

REVISTA CIENTÍFICA | FACULTAD DE FARMACIA. UNIVERSIDAD DE GRANADA. ESPAÑA

Ars Pharmaceutica

ISSN: 0004-2927

ISSNe: 2340-9894

2013;55(1):45-49

<http://farmacia.ugr.es/ars>

Revisiones

- » **Tratamiento de la neutropenia febril: filgrastim y pegfilgrastim.**
Franco-Trigo L, Calleja-Hernández MA, García-Corpas JP.
- » **Actualización en terapéutica de anticuerpos monoclonales.**
Pellicer-Corbí M, García-Ramos SE, García-Poza P, Ramos-Díaz F, Matoses-Asensio SM.

Originales

- » **Evaluación y establecimiento de las especificaciones de calidad del pool de aceite de hígado de tiburón.**
García Caridad M, Fernández M, Castiñeira M, Rodríguez M, Romero J, Márquez T.
- » **Design and evaluation of cedrela gum based microparticles of theophylline.**
Odeniyi MA, Takeuchi H.
- » **Efectos de un programa de atención farmacéutica para pacientes con esclerosis múltiple sobre la adherencia al tratamiento inmunomodulador.**
Sánchez Casanueva T, Tenías Burillo JM, Martínez-Martínez F, Valenzuela Gámez JC, Navarro Maestre E, Calleja Hernández MA.

Originales Breves

- » **Actividad de albendazol y los aceites esenciales de menta (*Mentha piperita*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente *Anisakis* tipo I.**
Romero López MC, Navarro Moll MC, Martín Sánchez J, Valero López A.

Artículos Especiales

- » **Importancia de la polietilenimina en biomedicina y sus aplicaciones en terapia génica.**
López-Viota Gallardo M, Megías Iglesias R, Ruiz Martínez MA, Arias Mediano LJ.

Actividad de albendazol y los aceites esenciales de menta (*Mentha piperita*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente *Anisakis* tipo I

María del Carmen Romero López¹, María Concepción Navarro Moll², Joaquina Martín Sánchez², Adela Valero López¹.

1. Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. (España)

2. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. (España)

Short reports

Original Breve

Correspondence/Correspondencia:

María Concepción Navarro Moll
Departamento de Farmacología.
Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
cnavarro@ugr.es

Competing interest / Conflicto de intereses:

Authors declared that there was no conflict of interest associated with this research work.

Fundings / Financiación:

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

Received: 06.11.2013

Accepted: 28.12.2013

RESUMEN

Objetivos: Estudiar la posible actividad sinérgica de los aceites esenciales de *Mentha piperita* y *Matricaria chamomilla* frente *Anisakis* tipo I.

Material y métodos: Se ensayó tanto *in vitro* como *in vivo*, la actividad larvicida de la mezcla de los aceites esenciales utilizando albendazol como fármaco de referencia y midiendo su eficacia mediante un modelo estadístico.

Resultados: En los ensayos *in vitro*, a las concentraciones de 250 y 187.5 µg/ml, la mortalidad de las larvas fue del 100% mientras que albendazol no mostró eficacia. *In vivo*, la mezcla de aceites esenciales fue más eficaz, reduciendo las lesiones en ratas en comparación con las tratadas con albendazol y control. Albendazol no redujo de forma significativa el porcentaje de lesiones producidas por las larvas frente al control.

Conclusión: La mezcla de aceite esencial de menta y manzanilla podría ser candidata para su uso en el tratamiento/profilaxis de la anisakiasis humana.

PALABRAS CLAVE: *Anisakis*, Albendazol, Manzanilla, Menta, PCR-RFLP.

ABSTRACT

Aim: We have studied the possible synergistic activity of the essential oils of *Mentha piperita* and *Matricaria chamomile* against *Anisakis* type I.

Materials and methods: the larvicidal activity of the mixture of essential oils was tested *in vitro* and *in vivo*, using as a reference the drug Albendazole and effectiveness measured through a statistical model.

Results: The *in vitro* and *in vivo* experiments both evidenced that the larvicidal activity of essential oils, was higher than the Albendazole activity. In the *in vitro* assay, at concentrations of 250 and 187.5 µg/ml, the mortality was 100% with the mixture of essential oils while albendazole was ineffective at the concentrations studied. In the *in vivo* assay, the mixture of essential oils, was significantly more effective in the reduction of numbers of lesions with rats in comparison to albendazole treatments and control. Albendazole did not significantly reduce the percentage of lesions caused by larvae vs. control.

Conclusion: Considering the results, we have come to the conclusion that the mixture of peppermint essential oils and chamomile could be used in the treatment/prophylaxis of human *Anisakis*.

KEY WORDS: *Anisakis*, Albendazole, Chamomile, Mentha, PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Anisakis* son parásitos de animales marinos que pueden causar zoonosis en el hombre. En su tercer estadio (L3) las larvas llegan al hombre al ingerir pescado crudo o semicrudo. Las manifestaciones clínicas tienen lugar después de que las larvas penetren en la pared del tubo digestivo, lo que puede conducir a cuadros digestivos y alérgicos. Aunque no se dispone de evidencia suficiente, en el caso de clínica digestiva, se han utilizado inhibidores de la secreción gástrica por el conocido efecto positivo que el pH ácido tiene sobre el desarrollo de la larva¹. También se han usado corticoides para reducir el edema parietal, antibióticos y distintos antihelmínticos, sobre todo el albendazol². Productos naturales, como distintos aceites esenciales (A.E.) y sus principales componentes³⁻⁶, han sido activos *in vitro* e *in vivo* frente a larvas de *Anisakis*. De lo expuesto, se desprende la necesidad de disponer de un fármaco capaz de aliviar los síntomas digestivos provocados por este nematodo, y evitar en algunos casos la endoscopia o cirugía.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la posible actividad sinérgica *in vitro* e *in vivo* de los aceites esenciales de *Mentha piperita* y *Matricaria chamomilla* frente las L3 de *Anisakis* tipo I, utilizando albendazol como fármaco de referencia y midiéndose su eficacia mediante un modelo estadístico. Las larvas utilizadas *in vivo* se identificaron mediante PCR-RFLP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han empleado larvas L3 de *Anisakis* tipo I de un tamaño >2 cm, obtenidos de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*) procedentes del norte de España y de Portugal. En las diferentes experiencias se han utilizado una mezcla de aceites esenciales de menta y manzanilla (1:1) obtenidos por hidrodestilación⁷.

Estudio *in vitro*

Se prepararon cinco disoluciones alcohólicas (alcohol de 96°) de la mezcla de aceites esenciales: 25,0; 18,7; 15,6; 12,5; 6,25 y 3,12 mg/ml. Para albendazol se utilizó 2 ml a las concentraciones de 0,5 y 1 mg/ml en 0,9% de NaCl (Albendex® 2%, S.P. veterinaria, S.A.). La axenización de las larvas se realizó en campana de flujo laminar durante 20 minutos con solución antibiótica cuya composición por cada 10 ml es: sulfato de gentamicina 80mg; anfotericina 0,625 mg; Penicilina 10.000 U.I. y solución de Hank's 4,5 ml. (Iglesias et al., 1997). Posteriormente, se introdujeron individualmente en placas de poliestireno con 2,0 ml de NaCl 0,9% y 20 µl de producto. Las concentraciones finales ensayadas fueron: 250; 187,5; 125; 62,5 and 31,25 µg/ml y

posteriormente se incubaron a 36° C con una atmosfera al 5% de CO₂. Se utilizaron dos controles, uno de NaCl al 0,9% (control 1) y otro de etanol al 1% (control 2). Las experiencias se realizaron por quintuplicado, en distintos días, para descartar que la muerte del parásito fuese debida a otras circunstancias. La mortalidad de las larvas fue observada bajo microscopio estereoscópico a las 4, 8, 24 y 48 h del inicio de la experiencia.

Estudio *in vivo*

Se infectaron 15 ratas hembras Wistar (150 g de peso), mediante sonda gástrica con 6 larvas y 46,9 mg de la mezcla de aceites esenciales en 0,5 ml de aceite de oliva (vehículo). Para albendazol, se utilizó la dosis humana de 400 mg/día v.o.⁸, adaptándola a ratas en función de su peso según Ruckebusch⁹. A las 4h se sacrificó el animal¹⁰ anotándose la localización de las larvas, número de parásitos vivos/muertos y número de lesiones. El control se realizó siguiendo la misma metodología y usando como vehículo 0,5 ml de aceite de oliva. Las larvas recuperadas se lavaron e incubaron en placas de poliestireno con 2 ml de NaCl al 0,9%, anotándose la supervivencia de los parásitos durante 15 días atendiendo a criterios de movilidad. Posteriormente se conservaron -20°C. Todos los experimentos con animales de laboratorio se realizaron siguiendo la normativa 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, de 22 de septiembre de 2010 y R.D. 1201/2005.

Tras el estudio *in vivo*, se identificaron por PCR-RFLP el 50% de L3 las larvas recuperadas según su localización en los animales (estómago, intestino y/o ciego) mientras que las que estaban clavadas en la mucosa gástrica o localizadas en la cavidad corporal fueron identificadas en su totalidad. La amplificación del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 de ADNr se realizó con los cebadores NC5 y NC2 descritos por Zhu et al.¹¹. A continuación se utilizaron las enzimas de restricción Hinf I y Taq I (Bioron international) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En la identificación de las especies se siguieron los patrones descritos por D'Amelio et al.¹².

Para verificar la eficacia *in vivo* de los aceites esenciales se realizó un análisis de los datos mediante ANOVA no paramétrica (SPSS 15.0., Chicago, IL) comparando el número de larvas muertas, lesiones encontradas, supervivencia tras el ensayo *in vivo*, y la especie del parásito. Se consideraron significativos los valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

In vitro

La mezcla de aceite esencial fue eficaz a las concentraciones

de 250 y 187 µg/ml ocasionando el 100% de mortalidad de las larvas de *Anisakis* tipo I a las 4h (tabla 1). La mortalidad disminuyó a la concentración de 125 µg/ml, muriendo todas las larvas a las 48h (Tabla 1). Finalmente el producto no resultó eficaz a la concentración de 62,5 y 31,2 µg/ml. Albendazol no mostró ninguna actividad hasta pasados 15 días.

In vivo

El 93,9% de las ratas control presentaron lesiones en el estómago con áreas hemorrágicas comprendidas entre 1-24 mm², mientras que con albendazol casi la mitad de los roedores (46,7%) mostraron lesiones gástricas muy similares. En los animales tratados con la mezcla de aceite esencial, sólo el 33,3% de las ratas presentaron lesiones, sobre todo en el estómago (67,7%). El 8,9% de las larvas no fueron recuperadas. La distribución en las ratas de las distintas especies identificadas se encuentra en la tabla 2 El tratamiento con la mezcla de aceites esenciales no sólo redujo el número de lesiones respecto al control y albendazol, (p=0,002 y p=0,137 respectivamente), sino también la viabilidad de las larvas recuperadas de los roedores (p<0,001). En el estudio estadístico no se encontró relación ente la especie de las larvas y susceptibilidad al producto (p=0,34), siendo *A. simplex* s.s. y genotipos híbridos más patógenos que *A. pegreffii* (p=0,022).

Tabla 1. Supervivencia media in vitro de L3 de Anisakis a diferentes concentraciones de la mezcla de aceite esencial de menta y manzanilla.

Concentración	Nº L ₃	Supervivencia media (%)			
		4h	8h	24h	48h
250 µg/ml	60	0	0	0	0
187,5 µg/ml	60	0	0	0	0
125 µg/ml	60	60	31,7	15	0
62,5 µg/ml	60	91,6	86,7	81,7	81,7
31,2 µg/ml	60	100	100	100	100

DISCUSIÓN

El albendazol es un antihelmíntico eficaz frente a parásitos intestinales, utilizado por algunos clínicos en la anisakiasis humana^{2,13}. En el estudio *in vitro*, este fármaco resultó inactivo frente a los parásitos mientras que la mezcla de aceite esencial de menta y manzanilla mostró una notable actividad. Esto puede deberse a que la eficacia del albendazol es mayor en medios básicos¹⁴ y la solución salina presenta pH neutro. En el estudio *in vivo*, la mezcla de A.E. de menta y manzanilla, disminuyó de forma significativa el número lesiones en ratas respecto al control. En el caso de albendazol, aunque redujo de forma significativa el porcentaje de lesiones frente al control (p=0,002), no mostró actividad larvicida y las larvas recuperadas se mantuvieron móviles más de 48 h. Este menor efecto del albendazol puede atribuirse a que se comporta como un

Tabla 2. Distribución e identificación de L3 de Anisakis recuperadas del estudio in vivo para cada compuesto estudiado.

Productos	Vivas			Muertas		
	Control	Albendazol	A.E. Menta-manzanilla	Control	Albendazole	EO Menta-manzanilla
Cavidad	<i>A. simplex</i>	25,4% (15/59L3)	6,4% (3/47L3)	-	-	-
	<i>A. pegreffii</i>	-	2,1% (1/47L3)	-	-	-
	Híbridos <i>A. simplex/A. pegreffii</i>	-	2,1% (1/47L3)	2,1% (1/48L3)	-	-
Clavadas	<i>A. simplex</i>	23,7% (14/59L3)	-	37,3% (22/59L3)	-	-
	<i>A. pegreffii</i>	-	-	-	-	-
	Híbridos <i>A. simplex/A. pegreffii</i>	-	10,6% (5/47L3)	-	-	-
Estómago	<i>A. simplex</i>	37,3% (22/59L3)	8,5% (4/47L3)	37,4% (18/48L3)	-	-
	<i>A. pegreffii</i>	-	12,8% (6/47L3)	10,4% (5/48L3)	-	-
	Híbridos <i>A. simplex/A. pegreffii</i>	-	4,3% (2/47L3)	6,2% (3/48L3)	-	2,1% (1/48L3)
Intestino	<i>A. simplex</i>	13,6% (8/59L3)	25,5% (12/47L3)	-	-	31,3% (15/48L3)
	<i>A. pegreffii</i>	-	25,5% (12/47L3)	2,1% (1/48L3)	-	-
	Híbridos <i>A. simplex/A. pegreffii</i>	-	2,1% (1/47L3)	-	-	-

profármaco que ha de sufrir metabolización hepática para dar lugar a la formación del metabolito activo, albendazol sulfóxido. Además, presenta baja solubilidad a pH ácido¹⁵, reduciendo así su posible actividad inhibitoria de la absorción de glucosa por la cutícula del parásito¹⁴.

Conclusión: Los datos obtenidos permiten concluir que *A. simplex* y los genotipos híbridos son más patógenas que *A. pegreffii*. La mezcla de aceite esencial de menta y manzanilla podría ser candidata para su uso en el tratamiento/profilaxis de la anisakiasis humana, si bien ello debe ser confirmado con estudios clínicos.

REFERENCIAS

1. Muraoka A, Suehiro I, Fujii M, Nagata K, Kusunoki H, Kumon Y, et al. Acute gastric anisakiasis: 28 cases during the last 10 years. *Dig Dis Sci.* 1996; 41(12):2362-2365.
2. Filauro M, Rollandi GA, Cassola G, Quilici P, Angelini G, Belli F, et al. Gastrointestinal bleeding due to suspected anisakiasis: challenging differential diagnosis for a rare disease. *Updates Surg.* 2011; 63(3):213-217.
3. Hierro I, Valero A, Perez P, Gonzalez P, Cabo MM, Montilla MP, et al. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomed.* 2004; 11(1):77-82.
4. Navarro-Moll MC, Romero MC, Montilla MP, Valero A. *In vitro* and *in vivo* activity of three sesquiterpenes against L₃ larvae of *Anisakis* type I. *Exp Parasitol.* 2011; 127(2):405-408.
5. Romero M, Valero López A. Actividad *in vivo* del mentol frente a larvas L3 de *Anisakis* tipo I. *Ars Pharm.* 2010; 51(3):841-846.
6. Romero MC, Valero A, Martin-Sanchez J, Navarro-Moll MC. Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomed.* 2012; 19(6):520-523.
7. Real Farmacopea Española. Agencia Española del Medicamento. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2005.
8. Moore DA, Girdwood RW, Chiodini PL. Treatment of anisakiasis with albendazole. *Lancet.* 2002; 360(9326):54.
9. Ruckebusch Y. Données numériques et miscellanées. *Physiologie pharmacologie thérapeutique animales.* París: Maloine S.M.; 1977.
10. Zúñiga JM, Orellana JM, Tur JA. *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio.* Madrid: Universidad de Alcalá de Henares; 2011.
11. Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol.* 1998; 28(12):1911-1921.
12. D'Amelio S, Mathiopoulou KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanco M, et al. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol.* 2000; 30(2):223-226.
13. Pontone S, Leonetti G, Guaitoli E, Mocini R, Manfredelli S, Catania A, et al. Should the host reaction to anisakiasis influence the treatment? Different clinical presentations in two cases. *Rev Esp Enferm Dig.* 2012; 104(11):607-610.
14. Arias-Díaz J, Zuloaga J, Vara E, Balibrea J, Balibrea JL. Efficacy of albendazole against *Anisakis simplex* larvae *in vitro*. *Dig Liver Dis.* 2006; 38(1):24-26.
15. Flórez J. Fármacos antiparasitarios: protozoos y helmintos. En: Flórez J, editor. *Farmacología humana.* Barcelona: Masson; 2003. p. 1361-1390.