haemonchus contortus*. Para ello se realizó un test de eclosión de huevos donde se probaron diferentes concentraciones del extracto desde 0,08 hasta 5,32 mg/mL. En comparación con el grupo control negativo se observó un efecto ovicida significativo ($P < 0,05$) con 100 % de inhibición de la eclosión a la mayor concentración empleada (5,32 mg/mL). Estos resultados sugieren que *P. sapota* posee efecto antihelmíntico contra *H. contortus*.

Palabras clave: antihelmíntico, test de eclosión de huevos, *Pouteria sapota*, *Haemonchus contortus*, fitoterapia

Pouteria sapota Against *Haemonchus contortus*. First Report

ABSTRACT

The hydro-alcoholic extract of the seed of *Pouteria sapota* is traditionally used as insecticide against louses. This study was carried out to evaluate the *in vitro* effect of this plant against the eggs of the parasitic nematode of small ruminants *Haemonchus contortus*. To do that an egg hatching assay was made. Compared to the negative control, significant ovicidal effects were observed ($P < 0.05$) with a hatching inhibition of 100 % for the highest concentration (5.32 mg/mL). The result suggests that *P. sapota* possess anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*.

Key words: anthelmintic, egg hatching assay, *Pouteria sapota*, *Haemonchus contortus*, phytotherapy

INTRODUCCIÓN

El parasitismo por nematodos gastrointestinales continúa siendo una de las principales amenazas para la crianza de pequeños rumiantes en países tropicales. *Haemonchus contortus* es una de las especies más significativas debido a su alta prevalencia y patogenicidad (Ferreira, Castro, Chagas, França y Belebóni, 2013). El control de estos parásitos ha dependido de la administración de antihelmínticos sintéticos. Sin embargo, el desarrollo de poblaciones resistentes a la mayoría de las drogas ha estimulado la búsqueda de estrategias de control alternativas como el uso de plantas bioactivas ricas en metabolitos secundarios con actividad antiparasitaria (Molento *et al.*, 2011).

El embrión de la semilla de mamey colorado (*Pouteria sapota*) se usa frecuentemente por la población en Camagüey y el resto de Cuba para preparar una solución alcohólica con propiedades pediculicidas (Roig, 1988), pero a pesar de los buenos resultados es un uso empírico sin ninguna formulación, por lo cual el objetivo del presente trabajo consiste evaluar la actividad ovicida del extracto hidro-alcohólico de la semilla de *Pouteria sapota* contra huevos de *Haemonchus contortus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del extracto

Se tomaron 20 g de embrión de semillas previamente molidos y secados al sol durante 8 h y se mezclaron en un matraz con 100 mL de agua y 100 mL de etanol. La solución se colocó en una zaranda toda la noche para facilitar la dilución de los principios activos. Posteriormente, se procedió a la filtración con un filtro Whatman de 0,45 μm . El filtrado obtenido fue utilizado para los experimentos. La concentración fue calculada mediante la desecación en la estufa de 100 μL previamente pesados.

Test de eclosión de huevos

El test *in vitro* de la eclosión de huevos se llevó a cabo según la metodología descrita por Coles *et al.* (1992). Los huevos fueron colectados de las heces de un ovino monoinfectado con *Haemonchus contortus*, la suspensión de huevos fue distribuida en una placa de 24 pocillos (0,5 mL por pocillo) y se mezcló con el mismo volumen del extracto de la planta. Cada concentración evaluada y los controles negativo (agua destilada) y positivo (albendazol) contaron con cinco réplicas.

Después de 48 h de incubación a 27° C la eclosión fue detenida por la adición de solución de Lugol al 3 %. El por ciento de inhibición de la eclosión se determinó usando la siguiente razón: $(h/h+L1) \times 100$, donde *h* es el número de huevos y *L1* el número de larvas.

Análisis estadístico

La media de los por cientos de inhibición de la eclosión de huevos de los grupos tratados y el control fue analizada mediante ANOVA de un factor y comparada usando el Test de comparación múltiple de Tukey (5 %). Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico GraphPadPrism 5.00.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del test de eclosión de huevos indicaron una actividad ovicida significativa del extracto hidro-alcohólico crudo de la semilla de *P. sapota* (ver Tabla). Las primeras cinco diluciones (5,32; 3,04; 1,52; 0,38 y 0,23 mg/mL) inhibieron significativamente ($P < 0,05$) la eclosión de los huevos de *H. contortus*. Con el control positivo (albendazol 0,032 mg/mL) la inhibición de la eclosión fue del 100 %, mientras en el grupo control fue tan sólo del 9,42 %.

Tabla. Efecto ovicida de *P. sapota* sobre *H. contortus*

Tratamiento	Concentración (mg/mL)	Por ciento de inhibición de la eclosión de huevos (media \pm D.T)
Control (-)	-	9,4240 \pm 3,27
Control (+)	0,032	100 a
<i>P. sapota</i>	5,32	100 a
<i>P. sapota</i>	3,04	99,02 \pm 0,69*
<i>P. sapota</i>	1,52	80,11 \pm 12,04 *
<i>P. sapota</i>	0,38	55,84 \pm 13,64 *
<i>P. sapota</i>	0,23	44,29 \pm 12,59*
<i>P. sapota</i>	0,08	25,81 \pm 7,36

* $P < 0,05$

El análisis de regresión no lineal indicó la existencia de una respuesta dosis-dependiente (ver figura) con $R^2 = 0,91$; IC50 = 0,5 mg/mL con el 95 % de los intervalos de confianza de 0,26-1,03.

El presente trabajo constituye el primer reporte del efecto ovicida *in vitro* de un extracto de la semilla de *Pouteria sapota* sobre *Haemonchus contortus*. Como se puede apreciar, incluso a concentraciones tan bajas como 0,23 mg/mL, se obtuvo efecto ovicida significativo, lo cual resalta al ser comparado con otros estudios de plantas medicinales donde, por ejemplo, 7,1 mg/mL de extracto acuoso de *Annona senegalensis* solo inhibió el 11,5 % de los huevos (Alawa *et al.*, 2003) y el extracto metanólico de *Spigelia anthelmia* indujo 97,4 % de inhibición de la eclosión, pero a concentración de 50 mg/mL (Assis *et al.*, 2003), mientras el extracto de *P. sapota* logró una inhibición de 99 % a concentraciones de 3,04 mg/mL.

El test de eclosión de huevos es un ensayo *in vitro* muy usado (Hernández-Villegas *et al.*, 2011; Botura *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2013) para evaluar la actividad antihelmíntica potencial de productos naturales. Los resultados en la inhibición de la eclosión de huevos se correlacionan positivamente con el efecto antihelmíntico *in vivo*, aunque sustancias y compuestos que son efectivos *in vitro* no necesariamente funcionan igual *in vivo*. Este tipo de divergencias en los resultados podría atribuirse a factores claves relacionados con la biodisponibilidad y también con la farmacología de tales compuestos o sustancias en el organismo y destrucción de los compuestos activos por los microorganismos del rumen o del intestino (Peneluc *et al.*, 2009).

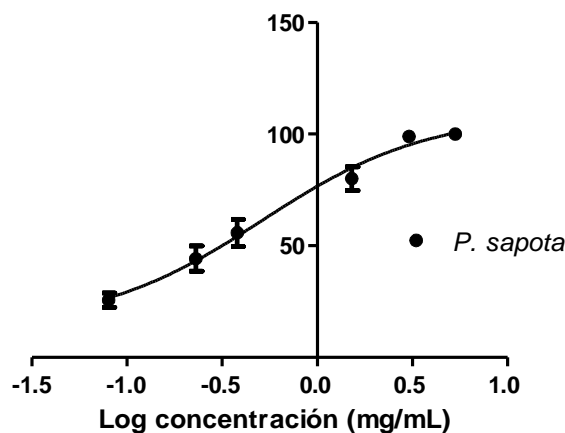


Figura. Curva de la respuesta dosis-dependiente del test de inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* con el extracto hidroalcohólico crudo de *P. sapota*

Según la literatura esta planta posee compuestos químicos tales como cumarinas, flavonoides y glucósidos cianogénicos (Silva, Simeoni y Silveira, 2009; Carriço *et al.*, 2014), los cuales son responsables de los efectos antiparasitarios de otras plantas (Hernández-Villegas *et al.*, 2011 y Botura *et al.*, 2013).

La eclosión de los huevos de nematodos se inicia por estímulos ambientales que provocan la liberación por parte de la larva de enzimas tales como proteasas, lipasas y quitinasas las cuales tienen la función de degradar la membrana del huevo (Mansfield *et al.*, 1992). Los compuestos flavonoides podrían actuar inhibiendo la actividad de estas enzimas. El efecto antiparasitario de los flavonoides se atribuye a cambios en la actividad de las enzimas y/o procesos metabólicos de los parásitos (Kerboeuf *et al.*, 2008).

Las cumarinas son conocidas por poseer una amplia variedad de actividades biológicas. Wang *et al.* (2008) mostró evidencias de las actividades nematocidas de las cumarinas contra dos especies de nematodos parásitos de plantas (*Bursaphelenchus xylophilus* y *Panagrellus redivivus*).

Powers *et al.* (1982) diseñaron las directrices para la evaluación *in vitro* de la eficacia antihelmíntica de las drogas; de acuerdo a estos autores, los agentes antihelmínticos eficaces deben inhibir la eclosión de los huevos en más del 90 % y cuando la inhibición es entre el 80 y 90 % debe considerarse moderadamente eficaces. Así que el resultado obtenido con el extracto de *P. sapota* contra *H. contortus* permite clasificarlo como eficaz.

Finalmente el problema del tratamiento clásico de las infecciones por nematodos usando drogas antihelmínticas convencionales va más allá de la resistencia antihelmíntica y del aumento en los costos de producción dado que no hay evidencia clara de que los antihelmínticos sintéticos no dejen residuos en la carne que puedan constituir peligro potencial para la salud pública (Rodríguez, Athayde, Rodríguez, Silva y Faria, 2007).

De ahí que la identificación de nuevos extractos de plantas como *P. sapota* puede contribuir al desarrollo de productos fitoterapéuticos más baratos, seguros y accesibles, y que provean menor riesgo de resistencia que el arsenal terapéutico actualmente usado.

CONCLUSIONES

El extracto mostró actividad ovicida *in vitro*, lo que constituye un paso previo a posteriores estudios *in vivo*.

REFERENCIAS

- ALAWA, C. B.; ADAMU, A. M.; GEFU, J. O.; AJANSUI, O. J.; ABDU, P. A.; CHIEZEY, N. P. y BOWMAN, D. D. (2003). *In vitro* Screening of Two Nigerian Medicinal Plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for Anthelmintic Activity. *Veterinary Parasitology*, 113 (1), 73-81.
- ASSIS, L. M.; BEVILAQUA, M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S.; COSTA, T. C.; SOUZA, A. L. (2003). Ovicidal and Larvicidal Activity *In Vitro* of *Spigelia Anthelmia* Linn. Extracts on *Haemonchus Contortus*. *Veterinary Parasitology*, 117 (1), 43-49.
- BOTURA, M.; DOS SANTOS, J. D.; DA SILVA, G. D.; DE LIMA, H. G.; DE OLIVEIRA, J. V. y DE ALMEIDA, M. A. (2013). *In Vitro* Ovicidal and Larvicidal Activity of Agave Sisalana Perr. (Sisal) on Gastrointestinal Nematodes of Goats. *Veterinary Parasitology*, 192 (1), 211-217.
- CARRIÇO, C.; PINTO, Z.; DUTOK, C.; CAETANO, R.; PESSANHA, R.; CHIL-NUÑEZ, I. y QUEIROZ, M. (2014). Biological Activity of *Pouteria Sapota* Leaf Extract on Post-Embryonic Development of Blowfly *Chrysomya Putoria* (Wiedemann, 1818) (Calliphoridae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 24 (3), 304-308.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, H. M.; GREETS, S.; KLEI, T. R. y TAYLOR, M. A. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) Methods for the Detection of Anthelmintic Resistance in Nematodes of Veterinary Importance. *Veterinary Parasitology*, 44 (1), 35-44.
- FERREIRA, L. E.; CASTRO, M. N.; CHAGAS, C. S.; FRANÇA, S. C. y BELEBONI, R. O. (2013). *In Vitro* Anthelmintic Activity of Aqueous Leaf Extract of *Annona Muricata* L. (Annonaceae) Against *Haemonchus Contortus* from Sheep. *Experimental Parasitology*, 134 (3), 327-332.
- HERNÁNDEZ-VILLEGAS, M. M.; BORGES-ARGÁEZ, R.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R. I.; TORRES-ACOSTA, F. J.; MÉNDEZ-GONZÁLEZ, M. y CÁCERES-FARFAN, M. (2011). Ovicidal and Larvicidal Activity of the Crude Extracts from *Phytolaccia Cosandra* Against *Haemonchus Contortus*. *Veterinary Parasitology*, 179 (1), 100-106.
- KERBOEUF, D.; RIOU, M. y GUÉGNARD, F. (2008). Flavonoids and Related Compounds in Parasitic Disease Control. *Mini Rev. Med. Chem.*, 8 (2), 116-128.
- MANSFIELD, L. S.; GAMBLE, H. R. y FETTERER, R. H. (1992). Characterization of the Eggshell of *Haemonchus Contortus*-I. Structural Components. *Comp. Biochem.*, 103 (3), 681-686.
- MOLENTO, M.; FORTES, F.; PONDELEK, D.; BORGES, F.; CHAGAS, A. y TORRES-ACOSTA, J. F. (2011). Challenges of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. *Veterinary Parasitology*, 180 (1), 126-132.
- PENELUC, T.; DOMINGUES, L. F.; ALMEIDA, G. N.; Ayres, M. C.; Moreira, E. L. y Cruz, A. C. (2009). Anthelmintic Activity of Aqueous Extract of *Zanthoxylum Rhoifolium* Lam. Leaves (Rutaceae). *Revista Brasileira Parasitologia Veterinaria*, 18 (1), 43-48.
- POWERS, K. G.; WOOD, I. B.; ECKERT, J.; GIBSON, T. y SMITH, H. J. (1982). World Associations of the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelmintics in Ruminants (Bovine and Ovine). *Veterinary Parasitology*, 10 (4), 265-284.
- RODRÍGUEZ, A. B.; ATHAYDE, A. C.; RODRÍGUEZ, O. G.; SILVA, W. W. y FARIA, E. B. (2007). Evaluation of the Efficacy of Anthelmintics to Control Gastrointestinal Nematodes in Goats Raised in the State of Paraíba. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 27 (4), 162-166.
- ROIG, J. T. (1988). *Plantas Medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. La Habana, Cuba: Editorial Científico Técnica.
- SILVA, C.; SIMEONI, L. y SILVEIRA, D. (2009). Genus *Pouteria*: Chemistry and Biological Activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19 (2A), 501-509.
- WANG, X. B.; LI, G. H.; LI, L.; ZHENG, L. J.; HUANG, R. y ZHANG, K. Q. (2008). Nematicidal Coumarins from *Heracleum candicans* Wall. *Nat. Prod. Res.*, 22 (8), 66-671.

Recibido: 22-9-2015

Aceptado: 1-10-2015