

ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA DE EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES DE *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G. Lohmann FRENTE A *Eisenia foetida*.

López Grau, Ever José; ever_grau@hotmail.com

Universidad Nacional de Asunción

Resumen

Las enfermedades parasitarias pueden producir alta morbilidad, por lo tanto, no pueden ser consideradas un problema médico exclusivamente, sino un problema de salud pública debido al impacto social y económico que éstas generan.

En el Paraguay, a lo largo de su historia, se han utilizado plantas medicinales, ya sean éstas nativas o cultivadas, para el tratamiento de las enfermedades, buscando la cura o un alivio de sus síntomas, una costumbre muy arraigada, vinculada principalmente al dificultoso acceso de la población a la salud pública de calidad.

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antihelmíntica in vitro de extracto crudo y fracciones de *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G Lohmann frente a *Eisenia foetida*, y determinar los metabolitos secundarios presentes en la planta.

Es un estudio experimental, dentro de la línea de investigación: Búsqueda de actividad antihelmíntica de plantas del Paraguay, del departamento de Fitoquímica de la FCQ.

Mediante el método de Ajaiyeoba y colaboradores, se colocaron tres gusanos por placa, donde fueron puestos en contacto con el extracto crudo y las distintas fracciones a concentraciones conocidas, y se registró el tiempo de parálisis y tiempo de muerte.

Los resultados presentados en este trabajo evidenciaron la presencia de moléculas con actividad antihelmíntica en esta especie vegetal, ya que existen diferencias significativas en cuanto al tiempo de parálisis y tiempo de muerte en relación al control empleado.

La composición química del extracto crudo se analizó empleando la metodología basada en pruebas de reacciones de coloración y/o precipitación, así como también cromatografía en capa

fina, para determinar la presencia de los principales metabolitos secundarios en la planta.

Palabras clave: *Amphilophium crucigerum*, actividad antihelmíntica, extracto crudo, *Eisenia foetida*.

INTRODUCCIÓN

América, luego del periodo de la conquista europea, ha sido objeto de varios cambios de gran magnitud, ya sean estos económicos, sociales y de hábitat. A medida que ocurrían los cambios demográficos, ecológicos y de salud, las poblaciones se iban adaptando a ellos, de esta manera, sus habitantes iban sufriendo el impacto que ello conlleva; degradación del medio ambiente, desmejoramiento en la calidad de vida y productividad. Estos cambios, normalmente, inciden directamente sobre los patrones de las enfermedades, al verse afectados los recursos económicos, prácticas sanitarias y el comportamiento nutricional (Navone, Zonta y Gamboa, 2014).

Las enfermedades parasitarias pueden producir alta morbilidad, por lo tanto, no pueden ser consideradas como problema médico exclusivamente, sino un problema de salud pública debido al impacto social y económico que éstas generan. Los agentes infecciosos causantes de la parasitosis, a menudo, pueden producir disminución del apetito, diarreas, y otros síntomas, afectando el estado nutricional de los humanos, incidiendo preferentemente en los niños, la cual provoca deficiencia de crecimiento, falta de atención, mal nutrición, y otras afecciones (Navone et al.,2014).

Las helmintiasis transmitidas por el suelo están ampliamente distribuidas por las zonas tropicales y subtropicales, especialmente en el África subsahariana, América, China y Asia oriental, y son una de las parasitosis más comunes en todo el mundo y afectan a las comunidades más pobres y desfavorecidas. Son transmitidas por los huevos de los parásitos eliminados con las heces de las personas infectadas, los que a su vez contaminan el suelo en zonas donde la educación sanitaria y hábitos de higiene no son comunes (Organización Mundial de la Salud, 2017).

Debido a las altas tasas de parasitosis, se deben promover estrategias y políticas públicas que ayuden a ejercer un control sobre las enfermedades ya existentes, y de prevención para evitar

los daños y el impacto de la parasitosis intestinal. El tratamiento en la actualidad es aplicado de forma preventiva y a partir de exámenes coprológicos, mediante fármacos antiparasitarios, terapias alternativas y medicina fitoterápica (Abarca y Gonzales, 2009).

Se cree que un cuarto de la población mundial está infectada con alguna especie de helminto intestinal, ya que existen unos 20 tipos de helmintiasis que pueden afectar al ser humano (Kogien y Teixeira, 2011).

Todas las culturas y poblaciones, a lo largo de los años, han intentado explicar y comprender el uso de plantas medicinales como tratamiento a sus afecciones y sigue siendo una base terapéutica en varias de ellas, acrecentándose sobre todo en países en vías de desarrollo, como lo es el nuestro (Navone et al., 2014).

En el Paraguay, a lo largo de su historia, se han utilizado plantas medicinales, ya sean éstas nativas o cultivadas, para el tratamiento de las enfermedades, buscando la cura o un alivio de sus síntomas, una costumbre muy arraigada, vinculada principalmente al dificultoso acceso de la población a la salud pública de calidad.

No se conoce con exactitud la verdadera prevalencia e intensidad de las helmintiasis en América Latina y el Caribe, ya que solamente se dispone de algunos estudios nacionales y subnacionales. Al respecto, la Organización Panamericana de la Salud tiene una base de datos de más de 526 estudios sobre la prevalencia de estas parasitosis, pero solamente 8 de los 35 países analizados han realizado encuestas nacionales sobre el tema en los últimos años y Paraguay no está incluido en este estudio (Organización Panamericana de la Salud, 2015).

En Paraguay, en el año 2016, se realizó la Campaña Nacional de Desparasitación Masiva a Escolares, Jaityke Sevo`í. La campaña fue liderada por la Dirección de Salud Integral de la Niñez y Adolescencia, dependiente de la Dirección General de Programas de Salud del MSP y BS en conjunto con el Ministerio de Educación y Cultura con el apoyo técnico y financiero de la Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS – Paraguay, 2015).

En 2016 se celebra la 4ta campaña consecutiva. En el 2013, la meta establecida a nivel internacional por la OPS/OMS fue de 75% de cobertura en la población de 6 a 16 años. En Paraguay, “gracias a los esfuerzos intersectoriales y el compromiso de los trabajadores de blanco, los resultados fueron muy alentadores; la última campaña nacional logró una cobertura

del 96% beneficiando a casi un millón de niños y adolescentes” (OPS/OMS – Paraguay, 2015).

Se estima que en la región de las Américas una de cada tres personas está infectada por geohelminos parásitos y cerca 46 millones de niños entre 1 y 14 años están en riesgo de infectarse por estos parásitos. Aproximadamente 13 millones de niños en edad pre-escolar (1 a 4 años) y 33,3 millones de escolares (entre 5 a 14 años), están en riesgo debido a la falta de saneamiento básico, acceso a agua potable e higiene de los alimentos. A nivel regional, los países priorizados por la OPS/OMS para realizar estas campañas masivas son: Brasil, Colombia, El Salvador, Guyana, Haití, Honduras, Nicaragua, Paraguay y República Dominicana (OPS/OMS – Paraguay, 2015).

En estas iniciativas nacionales se administraron una dosis única del fármaco albendazol y fueron provistas por la Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS – Paraguay, 2015).

Sin embargo, el uso masivo de antihelmínticos puede llevar al desarrollo de resistencia por parte de los parásitos, algo que ya se ha visto que ha sucedido en medicina veterinaria, por lo que la búsqueda de nuevos antihelmínticos es necesaria para combatir la eventual aparición de resistencia en los helmintos a los bencimidazoles, que son los fármacos más utilizados para ello (Geerts y Gryseels, 2000).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar la composición química y la actividad antihelmíntica *in vitro* de extracto de *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G. Lohmann frente a *Eisenia foetida*.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

- Determinar la actividad antihelmíntica del extracto metanólico y las fracciones de *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G. Lohmann
- Determinar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G. Lohmann mediante un análisis fitoquímico preliminar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas-UNA.

Línea de investigación en la que se enmarca: Búsqueda de actividad antihelmíntica de plantas del Paraguay.

Tipo de estudio: Análisis experimental.

Material vegetal

Amphilophium crucigerum

Nombre popular: Ka'í Kyguá, Peine de Mono

Nombre científico: *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G.Lohmann

Familia: Bignoniaceae

Descripción:

Planta trepadora leñosa, con ramas angulosas, tomentosas. Hojas compuestas, 2-3 foliadas, lámina 7-10 x 6-9 cm, oval a orbicular, pubescente, ápice obtuso a agudo, base cordada a subauriculada, peciolo de 3-8 cm de largo. Inflorescencia racimosa, pubescente o tomentosa, cáliz cupuliforme, denticulado, pubérulo a tomentoso, 1 cm de largo, corola tubular-campanulada, blanca o blanca -amarillenta (Schwirkowsk, 2009).

Floración/Fructificación

De noviembre a diciembre y fructifica de enero a junio (Schwirkowsk, 2009).

Hábitat (Instituto de Botánica Darwinion, 2017)

Distribución en Paraguay Alto Paraná, Amambay, Caaguazú, Caazapá, Canindeyú, Central, Concepción, Cordillera, Guairá, Itapúa, Misiones, Paraguari, San Pedro.

Recolección del material vegetal

La especie fue recolectada en el Barrio San Patricio, Segunda Compañía de la ciudad de Capiatá, Departamento Central, e identificada por personal del Departamento de Botánica de la facultad de Ciencias Químicas, en donde un ejemplar del mismo fue depositado en el Herbario (FCQ), ejemplar nº 222, L. Britos & E. López

Obtención del Extracto metanólico

El material vegetal fue secado en estufa. La parte empleada para *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G. Lohmann, fue la parte aérea, la cual fue triturada en un molino de cuchillas hasta consistencia de polvo fino. Posteriormente se extrajo por el método de maceración en frío. Para ello el material molido se puso en contacto con metanol grado analítico (Biopack), durante 24 horas, repitiendo el proceso 3 veces. Luego fue filtrado por gravedad utilizando algodón desengrasado como filtro. Se obtuvo el extracto crudo eliminándose el solvente por medio de un evaporador rotatorio de vacío.

Obtención de las fracciones a partir del extracto metanólico

Se realizó disolviendo el extracto crudo en agua, y posterior partición sucesiva liquido-liquido con solventes de polaridad creciente, obteniéndose así las siguientes fracciones:

- Fracción de hexano
- Fracción de cloroformo
- Fracción de acetato de etilo
- Fracción de n-butanol

- Fracción acuosa

Determinación de la actividad antihelmíntica

Las lombrices utilizadas en el estudio *in vitro* provinieron del stock de cría del Departamento de Fitoquímica, FCQ-UNA.

La especie utilizada es *Eisenia foetida*, comúnmente llamada lombriz roja californiana, de 4 a 6 cm de longitud en promedio, éstas fueron utilizadas debido a la semejanza con los parásitos intestinales humanos y la alta factibilidad de cría y disponibilidad.

El extracto crudo y las fracciones fueron pesados y disueltos en solución fisiológica al 0,9% junto con 5% de dimetilsulfóxido (DMSO), en concentraciones de 10, 20 y 40 mg/mL para el extracto crudo y 1 mg/mL para las fracciones.

El albendazol fue utilizado como control positivo, a una concentración de 10 mg/mL.

Mediante el método de Ajaiyeoba y colaboradores (Purushothaman, Sudhir, Joby, Aravind y Varghese, 2015) se determinó la actividad antihelmíntica y se procedió colocando tres gusanos por placa, en donde se pusieron en contacto con el extracto crudo a las concentraciones anteriormente citadas y las distintas fracciones y se registró el tiempo de parálisis y tiempo de muerte. Se constata la muerte de la lombriz cuando no presenta ningún movimiento en una placa con agua a 50°C. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados según el test de D'Agostino y Pearson para contrastar la normalidad del conjunto de datos, para posteriormente realizar ANOVA seguido del método de Dunett para realizar comparaciones múltiples pertinentes ($p < 0,05$).

Análisis Fitoquímico preliminar

El extracto crudo se analizó empleando la metodología basada en pruebas de reacciones de coloración y/o precipitación (Sanabria, 1983), así como también cromatografía en capa fina, para determinar la presencia de los principales metabolitos secundarios que se encuentran en

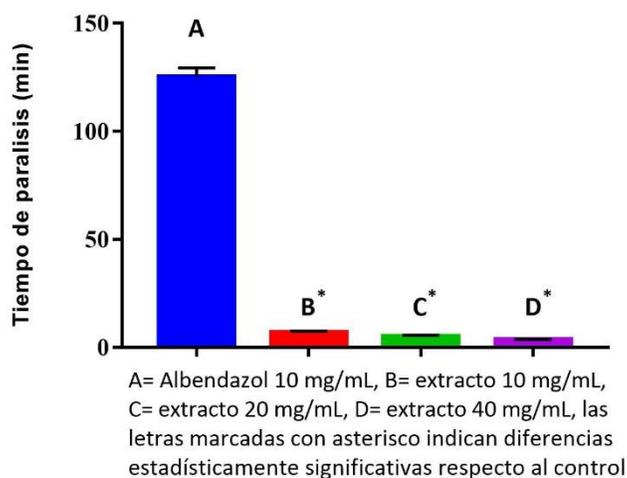
la planta. Se realizaron pruebas para determinar la presencia o ausencia de alcaloides, flavonoides, esteroides y/o triterpenoides, naftoquinonas y/o antraquinonas, taninos, saponinas, cumarinas, cardiotónicos y lactonas terpénicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Actividad antihelmíntica del extracto crudo metanólico de *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G. Lohmann.

Para el extracto crudo de *Amphilophium crucigerum* se observó que existe diferencia significativa en el tiempo de parálisis entre el extracto a todas las concentraciones respecto al

Tiempo de parálisis *Amphilophium crucigerum*



albendazol.

Figura 1. Tiempo de Parálisis. *Amphilophium crucigerum*

En tanto que para el tiempo de muerte, se observó que todas las concentraciones del extracto crudo disminuyeron de forma significativa el tiempo de muerte en comparación al control.

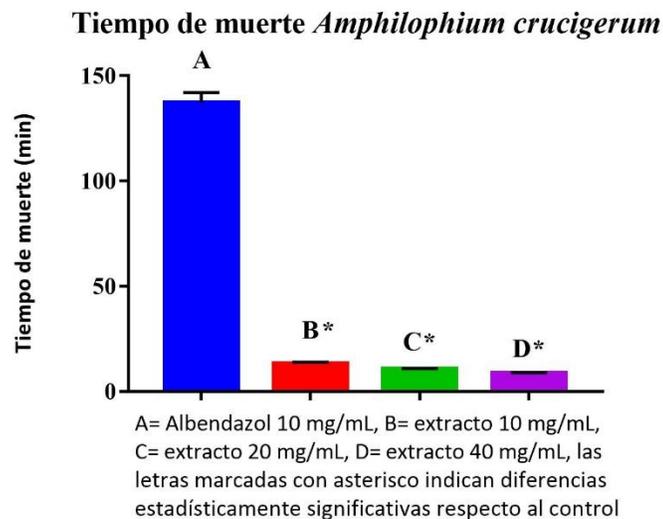
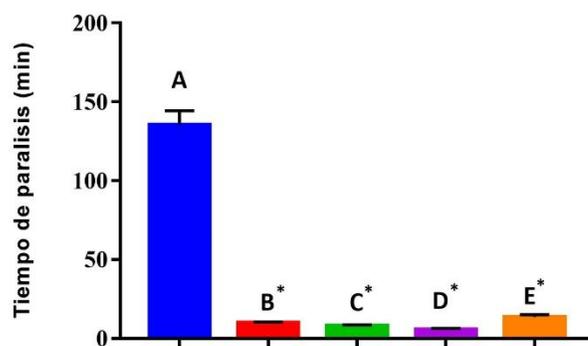


Figura 2. Tiempo de Muerte. *Amphilophium crucigerum*

2. Actividad antihelmíntica de las fracciones de *Amphilophium crucigerum*.

Se observó que los tiempos de parálisis y de muerte fueron significativamente inferiores a los valores alcanzados con el albendazol.

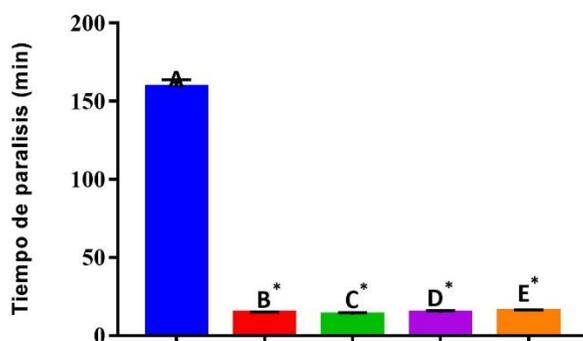
Tiempo de parálisis fracciones *Amphilophium crucigerum*



A= Albendazol 10 mg/mL, B= acetato de etilo 10 mg/mL, C= hexano 10 mg/mL, D= cloroformo 10 mg/mL, E= butanol 10 mg / mL. Las letras marcadas con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control

Figura 3. Tiempo de Parálisis Fracciones. *Amphilophium crucigerum*

Tiempo de muerte fracciones *Amphilophium crucigerum*



A= Albendazol 10 mg/mL, B= acetato de etilo 10 mg/mL, C= hexano 10 mg/mL, D= cloroformo 10 mg/mL, E= butanol 10 mg / mL. Las letras marcadas con asterisco indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control

Figura 4. Tiempo de Muerte. Fracciones. *Amphilophium crucigerum*

No se observó actividad con la fracción acuosa.

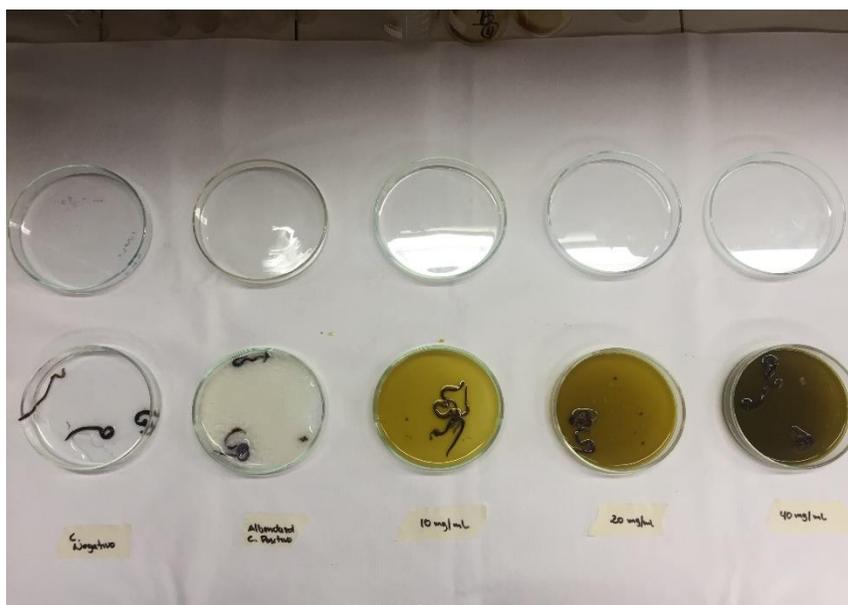


Figura 5. Prueba Experimental con Extracto Crudo

3. Caracterización fitoquímica de *Amphilophium crucigerum* (L.) L.G. Lohmann

Nombre: <i>Amphilophium crucigerum</i> (L.) L.G. Lohmann	
Familia: Bignoniaceae	
Parte estudiada: parte aérea	
Metabolito Secundario	Prueba
<i>Alcaloides</i>	Positivo
<i>Flavonoides</i>	Negativo
<i>Nafto y/o Antraquinonas</i>	Negativo
<i>Taninos</i>	Positivo
<i>Saponinas</i>	Positivo
<i>Esteroides y/o Triterpenoides</i>	Positivo
<i>Cumarinas</i>	Negativo
<i>Cardiotónicos</i>	Negativo
<i>Lactonas Terpénicas</i>	Negativo

CONCLUSIÓN

Al determinar la actividad antihelmíntica del extracto crudo de *Amphilophium crucigerum* demostró que se presenta una disminución significativa del tiempo de parálisis y tiempo de muerte respecto al albendazol, ésta diferencia se acrecentó a medida que aumentó la concentración.

Al analizar las fracciones también se observó una disminución significativa del tiempo de parálisis y tiempo de muerte con respecto al albendazol, observándose una mayor disminución del tiempo de parálisis con la fracción clorofórmica. Todas las fracciones presentaron actividad, excepto la acuosa.

Los resultados presentados en este trabajo evidenciaron la presencia de moléculas con actividad antihelmíntica en esta especie vegetal. Se requieren estudios posteriores para el

aislamiento del o los compuestos responsables para evaluar su actividad de forma individual.

Los resultados obtenidos a través de éste modelo abren posibilidades de ensayos en otro modelo superior al estudiado.

Se requieren también estudios para determinar la toxicidad o no de la especie estudiada.

Con la evidencia de los resultados obtenidos se abren nuevos caminos para obtener nuevos antiparasitarios empleando plantas nativas del país, y además realizar estudios más específicos en busca de obtener nuevos compuestos que presenten mayor eficacia y seguridad que los fármacos que actualmente se utilizan para éstas afecciones.

Con la caracterización fitoquímica de *Amphilophium crucigerum* se determinaron ciertos grupos de metabolitos secundarios tales como alcaloides de amonio cuaternario y/o óxidos de aminas, esteroides y/o triterpenoides, taninos y saponinas, algunos de los cuales podrían ser responsables de la actividad observada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abarca, D. y Gonzales, V. (2009) EFFECTIVENESS OF "Chenopodium ambrosioides and Cucurbita maxima Duch" IN STUDENTS OF ELEMENTARY EDUCATION PARASITOSIS TREATMENT FROM PUNO CITY. *Revista Investig. (Esc. Post Grado)* 5 (3): 51-66

Geerts, S. y Gryseels, B. (2000). Drug resistance in human helminths: Current situation and lessons from livestock. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (2): 207–222. Recuperado de <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.207-222.2000>

Instituto de Botánica Darwinion. Flora del Cono Sur. Catálogo de plantas vasculares. Recuperado el 25 de octubre del 2017 de <http://www.darwin.edu.ar>

Kogien, M. y Teixeira, CA. (2011) Mebendazol en el tratamiento de helmintiasis intestinales, revisión de literatura y consideraciones de Enfermería. *Enferm. Glob.* 10 (24).

Navone, G., Zonta, M. y Gamboa, M. (2014). Fitoterapia Mbyá-Guaraní en el control de las parasitosis intestinales: Un estudio exploratorio con *Chenopodium ambrosioides* L. var *anthelminticum* en cinco comunidades de Misiones, Argentina. *Polibotánica*. (37): 135-151.

Organización Mundial de la Salud (2017). Helmintiasis transmitidas por el suelo. Centro de prensa. Recuperado el 4 de noviembre del 2017 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/es/>

Organización Panamericana de la Salud (2015). Pautas operativas para la puesta en marcha de actividades integradas de desparasitación: contribución al control de las geohelmintiasis en América Latina y el Caribe. Washington, DC. Recuperado el 14 de noviembre del 2017 de <http://www.paho.org/col/>

Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. (2016). Campaña de desparasitación. Paraguay. Recuperado el 24 de noviembre de 2017 de <http://www.paho.org/par/>

Purushothaman, A., Sudhir, AS., Joby, G., Aravind, R. y Varghese, A. (2015) A study on antimicrobial and antihelmintic activity of methanolic leaf extracts of *Syzygium malaccense* (L.) Merr & Perry. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7 (4): 838-841

Sanabria, A. (1983) *Análisis fitoquímico preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia compositae*. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Farmacia. Bogotá, Colombia.

Schwirkowsk, P. (2009). Projeto de divulgação da flora nativa da cidade de São Bento do Sul, SC, Brasil.

ssSsSC, Brasil. Recuperado el 25 de octubre del 2017 de

