EVALUACIÓN DE UN EXTRACTO ETANÓLICO DE *Enterolobium cyclocarpum* CONTRA LARVAS INFECTANTES DE *Haemonchus contortus*

EVALUATION OF AN ETHANOLIC EXTRACT OF *ENTEROLOBIUM CYCLOCARPUM* AGAINST INFECTIVE *HAEMONCHUS CONTORTUS* LARVAE

María Lupita Castizo Canacasco[1], Edgar Jesús Delgado Núñez[1*], José Manuel Castro Salas[1], Miguel Angel Gruintal Santos[1], Tania de Jesús Adame Zambrano[1], Darvin Ervey Jiménez Sánchez[2], José Francisco Díaz Nájera[3], Ana Yuridia Ocampo Gutiérrez[4], Pedro Mendoza de Gives[4], Agustín Olmedo Juarez[4].

[1]Universidad Autónoma de Guerrero. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales. [2]Universidad Autónoma de Guerrero. Centro Regional Campus Zona norte. [3]Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. [4]CENID-SAI-INIFAP-Laboratorio de Helmintología. Jiutepec, Morelos

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar un extracto etanólico a partir de hojas de *Enterolobium cyclocarpum* contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus* considerado como uno de los nematodos gastrointestinales más patógenos debido a sus hábitos hematófagos y su alta prevalencia y patogenicidad en pequeños rumiantes. El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales dependiente de la Universidad Autónoma de Guerrero. La obtención de las larvas infectantes, se realizó mediante cultivos a partir de heces de un ovino donador utilizando la técnica de Baermann. La prueba del porcentaje de mortalidad, se usaron placas de microtitulación de 96 pozos con los siguientes tratamientos: 25, 12.5, 6.25 y 3.12 mg/mL, y un control positivo (ivermectina 0.5%) y controles negativos (agua destilada y metanol al 4%) por triplicado generando 12 unidades experimentales, distribuidos en un diseño completamente al azar y analizados por PROBIT y ANOVA. Los resultados revelaron que el mayor porcentaje de mortalidad fue de 93.97 ± 2.52 a una concentración de 25 mg/mL, mientras que a 3.12 mg/mL exhibieron el 68.25 ± 1.13 de mortalidad a las 72 horas post confrontación. Por otro lado, las concentraciones letales del extracto etanólico después de las 72 h de exposición para causar el 50 y el 90% de mortalidad fueron a 3.17 y 41.24 mg/mL respectivamente. El uso de esta leguminosa arbórea, representa una alternativa de aprovechamiento para el control de las nematodiasis en pequeños rumiantes, debido que las hojas de *E. cyclocarpum* contienen metabolitos secundarios responsables de la actividad larvicida.

Palabras clave: Hemoncosis ovina; antihelmíntico; plantas medicinales.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate an ethanolic extract from *Enterolobium cyclocarpum* leaves against infective larvae of *Haemonchus contortus*, considered one of the most pathogenic gastrointestinal nematodes due to its haematophagous habits and its high prevalence and pathogenicity in small ruminants. The study was carried out at the Faculty of Agricultural and Environmental Sciences of the Autonomous University of Guerrero. Infective larvae were obtained by culturing feces from a donor sheep using the Baermann technique. The percentage mortality test, 96-well microtiter plates were used with the following treatments: 25, 12.5, 6.25 and 3.12 mg/mL, and a positive control (ivermectin 0.5%) and negative controls (distilled water and 4% methanol) in triplicate generating 12 experimental units, distributed in a completely randomized design and analyzed by PROBIT and ANOVA. The results revealed that the highest percentage of mortality was 93.97 ± 2.52 at a concentration of 25 mg/mL, while 3.12 mg/mL exhibited 68.25 ± 1.13 mortality at 72 hours post confrontation. On the other hand, the

lethal concentrations of the ethanolic extract after 72 h of exposure to cause 50 and 90% mortality were at 3.17 and 41.24 mg/mL respectively. The use of this tree legume represents an alternative use for the control of nematodiasis in small ruminants, because the leaves of *E. cyclocarpum* contain secondary metabolites responsible for the larvicidal activity.

Keywords: Sheep haemonchosis; anthelmintic; medicinal plants.

INTRODUCCIÓN.

Las nematodiasis gastrointestinales (NGI) afectan considerablemente la salud y productividad en pequeños rumiantes y es la principal preocupación en los productores, debido a las pérdidas millonarias que estas representan en la producción a nivel mundial (Gebresilassie y Tadele, 2015). *Haemonchus contortus* es considerado como uno de los nematodos gastrointestinales más patógenos debido a sus hábitos hematófagos y su alta prevalencia y patogenicidad incluyendo la muerte en animales jóvenes (Baltrušis *et al.,* 2020). Existen varios métodos de control, como el uso de partículas de cobre, rotación de pastoreo, el método de FAMACHA, sin embargo, el más empleado con frecuencia son los antihelmínticos de síntesis química, que debido a su uso irracional han generado mecanismos de resistencia a estos antiparasitarios sintéticos (Toro *et al.,* 2014). México, cuenta con enorme biodiversidad de plantas medicinales, así como numerosas publicaciones etnobotánicas en el uso de compuestos bioactivos con propiedades medicinales y antiparasitarios lo que hace ser un recurso natural como alternativa para el control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes (Espinosa-Moreno *et al.,* 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las hojas de *Enterolobium cyclocarpum* (100 g) fueron colectadas en el mes de mayo en el municipio de Iguala de la Independencia, Guerrero (18°13’ y 18°27’ de latitud norte y entre los 99°29’ y 99°42’ de longitud oeste).

Preparación del extracto etanólico. Se usaron 100 gramos de hojas secas de “Parota” (*E. cyclocarpum*) las cuales se sometieron a un proceso de maceración con etanol (1:1 p/v) a temperatura ambiente durante 24 h. El extracto líquido se filtró, utilizando (gasa, algodón y papel de filtro) con la finalidad de obtener un extracto libre de material vegetal. El etanol se eliminó por destilación a presión reducida usando un rotaevaporador (Buchi R-100) a un rango de temperatura de 40-45ºC, posteriormente fue llevado a sequedad total usando una bomba de vacío CPS-Products INC Hialeah, Florida, USA y una campana de vacío de borosilicato.

Obtención de larvas infectantes de *Haemonchus contortus.* Se realizaron medios de cultivo de heces a partir de un ovino donador y la recuperaron las larvas infectantes fue por medio de la técnica del embudo de Baermann. Para el desenvaine de las larvas infectantes se utilizó hipoclorito comercial al 6% de acuerdo a lo descrito por Pineda-Alegría, 2017.

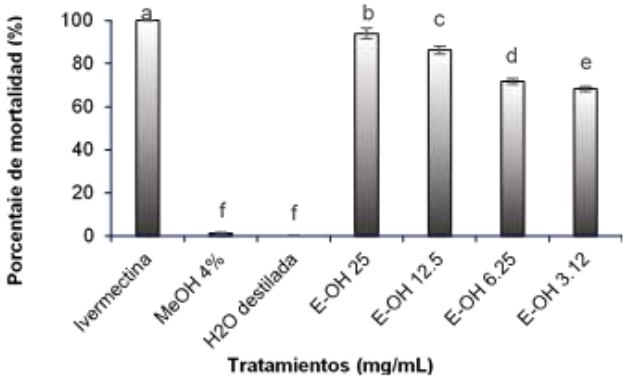
Evaluación del porcentaje de mortalidad de *Haemonchus contortus in vitro*. Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos, con 12 repeticiones. Los tratamientos fueron las concentraciones del extracto etanólico de *E. cyclocarpum* (25, 12.5, 6.25 y 3.12 mg/mL), se utilizó ivermectina al 0.5 % como control positivo (+), como controles negativos (**-**) se usó metanol al 4% y agua destilada. A cada pozo se depositó una suspensión acuosa conteniendo 100±20 larvas infectantes en 50 µL y en seguida se depositaron 50 µL del extracto, obteniendo un volumen final de 100 µL. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente 28-30 °C, durante 72 horas y en seguida procedió a contar cada pozo tomando 10 alícuotas de 5 µL. El porcentaje de mortalidad fue calculado mediante la siguiente fórmula:

%Mortalidad= [(larvas muertas) / (larvas vivas + larvas muertas)] × 100

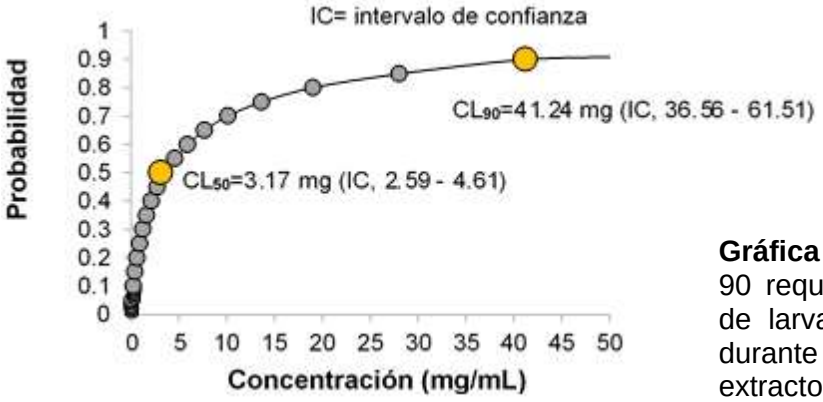
Los resultados del porcentaje de mortalidad, se analizó bajo un diseño completamente al azar mediante un ANOVA. La comparación de medias entre tratamientos se realizó con la prueba de Tukey (P <0,05) a un nivel de significancia del 0.05%, los tratamientos que tuvieron un efecto dependiente de la concentración, se les estimaron las concentraciones letales 50 y 90 (CL50 y CL90) mediante el sistema PROC PROBIT (SAS, 2006).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el estudio evidenciaron que los extractos a partir de hojas de Parota presentan componentes con un elevado efecto larvicida sobre *H. contortus*. En la gráfica 1, se muestran los resultados del % de mortalidad de *H. contortus* causados por el extracto etanólico. El porcentaje de mortalidad fueron cercanos al 100% a la concentración de 25 mg/mL, mientras que a la dosis mínima de 3.12 mg/mL se obtuvieron aún valores cercanos al 70% de mortalidad lo que indica un claro efecto dependiente a la concentración. Por otro lado, el análisis PROBIT, sus concentraciones letales mínimas y máximas se muestran en la gráfica 2; para causar el 50% de mortalidad se requieren 3.17 mg (IC, 2.59-4.61) mientras que para causar el 90% de mortalidad se requiere 41.24 mg (IC, 36.56-61.51), este resultado indica que existen compuestos bioactivos letales presentes en hojas de esta fabaceae.



Gráfica 1. Resultados del porcentaje de mortalidad del extracto etanólico de *E. cyclocarpum* contra larvas infectantes de *H. contortus*.



Gráfica 2. Concentraciones letales 50 y 90 requeridas para causar mortalidad de larvas de *H. contortus* expuestos durante 72 horas post confrontación al extracto etanólico de *E. cyclocarpum*.

DISCUSIÓN

Algunos autores han reportado la importancia nutracéutica y los beneficios en la salud de los animales al consumir estos recursos forrajeros por el aporte importante de más del 18% de

proteína cruda en su materia orgánica aunado a esto el efecto potencial antihelmíntico que posee el forraje y frutos de algunas leguminosas arbóreas contra el nematodo *H. contortus* en modelos *in vitro* e *in vivo* (Hoste *et al.,* 2016; Rojas-Hernández *et al.,* 2019). A este respecto, existe una limitada información acerca de la evaluación de *E. cyclocarpum* sobre larvas infectantes de *H. contortus*, sin embargo, un estudio realizado por Rivero-Perez *et al.* (2019) con un extracto hidroalcohólico de vainas de la fabaceae *Leucaena leucocephala* redujo un 22% a 6.25% de larvas L3, por otro lado, un estudio realizado por Olmedo-Juárez et al. (2017), muestra el potencial antihelmíntico de un extracto (200 mg/mL) a partir de hojas de *Acacia cochliacantha* produjo una mortalidad del 97.75% sobre larvas infectantes de *H. contortus*. En otro estudio realizado por De Jesús-Martínez *et al.* (2018), un extracto metanólico de frutos de *Caesalpinia coriaria* a 150 mg/mL obtuvo una mortalidad del 73% contra larvas L3. Estos resultados revelan el mismo efecto antihelmíntico comparado a los nuestros, usando el mismo grupo taxonómico de leguminosas arbóreas.

CONCLUSIÓN

El extracto etanólico a partir de hojas *Enterolobium cyclocarpum*, presenta compuestos bioactivos en contra del parásito de ovinos *Haemonchus contortus*. El extracto evaluado puede ser una alternativa natural y asequible para la prevención y control de las parasitosis en pequeños rumiantes.

REFERENCIAS

Gebresilassie, L., Tadele, B.A. 2015. Prevalence of ovine haemonchosis in wukro, Ethiopia. *J Parasitol Res.* https://doi.org/10.1155/2015/635703.

Baltrušis, P., Komáromyová, M., Várady, M., Samson-Himmelstjerna, G., et al. 2020. Assessment of the F200Y mutation frequency in the β tubulin gene of *Haemonchus contortus* following the exposure to a discriminating concentration of thiabendazole in the egg hatch test*. Exp Parasitol*, 217, 107957.

Toro, L., Rubilar, C., Palma, R., Pérez. 2014. Resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de ovinos tratados con ivermectina y fenbendazol. *Arch. Med. Vet*. 46:247-252.

Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Vera y Cuspinera, G.G., et al. 2016. *In vitro* antihelmintic activity of three plant species traditionally used in tabasco, Mexico. *Polibotanica*. 41, 91-100.

Pineda-Alegría, J. A., Sánchez-Vázquez, J. E., González-Cortazar, M., et al. 2017. The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus. J Med Food*. 20(12):1184-1192.

Rojas-Hernández, S., Olivares-Pérez, J., Chay-Canul, A.J., et al. 2019. Density and integral use evaluation of three leguminous trees in Silvopastoral Systems in the tropic of Guerrero, Mexico. *Polibotanica*.47.11.

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.F., Quijada, J., et al. 2016. Interactions between nutrition and infections with *Haemonchus contortus* and related gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Adv Parasitol*. 93:239-351.

Rivero-Perez, N., Jaramillo-Colmenero, A., Peláez-Acero, A., et al. 2019. Actividad antihelmíntica de la vaina de *Leucaena leucocephala* sobre nematodos gastrointestinales de ovinos (*in vitro*). *Abanico veterinario*, 9, e95. Epub.

Olmedo-Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Zamilpa, A., et al. 2017. *In vitro* larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. Veterinary Research Communications.