

Eficacia ovicida del extracto alcohólico de semillas de *Moringa oleifera* Lam en *Fasciola hepatica*

Ovicidal efficacy of the alcoholic extract of *Moringa oleifera* Lam seeds on *Fasciola hepatica*

Pedro Ortiz Oblitas^{1*}, Jorge Luis Portal Torres¹, María Elena Chilón Raico¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Av. Atahualpa 1050, C.P. 06003, Cajamarca, Perú.

*Autor de correspondencia: portiz@unc.edu.pe

Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto ovicida de los extractos alcohólico y acuoso de las semillas de *Moringa oleifera* sobre los huevos de *Fasciola hepatica*. Las semillas de *M. oleifera* fueron molidas y sumergidas en metanol (1:10) a temperatura ambiente por 2 días con rotación discontinua y luego filtrado a través de papel filtro. La concentración del extracto metanólico se realizó bajo presión reducida usando un rotaevaporador a 4°C. El extracto metanólico concentrado fue mantenido a 40°C hasta su uso. Para su utilización, el extracto metanólico fue disuelto en agua destilada con la adición de unas cuantas gotas de Tween-80. Para el extracto acuoso se pesaron 15 g de semillas de *M. oleifera*, las cuales fueron trituradas y se agregó 1 L de agua destilada. Luego, se hirvieron durante 3 minutos, con posterior enfriamiento y filtración. Luego, la decocción se concentró al vacío a 40 °C, se congeló en baño de centrifugado de alcohol, antes de ser sometida a desecación, en las mismas condiciones que el extracto metanólico. Los resultados muestran que el mejor efecto ovicida fue obtenido con el extracto metanólico a la concentración de 20 mg/mL, con una inhibición de la viabilidad y eclosionabilidad sobre los huevos de *F. hepatica* de un 100%. Se concluye que el extracto metanólico de *M. oleifera* resultó eficaz en inhibir la viabilidad y la eclosión de huevos de *F. hepatica* a la concentración de 20 mg/mL.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, *Moringa oleifera*, ovicida, extracto alcohólico

Abstract

The objective of this study was to determine the ovicidal effect of alcoholic and aqueous extracts of *Moringa oleifera* seeds on *Fasciola hepatica* eggs. *M. oleifera* seeds were ground and immersed in methanol (1:10) at room temperature for 2 days with discontinuous rotation and then filtered through filter paper. The concentration of the methanolic extract was carried out under reduced pressure using a rotary evaporator at 4°C. The concentrated methanolic extract was kept at 40°C until use. For use, the methanolic extract was dissolved in distilled water with the addition of a few drops of Tween-80. For the aqueous extract, 15 g of *M. oleifera* seeds were weighed, which were crushed, and 1 L of distilled water was added. Then, they were boiled for 3 minutes, with subsequent cooling and filtration. Then, the decoction was concentrated under vacuum at 40 °C, frozen in an alcohol spin bath, before

being subjected to desiccation, under the same conditions as the methanolic extract. The results show that the best ovicidal effect was obtained with the methanolic extract at a concentration of 20 mg/ml, with a 100% inhibition of viability and hatchability on *F. hepatica* eggs. It is concluded that the methanolic extract of *M. oleifera* was effective in inhibiting the viability and hatching of *F. hepatica* eggs at a concentration of 20 mg/mL.

Keywords: *Fasciola hepatica*, *Moringa oleifera*, ovicide, alcoholic extract

Introducción

Fasciolosis producida por *Fasciola hepatica* es una enfermedad mundialmente distribuida en animales y humanos, la cual afecta considerablemente la salud de las diferentes especies domésticas, principalmente bovinos y ovinos (Charlier et al., 2007; Khan et al., 2011), produciendo importantes pérdidas económicas para los productores a nivel global (Espinoza et al., 2010; Mehmood et al., 2017; Wolde y Tamiru, 2017). Por muchos años este parásito se ha convertido en uno de los principales problemas parasitarios que afectan a la ganadería de la región Cajamarca (Claxton et al., 1997) y a nivel mundial (Freitas et al., 2014; Mitchell, 2002). En Cajamarca, esta enfermedad tiene carácter hiperendémico (Mas-Coma et al., 2009), debido a las condiciones favorables para la proliferación de las principales especies de hospederos intermediarios identificados en la región, los cuales mantienen permanentemente el ciclo de vida del parásito (Bargues et al., 2012).

El método de control más utilizado para esta enfermedad es el tratamiento con antihelmínticos, los cuales vienen utilizándose desde la década de los 80s. Son limitados los principios activos utilizados para esta enfermedad, teniendo efecto, la mayoría de ellos, contra formas maduras del parásito, tal como sucede con el caso del closantel (Solana et al., 2016). De igual manera la combinación de oxiclozanida y oxfendazol ha demostrado tener un adecuado efecto contra las especies de *Fasciola* (Khan et al., 2017), siendo el triclabendazol (TCBZ), la droga de elección para el tratamiento de fasciolosis, por su alta eficacia, frente a formas inmaduras y maduras del parásito (Boray et al., 1983; Fairweather y Boray, 1999). Desafortunadamente, los fenómenos de resistencia antihelmíntica vienen causando problemas en el empleo de estas drogas, principalmente en el caso del TCBZ, especialmente en Cajamarca (Ortiz et al., 2013), situación que afecta el control de la enfermedad y requiere la búsqueda de tratamientos alternativos, uno de los cuales podría ser el empleo de plantas medicinales con actividad fasciolicida contra la *F. hepatica* (Alvarez-Mercado et al., 2015; Pereira et al., 2016; Ullah et al., 2017).

La planta *Moringa oleifera* pertenece a la familia Moringaceae (Nadkarni, 1976; Ramachandran et al., 1980), conocida por su excelente aporte de sustancias fitoquímicas, las cuales tienen una gran diversidad de aplicaciones (Anwar et al., 2007; Brilhante et al., 2017; Gopalakrishnan et al., 2016), nutricionales (Brilhante et al., 2017), industriales (Saini et al., 2016), anticancerígenas (Khor et al., 2018) y antihelmínticas (Cabardo y Portugaliza, 2017; Kandil et al., 2018; Tayo et al., 2014).

Desafortunadamente, la resistencia antihelmíntica contra varios de estos antihelmínticos, incluyendo al TCBZ (Brennan et al., 2007; Fairweather et al., 2020; Leathwick, 2013) ha ido agravándose en los últimos años, situación que afecta el control de la esta enfermedad. En este contexto, se necesita investigar otras alternativas de control y tratamiento, una de las cuales podría ser el empleo de plantas medicinales (Ullah et al., 2017), por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto ovicida del extracto metanólico de semillas de *Moringa oleifera* sobre la viabilidad y eclosionabilidad de huevos de *Fasciola hepatica*.

Materiales y métodos

Preparación del extracto de semillas de M. oleifera

Las semillas de *M. oleifera* fueron obtenidas del mercado local de Cajamarca. Las semillas fueron molidas en un molino manual y almacenadas en un recipiente de vidrio cerrado. El polvo molido de las semillas (500 g) fue sumergido en metanol (1:10) a temperatura ambiente por 2 días con rotación discontinua y luego filtrado a través de papel filtro. La concentración del extracto metanólico se realizó bajo presión reducida usando un rotaevaporador a 4°C. El extracto metanólico concentrado fue mantenido a 40 °C hasta su uso. Para su utilización, el extracto metanólico fue disuelto en agua destilada con la adición de unas cuantas gotas de Tween-80 (Harborne, 1984).

Para el extracto acuoso se pesaron 15 g de semillas de *M. oleifera*, las cuales fueron trituradas y se agregó 1 L de agua destilada. Luego, se hirvieron durante 3 minutos, con posterior enfriamiento y filtración. Luego, la decocción se concentró al vacío a 40 °C, se congeló en baño de centrifugado de alcohol, antes de ser sometida a desecación, en las mismas condiciones que el extracto metanólico.

Colección de huevos de F. hepática

Para este fin, se obtuvieron hígados de bovinos naturalmente infectados con *F. hepatica* sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca.

Las vesículas biliares de los hígados infectados con *F. hepatica* fueron transportadas al Laboratorio de Inmunología e Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias, lavadas y examinadas individualmente en busca de presencia de huevos de *F. hepatica*. Se utilizó la técnica de Fluke Finder (Welch et al., 1987). Cada vesícula biliar fue evacuada separadamente en un vaso cónico de vidrio al cual se añadió agua de caño. Se dejó sedimentar, luego el sobrenadante fue decantado sin agitar el sedimento. Este proceso se repitió de 3 a 5 veces. El sedimento del último lavado fue colado a través de dos coladores de 400 y 100 micrometros, respectivamente. Los huevos de *F. hepatica* limpios fueron almacenados entre 4 a 8 °C hasta su utilización, para lo cual se siguió el procedimiento descrito por (Hegazi et al., 2007). Se calculó el número de huevos/mL de solución y fueron mantenidos en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Actividad ovicida del extracto de semillas de M. oleifera

La eficacia del extracto metanólico de *M. oleifera* fue evaluada enfrentando el extracto preparado con huevos de *F. hepatica* a una concentración de 1, 5, 10, 20 y 40 mg/mL, a diferentes tiempos de exposición; 24, 48 y 72 horas en tubos Falcon de 50 mL. Cada tubo contenía aproximadamente 1000 huevos de *F. hepatica*. Al final del tiempo de exposición, los huevos fueron lavados con agua destilada, mediante sedimentación, por tres veces, con la finalidad de eliminar cualquier remanente del extracto. Tubos con la misma cantidad de huevos, suspendidos en agua destilada, fueron incluidos como controles. Todos los tubos fueron incubados a 26 °C hasta su completa embrionación y eclosión. Los huevos fueron examinados cada 3 días hasta que los de los tubos control eclosionaron, lo cual fue evidenciado por el movimiento del miracidio dentro de los huevos (Rowcliffe y Ollerenshaw, 1960). El día de la eclosión fue aquel en el que la mayoría de los huevos eclosionaron después de la exposición a luz artificial por 15 minutos. Se contó y se registró el número de huevos eclosionados de cada cien huevos, en cinco campos microscópicos separados.

El porcentaje promedio de eclosión fue examinado de acuerdo con lo descrito por Hegazi et al. (2007), después de lo cual, el porcentaje de reducción de la eclosión de huevos de *F. hepatica*, expuestos a las diferentes concentraciones del extracto, fue determinado siguiendo la siguiente fórmula: Actividad inhibitoria de eclosión = (% eclosión huevos control - % eclosión huevos expuestos) / (% eclosión huevos control) × 100

Resultados

Las concentraciones del extracto metanólico de *Moringa oleifera* tuvieron efectos variados sobre los huevos de *Fasciola hepatica*, siendo más eficaces a mayor concentración (Tabla 1, Figura 1).

Tabla 1. Actividad inhibitoria del extracto metanólico de *Moringa oleifera* sobre huevos de *Fasciola hepatica*, a diferentes concentraciones

Tiempo (hora)	Concentración extracto metanólico <i>M. oleifera</i>				
	1	5	10	20	40
24	5	12	60	95	98
48	8	18	72	100	100
72	10	20	75	100	100

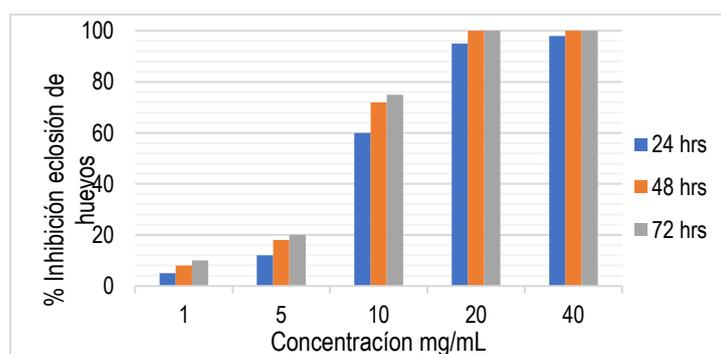


Figura 1. Actividad inhibitoria de extracto metanólico de semillas de *Moringa oleifera* sobre la eclosión de huevos de *Fasciola hepatica*

De manera similar, las concentraciones del extracto acuoso de *Moringa oleifera* tuvieron efectos variados sobre los huevos de *Fasciola hepatica*, sin embargo, no mostraron resultados alentadores (Tabla 2, Figura 2).

Tabla 2. Resultados de la actividad inhibitoria del extracto acuoso de *Moringa oleifera* sobre huevos de *Fasciola hepatica*, a diferentes concentraciones

Tiempo (Hora)	Concentración extracto acuoso mg/mL <i>M. oleifera</i>				
	1	5	10	20	40
24	5	7	20	23	25
48	8	8	16	20	24
72	10	11	17	19	22

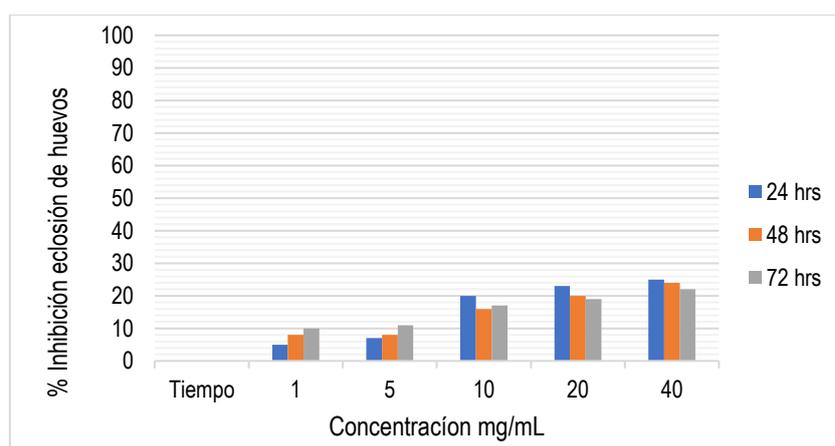


Figura 2. Actividad inhibitoria de extracto metanólico de semillas de *Moringa oleifera* sobre la eclosión de huevos de *Fasciola hepatica*

Discusión

El presente estudio se llevó a cabo con la finalidad de evaluar la actividad ovicida *in vitro* de extractos metanólico y acuoso de semillas de *M. oleifera* sobre huevos de *F. hepatica*. La finalidad de estos estudios preliminares es que, previa evaluación de los resultados *in vivo*, estos puedan ser utilizados como un tratamiento terapéutico alternativo tanto en casos de fasciolosis animal como humana. Los resultados encontrados proveen evidencia de actividad inhibitoria de los extractos, principalmente el metanólico, sobre la viabilidad y eclosión de huevos de *F. hepatica*. Esta actividad inhibitoria estuvo directamente relacionada con la concentración del extracto metanólico utilizado; igualmente tuvo una fuerte correlación con el tiempo de exposición, a mayor tiempo de exposición, mayor actividad inhibitoria de la viabilidad de los huevos de *F. hepatica*. En reportes sobre actividad inhibitoria de distintos

fasciolicidas probados, la actividad fasciolicida incrementaba en relación directa con la concentración y el tiempo de exposición (Hegazi et al., 2007; Moazeni y Khademolhoseini, 2016). La actividad inhibitoria de la embrionación de huevos de *Haemonchus contortus*, fue probada a través del empleo de extractos etanólicos (95.8%) y de extracto acuoso (81.72%) de las hojas de *M. oleifera* (Cabardo y Portugaliza, 2017). Resultados similares fueron obtenidos en otro trabajo realizado con huevos de *H. contortus* (Tayo et al., 2014). En ambos estudios los mejores resultados en la inhibición de huevos de *H. contortus* fueron obtenidos con el empleo de extractos etanólicos. La eclosión con extractos acuosos fue menor. Los resultados de estos estudios son concordantes con los hallados en el presente trabajo, ya que los mejores resultados obtenidos fueron cuando se empleó extractos metanólicos a una mayor concentración (20 mg/mL), comparados con la menor concentración efectiva hallada en los dos últimos trabajos mencionados.

El efecto inhibitorio de los extractos sobre la vitalidad y eclosionabilidad de los huevos de *F. hepatica* podría ser atribuido a los taninos que son el principal metabolito secundario de las semillas de *M. oleifera* (Cabardo y Portugaliza, 2017). Los taninos podrían permear las diferentes capas de los huevos del parásito afectando al desarrollo embrionario, suprimiendo la formación de miracidio. En la literatura disponible se han ilustrado tres mecanismos razonables que podrían inhibir la eclosionabilidad de los huevos de parásitos utilizando extractos de plantas, incluyendo un efecto en la permeabilidad de la envoltura de los huevos, supresión de algunas enzimas importantes para la eclosionabilidad y por ende su impacto sobre los receptores de eclosionabilidad presentes en la cáscara de los huevos (Vargas-Magaña et al., 2014).

Conclusión

El extracto metanólico de *M. oleifera* resultó eficaz en inhibir la viabilidad y la eclosión de huevos de *F. hepatica* a la concentración de 20 mg/mL.

Referencias

- Alvarez-Mercado, J.M., Ibarra-Velarde, F., Alonso-Díaz, M.Á., Vera-Montenegro, Y., Avila-Acevedo, J.G., García-Bores, A.M. 2015. In vitro antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. *BMC Vet. Res.* 11: 1-6.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, A.H. 2007. *Moringa oleifera*: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. *Phytother. Res.* 21:17-25.
- Bargues, M.D., Artigas, P., Khoubbane, M., Ortiz, P., Naquira, C., Mas-Coma, S. 2012. Molecular characterisation of *Galba truncatula*, *Lymnaea neotropica* and *L. schirazensis* from Cajamarca, Peru and their potential role in transmission of human and animal fascioliasis. *Parasites & Vectors.* 5: 174.
- Boray, J., Crowfoot, P., Strong, M., Allison, J., Schellenbaum, M., von Orelli, M., Sarasin, G. 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Vet. Rec.* 113: 315-317.
- Brilhante, R.S.N., Sales, J.A., Pereira, V.S., Castelo-Branco, D. de S.C.M., Cordeiro, R. de A., de Souza Sampaio, C. M., de Araújo Neto Paiva, M., Santos, J.B.F. dos, Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2017. Research advances on

the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10: 621-630.

Cabardo, D.E., Portugaliza, H.P. 2017. Anthelmintic activity of *Moringa oleifera* seed aqueous and ethanolic extracts against *Haemonchus contortus* eggs and third stage larvae. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 5: 30-34.

Charlier, J., Duchateau, L., Claerebout, E., Williams, D., Vercruyse, J. 2007. Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 78: 57-66.

Claxton, J., Zambrano, H., Ortiz, P., Amorós, C., Delgado, E., Escurra, E., Clarkson, M. 1997. The epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Parasitol. Int.* 46: 281-288.

Espinoza, J., Terashima, A., Herrera-Velit, P., Marcos, L.A. 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: Impacto en la economía de las zonas endémicas. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud. Pública.* 27: 604-612.

Fairweather, I., Boray, J.C. 1999. Fasciolicides: Efficacy, actions, resistance and its management. *Vet. J.* 158: 81-112.

Freitas, D.F., Martins, I.V.F., dos Santos, G., dos Santos, A.R., da Silva Gomes, D. 2014. Bioclimatic distribution and prevalence maps for *Fasciola hepatica* in Espírito Santo State, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 20: 32.

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., Kumar, D.S. 2016. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Sci. Hum. Wellness.* 5: 49-56.

Harborne, J. 1984. *Phytochemical methods*. Editors Chapman & Hall. Great Britain.

Hegazi, A.G., Adb El Hady, F.K., Shalaby, H.A. 2007. Inhibitory Effect of Egyptian Propolis on *Fasciola gigantica* eggs with Reference to its Effect on *Clostridium oedematiens* and Correlations to Chemical Composition. *Pak. J. Biol. Sci.* 10: 3295-3305.

Kandil, O.M., Hassan, N.M.F., Sedky, D., Ata, E.B., Nassar, S.A., Shalaby, H.A., Nanev, V., Tsocheva-Gaytandzhieva, N., Gabrashanska, M. 2018. Anthelmintic efficacy of *Moringa oleifera* seed methanolic extract against *Fasciola hepatica*. *J. Parasit. Dis.* 42: 391-401.

Khan, M.K., Sajid, M.S., Khan, M.N., Iqbal, Z., Arshad, M., Hussain, A. 2011. Point prevalence of bovine fascioliasis and the influence of chemotherapy on the milk yield in a lactating bovine population from the district of Toba Tek Singh, Pakistan. *J. Helminthol.* 85: 334-338.

Khan, M.N., Sajid, M.S., Rizwan, H.M., Qudoos, A., Abbas, R. Z., Riaz, M., Khan, M. K. 2017. Comparative efficacy of six anthelmintic treatments against natural infection of *Fasciola species* in sheep. *Pak. Vet. J.* 37: 65-68.

Khor, K., Lim, V., Moses, E., Samad, N. 2018. The in vitro and in vivo anticancer properties of *Moringa oleifera*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 1071243.

Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D. 2009. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol.* 69: 41-146.

Mehmood, K., Zhang, H., Jawad, A., Zahid, R., Ijaz, M., Zameer, A., Hassan, M., Ur, M., Kashif, M., Wang, Y., Abbas, T., Hussain, R., Taslim, M., Ali, S., Ullah, A., Li, J. 2017. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb. Pathog.* 109: 253-262.

- Mitchell, G. 2002. Update on fasciolosis in cattle and sheep. In Practice. 24: 378-385.
- Moazeni, M., Khademolhoseini, A.A. 2016. Ovicidal effect of the methanolic extract of ginger (*Zingiber officinale*) on *Fasciola hepatica* eggs: an in vitro study. J. Parasit. Dis. 40: 662–666.
- Nadkarni, A.K. 1976. Indian Materia Medica. Popular Prakashan, Bombay. Pag 1142.
- Ortiz, P., Scarcella, S., Cerna, C., Rosales, C., Cabrera, M., Guzmán, M., Lamenza, P., Solana, H. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against Triclabendazole in cattle in Cajamarca (Peru): A clinical trial and an in vivo efficacy test in sheep. Vet. Parasitol. 195: 118-121.
- Pereira, C.A.J., Oliveira, L.L.S., Coaglio, A.L., Santos, F.S.O., Cezar, R.S.M., Mendes, T., Oliveira, F.L.P., Conzesa, G., Lima, W.S. 2016. Anti-helminthic activity of *Momordica charantia* L. against *Fasciola hepatica* eggs after twelve days of incubation in vitro. Vet. Parasitol. 228: 160-166.
- Ramachandran, C., Peter, K.V., Golapakrishnan, P.K. 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): A Multipurpose Indian Vegetable. Econ. Bot. 34: 276-283.
- Rowcliffe, S.A., Ollerenshaw, C.B. 1960. Observations on the Bionomics of the Egg of *Fasciola Hepatica*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 54: 1-11.
- Saini, R.K., Sivanesan, I., Keum, Y.-S. 2016. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. 3 Biotech. 6: 1-14.
- Solana, M.V., Mera y Sierra, R., Scarcella, S., Neira, G., Solana, H.D. 2016. In vivo assessment of closantel ovicidal activity in *Fasciola hepatica* eggs. Exp. Parasitol. 160: 49-53.
- Tayo, G.M., Poné, J.W., Komtangi, M.C. 2014. Anthelmintic Activity of *Moringa oleifera* Leaf Extracts Evaluated in Vitro on Four Developmental Stages of *Haemonchus contortus* from Goats. Am. J. Plant Sci. 5: 1702-1710.
- Ullah, R., Rehman, A., Zafeer, M. F., Rehman, L., Khan, Y.A., Khan, M.A.H., Khan, S.N., Khan, A.U., Abidi, S.M. A. 2017. Anthelmintic Potential of Thymoquinone and Curcumin on *Fasciola gigantica*. PLoS One. 12: e0171267.
- Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Chan-Pérez, J.I. 2014. Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. Vet. Parasit. 206: 322-327.
- Welch, S., Malone, J., Geaghan, H. 1987. Herd evaluation of *Fasciola hepatica* infection in Louisiana cattle by an ELISA. Am. J. Vet. Res. 48: 345-347.
- Wolde, T., Tamiru, T. 2017. Incidence and economic impact of fasciolosis in Wolkite town, Community Abattoir. JVMAH. 9: 116-120.