

## ARTÍCULO ORIGINAL

**Actividad in vivo del mentol frente a larvas I3 de Anisakis tipo I****In vivo larvicidal activity of menthol against Anisakis type I****Romero MC<sup>1</sup>, Navarro MC<sup>2</sup>, Montilla P<sup>2</sup>, Romero-Calvo I<sup>2</sup>, Martín-Sánchez J<sup>1</sup>, Valero A<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. avalero@ugr.es<sup>2</sup>Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. cnavarro@ugr.es

---

**RESUMEN**

Se ha estudiado la actividad larvicida *in vivo* de mentol, principal componente del aceite esencial de *Mentha piperita*, frente a larvas de *Anisakis* tipo I aisladas del hospedador *Micromesistius poutassou* (bacaladilla), adquiridas en diversas pescaderías de la ciudad de Granada. Los resultados obtenidos en el ensayo muestran que en el grupo tratado con mentol no se apreciaron lesiones en el aparato digestivo, mientras que en el grupo control estas lesiones fueron observadas en el 93'3% de los animales de experimentación. En este mismo grupo se encontraron larvas que habían perforado la pared gástrica, localizándose libres en la cavidad corporal.

**PALABRAS CLAVE:** *Anisakis*, *Mentha piperita*, aceite esencial, mentol, ensayo *in vivo*.

---

**ABSTRACT**

We have studied the *in vivo* larvicidal activity of menthol, the main component of the essential oil of *Mentha piperita*, against *Anisakis* type I larvae isolated from the host *Micromesistius poutassou* (blue whiting), acquired in several fishmongers in the city of Granada. The *in vivo* test results showed no gastric wall lesions in the group treated with menthol, while in the control group, 93.3% of infected rats showed those lesions. In the same control group were found larvae that had drilled the gastric wall, located free in the abdominal cavity.

**KEYWORDS:** *Anisakis*, *Mentha piperita*, essential oil, menthol, *in vivo* assay.

---

---

## INTRODUCCIÓN

La anisakidosis es una afección parasitaria producida por larvas de nematodos de la familia Anisakidae, que el hombre adquiere por consumo de pescado parasitado con el tercer estadio larvario (L<sub>3</sub>). El primer caso de anisakidosis publicado en nuestro país fue en 1991 por Arenal Vera et al.<sup>17</sup> A partir de esta fecha se han notificado un gran número de casos, tanto de infecciones como de reacciones de hipersensibilidad por el consumo de pescado crudo o poco cocinado.<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup> Este incremento de casos diagnosticados, ha hecho que en la actualidad se estime como un problema de salud, considerándose una Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en Andalucía desde el año 2003.

El tratamiento clínico más efectivo actual, siempre que la ubicación larvaria lo permita, se fundamenta en la extracción del parásito por endoscopia. Por ello, es necesaria la búsqueda de tratamientos farmacológicos que constituyan una alternativa fiable. El empleo de plantas medicinales con fines terapéuticos, es una práctica que se conoce desde la antigüedad constituyendo una herramienta en el tratamiento de múltiples procesos patológicos. Dentro de las investigaciones que tienen como finalidad la búsqueda de fármacos frente a esta enfermedad, destacan las relativas a la actuación de distintos aceites esenciales y sus principales componentes, obtenidos a partir de la flora aromática.

En relación con la posible actividad frente a larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis* de aceites esenciales y/o de sus principales componentes, destacan los trabajos realizados por Kasuya et al.<sup>10,11</sup>, en los que se puso de manifiesto el efecto larvicida *in vitro* del aceite esencial de *Perilla frutescens* y de su principal componente, el perillaldehído.

Este grupo de trabajo, ha demostrado la acción de diferentes compuestos monoterpénicos frente a L<sub>3</sub> de *Anisakis simplex* s.l. (geraniol, citronellol, carvacrol, aldehído cumínico y eugenol). Todos ellos, excepto eugenol, fueron activos *in vitro* a la mayor concentración ensayada (125 µg/ml). Igualmente, para otros componentes de aceites esenciales como el timol, citral y citronellol se puso de manifiesto en experiencias *in vivo* una alta mortalidad de las larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis*.<sup>12,13,14</sup> Más tarde, Navarro et al.<sup>15</sup> estudiaron la actividad larvicida del α-pineno, β-pineno, acetato de geranilo, mirceno, ocimeno y eucaliptol, siendo el ocimeno y α-pineno los compuestos con mayor actividad.

En este sentido hemos podido establecer una línea de investigación consistente en el estudio de la actividad biocida de distintas especies aromáticas empleadas habitualmente en nuestro país, tales como *Mentha piperita*.

## OBJETIVO

Establecimiento de la posible actividad *in vivo* del mentol, principal componente del aceite esencial de *M. piperita*, frente a larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis* tipo I.

## METODOLOGÍA

Las larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis* tipo I se han extraído del hospedador *Micromesistius poutassou* (bacaladilla) de origen Atlántico, obtenidos de diversas pescaderías de la ciudad de Granada. Para ello, con la ayuda de unas tijeras, se realiza la disección del pescado, comenzando por el ano hasta las branquias siguiendo la línea alba (Figura 1).

**Figura 1.** Bacaladillas con *Anisakis* spp.



El aislamiento de los nematodos se lleva a cabo con una aguja enmangada extrayendo las larvas de *Anisakis* que se encuentran libres en la cavidad abdominal. Seguidamente, se procede a la separación del tubo digestivo, vísceras y mesenterio del hospedador, depositándose en placas de Petri con solución salina al 0'9% con el fin de recuperar las larvas que se hallan en el paquete visceral. A continuación, con la ayuda de un pincel, se eliminan los restos adheridos a los parásitos y se lavan varias veces en solución salina al 0'9%. Para seleccionar las larvas, se escogen aquellas que no se encuentren deterioradas y se identifican con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Si la identificación ofrece dudas, las larvas se depositan entre portaobjetos y cubreobjetos con una gota de solución salina al 0'9% y se observa al microscopio óptico.

En el ensayo *in vivo*, la dosis administrada a los animales de experimentación fue de 46'9 mg en 0'5 ml de aceite de oliva, concentraciones obtenidas de acuerdo con la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>). El diseño del ensayo consiste en introducir 6 larvas L<sub>3</sub> de *Anisakis* tipo I en el extremo de una sonda gástrica de 2'5 mm de sección, conectada por el extremo opuesto a una jeringa de 2 ml de volumen con la dosis correspondiente. La sonda gástrica se introduce por la boca de la rata inmovilizada y se deposita el contenido de la sonda (6 larvas) y de la jeringa (46'9 mg/0'5 ml) en el estómago. A continuación, se mantiene al animal con dieta blanda (agua) en jaulas individuales hasta su sacrificio (4 horas). Acto seguido, se inició la necropsia reglada del animal<sup>16</sup>.

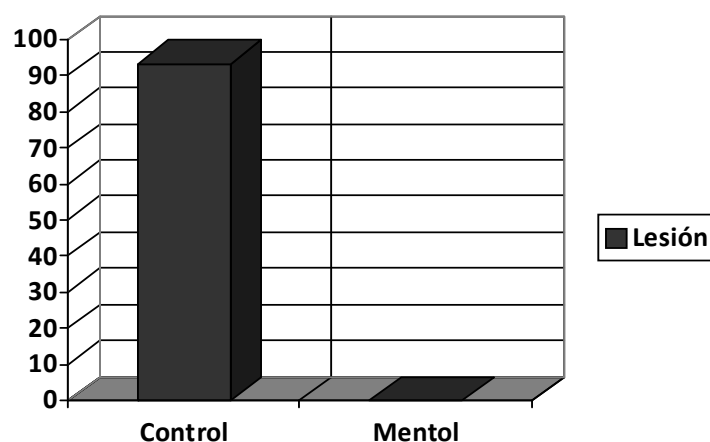
Se realizó un examen visual minucioso de los órganos (hígado, páncreas, riñones,

genitales y grasa adyacente) y del interior del roedor para localizar las larvas que pudieran hallarse en la cavidad; a continuación se extrajo el tracto gastrointestinal desde el esófago hasta el ano, colocándolo en una placa de Petri para proceder a su apertura e inspección, y localizar el resto de parásitos con ayuda del microscopio estereoscópico. Por último, en el caso de que faltase algún nematodo por recuperar, se inspeccionan las heces de las jaulas, dispersándolas en una placa de Petri con agua para rehidratación y observación al microscopio estereoscópico. Se anotaron tanto las localizaciones de las larvas como los incidentes derivados del experimento, tales como: lesiones (gástricas y/o intestinales), nematodos fijados a la pared del estómago. Paralelamente, se realizó un ensayo control, administrando a un grupo de animales 0'5 ml de aceite de oliva con ayuda de la sonda gástrica junto con 6 larvas del parásito, y posterior sacrificio del roedor a las 4 horas.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos mostraron que en ninguna de las ratas correspondientes al grupo tratado con mentol se apreció presencia de lesiones en el aparato digestivo, mientras que en el grupo control estas lesiones fueron observadas en el 93'3% de los animales de experimentación. En este mismo grupo se observó que un 16'7% de las larvas habían perforado la pared gástrica, localizándose en la cavidad corporal.

**Gráfica 1.** Lesiones observadas en los animales de experimentación.



---

## DISCUSIÓN/CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos permiten concluir que el mentol, principal componente del aceite esencial de *M. piperita* se muestra como un buen candidato para la realización de estudios posteriores tendentes a poner de manifiesto su posibilidad de empleo en el tratamiento del anisakiosis humana.

**Trabajo financiado por el proyecto: P07-CVI-03249.**

**BIBLIOGRAFIA**

1. Barros C, Manzarbeitia F, López-Vélez R, Oñate JM. Anisakiasis humana en España por consumo de sardinas crudas. *Alimentaria*, (1992), 92: 57-61.
2. López Vélez R, García A, Barros C, Manzarbeitia F, Oñate JM. Anisakiasis en España. Descripción de 3 casos. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.*, (1992), 10: 158-161.
3. Valero A, Mira-Gutiérrez J, Pérez-Cano R, Sanz-Domínguez J, Geraldía-Loma M, García-Herruzo J, García-Martos P, Adroher FJ. Descripción de un caso de anisakiosis humana. IX Reunión Científica de Parasitólogos Españoles, León, (1992), p. 69.
4. Cruchaga S, Pascual J, Muñoz F, Guerra A, Ladrón de Guevara C. Hallazgo endoscópico de una larva de gusano en el fondo de úlcera gástrica. *Enf. infec. Mic. Clin.*, (1995), 13: 631-632.
5. Acebes Rey JM, Fernández P, Díaz-Gonzalez G, Velicia R, Gonzalez JM, Citores R. Dos casos de anisakiasis en el Hospital "Del Rio Hortega" de Valladolid. *Rev. Esp. Enf. Digest.*, (1996), 88:59-60.
6. Canut Blasco A, Labora Loriz A, De Torre Ramírez JL, Romero Ramírez JA. Anisakiosis gástrica aguda por cocción insuficiente en horno microondas. *Med. Cli. De Barcelona*, (1996), 106: 317-318.
7. Oliveira A, Sánchez Rancaño S, Conde Gacho P, Moreno A, Martínez A, Comas C. Anisakiasis gastrointestinal. Siete casos en tres meses. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, (1999), 91: 71-72.
8. Moreno-Ancillo A, Caballero MT, Cabañas R, Contreras J, Martín-Barroso JA, Barranco P, López-Serrano MC. Allergic reactions to *Anisakis simplex* parasitizing seafood. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, (1997), 79: 246-250.
9. Obispo J, Herrero JJ, Borobia LE, Chivato T, Laguna R, Baquedano J. Obstrucción intestinal producida por la larva de *Anisakis*. *Cir. Esp.*, (2000), 67: 368-371.
10. Kasuya S, Goto C, Ohtomo H. Studies on prophylaxis against anisakiasis-A screening of killing effects of extracts from foods on the larvae. *Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, (1988), 62: 1152-1156.
11. Kasuya S, Goto C, Koga K, Ohtomo H, Kagei N, Honda G. Lethal efficacy of leaf extract from *Perilla frutescens* (traditional Chinese medicine) or perillaldehyde on *Anisakis* larvae in vitro. *Jpn. J. Parasitol.*, (1990), 39: 220-225.
12. Hierro I, Valero A, González de Selgas JM, Navarro MC. Actividad larvicida del timol frente a *Anisakis simplex* s.l. *Rev. Fitoter.*, (2004b), 4: 175-176
13. Hierro I, Valero A, Navarro MC. In vivo larvicidal activity of monoterpene derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomed.*, (2006), 13: 527-531.
14. Valero A, Hierro I, González P, Montilla P, Navarro MC. Activity of various essential oils and their main components against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. In: J.N. Govil, V.K. Singh, P. Arunachalam, Editors, *Recent Progress in Medicinal Plants, Drug Development from Molecules* vol. 11, Studium Press, LLC, Houston (2006), pp. 247-265.
15. Navarro MC, Noguera MA, Romero MC, Montilla MP, González de Selgas JM, Valero A. *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpene derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo, *Exp. Parasitol.*, (2008), 120: 295-299.
16. Feldman DB, Seely JC. *Necropsy Guide: Rodents and the rabbit*. CRC Press, Boca Ratón (1988)
17. Arenal-Vera JJ, Marcos-Rodríguez JL, Borrego-Pintado MH, Bowakin-Dib W, Castro-Lorenzo J, Blanco-Álvarez JL. Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico. El primer caso en la literatura médica. *Rev. Esp. Enf. Dig.*, (1991), 79: 355-358.