

## Efecto Antihelmíntico *in vitro* del Extracto de *Albizia lophantha* sobre Nematodos Gastrointestinales de Caballos

### IN VITRO ANTHELMINTIC EFFECT OF THE EXTRACT OF *Albizia lophantha* ON GASTROINTESTINAL NEMATODES OF HORSES

E. Chicaiza-Tisalema<sup>1</sup>, M. Barros-Rodríguez<sup>1,2</sup>, H. Zurita-Vásquez<sup>1</sup>,  
R. Mera-Andrade<sup>1</sup>, G. Velástegui-Espín<sup>1</sup>, M. Muñoz-Espinoza<sup>1</sup>,  
S. Espinoza-Vaca<sup>1</sup>, P. Ortiz-Tirado<sup>1</sup>, E. Ibarra-López<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El extracto de *Albizia lophantha* fue empleado (T1: 0 mg de extracto/ml de cultivo [mg/ml], T2: 0.04 mg/ml, T3: 0.08 mg/ml, T4: 0.12 mg/ml) para evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* en nematodos gastrointestinales de caballos. Se observó mayor inhibición en la eclosión de huevos (T4: 43% y T3: 11%) y menor supervivencia larval con dosis altas (T4: 0%, T3: 0% a las 36 y 60 horas después de aplicar el extracto, respectivamente) ( $p=0.0001$ ). El extracto de *A. lophantha* fue eficaz en el control *in vitro* de nematodos gastrointestinales de caballos.

**Palabras clave:** *Albizia lophantha*, taninos, caballos, nematodos

#### ABSTRACT

The *Albizia lophantha* extract (T1: 0 mg of extract/ml of nutritive cultivation [mg/ml], T2: 0.04 mg/ml, T3: 0.08 mg/ml, T4: 0.12 mg/ml) was used to evaluate the *in vitro* anthelmintic effect on gastrointestinal nematodes of horses. Higher inhibition in the hatching of eggs (T4: 43% and T3: 11%, respectively) and lower in the survival of larvae in the treatments of high doses (T4: 0% and T3: 0% at 36 and 60 hours after applying the extract respectively) ( $p=0.0001$ ). The *A. lophantha* extract was effective in the *in vitro* control of gastrointestinal nematodes of horses.

**Key words:** *Albizia lophantha*, tannins, horses, nematodes

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Tungurahua, Ecuador

<sup>2</sup> E-mail: ma\_barrosr@yahoo.es

Recibido: 2 de febrero de 2016

Aceptado para publicación: 16 de mayo de 2016

## INTRODUCCIÓN

El parasitismo de nematodos gastrointestinales (NGI) en equinos es uno de los casos más graves e importantes en la producción equina. El uso de plantas bioactivas ricas en metabolitos secundarios (taninos), puede ser una alternativa de control de los NGI, ya que se ha demostrado la presencia de un potente antihelmíntico natural cuando son proporcionadas a los rumiantes (Hernandez-Villegas *et al.*, 2014). El efecto antihelmíntico de los taninos ha sido asociado con su capacidad para formar complejos con la proteína de los parásitos (Alonso-Díaz *et al.*, 2010), afectando de esta manera el metabolismo de los nematodos (Alonso-Díaz *et al.*, 2008; Brunet *et al.*, 2011).

Otro mecanismo de acción directa de los taninos sobre el control de nematodos propuesto por Iqbal *et al.* (2007) es la unión de los taninos a la cutícula de la larva, la cual está compuesta de glicoproteínas que al ser destruidas o disminuidas producen la muerte del parásito. Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antihelmíntica *in vitro* del extracto de *Albizia lophantha* sobre nematodos gastrointestinales de caballos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el Cantón Cevallos, Tungurahua, Ecuador, a 2900 msnm.

Las hojas verdes y frescas de *Albizia lophantha* fueron recolectadas de árboles de aproximadamente 5 m de altura, sembrados en los predios de la institución. El material vegetal fue secado a 60 °C en estufa durante 24 h y luego fue triturado. Se pesó una muestra de 100 g que fue introducida en un balón

Cuadro 1. Concentración de taninos totales, fenoles totales de la *Albizia lophantha* y N.º de huevos promedio por gramo de heces (hpg)

Forraje	Compuestos secundarios	
	Taninos totales	Fenoles totales
<i>Albizia lophantha</i>	+++	+++
Tipo de parásitos	N.º de huevos por gramo de heces (hpg)	
<i>Strongylus</i> sp	600	
<i>Trichostrongylus axei</i>	300	
<i>Strongyloides westeri</i>	250	
<i>Parascaris equorum</i>	50	

aforado de fondo redondo, con una capacidad de 1 L. Se agregó el disolvente (300 ml de alcohol al 50%) y se sometió a baño maría a 70 °C durante 1 h. Se dejó en reposo a temperatura ambiente y se filtró a través de un papel filtro. Al extracto se le realizó un 'screening' fitoquímico para determinar la presencia de taninos totales y fenoles totales (Cuadro 1), siguiendo la metodología descrita por Castillo *et al.* (2014).

Se tomaron muestras de heces, directamente del recto de 10 caballos parasitados. Las muestras fueron colocadas en fundas plásticas dentro de un termo de polietileno a 4 °C y fueron trasladadas de inmediato al laboratorio para su análisis. Se estimó la cantidad de huevos por gramo de heces (hpg) mediante la técnica de McMaster con solución azucarada (8:1000). Se encontraron huevos de *Strongylus* spp, *Trichostrongylus axei*, *Strongyloides westeri* y *Parascaris equorum* (Cuadro 1).

Cuadro 2. Inhibición de la eclosión de huevos *in vitro* de nematodos gastrointestinales de caballos a diferentes niveles de extracto de *Albizia lophantha* (50 huevos por placa Petri; 6 placas Petri)

Horas post tratamiento	Tratamientos <sup>1</sup>				EE	Valor P
	T1	T2	T3	T4		
0	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	0	>0.05
24	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	44.0 <sup>b</sup>	28.0 <sup>c</sup>	0.529	0.0001
Inhibición de huevos (%)	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	11.0 <sup>b</sup>	43.0 <sup>a</sup>	1.059	0.0001

<sup>a,b,c</sup> Medias con superíndices diferentes dentro de filas difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

<sup>1</sup>T1: 0 mg de extracto/ml de cultivo (mg/ml); T2: 0.04 mg/ml; T3: 0.08 mg/ml, T4: 0.12 mg/ml

EE: Error estándar de la media

El estudio *in vitro* se realizó con cuatro tratamientos: T1, 0 mg de extracto/ml de cultivo (mg/ml); T2, 0.04 mg/ml; T3, 0.08 mg/ml; y T4, 0.12 mg/ml.

Se estimó la inhibición *in vitro* de la eclosión de huevos utilizando la técnica de Willis (flotación). Se tomó 10  $\mu$ l de la superficie del contenido, se depositó en un portaobjeto y se observó al microscopio. Se seleccionaron 50 huevos según el porcentaje que correspondía para cada parásito identificado, donde el porcentaje fue calculado según el número de huevos por gramo de heces: *Strongylus* spp (50%), *Trichostrongylus axei* (25%), *Strongyloides westeri* (20.8%) y *Parascaris equorum* (4.2%). Los huevos se depositaron en cajas Petri ( $n = 6$  por tratamiento), las cuales contenían 3 ml de la solución azucarada y se incubaron a 24 °C. Luego de 16 h (hora 0) se aplicaron las dosis del extracto de acuerdo a cada tratamiento y se volvió a incubar por 24 h. Posteriormente se procedió al conteo de huevos no eclosionados y larvas L<sub>1</sub> (hora 24), según la metodología descrita por Marie-Magdeleine *et al.* (2009).

Para determinar la mortalidad larval *in vitro* se sembraron 50 huevos en cajas Petri ( $n = 6$  por tratamiento), según el método anteriormente descrito. Una vez ocurrida la

eclosión de los huevos a estado larval L<sub>1</sub> y L<sub>2</sub>, se aplicaron las dosis del extracto según corresponde a cada tratamiento (hora 0) y se incubó a 24 °C. Posteriormente, se observó al microscopio cada 12 h hasta las 72 h, para contabilizar las larvas muertas por tratamiento (Marie-Magdeleine *et al.*, 2009).

Se utilizó un diseño completamente al azar, con cuatro tratamientos y seis repeticiones (placas Petri). Las variables fueron analizadas según el diseño empleado mediante el PROC GLM del SAS. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey en el paquete estadístico SAS 2009.

## RESULTADOS

Se encontró 43 y 11% de inhibición en la eclosión de huevos para T4 y T3, respectivamente, resultando diferencias significativas ( $p = 0.0001$ ) con respecto a los demás tratamientos (Cuadro 2).

La mortalidad larval se presenta en el Cuadro 3. A partir de las 12 h, los grupos con dosis ascendentes del extracto de *A. lophantha* tuvieron mejores respuestas en comparación con el grupo control, T1 ( $p = 0.0001$ ). Asimismo, todas las larvas del T4 llegaron a morir a las 36 h, a diferencia de

Cuadro 3. Mortalidad larval *in vitro* (por horas) de nematodos gastrointestinales de caballos a diferentes niveles de extracto de *Albizia lophantha*

Horas post tratamiento	Tratamientos <sup>1</sup>				EE	Valor P
	T1	T2	T3	T4		
0	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	0	>0.05
12	50 <sup>a</sup>	47.0 <sup>b</sup>	47.0 <sup>b</sup>	44.0 <sup>c</sup>	0.411	0.0001
24	50 <sup>a</sup>	38.0 <sup>b</sup>	32.0 <sup>c</sup>	21.0 <sup>d</sup>	0.841	0.0001
36	50 <sup>a</sup>	32.0 <sup>b</sup>	22.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.746	0.0001
48	50 <sup>a</sup>	18.0 <sup>b</sup>	7.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.578	0.0001
60	50 <sup>a</sup>	11.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.396	0.0001
72	50 <sup>a</sup>	11.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.403	0.0001

<sup>a,b,c</sup> Medias con superíndices diferentes dentro de filas difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

<sup>1</sup> T1: 0 mg de extracto/ml de cultivo (mg/ml); T2: 0.04 mg/ml; T3: 0.08 mg/ml; T4: 0.12 mg/ml

EE: Error estándar de la media

los demás tratamientos ( $p=0.0001$ ). La menor supervivencia larval en T3 y T2 se observó a las 60 h (Cuadro 3).

## DISCUSIÓN

El efecto del extracto de *A. lophantha* sobre la inhibición en la eclosión de huevos y la supervivencia larval de los NGI fue evidente en el estudio. El modo de acción se debe probablemente a la presencia de metabolitos secundarios (taninos y fenoles totales) en el extracto (Cuadro 1). Estos metabolitos tienen capacidad para formar complejos con las proteínas de los parásitos (Alonso-Díaz *et al.*, 2010), lo que afecta la biología de los nematodos, interfiriendo con la eclosión de huevos, proceso de desvainado y desarrollo larval (Iqbal *et al.*, 2007).

Los resultados del presente estudio son consistentes con el trabajo de Marie-Magdeleine *et al.* (2009) y Hernández-Villegas *et al.* (2014), quienes observaron un efecto antihelmíntico en nematodos gastrointestinales en rumiantes utilizando extractos de plantas ricas en taninos.

## CONCLUSIÓN

El extracto de *Albizia lophantha* mostró efectividad *in vitro* sobre la eclosión de huevos y la supervivencia de larvas de nematodos gastrointestinales de caballos.

## LITERATURA CITADA

1. **Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. 2010.** Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe? *Small Rumin Res* 89: 164-173. doi: 10.1016/j.smallrumres.2009.12.040
2. **Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal C, Brunet S, Hoste H. 2008.** Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol* 153: 187-192. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.01.011
3. **Brunet S, Fourquaux I, Hoste H. 2011.** Ultrastructural changes in the

- third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol Int* 60: 419-424. doi: 10.1016/j.parint.2010.09.011
4. **Castillo M, Quinatoa E, Risco D, Arnelas I. 2014.** Preliminary phytochemical screening of some Andean plants. *Int J Pharm Sci Rev Res* 28: 35-37.
  5. **Hernandez-Villegas M, Pérez-Pérez C, de la Cruz-Burelo P, Hernández-Bolio G, Bolio-López G. 2014.** *In vitro* anthelmintic effect of methanolic leaf extract of *Gliricidia sepium* against gastrointestinal nematodes of sheep. *Trop Subtrop Agroecosyst* 17: 105-111
  6. **Iqbal Z, Sarwar M, Jabbar A, Ahmed S, Nisa M, Sajid MS, Khan MN, et al. 2007.** Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. *Vet Parasitol* 144: 125-131. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.09.035
  7. **Marie-Magdeleine C, Hoste H, Mahieu M, Varo H, Archimede H. 2009.** *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 161: 99-105. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.12.008