

ACTIVIDAD LARVICIDA DE EXTRACTOS DE *Rhizophora mangle* L. CONTRA ESTRONGÍLIDOS GASTROINTESTINALES DE OVINOS

Y. Alemán*, Luz María Sánchez*, Tania Pérez*, Yanet Rodríguez*, J.L. Olivares**, J.G. Rodríguez*

*Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Correo electrónico: yaleman@censa.edu.cu; **Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X). Calzada del Hueso No. 1100. Col. Villa Quietud, Deleg. Coyoacán, México 04960

RESUMEN: Con el objetivo de evaluar la actividad *in vitro* de *Rhizophora mangle* L., sobre el desarrollo larvario exógeno de estrombilidos gastrointestinales de ovino, se utilizaron tres extractos: dos de ellos procedentes del residual obtenido de lixiviación de la corteza como sub-producto en la producción de medicamentos registrados (acuoso y metanólico) y un extracto acuoso total de *R. mangle* (extracción directa de las cortezas). Cada extracto se evaluó en tres niveles de concentraciones: 5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, sobre larvas de miembros de ese orden, donde primaba *Trichostrongylus* spp. Los resultados obtenidos demuestran que los tres extractos en concentraciones de 50 mg/mL, reducen significativamente ($p < 0.05$) el desarrollo de la L3 al cuarto día de experimento (sexto día de vida larvaria); con una media de efectividad de 64.12 %. Los resultados obtenidos evidencian que los extractos en estudio presentan actividad larvicida sobre los estrombilidos gastrointestinales de ovino.

(Palabras clave: ovino; *Rhizophora mangle* L.; Strongylida)

LARVICIDAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *Rhizophora mangle* L. AGAINST GASTROINTESTINAL STRONGYLID OF SHEEP

ABSTRACT: In order to know the *in vitro* activity of three of the *Rhizophora mangle* L., on exogenous larval development of gastrointestinal strongyles of sheep. It were used three extract: *R. mangle* aqueous extract directly from bark, aqueous and methanol extracts obtaining by lixiviation from residual material after the manufacturing of register drugs. Each extract was evaluated in three concentration level: 5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, for evaluate its action on larvae of members of these order where *Trichostrongylus* spp was represented fundamentally. The results showed that the three extracts in concentrations of 50 mg/mL, significantly reduced ($p < 0.05$) from the development of L3 on the fourth day of experiment (sixth day of larval life), with an average of 64.12% effectiveness. These results reveal that extracts of the *R. mangle* L show larvicide activity, on the sheep gastrointestinal strongyles larvae.

(Key words: sheep; *Rhizophora mangle* L.; Strongylida)

INTRODUCCIÓN

Las gastroenteritis parasitarias en ovejas y cabras en pastoreo constituyen uno de los problemas de primera magnitud, por ser los más frecuentes e importantes de los pequeños rumiantes; por lo que su estudio y tratamiento son siempre temas de alto interés (1, 2).

La presentación de resistencia a los antihelmínticos es especialmente elevada en el ganado ovino y caprino (3). El rápido desarrollo de resistencia a los antihelmínticos, asociados con el alto costo de la disposición fármacos antihelmínticos, limita el éxito de productos en el control de nematodosis gastrointestinales en el ganado ovino y, por tanto

incrementa los intereses en el estudio de plantas bioactivas como fuente alternativa de antihelmínticos (4).

Uno de los efectos beneficiosos más analizados de las plantas taníferas durante los últimos 10 años, es el efecto antihelmíntico de algunos de sus metabolitos secundarios contra nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. La mayoría de los estudios se concentran en legumbres cuyos efectos antihelmínticos se atribuyeron principalmente a taninos condensados (5, 6, 7).

Los taninos condensados, metabolitos secundarios de las plantas, constituyen una de las posibles alternativas para el control de estas parasitosis y como parte del empleo de algunas plantas en fitoterapias antiparasitarias. La actividad antihelmíntica de taninos condensados reportados en ensayos *in vivo* se confirma generalmente por los resultados de ensayos *in vitro* (2, 8, 9, 10, 11).

Los resultados recientes, en experimentos *in vivo* e *in vitro*, sugieren que los forrajes que contienen taninos podrían utilizarse como nutracéuticos (plantas que contienen metabolitos secundarios bioactivos, como los taninos, que son consideradas por sus efectos benéficos sobre la salud más que por su valor nutritivo directo) y sus propiedades antihelmínticas, como tal, son una opción prometedora para su uso en el control integrado de las nematodosis gastrointestinales en los sistemas de producción agrícola (2, 9, 10, 12).

En el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) desde hace varios años se obtienen fitofármacos a partir del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* L. (mangle rojo), debido a las propiedades medicinales que esta planta posee, determinadas por su alto contenido de taninos (13). Una vez extraídos los principios activos de la corteza esta se elimina; sin embargo, aún están presentes productos activos, como los taninos, que pudieran ser empleados en lugar de desperdiciarse.

El presente estudio, tiene como objetivo evaluar la actividad *in vitro* de *Rhizophora mangle* L., sobre el desarrollo larvario exógeno de estrogilidos gastrointestinales de ovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la corteza de mangle rojo para obtener su extracto acuoso (EA), mediante la decocción de 100 g de corteza en 700 mL agua desionizada (1:7), durante 30 minutos a 95°C, posteriormente el extracto se separó del sólido por filtración. El filtrado se liofilizó y a partir de este se prepararon las soluciones de trabajo.

A partir del sólido residual de esa extracción se obtuvieron nuevos extractos: acuoso y metanólico. Para el extracto acuoso del residual (EAR) se siguió el procedimiento antes descrito y para la preparación del extracto metanólico del residual (EMR) se tomaron 500 g de residuo y se refluaron durante 4 horas con 200 mL de metanol calidad reactivo. Posteriormente se filtró y el extracto se llevó a sequedad en rotovaporador. De este extracto seco se prepararon las soluciones de trabajo en agua desionizada.

Las heces de ovinos infestados naturalmente con estrogilidos, se colectaron directamente de la ampolla rectal en cantidades suficientes para realizar coprocultivos. Como sistema de cultivo se utilizó el método de Corticelli y Lai (14), con las modificaciones planteadas por Roberts y O'Sullivan (15).

Se colectaron las larvas L2 tras la incubación del coprocultivo, mediante la técnica de *Baermann*. Se comprobó la viabilidad de las larvas emergidas tras el coprocultivo y se procedió al conteo y registro de L2 en una placa de cultivo de 24 pocillos, mediante observación directa al microscopio invertido; quedando finalmente una concentración de 50 larvas por pocillos. Posteriormente se agregaron los extractos y fueron selladas las placas con *Parafilm* e incubadas a 37°C, 85 % de humedad relativa y 5 % de CO₂.

La eficacia de la actividad larvicida para cada extracto sobre el desarrollo de las L2 de estrogilidos, se evaluó a tres concentraciones: 5, 25, 50 mg/mL, comparándose con agua desionizada como control negativo, en cinco réplicas. El por ciento de eficacia fue calculado como: % eficacia = [1 - (media de Larvas Desarrolladas en grupo extractos / media de Larvas Desarrolladas en grupo control)] x 100. Las larvas que alcanzaron el estadio de L3 fueron contadas e identificadas, conforme a lo reportado por la literatura (16).

Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism 2007 versión 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, USA) y se realizó la prueba no paramétrica *Kruskal Wallis* para la comparación múltiple de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los diez días que se realizó el experimento se observó el desarrollo larvario frente a los diferentes extractos y el control negativo. El último día se identificaron las larvas en estadio L3. Las fases exógenas identificadas pertenecían al orden Strongilida fundamentalmente a *Haemonchus* spp. y *Trichostrongylus* spp., este último de forma mayoritaria.

TABLA 1. Media aritmética del porcentaje de la actividad larvicida de los diferentes extractos de *Rhizophora mangle* L. contra los estrongilidos gastrointestinales de ovinos, al cuarto día de observación*/ *Arithmetic half of the percentage of larvicidal activity of the different extracts Rizophora mangle L. against sheep gastrointestinal strongles, to the fourth day observation**

Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	EAR	EMR	EA
50	68.4 \pm 1.5 b	52.0 \pm 6.6 ab	72.4 \pm 3.9 b
25	26.0 \pm 3.0 ab	53.2 \pm 2.6 b	28.4 \pm 1.5 ab
5	6.8 \pm 2.4 a	11.2 \pm 2.1 a	4.4 \pm 0.8 a
p	0.0019	0.0057	0.0019

EAR.- extracto acuoso del residual

EMR.-extracto metanólico del residual

EA.-extracto acuoso

*Medias con igual letra dentro de una misma columna no son significativamente diferentes para $p < 0.05 \pm \text{EE}$.

Los resultados de la media aritmética de la actividad larvicida se resumen en la Tabla 1, donde se muestran las comparaciones al cuarto día de observación, que equivalen al sexto día de vida de las larvas donde se produce el cambio de L2 a L3 bajo las condiciones de incubación adoptadas.

Los valores de mayor por ciento de actividad larvicida se observaron para la concentración de 50 mg/mL en los tres extractos empleados, con índices superiores al 60% para EAR y EA. La actividad larvicida a la concentración de 5 mg/mL fue la menor y no excedió el 15%; sin detectarse diferencias significativas con respecto al control negativo para los tres extractos; independientemente de su vía de obtención.

En estudios realizados, donde se utilizan extractos de plantas para evaluar sus propiedades antihelmínticas, se emplean concentraciones en el orden de los miligramos por mililitros. En el presente experimento los valores de las concentraciones de los diferentes extractos están en el orden de los microgramos por mililitros (1000 veces inferior al empleado usualmente); sin embargo, se obtuvieron valores similares en la actividad larvicida. Al utilizar el EA a una concentración de 50 mg/mL se alcanzó un 72.4% de efectividad y 68.4 % para EAR, índices comparables al enfrentar de forma *in vitro* extractos residuales de *Musa sp.* contra larvas *Haemonchus contortus* de ovinos (17). Sin embargo con extracto acuoso de *Adhatoda vasica* se obtuvo un efecto larvicida del 76.7% y 80.7% para *Trichostrongylus spp.* y *H. contortus* respectivamente, con una concentración de 50 mg/mL (18); que es una concentración 1000 veces superior a la empleada en el presente experimento con los EA y EAR de *R. mangle* L. para los mismos nematodos gastrointestinales.

Este comportamiento se debe a que los taninos constituyen los componentes mayoritarios del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* L.; de los cuales el 80% representa taninos poliméricos y el resto taninos hidrolizables, destacándose la presencia de epicatequinas, catequinas, ácido clorogénico, ácido gálico, ácido egálico, galotaninos, elagitaninos y taninos condensados con probada actividad antiséptica, antibacteriana, antifúngica entre otras (19).

El comportamiento de la actividad larvicida, de los EAR, EAM y EA durante los diez días de experimentación se representa en la Figura 1. Los EA y EAR presentaron similar tendencia para las concentraciones correspondientes. A la concentración de 50 mg/mL se alcanzó una meseta, con una tendencia al 100 % de actividad larvicida a partir del sexto día de observación. Cuando se empleó una concentración de 5 mg/mL ocurrió un aumento de la acción larvicida, sin embargo la pendiente fue suave y el porcentaje de actividad larvicida no excedió el 20 % para ninguno de los dos extractos, con un comportamiento similar al control negativo. En el caso que se utilizó una concentración de 25 mg/mL en ambos extractos aumentó la actividad larvicida después del cuarto día de observación, con un comportamiento lineal para el EA hasta el décimo día. El EAR alcanzó una tendencia lineal hasta el octavo día del experimento donde el porcentaje de actividad larvicida (91.2 %) fue semejante al último día experimental (96.4%).

El EMR presentó un comportamiento lineal para las concentraciones 25 y 50 mg/mL. La concentración de 5 mg/mL presentó una acción larvicida que excedió el 30% al finalizar el experimento. Esta actividad del EMR se explica por el empleo del metanol en la obtención de dicho extracto. El aislamiento de complejos activos

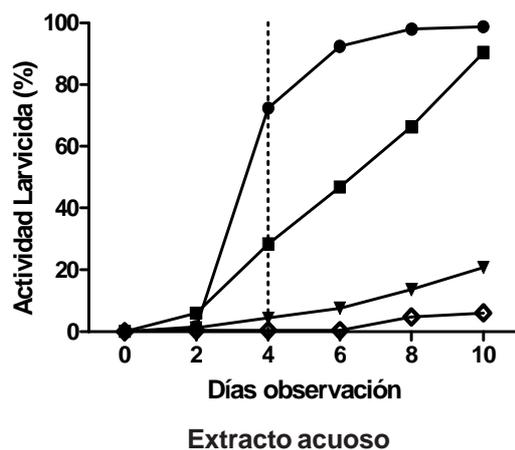
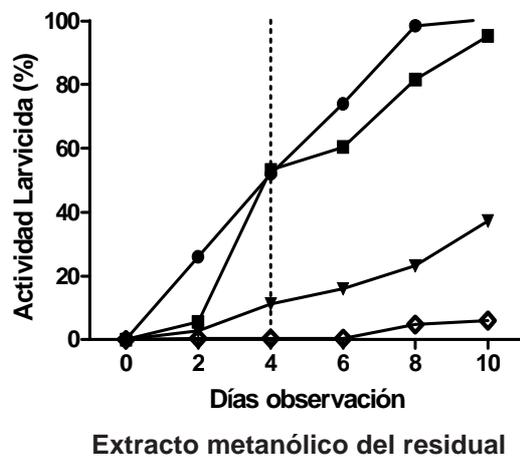
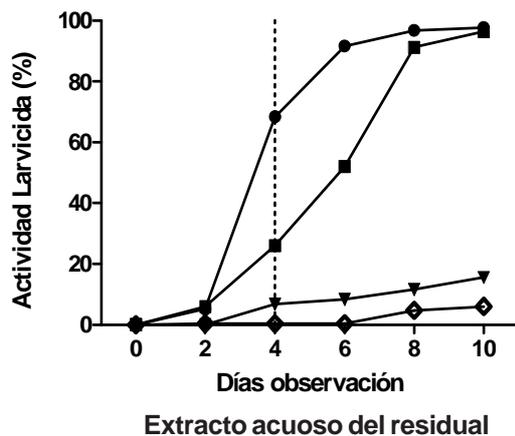


FIGURA 1. Eficacia de la actividad larvívica, de los diferentes extractos a las distintas concentraciones (●) 50 mg/mL, (■) 25 mg/mL, (▼) 5 mg/mL (◇) control negativo./ *Effectiveness of larvicidal activity of different extracts at concentration different.*

de plantas depende del disolvente; al utilizarse disolventes orgánicos se extraen más compuestos bioactivos de las plantas en comparación a extractos acuosos (20, 21). En este mismo orden se plantea, que un amplio espectro de plantas tiene actividad antihelmíntica, la intensidad de sus extractos, sin embargo, depende del modo de extracción (22).

Estos eventos indican, en condiciones de laboratorio, la posibilidad de utilizar extractos de la corteza de *R. mangle* L. como antihelmíntico contra *Trichostrongylus spp.* Estudios posteriores son necesarios para evaluar su espectro de acción sobre otras fases de desarrollo de strongilidos gastrointestinales en ovinos.

REFERENCIAS

- Mateos-Sanz A, Osoro K, Ortega-Mora LM, Ferre I. TANINOS CONDENSADOS: Nueva alternativa en el control de las nematodosis gastrointestinales de los pequeños rumiantes. 2005. (Consultado 6-10-09. Disponible en: <http://www.edicionestecnicasreunidas.com/produccion/tanene5.htm>).
- Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 2006; 22(6): 253-261.
- Rodríguez-Diego J.G. Aportes a la biología, diagnóstico y epizootiología de parásitos de interés veterinario. Tesis (Doctorado segundo nivel)-Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). La Habana. 2008
- Githiori JB, Hoglund J and Waller PJ. Ethnoveterinary plant preparation as dewormers: practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for future. *Anim Health. Res. Rev.* 2005; 6(1): 91-103.
- Terrill TH, Dykes GS, Shaik SA, Miller JE, Kouakou B, Kannan G, et al. Efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats: dose titration study. *Vet Parasitol.* 2009; 163: 52-56.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Hoste H. Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: A friendly foe? *Small Rumin Res.* 2010; 89: 164-173.
- Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Vargas-Magaña JJ, Canul-Ku HL, Miranda-Soberanis R, Capetillo-Leal C, Sandoval-Castro CA, et al. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on

- adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol.* 2010; 172: 283-290.
8. Lorimer SD, Perry NB, Foster LM, Burgess EJ, Douch PG, Hamilton MC, et al. A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. *J Agric Food Chem.* 1996; 44: 2842-2845.
 9. Niezen JH, Waghorn GC, Graham T, Carter JL, Leathwick DM. The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture. *Vet Parasitol.* 2002; 105: 269-283.
 10. Molan AL, Waghorn GC, McNabb WC. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* in vitro. *Vet Rec.* 2002; 150:65-69.
 11. Houdijk JG, Athanasiadou S, 2003. Direct and Indirect effects of host nutrition on ruminant gastrointestinal nematodes. Matching herbivore nutrition to ecosystems biodiversity. VI International Symposium on the nutrition of herbivores (Ed. L't Mannelje, Ramírez L, Sandoval-Castro C, Ku-Vera JC), Mérida, México, pp. 213-236.
 12. Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. Direct antihelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet Parasitol.* 2001; 99: 205-219.
 13. Pérez T, Escobar A, Rodríguez R, Riverón Y, Fraga I, Sánchez LM, Fraga V, Hernández E, Muñoz A. Obtención de una formulación de *R. mangle* a escala industrial. *Revista Cubana de Química. II Conferencia Internacional de Química.* (CD-ROM ISBN 959-250-080-0); 2003.
 14. CORTICELLI B y LAI M.. Ricerche sulla tecnica di coltura delle larve infestive degli strongili gastrointestinali del bovino. *Acta Medica Veterinaria*, año 9, fâsc. V/VI, 1963.
 15. ROBERTS FH y O'SULLIVAN YJ. Methods for egg counts and larvae cultures for Strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Aust J Agr. Res.* 1949;1: 99-102.
 16. van Wyk JA, Cabaret J, Michael LM. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Vet Parasitol.* 2004; 119: 277-306.
 17. Nunes OL, Robson DE, Aparecida Nogueira Flavia, Rayana Brito da Silva, Emygdio de Faria FD, Luciana Castro Geraseev. Eficácia de resíduos da bananicultura sobre a inibição do desenvolvimento larval em *Haemonchus* spp. provenientes de ovinos. *Ciência Rural*, Santa Maria. 2010; 40(2): 488-490.
 18. AL-SHAIBANI IR, Phulan MS, Arijo A and Qureshi TA. Ovicidal and larvicidal properties of *ADHATODA VASICA (L.)* extracts against gastrointestinal nematodes of sheep in vitro. *Pakistan Vet J.* 2008; 28(2): 79-83.
 19. Sánchez LM. Composición química y actividad biológica de un extracto acuoso de cortezas de *Rhizophora mangle L.* Tesis en opción del grado científico de Dr. en Ciencias Veterinarias, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana. 1998.
 20. Alawa CB, Adamu AM, Gefu JO, Ajanusic OJ, Abdu PA, Chiezey NP, et al. In vitro screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Vet Parasitol.* 2003; 133: 73-81.
 21. Cowan MM. Plant products as antibacterial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(4): 564-582.
 22. Klimpel S, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KA, Aksu G, Fischer K, Strassen B, et al. The effects of different plant extracts on nematodes. *Parasitol Res.* 2011; 108 (4): 1047-1054.

(Recibido 3-12-1010; Aceptado 1-8-2011)