



Avances en Biomedicina
ISSN: 2477-9369
ISSN: 2244-7881
avanbiomed.idic@gmail.com
Universidad de los Andes
Venezuela

Potencial parasitocida de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae)

Nieves, Elsa; Calles, Leidy Stefany; Rondón, Maritza; Contreras, Billmary; Chataing, Bernardo

Potencial parasitocida de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae)

Avances en Biomedicina, vol. 6, núm. 2, 2017

Universidad de los Andes, Venezuela

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331355420001>

Potencial parasiticida de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae)

(Potential parasiticide of *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae))

Elsa Nieves nievesbelsa@gmail.com

Universidad de Los Andes, Venezuela

Leidy Stefany Calles

Universidad de Los Andes, Venezuela

Maritza Rondón

Universidad de Los Andes, Venezuela

Billmary Contreras

Universidad de Los Andes, Venezuela

Bernardo Chataing

Universidad de Los Andes, Venezuela

Avances en Biomedicina, vol. 6, núm. 2,
2017

Universidad de los Andes, Venezuela

Recepción: 21 Marzo 2017
Aprobación: 04 Agosto 2017

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331355420001>

Resumen: La tripanosomiasis americana, la leishmaniasis y la schistosomiasis son enfermedades parasitarias que afectan a millones de personas en el mundo y constituyen un grave problema de salud pública principalmente en los países de Latinoamérica. Los tratamientos actuales no son satisfactorios, de ahí la necesidad de nuevos compuestos. El objetivo de este trabajo fue determinar el potencial bioactivo de la planta *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) contra parásitos. Se realizaron varios bioensayos con diferentes partes de la planta de *Pimenta racemosa* para determinar la actividad tóxica en *Artemia salina*, sobre eritrocitos de humano y su efecto parasiticida contra *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* y *Schistosoma mansoni*. Se calcularon las concentraciones letales y se realizó el análisis de PERMANOVA. Los resultados evidenciaron que *P. racemosa* no produce un efecto tóxico, ni citotóxico. Tampoco mostró efecto contra los promastigotes de *L. amazonensis* ni contra epimastigotes de *T. cruzi*, determinándose concentraciones letales altas que no se encuentran dentro del rango para ser consideradas bioactivas. Mientras que *P. racemosa* si mostró actividad parasiticida contra las formas inmaduras de *S. mansoni*, ocasionando mayor mortalidad y alteraciones morfológicas en los miracidios que en las cercarias y se evidenció un efecto de atenuación sobre las cercarias de *S. mansoni*. La parte de las Ramas finas de *P. racemosa* fue la que presentó menor CL50 de 0,10 mg/ml (0,08-0,14 mg/ml). Se aportan datos sobre la bioactividad de *P. racemosa*, no se evidenció actividad biológica contra *L. amazonensis* y *T. cruzi*. Sin embargo, *P. racemosa* presentó una baja citotoxicidad, sin efecto tóxico y con actividad biocida contra las formas inmaduras de *S. mansoni* por lo que se sugiere profundizar los estudios para potencializar sus metabolitos secundarios antiparasitarios contra *S. mansoni*.

Palabras clave: Bioactividad, parasiticida, *Pimenta racemosa*, toxicidad.

Abstract: American trypanosomiasis, leishmaniasis and schistosomiasis are parasitic diseases that affect millions of people in the world and are a serious public health problem, mainly in Latin American. Current treatments are not satisfactory, hence the need for new compounds. The objective of this work was to determine the bioactive potential of the plant *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) against parasites. Different bioassays were carried out with different parts of the *Pimenta racemosa* plant to determine the toxic activity on *Artemia salina*, on human erythrocytes and its parasiticide effect against *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni*. Lethal concentrations were calculated and PERMANOVA

analyses were performed. The results showed that *P. racemosa* does not produce a toxic or cytotoxic effect. It also showed no effect against *L. amazonensis* promastigotes or against *T. cruzi* epimastigotes, presented high lethal concentrations being determined that are not within the range to be considered bioactive. While *P. racemosa* showed parasitocidal activity against the immature forms of *S. mansoni*, causing greater mortality and morphological alterations in the miracidia than in the cercariae and an attenuation effect on *S. mansoni* cercariae was evidenced. The parts of *P. racemosa* fine branches presented the lowest LC50 of 0.10 mg/ml (0.08-0.14 mg/ml). Data are provided on the bioactivity of *P. racemosa*, no biological activity was evidenced against *L. amazonensis* and *T. cruzi*. However, *P. racemosa* presented a low cytotoxicity, with no toxic effect and biocidal activity against the immature forms of *S. mansoni*. Therefore, it is suggested to deepen the studies to potentiate its antiparasitic secondary metabolites against *S. mansoni*.

Keywords: Bioactivity, parasiticide, *Pimenta racemosa*, toxicity.

Introducción

Las enfermedades tropicales parasitarias como la leishmaniasis, la schistosomiasis y el mal de Chagas continúan haciendo estragos en la salud pública a nivel mundial, con consecuencias socio económicas elevadas por su carácter de endemicidad, que llevan a grandes masas de la población a la incapacidad y muerte. Unos 10 millones de personas están infectadas con el parásito *Trypanosoma cruzi*, que causa el mal de Chagas o tripanosomiasis americana con una amplia distribución en Latinoamérica (1). La leishmaniasis es otro grupo de enfermedades tropicales causadas por protozoarios del género *Leishmania amazonensis* que presenta una alta ocurrencia, con 350 millones de personas expuestas al riesgo de contraer la enfermedad en 88 países (2). La schistosomiasis es una enfermedad crónica discapacitante que presenta una alta morbi-mortalidad, cuyo agente etiológico en América es el trematodo *Schistosoma mansoni*, que parasita en el sistema venoso portal (3).

Venezuela es un país tropical con todas las condiciones climáticas, socioeconómicas y culturales para el desarrollo y establecimiento de estas parasitosis lo que constituye un grave problema de salud (4). El riesgo de infección del mal de Chagas es de 6 millones de personas que viven en 198 municipios en 14 estados y recientemente se han reportado brotes epidémicos urbanos en la capital Caracas y en el Estado Vargas (5); la leishmaniasis presenta una alta ocurrencia y en los últimos años ha registrado un incremento continuo de casos (6); mientras que el área endémica de la schistosomiasis abarca el 1,6% del territorio nacional, ocurriendo en las zonas más habitadas con una población de riesgo de 200 mil habitantes (7).

Los medicamentos disponibles para el tratamiento de estas enfermedades parasitarias son extremadamente limitados. Además, se ha incrementado la resistencia de los parásitos a las drogas, por lo que es importante encontrar otras fuentes de metabolitos bioactivos, con potencial para el desarrollo de alternativas terapéuticas que sean más seguras, efectivas, económicas y fáciles de administrar (8), de ahí

la necesidad de agilizar la búsqueda de nuevos compuestos naturales provenientes de la plantas (9).

Los extractos de muchas plantas pertenecientes a la familia Myrtaceae son utilizadas tradicionalmente en la medicina natural. La familia Myrtaceae presenta una distribución subtropical y uno de sus representantes es *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) comúnmente llamada Malagueta o Bay-rum (10). El análisis del aceite esencial de *P. racemosa* muestra diferencias con otras especies con respecto a las características físicas y a la composición química, revelando mayor cantidad de éteres fenólicos (eugenol, chavicol, estragol, metileugenol, geranial y neral) (11). Otro estudio sobre la fitoquímica con diferentes partes de la planta, *P. racemosa* reveló la presencia en todos los extractos de las partes de la planta estudiados de abundantes núcleos fenólicos y de taninos sin detectarse la presencia de alcaloides. Mientras que compuestos como los glucósidos cardiotónicos, esteroides, terpenoides, quinonas y flavonoides están presentes en diferentes cantidades en las partes de la planta (12).

La planta *P. racemosa* se utiliza en la medicina popular en el tratamiento de diferentes enfermedades, como el reumatismo, dolor de dientes, dolores abdominales, fiebre, neumonía, diarrea e incontinencia (13,14).

Por otro lado, se ha comprobado el efecto antibacterial (15) y antifúngico (16) de *P. racemosa*, de ahí la importancia de aportar información sobre la potencialidad de *P. racemosa* de ser utilizada como alternativa contra enfermedades parasitarias. Hasta ahora no existe ningún reporte sobre la posible actividad biológica de *P. racemosa* sobre protozoarios parásitos como *Leishmania*, *Trypanosoma* y tampoco estudios similares contra las formas larvales de helmintos como *S. mansoni* (17). El presente trabajo estudia el potencial parasiticida de *P. racemosa* con la idea de generar nuevos productos biológicos que pudieran ser una alternativa en el control de estas enfermedades parasitarias.

Materiales y métodos

Extracto de las partes de la planta de P. racemosa: Se usó la planta *Pimenta racemosa* (P. Miller) J.W. var. *racemosa* (Myrtales: Myrtaceae), nombre común Bay-rum, procedente del Municipio Junín, Rubio estado Táchira, Venezuela a 850 msnm, Longitud oeste: 72°21', Latitud norte: 7°42'. Árbol de tronco recto y con copa frondosa, de aproximadamente 7 metros de altura, con unos 60 años, en el estado final del periodo de floración y cargado de fruto al momento de la colección de las muestras.

Las muestras fueron colectadas por la Ing. Billmary Contreras e identificada por la Dra. Leslie R Landrum con Vouche N° ASU0075448 depositado en el herbario de la Universidad del Estado de Arizona, USA.

Los extractos de las partes de la planta *P. racemosa*, Raíz, Ramas finas y Hoja se realizaron por inmersión en alcohol isopropílico (1:4 m/v) del material vegetal previamente secado y pulverizado, en 4 periodos de 21 días cada uno. Los extractos obtenidos se filtraron y se concentraron bajo presión a 30°C para eliminar el alcohol isopropílico restante, la extracción

se llevó a cabo en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes por la Ing. Billmary Contreras y cedidos gentilmente en colaboración. Los extractos de Raíz, Ramas Finas y Hojas de la planta *P. racemosa* se prepararon en soluciones madres a concentraciones de 10 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%. La solución de DMSO al 1% fue preparada con agua deionada o buffer fosfato salino (PBS) según el ensayo a utilizar. Estas soluciones se almacenaron en viales de vidrio y se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Parásitos: Se usaron cepas de referencia de la OMS, IFLA/BR/67/PH8 de *Leishmania amazonensis* y la cepa M/HOM/VE/92/YBM de *Trypanosoma cruzi*, las cuales fueron mantenidas por pasajes seriados en cultivos NNN en el Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

Se usaron parásitos de *Schistosoma mansoni* cedidos gentilmente por el Dr. Gilberto Payares de la Universidad Central de Venezuela que fueron mantenidos por pasajes en hámster y en caracoles de *Biomphalaria glabrata* (cepa Puerto Rico) en el Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX) de la Universidad de Los Andes. En los diferentes bioensayos se utilizaron formas inmaduras de miracidios y cercarias de *Schistosoma mansoni*.

Bioensayos: Toxicidad de *Pimenta racemosa*: El bioensayo de letalidad de *A. salina* es un valioso instrumento que es utilizado como una de las primeras evaluaciones para determinar la toxicidad de sustancias vegetales y además, para determinar el impacto tóxico de estos compuestos sobre la biota marina (8).

Los extractos de la planta se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%, para todos los bioensayos se prepararon soluciones a concentraciones de 5, 50, 500 y 1000 µg/ml con cada una de las partes de la planta a partir de las soluciones madres concentradas. Cada concentración fue montada por triplicado. Cada ensayo fue realizado por triplicado en condiciones semejantes y se determinaron las concentraciones letales, mediante análisis Probit.

El ensayo de toxicidad se realizó con nauplios de camarones de *Artemia salina*, se colocaron 20 nauplios en los pozos de microplacas, se incubaron con las diferentes concentraciones de los extractos. Después de 24 horas se contaron las larvas muertas. La muerte de las formas inmaduras de *S. mansoni* fue establecida por la falta de movimiento por más de 10 segundos bajo observación al microscopio invertido con contraste de fases. Como control positivo se emplearon dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) y como control negativo dimetilsulfóxido (DMSO).

Para el cálculo de las concentraciones letales por análisis Probit, los valores fueron normalizados, se graficaron y los resultados se expresaron como la media aritmética ± error estándar de la media. Se calcularon las concentraciones letales 50 (CL₅₀) y 90 (CL₉₀) en µg/ml utilizando el método de regresión no lineal en la relación dosis-respuesta usando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XV con un límite de confianza del 95% (18).

El grado de toxicidad para *A. salina* fue definido en función del rango en que se determinaron los valores de CL de acuerdo a 4 categorías siguientes: Extremadamente tóxico ($CL_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$), muy tóxico ($10 < CL_{50} < 100$), moderadamente tóxico ($100 < CL_{50} < 1000$) y no tóxico ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$) (19). Se realizó un análisis de varianza de dos vías (PERMANOVA). El análisis de varianza de dos vías (PERMANOVA) considera significativas las diferencias entre los grupos tratados cuando $p < 0.01$ (99% de confianza) utilizando el programa estadístico PRIMER-E (20).

Otra prueba previa para determinar los efectos tóxicos de una sustancia vegetal, drogas u otros compuestos químicos son los ensayos de citotoxicidad, que permiten detectar los efectos adversos de los compuestos bioactivos en la estructura, supervivencia, proliferación y funciones básicas a nivel celular del organismo utilizando como blanco diferentes células, una muy utilizada son los eritrocitos de humanos (21).

Para evaluar la actividad citotóxica de la planta se utilizó la lisis de eritrocitos de humano. Los extractos de las partes de la planta *P. racemosa* se solubilizaron en DMSO al 1% en PBS, y se esterilizaron utilizando filtros de acetato de celulosa.

Se prepararon soluciones con sangre de humano fresca estéril de 10×10^8 células/ml en PBS estéril y se incubaron con los extractos a concentraciones de 5, 50, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ en una cámara caliente a 37°C por 35 min, se determinó la lisis de los eritrocitos utilizando un espectrofotómetro de microplacas a absorbancia de 576 nm. Como controles se utilizó tritón X-100 para el control positivo y el control negativo tampón fosfato salino (PBS). Se calcularon los porcentajes de hemólisis para cada concentración (22).

Actividad parasitocida de Pimenta racemosa: Contra Leishmania y Trypanosoma. Los bioensayos de actividad parasitocida se realizaron con epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. amazonensis*, para medir viabilidad de los parásitos se empleó el método colorimétrico utilizando la sal de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-fenil carboximetil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna (MTS) (23).

Para los ensayos se colocaron 100 μl de suspensión de los parásitos (10^5 parásitos/ml) por duplicado en placa de 96 pozos, se agregaron 100 μl las concentraciones de 5, 50, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de los extractos de las diferentes partes de *P. racemosa*, se incubaron a 26°C durante 72 horas, posteriormente se agregó la solución MTS, se incubaron por 3 horas a 28°C , seguidamente se realizaron las lecturas a 490 nm (24). Como control positivo se usó Cristal Violeta (250 $\mu\text{g/ml}$) y Glucantime® (300 mg/ml) en los ensayos con *Leishmania amazonensis*; como control negativo se utilizó DMSO al 1%. Los ensayos se montaron por triplicado. Los valores de CL_{50} se obtuvieron por el método de análisis estadístico Probit con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XV (18).

Actividad parasitocida de Pimenta racemosa contra cercarias y miracidio de Schistosoma mansoni. Los diferentes bioensayos se realizaron en placas de 16 pozos, los extractos de *P. racemosa* se prepararon a concentraciones de 5, 50, 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ con DMSO al 1% en agua de clorada.

Para cada ensayo se tomaron 20 cercarias o 20 miracidio por pozo, se incubaron con las diferentes concentraciones de los extractos a ensayar por 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave a 15 rpm. Al finalizar el tiempo de incubación se registró el total de larvas muertas, cercarias o miracidio, con la ayuda de lugol bajo observación en el microscopio invertido a 10X. Se consideraron como muertas las formas larvales que no poseían movimiento y que caían en el fondo. Los ensayos se montaron por triplicado, como control positivo se sustituyó el volumen del extracto por alcohol 100% y para el control negativo por DMSO al 1%.

Atenuación de infectividad de cercarias de S. mansoni. Para determinar el efecto atenuante sobre las cercarias de *S. mansoni* se utilizó el extracto de la planta de *P. racemosa* que produjo mayor mortalidad.

Las cercarias se expusieron a concentraciones sub-letales, las cercarias sobrevivientes se cuantificaron mediante el uso de un microscopio estereoscópico. Se prepararon inóculos de 400 cercarias atenuadas sobrevivientes para infectar los animales. Los hámsteres previamente anestesiados con 0,4 ml de sodio pentobarbital al 5% se infectaron por penetración activa con las cercarias atenuadas.

Los hámsteres infectados fueron sacrificados luego de 6 semanas postinfección, y se le determinó el grado de parasitosis presente por comparación con los controles. Los animales fueron anesteciados y se realizó la técnica de perfusión para luego cuantificar los parásitos y el grado de afectación de los órganos. Los parásitos de *S. mansoni* se colocaron en una placa de Petri y se cuantificaron bajo el microscopio estereoscópico. Como control se utilizaron hámster infectados con cercarias no atenuadas.

La CL₅₀ y CL₉₀ se determinaron mediante análisis Probit utilizando STATGRAPHICS Centurión XV, con un límite de confianza del 95% (18). Se realizó el análisis de varianza de dos vías (PERMANOVA) utilizando el programa estadístico PRIMER-E (20).

Declaración de aspectos éticos. El uso de los animales de experimentación se realizó cumpliendo con las normas internacionales y códigos de Bioética establecidos por la OMS sobre el cuidado y manipulación de animales de laboratorio (25).

Resultados

El extracto de la Raíz de *P. racemosa* contra los nauplios de *A. salina* presentó una CL₅₀ de 1,13 mg/ml, valor estimado no tóxico, mientras que para las Hojas y de Ramas finas de *P. racemosa* se calcularon en CL₅₀ de 0,99 mg/ml y 0,86 mg/ml, respectivamente, valores considerados moderadamente tóxicos.

El porcentaje de lisis de eritrocitos para los diferentes extractos de las distintas partes de *P. racemosa* ensayadas fue menor al 8 %. El extracto de la rama fina de *P. racemosa* mostró una CL₅₀ de 2,86 mg/ml, mientras que la raíz de 4,46 mg/ml y para la parte de la hoja de 4,66 mg/ml. Los análisis de los valores de las concentraciones letales de las diferentes partes de la

planta *P. racemosa* sobre eritrocitos de humano fueron consideradas no citotóxicas.

Los porcentaje de viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* expuestos a los extractos de las distintas partes de la planta de *P. racemosa* ensayados mostraron muy poca actividad biológica, registrándose diferencias estadísticamente significativas entre las partes de la planta de *P. racemosa* y entre las concentraciones utilizadas, con un $p = 0,0001$. Mientras que las concentraciones letales de los extractos de las distintas partes de la planta de *P. racemosa* fueron para ramas finas una CL_{50} de 1,04 mg/ml, para las hojas una CL_{50} de 1,34 mg/ml y para la raíz una CL_{50} de 1,76 mg/ml. Los valores determinados para la $CL_{50} > 1$ se consideran sin efectiva bioactividad de *P. racemosa* contra epimastigotes de *T. cruzi*.

Los resultados del los porcentaje de viabilidad de promastigotes de *L. amazonensis* expuestos a *P. racemosa* revelaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones empleadas de las diferentes partes de *P. racemosa* $p=0,0001$, mientras que no hubo diferencias entre las partes de la planta $p= 0,028$. Los bajos valores de mortalidad registrados con altos valores de concentraciones letales para todas las partes de *P. racemosa* muestran poca bioactividad de *P. racemosa* contra promastigotes de *L. amazonensis*, determinándose una CL_{50} de 1,58 mg/ml para la raíz, 1,40 mg/ml para la hoja y de 1,06 mg/ml para rama finas, considerándose a *P. racemosa* sin actividad biológica contra promastigotes *Leishmania*.

Todas las partes de la planta de *P. racemosa* estudiadas mostraron buena bioactividad contra cercarias de *S. mansoni*, presentando alta mortalidad y alteraciones morfológicas incluyendo desprendimiento de la cabeza (figura 1).

Los análisis determinaron diferencias estadísticamente significativas entre las partes de la planta de *P. racemosa* $p= 0,0001$, siendo la parte de la planta de Ramas finas la que presentó el mejor valor de concentración letal 50 de 0,10 mg/ml (tabla 1).

Los valores de las concentraciones letales de todas las partes de la planta de *P. racemosa* ensayadas evidenciaron un buen efecto bioactivo contra los miracidios de *S. mansoni*, ocasionando alta mortalidad y alteraciones morfológicas con formación de vacuolas en la membrana de los miracidios (figura 2).

La parte de parte de Ramas finas de *P. racemosa* fue la que evidenció la menor concentración letal con un $CL_{50}= 0,064$ mg/ml (tabla 2).

Los resultados de *P. racemosa* sobre la infectividad de cercarias de *S. mansoni* demostraron un efecto atenuante significativo sobre las cercarias sobrevivientes expuestas a los extractos de las Ramas Finas de *P. racemosa*, con una disminución de la infectividad de las cercarias de *S. mansoni* al hámster. Se determinó un desarrollo de adultos de *S. mansoni* menor al 5% en comparación a los controles que presentaron un desarrollo de adultos del 40%. El efecto de atenuación en la infectividad de las cercarias de *S. mansoni* expuestas a *P. racemosa* se muestran en a figura 3.

Tabla 1.
Concentraciones letales (CL₅₀ y CL₉₀) de las partes de la planta de *P. racemosa* contra cercarias de *S. mansoni*.

Parte de la Planta	Concentraciones letales (mg/ml)		Límites de confianza (95%) Inferior-superior (mg/ml)	
	CL ₅₀	CL ₉₀	CL ₅₀	CL ₉₀
Raíz	0,63	1,17	0,59-0,67	0,11-1,25
Hoja	0,51	0,81	0,48-0,54	0,77-0,86
Rama Fina	0,10	0,16	0,08-0,14	0,13-0,24

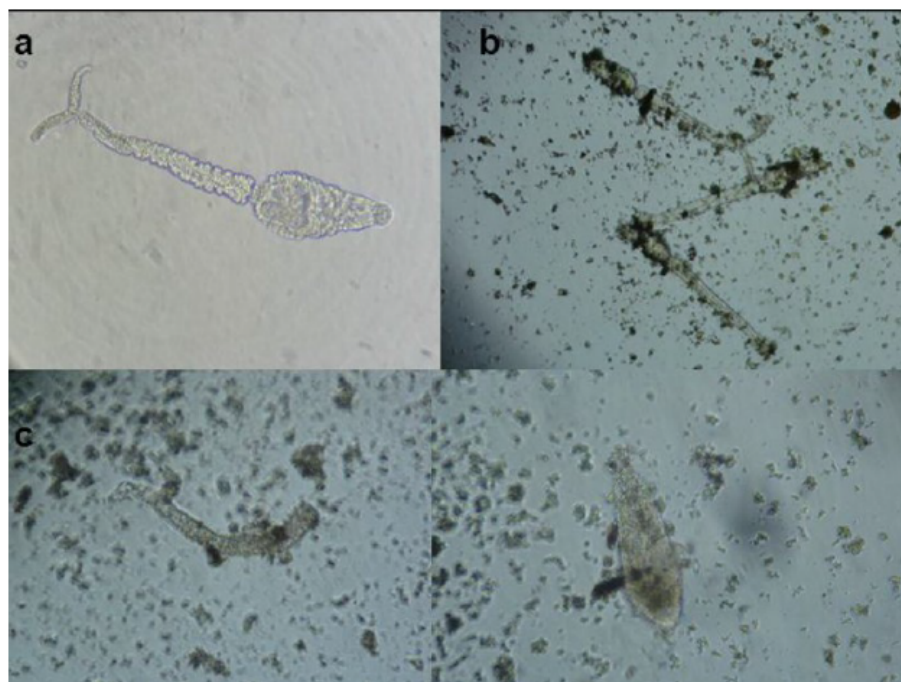


Figura 1.

Microfotografías de Cercarias de *S. mansoni* expuestas a las partes de *P. racemosa*.

1a. Control Cercaria viva de *S. mansoni*; Mostrando su morfología y estructura conservada. 1b. Cercarias muertas de *S. mansoni* expuestas a la parte de Ramas Finas de *P. racemosa*. 1c. Cercaria de *S. mansoni* expuesta a la parte de Ramas Finas de *P. racemosa* mostrando alteraciones morfológicas con desprendimiento de cabeza. Imágenes tomadas con un microscopio invertido LEICA con contraste de fases y cámara fotográfica SONY de 16 mega píxeles. Aumento 40X con Zoom de la cámara, 5X.

Los resultados evidenciaron un menor grado de patología en los hámster infectados con cercarias atenuadas con *P. racemosa* en relación a los controles, presentando menor grado de hepatomegalia y menos granulomas en el hígado que los controles.

Discusión

Una de las primeras evaluaciones de una sustancia vegetal para ser utilizada como posible droga es determinar su toxicidad y el impacto sobre el medio ambiente, uno de estos instrumentos valiosos para evaluar toxicidad, es determinar la letalidad sobre *A. salina* (8). Los resultados revelaron que el extracto de la parte de la Raíz de *P. racemosa* no mostró toxicidad sobre nauplios de *A. salina*, mientras que las otras partes de *P.*

racemosa probadas, Ramas Finas y las Hojas, evidenciaron una moderada toxicidad (19), estos resultados concuerdan con previos reportes (26).

Otra prueba ampliamente utilizada para determinar efectos tóxicos sobre la estructura, supervivencia, proliferación y funciones básicas a nivel celular de un organismo es la prueba de lisis de eritrocito (27). Los resultados no revelaron un efecto citotóxico con las distintas partes de la planta *P. racemosa* ensayadas contra eritrocitos de humano. El bajo efecto tóxico sin citotoxicidad observado con la planta de *P. racemosa* apoya la idea de poder usar a esta planta contra enfermedades parasitarias.

Por otro lado, los resultados de los extractos con las diferentes partes de la planta *P. racemosa* contra epimastigotes de *T. cruzi* evidenciaron una baja actividad tripanocida in vitro. Similarmente, se determinaron concentraciones letales muy elevadas con las diferentes partes de la planta *P. racemosa* que son consideradas no bioactivas contra promastigotes de *L. amazonensis*, estos resultados concuerdan con reportes previos (28). La poca efectividad de la planta de *P. racemosa* contra *Leishmania* y *Trypanosoma* puede atribuirse a la ausencia de alcaloides en *P. racemosa*, a los cuales se le atribuyen una fuerte actividad leishmanicida y tripanocida (29,30).

Tabla 2.
Concentraciones letales (CL₅₀ y CL₉₀) de las partes de la planta de *P. racemosa* contra miracidios de *S. mansoni*.

Parte de la Planta	Concentraciones letales (mg/ml)		Límites de confianza (95%) Inferior-superior (mg/ml)	
	CL ₅₀	CL ₉₀	CL ₅₀	CL ₉₀
Raíz	0,26	0,49	0,24-0,28	0,46-0,53
Hoja	0,32	0,72	0,30-0,35	0,68-0,77
Rama Fina	0,06	0,14	0,06-0,08	0,11-0,18

En la literatura solo existen reportes de *P. racemosa* contra adultos de *S. mansoni* que se desarrollan en el hospedador vertebrado (31,32). Los resultados evidenciaron que *P. racemosa* tiene una mayor actividad biocida sobre los miracidios de *S. mansoni* que contra las cercarias. Las diferencias en la susceptibilidad entre miracidios y las cercarias de *S. mansoni* podrían deberse al tegumento. Los miracidios de *S. mansoni* presentan un tegumento formado por microvellosidades y un gran número de cilios (33), que pueden estar aumentando la superficie de contacto con el metabolito secundario de la planta, causándole un mayor daño. Mientras que el tegumento de las cercarias de *S. mansoni* está constituido por tres placas epidérmicas que poseen espinas y una capa superficial mucilaginosa que le pueden conferir a las cercarias una mayor resistencia ante los compuestos bioactivos de la planta (34). Los resultados concuerdan con reportes de extractos de *Punica granatum* contra las formas inmaduras de *S. mansoni*, donde los miracidios eran más sensible que las cercarias (35). La diferencias encontradas en la actividad biocida entre las partes de *P. racemosa* pueden ser atribuidas a pequeñas

variaciones en la cantidad y naturaleza de los compuestos activos liberados por los diferentes procesos de extracción (12,36).

Otro aspecto que corrobora la actividad parasiticida de *P. racemosa* es el efecto atenuante sobre las cercarias de *S. mansoni*. A pesar de que se evidenció baja mortalidad de las cercarias de *S. mansoni*, se determinó un efecto atenuante sobre las cercarias sobrevivientes con la consecuente reducción del número de adultos desarrollados en los animales infectados. Existen varios reportes similares con otras plantas (37,38,39). El efecto atenuante podría deberse a la disminución del movimiento de las cercarias con pérdida de la capacidad de penetración activa a través de la piel (40). Otra explicación del efecto atenuante, es que las cercarias también sufren un daño osmótico que las conduce a un comportamiento errático de arrastramiento que le impide la penetración en la piel y reduce el número de adultos desarrollados (39). Aunque el grado de patología está relacionado directamente a la carga parasitaria (41), el efecto atenuante sobre las cercarias, también se podría evidenciar en las etapas sucesivas dentro del animal, alterando su desarrollo hacia el estado de adultez o fecundidad de los adultos (38), lo que podría reducir la transmisión de *S. mansoni*.

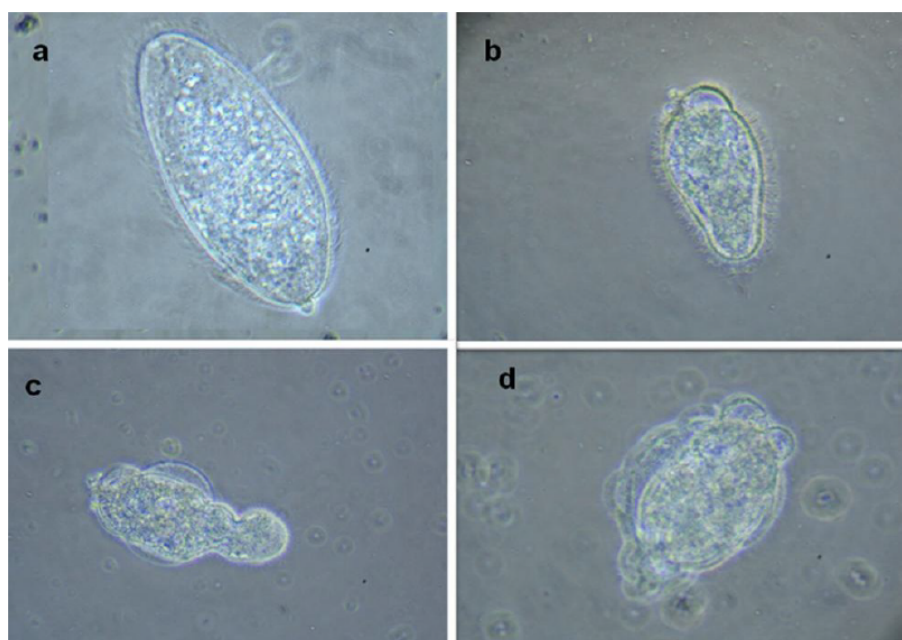


Figura 2.

Microfotografía de Miracidios de *S. mansoni* expuestas a las partes de *P. racemosa*.

2a Control Miracidio de *S. mansoni* Mostrando su morfología y estructura conservada. 2b y 2c Alteraciones morfológicas de miracidios luego de la exposición a la parte de Ramas finas de *P. racemosa*. 2d Formación de vacuolas en la membrana celular. Imágenes tomadas con un microscopio invertido LEICA con contraste de fases y cámara fotográfica SONY de 16 mega pixeles. Aumento 40X con el Zoom de la cámara, 5X.

Es importante resaltar que aunque las concentraciones letales obtenidas con todas las partes de la planta de *P. racemosa* fueron mayores a los de un biocida ideal, cabe destacar que los compuestos bioactivos de *P. racemosa* fueron capaces de causar alteraciones o daños en la primera barrera de protección de los miracidios y cercarias de *S. mansoni*, determinante para continuar el desarrollo y la supervivencia

en el medio externo. Otros autores también evidenciaron alteraciones superficiales drásticas por vesiculación de la membrana en los miracidios y en las cercarias de *S. mansoni* usando extractos metanólicos de *Jatropha curcas* (37), atribuyendo la formación de vesículas en la superficie en estas formas inmaduras a los ésteres de forbol. Si bien la presencia de los ésteres de forbol en la planta *P. racemosa* no han sido descritos en la literatura, si ha sido reportada en el análisis fitoquímico de *P. racemosa* un gran grupo de diterpenos, al cual pertenecen los ésteres de forbol (42). Los diterpenos poseen propiedades farmacológicas como antirretrovirales (43), antimicrobianas (44), antiinflamatorias, analgésicas y gastroprotectoras (45). Por lo tanto, se sugiere aislar los compuestos activos presentes en *P. racemosa* que han sido descritos por su actividad antihelmíntica y crear una mezcla sinérgica que aumente la eficacia en la actividad biológica de *P. racemosa* contra formas inmaduras de *S. mansoni*.

Conclusiones, se aportan datos importantes sobre la bioactividad de *P. racemosa*. Aunque *P. racemosa* no mostró un efecto contra *L. amazonensis* y *S. cruzi*, si mostró actividad biocida contra las formas inmaduras de cercarias y miracidios de *S. mansoni*, presentando además, una baja citotoxicidad y sin un efecto tóxico adverso al medio ambiente, por lo que sugerimos profundizar los estudios con *P. racemosa* para potencializar sus metabolitos biológicamente activos para su uso como antiparasitario contra *S. mansoni*.

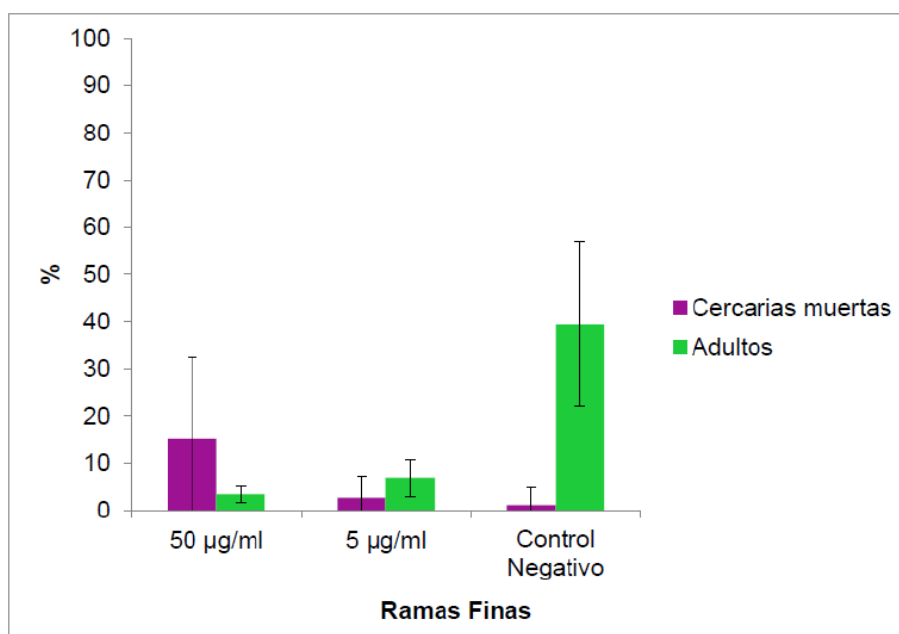


Figura 3.
Efecto de atenuación en la infectividad de las cercarias expuestas a *P. racemosa*.
 Mortalidad de cercarias expuestas = *Color Morado*. Adultos desarrollados en hámster = *Color verde*.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este artículo.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Proyecto Estratégico- N° 2011000371 del FONACIT y por la Universidad de Los Andes.

Referencias

1. OMS. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). 2012. (Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>).
2. Organización mundial de la Salud (OMS). *Control de la leishmaniasis*. Informe de la Secretaria. 2015. Resolución N° A60/10; Ginebra, Suiza.
3. Pereira A, Pérez M. Esquistosomiasis. Una amenaza para el sistema venoso portal del ser humano. *Offarm: Farmacia y Sociedad*. 2004; 23: 104-10. [Google Scholar]
4. Mijac V, Ryder E. Análisis bibliométrico de las publicaciones científicas sobre parasitosis en Venezuela (2002-2007). *Interciencia*. 2009; 34: 140-6. [Google Scholar]
5. Risquez A. Mortalidad por enfermedad de Chagas: A propósito de los brotes de Chagas agudo como enfermedad reemergente de transmisión alimentaria. *Gac Méd Caracas*. 2009; 117: 319-21. [Google Scholar]
6. De Lima H, Borges R, Escobar Jaime, Convit J. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal. *Bol Mal Salud Amb*. 2010; 50: 283-99. [Google Scholar]
7. González A, Montenegro L, Navarro M, De Noya B, López M. Frecuencia de esquistosomiasis y otras enfermedades parasitarias en Zuata, Edo Aragua, Venezuela 2008-2009. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol*. 2012; 71: 167-71. [Google Scholar]
8. Pino P, Lazo F. Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev Protección Veg*. 2010; 22: 34-43. [Google Scholar]
9. Bittner M, Alarcón J, Aqueveque P, Becerra J, Hernández V, Hoeneisen M, Silva M. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. *Bol Soc Chil Quim*. 2001; 46: 419-31. [Google Scholar]
10. Paula J, Reis J, Ferreira L, Menezes A, Paula J. Género *Pimenta*: aspectos botánicos, composição química e potencial farmacológico. *Rev Bras Pl Med*. 2010; 12: 363-79. [Google Scholar]
11. Abaul J, Bourgeois P, Bessiere J. Chemical composition of the essential oils of chemotypes of *Pimenta racemosa* var *racemosa* (P. Miller) J. W. Moore (Bois d'Inde) of Guadeloupe (F.W.I.). *Flav Fragr J*. 1995; 10: 319-21. [Google Scholar]
12. Contreras B, Rojas J, Celis M, Rojas L, Méndez L, Landrum L. Componentes volátiles de las hojas de *Pimenta racemosa* var. *Racemosa* (Mill.) (Myrtaceae) de Táchira-Venezuela. *BLACPMA*. 2014; 13: 305-10. [Google Scholar]
13. Robineau L. Towards a Caribbean Pharmacopeia. *Tramil* 4, 1991. Enda-Caribe, Santo Domingo.
14. Alitonou A, Noudogbessi J, Sessou P, Tonouhewa A, Avlessi F, Menut C, Sohounhloue D. Chemical composition and biological activities of

- essential oils of *Pimenta racemosa* (Mill.) J. W. Moore. from Benin. Int J Biosci. 2012; 2: 1-12. [Google Scholar]
15. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol. 1999; 86: 985-90. [PubMed] [Google Scholar]
16. Kim J, Lee YS, Lee SG, Shin SC, Park I. Fumigant antifungal activity of plant essential oils and components from West Indian bay (*Pimenta racemosa*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oils against two phytopathogenic fungi. Flav Fragr J. 2008; 23: 272-7. [Google Scholar]
17. Getti G, Durgadoss P, Domínguez- Carmona D, Martin-Quintal Z, Peraza-Sánchez S, Peña-Rodríguez LM, Humber D. Leishmanicidal Activity of Yucatecan Medicinal Plants on *Leishmania* Species Responsible for Cutaneous Leishmaniasis. J Parasitol. 2009; 95: 456-60. [PubMed] [Google Scholar]
18. Programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XV. Disponible: www.statgraphics.net.
19. Fernández A, Mendiola J, Monzote L, Parra M, Sariago I, Acuña D, Scull R, Gutiérrez Y. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. Rev Cubana Med Trop. 2009; 61: 254-8. [Google Scholar]
20. Cáceres R. Estadística aplicada a las ciencias de la salud, Ediciones Diaz de Santos. 2007; 1030.
21. Repetto, M. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group. Tercera edición. 2002; 303-5.
22. Löfgren SE, Milette LC, Steindel M, Bachère E, Barracco MA. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. Exp Parasitol. 2008; 118: 197-202. [PubMed] [Google Scholar]
23. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. J Immunol Methods. 1993; 157: 233-40. [PubMed] [Google Scholar]
24. Henriques C, Moreira T, Brigagao C, Henriques A, Carvalho T, Souza S. Tetrazolium salt based methods for high- throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy. Analytical Method. 2011; 3: 2148. [Google Scholar]
25. OMS. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Tercera edición. Ginebra, 2005, www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguirad_laboratorio.pdf,
26. Claudio-Campos K, Hernández-Rivera J, Rivera-Gutierrez J, Ortiz-Rivera I, Carvajal-Vélez A, Pérez-Torres M, Pagán-Ortiz M, Ospina-Millán CA. Biological screening of select Puerto Rican plants for cytotoxic and antitumor activities. P R Health Sci J. 2015; 34: 25-30. [PubMed] [Google Scholar]
27. Repetto, M. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group. Tercera edición. 2002; 303-5.
28. Gallego A, Fernando T, Robledo S, Vélez I, Carrillo L, Muñoz W, Fonnegra R, Roldán J, Valencia O, Echeverri F. Actividad leishmanicida

- y tripanocida de *Acacia farnesiana*, *Piper aricianum*, *P. subpedale* *Sphagnum recurvum* y *Vismia baccifera* subsp. *Ferruginea*. *Actual Biol.* 2006; 28: 39-49. [PubMed] [Google Scholar]
29. Staerk D, Lemmich E, Christensen J, Kharazmi A, Olsen CE, Jaroszewski JW. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. *Planta Med.* 2000; 66: 531-536. [PubMed] [Google Scholar]
30. García J, Reyes R, Huerta M, Castillo J, Santillán S, Vázquez B, Mendoza J. El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: una revisión botánica, química y farmacológica. *Vitae.* 2014; 21: 126-45. [Google Scholar]
31. Priya S, Sheth R, Jayaveera K. Anthelmintic activity of essential oil of *Pimenta dioica* (Linn.) Merrill, Family: Myrtaceae, collected in Summer from South Canara, India. *Eur J Exp Biol.* 2012; 2: 2271-5. \ [Google Scholar]
32. Schelkle B. Use of cajeput and *Pimenta racemosa* extract for treating parasitic infestation of fish. 2012. Patent CA2769615 C. [Google Scholar]
33. Ebrahimzadeh A. Contributions to the micromorphology of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. I. Fine structure of the tegument and its "associated structures". *Z Parasitenkd.* 1977; 54: 257-67. [PubMed]
34. Morris GP. The fine structure of the tegument and associated structures of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. *Z Parasitenkd.* 1970; 36: 15-31. [PubMed]
35. Zeid A, Hussein K. In vitro effect of *punica granatum* and *nigella sativa* extracts on *schistosoma mansoni* cercariae, miracidia and adult worms. Sudan university of science and technology, medical laboratory science. *Zootecnia Trop.* 2012; 23: 259-94. [Google Scholar]
36. Samia A. Saad A, Laila A, Nasser S, Olov S, Sanaa B. Potential antischistosomal activities of some egyptian native plants using *schistosoma mansoni* worm killing assay. *Global J Pharmacol.* 2014; 8: 237-44.
37. Rug M, Ruppel A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of Schistosomes. *Trop Med Int Health.* 2000; 5: 423–30. [PubMed] [Google Scholar]
38. El-Ansary A, Mohamed AM, Mahmoud SS, El-Bardicy S. On the pathogenicity of attenuated *Schistosoma mansoni* cercariae released from metabolically disturbed *Biomphalaria alexandrina*. *J Egyptian Soc Parasitol.* 2003; 33: 777-94. [PubMed] [Google Scholar]
39. Kamel EG, El-Emam MA, Mahmoud SSM, Fouda FM, Bayaomy FE. Attenuation of *Schistosoma mansoni* cercarial infectivity to albino mice by methanol extract of some plant species. *Pestic Biochem Physiol.* 2010; 98: 342–8. [Google Scholar]
40. Perrett S, Whitfield PJ, Bartlett A, Sanderson L. Attenuation of *Schistosoma mansoni* cercariae with a molluscicide derived from *Milletia thonningii*. *Parasitol.* 1994; 109: 559-63. [PubMed] [Google Scholar]
41. World Health Organization. Immunology of schistosomiasis. *Bull World Health Organ.* 1974; 51: 553-95.
42. Contreras B, Rojas J, Méndez L, Celis M. Preliminary phytochemical screening of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (Myrtaceae) from Táchira – Venezuela. *Pharmacol on line.* 2014; 62: 61-8. [Google Scholar]

43. Brunton L, Lazo J, Parker K. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11a Ed. Colombia: McGraw-Hill Interamericana. 2007; 1049-62.
44. Ambrosio SR, Tirapelli CR, da Costa FB, de Oliveira AM. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. *Life Sci.* 2006; 79: 925-33. [PubMed] [Google Scholar]
45. Guedes MM, Cunha AN, Silveira ER, Rao VS. Antinociceptive and gastroprotective effects of diterpenes from the flower buds of *Egletes viscosa*. *Planta Med.* 2002; 68(11): 1044-6. [PubMed] [Google Scholar]

Notas de autor

Autor de correspondencia: Elsa Nieves. Laboratorio de Parasitología Experimental (LAPEX), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, 5101. La Hechicera, Mérida- Venezuela. Teléfono: 005804121724064. Email: nievesbelsa@gmail.com

Información adicional

Como citar este artículo: Nieves E, Calles LE, Rondón M, Contreras B, Chataing B. Potencial parasiticida de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae). *Avan Biomed* 2017; 6: 88-97.

PII: S2477-9369(17)06013-O