

# EFECTO IN VITRO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE PIÑA (*Ananas comosus*) SOBRE NEMATODOS GASTROINTESTINALES DE OVINOS

IN VITRO EFFECT OF THE AQUEOUS EXTRACT OF PINEAPPLE LEAVES (*Ananas comosus*) ON GASTROINTESTINAL NEMATODES OF SHEEP

Hernández-Villegas M.M.<sup>1\*</sup>, Barrientos-Ramírez L.<sup>2</sup>, Bolio-López G.I.<sup>1</sup>, Hernández-Bolio G.I.<sup>3</sup>, Rivera-Torrez D.L.<sup>1</sup>, Hipólito-Velasco J.C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>División de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias. Universidad Popular de la Chontalpa, Tabasco, México.

\*mahervi57@gmail.com.

<sup>2</sup>Departamento de Madera, Celulosa y Papel, CUCEI. Universidad de Guadalajara, México.

<sup>3</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

---

**Keywords:** Anthelmintic activity; *Haemonchus contortus*; Parasite control; Phytotherapy.

**Palabras clave:** Actividad antihelmíntica; *Haemonchus contortus*; Control de parásitos; Fitoterapia.

---

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the anthelmintic effect of the aqueous extract of leaves of *Ananas comosus* on eggs of gastrointestinal nematodes (GIN). The procedure was as follows: 5 g of the ground leaf material were boiled in 100 ml of distilled water; the resulting solution was filtered and subjected to a deep freezing process at -20°C. Subsequently it was lyophilized, obtaining the pure extract. Additionally, a phytochemical profile and determination of protein content and digestibility were performed. Two donor lambs, previously infected with *Haemonchus contortus* larvae, were used to obtain eggs from GIN. For the evaluation of the anthelmintic effect, egg-hatching test was used. An analysis of variance (ANOVA) was used for comparison of means. The overall findings of the current study indicated that the aqueous extract of leaves of *A. comosus* at the concentration of 600 µg / mL showed an inhibition of hatching of *H. contortus* eggs similar to the positive control (thiabendazole 10 µg/mL), 96 and 98% respectively. Among the secondary compounds found to be of major importance are mainly tannins, quinones and alkaloids, which may be responsible for the inhibitory effect of hatching of *H. contortus* eggs of sheep.

---

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antihelmíntico del extracto acuoso de hojas de *Ananas comosus* sobre huevos de nematodos gastrointestinales (NGI) en ovinos y realizar un perfil fitoquímico. El procedimiento fue el siguiente: 5g del material molido de hojas de *A. comosus* fueron puestos en 100 ml de agua destilada, previamente en ebullición; una vez fría, la solución resultante fue filtrada y sometida a un proceso de ultracongelación a -20 °C. Posteriormente fue liofilizada, obteniendo el extracto puro. Adicionalmente se realizó un perfil fitoquímico y la determinación del porcentaje de proteína y digestibilidad. Para la obtención de los huevos de NGI se utilizaron dos corderos donadores, infectados previamente con larvas de

*Haemonchus contortus*. Para la evaluación del efecto antihelmíntico se utilizó la prueba de eclosión de huevos *in vitro*. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para comparación de medias. Los resultados señalan que el extracto acuoso de hojas de *A. comosus* a la concentración de 600 µg/mL mostró una inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* similar al control positivo (tiabendazol 10 µg/mL), 96 y 98 % respectivamente. Entre los compuestos secundarios encontrados en mayor importancia se encuentran principalmente, taninos, quinonas y alcaloides, los cuales podrían ser responsables del efecto de inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* en ovinos.

---

## INTRODUCCIÓN

Los nematodos gastrointestinales (NGI) son la principal amenaza y limitante primaria en la producción de ovinos y ponen en peligro el bienestar animal en el mundo. La situación se torna más grave en los países en desarrollo. Algunas especies de nematodos especialmente aquellos que se alimentan de sangre tales como *Haemonchus contortus*, es responsable de grandes pérdidas económicas en la producción de pequeños rumiantes. Aunque las especies de *Haemonchus* infectan a todos los rumiantes, la severidad por *H. contortus* es más pronunciada en ovinos, donde se relaciona a anemia severa, diarrea, pérdida de peso y muerte del animal (Agarwal & Banerjee, 2007). La forma de control de los NGI es mediante el uso de antihelmínticos (AHs) sintéticos, sin embargo, el desarrollo de poblaciones de nematodos resistentes a todos los AHs, la contaminación del suelo y los posibles residuos que entran a la cadena alimenticia ha despertado el interés de los investigadores para encontrar nuevas alternativas de control (Melo *et al.*, 2003). Esto ha detonado la necesidad de explorar nuevas estrategias para el control de los NGI. En este sentido, las plantas que contienen metabolitos secundarios con propiedades antihelmínticas están siendo consideradas como una alternativa para el control de NGI en climas templados y tropicales. La piña, *Ananas comosus* (Bromeliaceae), es ampliamente cultivada en regiones tropicales y subtropicales, además de ser uno de los frutos más importantes en el mundo; el jugo de este fruto es el tercero más preferido a nivel mundial después del jugo de naranja y manzana (Upadhyay *et al.*, 2010; Suksathit *et al.*, 2011). El cultivo de la piña genera una cantidad importante de subproductos por hectárea que pueden ser conservados y utilizados en la alimentación de animales rumiantes; de acuerdo a López *et al.* (2008), por cada hectárea de cultivo de piña cosechada quedan entre 200 y 250 toneladas de material verde (planta entera) que no tiene uso y representa un enorme potencial para ser utilizado en la alimentación de rumiantes. Comercialmente el fruto de la piña es muy apetecido y las hojas son consideradas como desechos materiales del fruto que pueden ser utilizadas para diversos usos. Las propiedades terapéuticas de sus extractos incluyen actividad antiinflamatoria, antifúngica, y actividad antihelmíntica (Steppek *et al.*, 2005; Hordegen *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2013). Se ha encontrado que el Bromelain, una cistein proteasa que se encuentra principalmente en el tallo del fruto, tiene actividad sobre la cutícula de nematodos, atribuida al complejo de enzimas denominadas proteinasas, que promueven la digestión de la cutícula y muerte del parásito (Steppek *et al.*, 2007a; Steppek *et al.* 2007b; Buttle *et al.*, 2011). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *A. comosus* sobre huevos de *H. contortus* de ovinos y realizar un perfil fitoquímico del extracto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Localización*

El trabajo se realizó en el laboratorio de investigación animal de la Universidad Popular de la Chontalpa, ubicado en el km 2.0 de la carretera Cárdenas-Huimanguillo. Geográficamente se localiza entre las coordenadas 18° 0' de latitud norte y 93° 23' de longitud oeste, a una altitud de 10 msnm. Tiene un clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano y un rango de temperatura 26-28°C el tipo de suelo predominante es el vertisol (INEGI, 2011).

### *Colecta y preparación del extracto*

Las hojas de *A. comosus* fueron colectadas en el mes de abril de 2015 en el ejido Lic. Salvador J. Neme Castillo, municipio de Huimanguillo, Tabasco; posteriormente fueron trasladadas al laboratorio de la Universidad Popular de la Chontalpa. Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente durante 7 días. Una vez seco el material, fue cortado en pequeños pedazos para después molerlo hasta obtener un tamaño de partícula fina. Después, se preparó la infusión colocando 5 g del material molido de *A. comosus* en 100 mL de agua destilada, previamente colocada a ebullición; luego, la solución resultante se dejó enfriar y posteriormente fue filtrada. La solución final fue colocada en viales para su congelación a -20°C. Por último, el material fue sometido al proceso de liofilización para la obtención del extracto puro y almacenado a 4°C hasta su uso.

### *Obtención de huevos de parásitos gastrointestinales*

Para la obtención de huevos de parásitos gastrointestinales, se utilizaron 2 ovinos infectados artificialmente con una cepa de *H. contortus*, la cual fue donada por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Yucatán. Los animales fueron alojados en un corral con piso de concreto para evitar reinfestaciones. El periodo de adaptación fue de 10 días, este tiempo sirvió para conocer la carga parasitaria y efectuar la desparasitación con dos antihelmínticos comerciales: levamisol al 12% 7.5 mg por kg de peso vivo (P.V.) vía subcutánea y albendazol 5.0 mg por kg de P.V. vía oral. Una vez confirmado que los animales estaban libre de parásitos, se procedió a realizar la infección monoespecífica con *H. contortus*, utilizando aproximadamente 350 larvas infectivas L3 por kg de peso vivo. 14 días después de la infección se procedió a realizar la confirmación de la infección y el monitoreo para colectar los huevos. Los huevos fueron extraídos de las heces de los animales de acuerdo a la metodología descrita por Coles *et al.* (1992) con algunas modificaciones leves.

### *Prueba de eclosión de huevos in vitro*

Esta prueba fue realizada de acuerdo a la guía de la asociación mundial para el avance de la parasitología veterinaria (WAAVP, por sus siglas en inglés) (Coles *et al.*, 1992). La suspensión de huevos a una concentración de 150 huevos/mL, fue distribuida en las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *A. comosus* 75, 150, 300 y 600 µg/mL y asignadas en placas de 24 posos. El PBS (Phosphate Buffer Saline) fue usado como control negativo y el tiabendazol como control positivo (10 µg/mL). El tiabendazol fue usado en esta prueba, ya que es un antihelmíntico de amplio espectro que tiene poder ovocida, su mecanismo de acción es inhibir la polimerización de los microtúbulos ocasionando la muerte celular (Martin, 1997). Se utilizaron cuatro replicas por concentración y los controles. Después de 48 h de incubación a 28°C, la eclosión fue detenida al adicionar una gota de lugol. Posteriormente, las larvas eclosionadas (muertas o vivas) y los huevos no eclosionados fueron contados a través de un microscopio óptico a 40x.

### Análisis fitoquímico

Las pruebas fitoquímicas para detectar la presencia de alcaloides, esteroides, flavonoides, quinonas, saponinas y taninos fueron realizadas en el extracto acuoso de hojas de *A. comosus*, de acuerdo a los métodos previamente descritos por Domínguez (1979).

Estas pruebas están basadas en la observación visual de cambio de color o de la formación de precipitados después de adicionar un reactivo específico. Para detectar la presencia de diferentes metabolitos se utilizaron las pruebas de: Alcaloides (Dragendorff y Mayer); Cianidina (Flavonoides); Esteroides (Salkowsky); Quinonas (Bornträger); Taninos (Gelatina sal y Cloruro Férrico) y Saponinas (Liebermann-Burchard).

### Análisis estadístico

Los porcentajes de inhibición de la eclosión de huevos a las diferentes concentraciones probadas fueron comparados contra el grupo control positivo (tiabendazol), por medio de un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el programa SPSS versión 15.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas *in vitro* son consideradas uno de los mejores medios de tamizajes para la actividad antihelmíntica de nuevos compuestos de plantas. En el presente estudio, usando la prueba de inhibición de la eclosión de huevos el extracto acuoso de hojas de *A. comosus* contra *H. contortus* a la concentración de 600 µg/mL mostró una actividad similar al control positivo tiabendazol  $P \leq 0.05$  (Tabla I). En un estudio realizado por Ferreira *et al.* (2013), obtuvieron un porcentaje de inhibición del 100% utilizando una concentración 250 mg/mL del extracto acuoso de la cáscara de piña, estos resultados son superiores a los obtenidos en el presente estudio, sólo que, la concentración utilizada fue mucho mayor a la utilizada en el presente estudio. Estudios similares con extractos de plantas han encontrado resultados promisorios en las pruebas de eclosión de huevos, desarrollo larval y prueba de inhibición de la migración larval (Camurca-Vasconcelos *et al.*, 2007; Egualde *et al.*, 2007; Alonso-Díaz *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2008; Manolaraki *et al.*, 2010).

**Tabla I.** Medias  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de eficacia de inhibición de huevos de *H. contortus* con el extracto acuoso de hojas de *A. comosus* (Means  $\pm$  standard deviation of percentage of inhibition efficacy of eggs from the aqueous extract of *A. comosus* leaves against *H. contortus*).

Tratamiento	Concentración µg/mL	Eficacia $\pm$ D.E.
Tiabendazol	0.05	98.5 $\pm$ 4.26 <sup>a</sup>
EAAc	600	96.0 $\pm$ 4.26 <sup>a</sup>
EAAc	300	89.7 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>
EAAc	150	68.5 $\pm$ 3.00 <sup>c</sup>
EAAc	75	66.0 $\pm$ 7.10 <sup>c</sup>
Control negativo	PBS	6.25 $\pm$ 3.68 <sup>d</sup>

Letras diferentes en la misma columna representan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ); EAAc=Extracto Acuoso de *Ananas comosus*; PBS=Phosphate Buffered Saline.

La actividad antihelmíntica del extracto de hojas de *A. comosus*, puede ser atribuible a los compuestos encontrados en el extracto (tabla II) y que se encuentran en mayor proporción. Las saponinas y los taninos pueden estar involucrados en la actividad de inhibición de la eclosión de los huevos de *H. contortus*, las saponinas usualmente actúan enlazándose a la superficie de la

molécula (proteína o esteroides) induciendo la inhibición de la expresión de la proteína y/o lisis de la célula (Marie-Magdeleine *et al.*, 2014).

**Tabla II.** Compuestos químicos encontrados en el extracto de hojas de *A. comosus* (*Chemical compounds found in A. comosus leaf extract*).

Método	Alcaloides	Esteroides	Flavonoides	Quinonas	Saponinas	Taninos
Cianidina			+			
Mayer	++					
Dragendorff	++					
Gelatina sal						++
Cloruro Férrico						+++
Borntäger				+++		
Liebermann-Burchard					++	
Salkowsky		-				

+ = Presencia baja; ++ = Moderada; +++ = Abundante; - Ausencia.

El contenido de materia seca encontrado en las hojas de piña 90.64% (tabla III), representa un buen potencial para la alimentación animal; adicionalmente, de mostrar un porcentaje de proteína bajo, pero una buena digestibilidad de la misma 77.31% (tabla IV).

**Tabla III.** Composición química de las hojas de piña (*A. comosus*) (*Chemical composition of pineapple leaves A. comosus*).

Determinación	Porcentaje (%)
Humedad y materia volátil	9.36%
Proteína (% N X 6.25)	2.98%
Extracto Etéreo	0.89%
Cenizas	4.25%
Fibra cruda	49.00%
ELN.	33.52%
Materia seca	90.64%

**Tabla IV.** Contenido de Proteína % y digestibilidad de la hoja de piña (*Protein content percentage of pineapple leaf digestibility*).

Determinación	Porcentaje (%)
Proteína (% N X 6.25)	9.83
Digestibilidad proteína	77.31

## CONCLUSIONES

El extracto acuoso de hojas de *A. comosus* mostró un efecto eficaz contra la eclosión de huevos de *H. contortus in vitro* de ovinos, el cual podría estar asociado con los compuestos químicos encontrados, principalmente taninos y saponinas.

**BIBLIOGRAFIA**

- Agarwal, M.C., Banerjee, P.S., (2007). Problems confronting helminthic diseases of domestic animals in India. *J. Parasitol. Dis* 31, 3–13.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Hoste, H., (2008). In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet. Parasitol* 153, 313–319.
- Association of Official Analytical Chemists (2010). (AOAC). Official Methods of Analysis 18<sup>th</sup> ed.
- Buttle, D., Behnke, J.M., Bartley, Y., Elsheikha, H.M., Bartley, D.J., Garnett, M.C., Donnan, A.A., Jackson, F., Lowe, A., Duce, I.R., (2011). Oral dosing with papaya latex is an effective anthelmintic treatment for sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasite Vector* 4 (36), 1–11.
- Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Maciel, M.V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Braga, R.R., Silva, R.A., Vieira, L.S., (2007). Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet. Parasitol* 148, 288–294.
- Coles, G., Bauer, C., Borgsteede, F.H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J., (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 44, 35-44.
- Costa, C.T.C., Bevilaqua, C.M.L., Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Maciel, M.V., Morais, S.M., Castro, C.M.S., Braga, R.R., Oliveira, L.M.B., (2008). In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extract on *Haemonchus contortus*. *Small Rum. Res* 74, 284–287.
- Domínguez, S.X.A., (1979). Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa, S.A. México, D.F.
- Egualde, T., Tilahun, G., Debella, A., Feleke, A., Makonnen, E., (2007). *Haemonchus contortus*: in vitro and in vivo anthelmintic activity of aqueous and hidro-alcoholic extracts *Hedera helix*. *Exp. Parasitol* 116, 340–345.
- Ferreira, D.L., Giglioti, R., Alves, F.K., Regina, F.R., Dias, R.M., de Sena, O.M.C., Henrique, B.G., Pereira, O.G., Barioni, J.W., de Souza, C.A.C., (2013). In vitro and in vivo evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. *Veterinary Parasitology* 197, 263–270.
- Hordegen, P., Cabaret, J., Hertzberg, H., Langhans, W., Maurer, V., (2006). In vitro screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemonchus contortus* with a modified methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay. *J. Ethnopharmacol* 108, 85–89.
- INEGI, (2011). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Cárdenas, Tabasco.
- Lopez, M., Wingching-Jones, R., Rojas, A. (2009). Características fermentativas y nutricionales del ensilaje de rastrojo de piña (*Ananas comosus*). *Agronomía Costarricense* 33(1), 1 – 15.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., (2010). Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 685–696.
- Marie-Magdeliene, C., Udino, L., Philibert, L., Bocage, B., Archimede, H., (2014). In vitro effects of *Musa x paradisiaca* extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science* 96, 127-132.
- Martin, R.J., (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *Vet. J.* 154, 11-34.
- Melo, A.C.F.L., Reis, I.F., Bevilaqua, C.M.L., Vieira, L.S., Echevarria, F.A.M., Melo, L.M., (2003). Nematodeos resistentes a antihelmnticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceara, Brasil. *Cienc. Rur* 33, 339–344.
- Steppek, G., Lowe, A.E., Buttle, D.J., Duce, I.R., Behnke, J.M., (2007a). Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, in vitro and in vivo. *Parasitology* 134, 103–112.
- Steppek, G., Lowe, A.E., Buttle, D.J., Duce, I.R., Behnke, J.M., (2007b). In vitro anthelmintic effects of cysteine proteinases from plants against intestinal helminthes of rodents. *J. Helminthol* 81, 353–360.

- Stepek, G., Buttle, D.J., Duce, I.R., Lowe, A., Behnke, J.M., (2005). Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vitro. *Parasitology* 130, 203–211.
- Suksathit, S., Wachirapakorn, C., Opatpatanakit, Y., (2011). Effects of levels of ensiled pineapple waste and pangola hay fed as roughage sources on feed intake, nutrient digestibility and ruminal fermentation of Southern Thai native cattle. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 33 (3), 281-289.
- Upadhyay, A., Prava, L.J., Tawata, S., (2010). Utilization of Pineapple Waste: A Review. *J. Food Sci. Technol* 6, 10-18.