

Artículo Original

Actividad Antihelmíntica de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (SRB) ka'á he'ê: Primera etapa del proyecto de investigación con *lombricus terrestris* *

Antihelmintic activity of the *Stevia rebaudiana* Bertoni (SRB) – ka'á he'ê: First stage of the *lombricus terrestris* research project

Achucarro C^{1,6}, Echagüe G², Sosa L², Ferro E³, Sckell C⁴, Ferreira M⁵, Pistilli N², Alborn RM⁶.

¹Cátedra de Clínica Pediátrica. Facultad de Ciencias Médicas – UNA, ²Departamento de Análisis Clínicos. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud – UNA, ³Cátedra de Bioquímica. Facultad de Ciencias Médicas – UNA, ⁴Cátedra de Patología Médica I. Facultad de Ciencias Médicas – UNA, ⁵Departamento de Medicina Tropical. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud – UNA, ⁶Coordinación de Extensión Universitaria y Servicios. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud – UNA

* Trabajo de investigación realizado en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción con financiamiento de la Dirección General de Investigación Tecnológica y Científica de la UNA.

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo para evaluar la actividad anti helmíntica *in vitro* de varias formulaciones de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni (SRB), ka'á he'ê, y el steviosido según la técnica de motilidad y supervivencia de la lombriz de la tierra utilizada como modelo biológico, nematodo de vida libre; según la medida de la variable tiempo de supervivencia o muerte expresada en minutos. Las formulaciones de las *Stevia rebaudiana* Bertoni (SRB) fueron: en solución acuosa, del extracto etanólico al 1 y 10% del extracto acuoso al 10%. El steviosido (polvo) en solución utilizado fue al 0,5 mg% y 0,5 g%. Los formulados comerciales en solución: Albendazol al 1 y 10%; Mebendazol al 10% como controles positivos y como control negativo: Solución de suero fisiológico al 5%.

La evaluación cualitativa del ensayo demostró actividad antihelmíntica evidente de la SRB en solución del extracto alcohólico el 1% y al 10% y la solución del extracto acuoso al 10% así como el Mebendazol pero éste en mucho menor proporción y en 10 veces más tiempo.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana* Bertoni, Actividad antihelmíntica, parasitosis intestinal.

ABSTRACT

A comparative study was performed to evaluate the *in vitro* antihelmintic activity of different formulations extracted from the *Stevia rebaudiana* Bertoni (SRB) plant, and the stevioside by the technique of motility and survival soil worms, a free life nematode used as a biologic model, according to the measurement of the variable time of survival or death expressed in minutes. The SRB's formulations were: aqueous solution, 1% and 10% ethanol extracts of the 10% aqueous extract. The stevioside

¹ Autor correspondiente: **Prof. Dra. Carmen Achucarro de Varela**

Editorial de la Facultad de Ciencias Médicas. Facultad de Ciencias Médicas - UNA, Dr. Montero 658. Asunción – Paraguay / Tel: (595-971-212204) / E-mail: efacim@med.una.py

(powder) was diluted to use at 0.5mg % and 0.5g %. Commercial formulations of 1% and 10% albendazole, 10% mebendazole 10% and a 5% saline solution were used as positive and negative controls respectively. The qualitative evaluation of the assay showed evident antihelmintic activity of SRB in the 1% and 10% alcoholic extract as well as in the 10% aqueous extract. Mebendazole also showed activity but in lower proportion and it also took ten times more to be evident.

Keywords: *Stevia rebaudiana* Bertoni, antihelmintic activity, intestinal parasitosis

INTRODUCCIÓN

Los nematodos parásitos causan enfermedades importantes en el ser humano especialmente a los más vulnerables: la niñez, mujeres y adultos de la 3ª edad y ocurre igualmente en los animales domésticos en general (1,2).

Las infecciones parasitarias intestinales son las causas más comunes de morbilidad en el mundo, así como de mortalidad en numerosas y especiales ocasiones, por las complicaciones secundarias, como las obstrucciones intestinales por *Áscaris* y las anemias graves por *Uncinarias* (3). Además, diarrea, pérdida de sangre, disminución de la capacidad de trabajo, reducción del crecimiento por desnutrición crónica y alteración de las funciones cognitivas importantes problemas médicos, de salud pública y sociales asociadas a las parasitosis intestinales (4).

La observación y experiencia vivida en nuestros países nos permite estimar que los helmintos intestinales estuvieron y continúan estando en la historia del mundo, omnipresentes en forma singular, causando grandes epidemias y a la fecha aparece muy difícil su erradicación incluso en países desarrollados o no (4).

Las investigaciones actuales sugieren que los parásitos pueden deprimir las funciones cognitivas e inmunitarias pues, secretan y/o excretan sustancias que pueden deprimir las por los efectos directos sobre el sistema nervioso central con producción secundaria de desequilibrio entre las células y las citoquinas en contra de la respuesta del sistema inmune del huésped y en forma indirecta como consecuencia de las secuelas físicas (5-8).

Además, son patentes sus efectos clínicos y las complicaciones físicas y mentales relacionadas con la desnutrición calórico-proteíca y el déficit de micronutrientes como el hierro y las vitaminas (5).

La intensidad de las infestaciones parasitarias, especialmente las causadas por *Uncinarias*, aumenta con la edad a diferencia de otros helmintos transmitidos desde el suelo contaminado como *Áscaris lumbricoides* y *Trichuris trichura* con tasas más elevadas en la niñez. Se plantean la hipótesis de que las *Uncinarias* pueden evadir o suprimir la respuesta inmune, y varios investigadores describieron moléculas antiinflamatorias o inmunomoduladoras de los parásitos adultos que provocan disminución de respuestas inmunes a otras infecciones. Es así que esto puede contribuir a dilucidar la susceptibilidad a la infección por VIH, malaria y tuberculosis entre otras (5).

La adopción de medidas de salud pública, como el uso de calzados, se consideran importantes para el control de las helmintiasis y sus efectos son evidentes solo después de varias décadas. Por este motivo, la remoción de estos parásitos con la administración de dosis únicas o múltiples de agentes antihelmínticos benzimidazólicos, reduce la carga y la transmisión a un nivel debajo de lo necesario para producir enfermedad. En algunos casos, se requiere el tratamiento tres veces por año y los datos indican que la eficacia terapéutica disminuye con la periodicidad (6).

Esta preocupación acerca de la resistencia hacia los antiparasitarios benzimidazólicos, llevó a dirigir los esfuerzos a la búsqueda de nuevas herramientas para el control de las parasitosis intestinales (7).

Hasta que las reformas socio-económicas sean de alcance masivo, la meta global de la OMS para el año 2010 es brindar el tratamiento de rutina al menos al 75% de los niños en edad escolar en riesgo de infección. Para contribuir a ello es necesaria la búsqueda de otros antiparasitarios, como los naturales, por ejemplo a partir de la *Stevia rebaudiana* Bertoni o *ka'a he'e* (8,9).

El control de estas afecciones se apoya fundamentalmente en el tratamiento con antihelmínticos y la buena alimentación; pero, actualmente, constituye una necesidad imperiosa y un reto para la investigación

médica y farmacológica buscar y encontrar alternativas terapéuticas en especial para los helmintos resistentes (10,11).

Además, a nivel mundial con énfasis en nuestro país, el Paraguay, tiende a crecer y desarrollarse la medicina tradicional como una vía para sustituir medicamentos sintéticos con costo elevado y con efectos secundarios desagradables y/o tóxicos por medicamentos de origen natural, en especial los antihelmínticos, tratando de hallar el antiparasitario ideal. Por ello, nos propusimos determinar y evaluar la actividad antihelmíntica in vitro de formulaciones del extracto de la Stevia rebaudiana Bertoni (SRB) o ka'á he'ê, especie vegetal reconocida por su efecto edulcorante, antidiabética, antihipertensiva y otras (12-16).

MATERIALES Y METODOS

Diseño: Experimental. Consistió en exponer 9 (nueve) grupos de cinco lombrices de tierra (*Lombricus terrestris*) de 7-8,5 cm. a las siguientes sustancias del ensayo:

- Extracto etanólico al 1 % y al 10% de S. rebaudiana.
- Extracto acuoso al 10% de S. rebaudiana en agua destilada.
- Esteviósido en polvo (Esteviafarma Industrial) disuelto al 0,5 mg % y 0,5 gramos %.
- Formulaciones farmacéuticas de antiparasitarios Albendazol (Mollet 400mg/10mL) al 1 y 10% y Mebendazol (V. Scavone 100mg/5mL) en solución al 10% como controles positivos.
- Solución fisiológica (Na Cl 9,5 g/L) como control negativo.

Características de la población

Cultivo de Lombriz: Se utilizó como modelo biológico la lombriz de tierra, mantenida en medio de cultivo rico en materia orgánica (humus), a 25° - 27° C, humedad relativa del 80% y pH7. Las lombrices fueron facilitadas por la Dra. Amalia Vatteone de Scappini, quien se dedica en forma privada al lombricultivo.

Inmediatamente antes del experimento, las lombrices se extrajeron con cuidado del medio de cultivo y fueron transferidas a un recipiente con agua destilada para ser lavadas. Seguidamente se colocaron una a una en placas Petri de 9,5 cm. de diámetro, identificadas según los grupos de experimento y control. A continuación se añadieron los extractos y los controles en volumen de 10 mL.

Material vegetal

Stevia rebaudiana Bertoni (SRB) ka'á he'ê se adquirió en el comercio. Es un material secado al natural de las hojas y tallos triturados, mantenidos en la sombra a temperatura ambiente, protegido de la humedad, con buena aireación durante 20-30 días.

Preparación de los extractos

Extracto etanólico de SRB, se preparó a partir de 2 kg. de material seco y molido; se dejó macerar en etanol 95° durante 7 días con agitación frecuente, protegido de la luz solar, luego filtrar con papel del filtro. Posteriormente, se realizó la evaporación del disolvente bajo presión reducida en un evaporador rotatorio, a 40°C hasta obtener una masa siruposa.

Extracto acuoso de la SRB, se preparó a partir de 1 kilo de material seco molido; se dejó macerar en agua destilada durante 7 días, con agitación frecuente, protegido de la luz solar, filtrando luego con papel de filtro. La dilución se concentró por evaporación del disolvente bajo presión en un evaporador rotatorio, posteriormente.

Evaluación in vitro de la actividad antihelmíntica

Se realizó según la técnica de motilidad y supervivencia de la lombriz de la tierra (*Lumbricus terrestris*) (2).

La actividad antihelmíntica se evalúa mediante la observación directa y con lupa detectando en las lombrices cambios en la motilidad, alteraciones en el tegumento, deyecciones y la muerte en función del tiempo (motilidad y supervivencia o muerte) según los siguientes criterios:

Parálisis: Tiempo transcurrido desde el inicio de la experiencia hasta que los movimientos desaparecen, más allá de la motilidad normal (1,11).

Muerte: Tiempo transcurrido desde el inicio del experimento hasta que se comprueba la muerte de las lombrices, colocando estas durante 10 segundos en tubos de ensayos de 25 mm de diámetro conteniendo agua destilada a 45° C; lo que las estimula e induce movimientos en los vermes si aun están vivos.

Esto se prueba cada 5 minutos después de confirmada la parálisis (1,11).

FIGURAS: Lombrices en placas de Petri utilizadas en el experimento.



Análisis Estadístico

Comparar los tiempos de sobre vida de cada tratamiento frente al control, mediante la prueba de Wilcoxon y la prueba de Kruskal – Wallis con suero fisiológico.

Aspectos Éticos del ensayo pre - clínico

El uso de los animales (*Lumbricus terrestris*); estos, fueron adquiridos en un lombricultivo a cargo de una profesional estudiosa en condiciones generales correctas; las lombrices fueron transportadas en cajas especialmente preparadas con el humus correspondiente, alojados posteriormente en forma cuidadosa a temperatura ambiente con una humedad de 80-90%, con buena ventilación, a la sombra, alimentados diariamente con restos de alimentos naturales y suficiente agua.

Las lombrices mantenidas en criaderos no están en peligro de extinción y su utilización no alteraría el ecosistema. Además son invertebrados con sistema nervioso rudimentario no tienen conciencia y no expresan dolor.

RESULTADOS

Las formulaciones evaluadas:

Los extractos etanólicos al 1 y al 10% de la *S. rebaudiana* produjeron en promedio la muerte de *Lumbricus terrestris* en 49 minutos y 30 minutos, respectivamente. El extracto acuoso al 10% de la *S. rebaudiana* fue 28 minutos. Las diluciones de esteviósido al 0,5 mg/dL y al 500 mg/dL fue 2365 y 1200 minutos, respectivamente.

La mortalidad se observó en los controles positivos, albendazol al 1% en 1457 minutos, albendazol al 10% en 465 minutos y con mebendazol al 10% 172 minutos.

En el control negativo de solución fisiológica se mostró viabilidad hasta 2022,1 minutos en promedio, lo que equivale a más de 33 horas. Ver tabla 1, 2 y 3.

Tabla 1. Actividad antihelmíntica comparada en términos de muerte según el tiempo de exposición (minutos promedio)

	Grupos experimentales contra <i>Lumbricus terrestris</i> :	Promedio tiempo de muerte (minutos)	Promedio tiempo de muerte (horas)
Control negativo:	Solución fisiológica	2022	33,7
Formulaciones evaluadas	Extracto etanólico al 1% (SRB)	49	0,8
	Extracto etanólico al 10% (SRB)	30	0,5
	Extracto acuoso al 10% (SRB)	28	0,5
	Esteviósido al 0.5 mg/dL	2365	39,4
	Esteviósido al 500 mg/dL	1200	20,0
Controles positivos	Albendazol al 1%	1457	24,3
	Albendazol al 10%	465	7,7
	Mebendazol al 10% mg/dL y g/L	172	2,9

Tabla N° 2. Resultados del Análisis estadístico: Rangos con signo de Wilcoxon

Grupo experimentales contra <i>Lumbricus terrestris</i>	Promedio tiempo de muerte (minutos)	Valor de P
Extracto alcohólico (SRB) al 1 % VERSUS Albendazol al 1%	49 1457	P = 0,043 (diferencia significativa p<0,05)
Extracto alcohólico (SRB) al 10 % VERSUS Albendazol al 10%	30 465	P = 0,043 (diferencia significativa p<0,05)
Extracto alcohólico (SRB) al 10 % VERSUS Mebendazol al 10%	30 172	P = 0,068 (diferencia NO significativa p>0,05)
Extracto acuoso (SRB) al 10 % VERSUS Albendazol al 10%	28 465	P = 0,043 (diferencia significativa p<0,05)
Extracto acuoso (SRB) al 10 % VERSUS Mebendazol al 10%	28 172	P = 0,068 (diferencia NO significativa p>0,05)
Extracto acuoso (SRB) al 10 % VERSUS Esteviósido al 500 mg/dl	28 1200	P = 0,043 (diferencia significativa p<0,05)
Extracto acuoso (SRB) al 10 % VERSUS Solución fisiológica	28 2022	P = 0,043 (diferencia significativa p<0,05)
Extracto alcohólico (SRB) al 1 % VERSUS Solución fisiológica	49 2022	P = 0,043 (diferencia significativa p<0,05)

Tabla 3. Comparaciones del tiempo de mortalidad de *Lumbricus terrestris*, en minutos promedio de tiempo. Kruskal – Wallis (EpiInfo)

Muestra	N	Tiempo (minutos) Promedio	Significancia frente al Suero Fisiológico (Kruskal – Wallis)
Suero fisiológico	7	2022	---
Albendazol al 1%	5	1457	p= 0,1900
Albendazol al 10%	5	465	p= 0,0045
Mebendazol al 10% mg/dL y g/L	4	172	p= 0,0082
Extracto etanólico al 1% (SRB)	5	49	p= 0,0045
Extracto etanólico al 10% (SRB)	5	30	p= 0,0045
Extracto acuoso al 10% (SRB)	5	28	p= 0,0042
Esteviósido al 0,5 mg/dL	5	2365	p= 0,6826
Esteviósido al 500 mg/dL	5	1200	p= 0,0042

DISCUSIÓN

El **extracto alcohólico** de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (SRB) al **1%** y al **10%** mostró una reducción llamativa del tiempo de sobre vida en comparación a los controles positivos y negativos. Con el **extracto acuoso** de la *S. rebaudiana* al **10%** se obtuvo un promedio de 27 minutos 8 segundos del total para llegar a la muerte de las lombrices. Se apreció una efectividad superior al comparar la actividad de los extractos alcohólico y acuosos de la SRB con las formulaciones farmacéuticas disueltas y diluidas al 1% y 10% del albendazol y una dilución al 10% del mebendazol.

La actividad antihelmíntica con el **esteviósido** al 0,5 mg % y al 0,5 g % (500 mg) fue mucho menor que el de los extractos del SRB.

Debemos aclarar que el polvo del esteviósido se utiliza preferentemente como edulcorante, por tanto su probable efecto antihelmíntico es mucho menor y discutible; al observar el proceso en las placas de Petri con las lombrices, es como si estas fueran estimuladas por el esteviósido con el resultado final de mayor energía o vitalidad.

Los controles positivos. Soluciones de Albendazol al 1% y al 10% y la solución de Mebendazol a 10%, fue mucho mayor en tiempo para la muerte de las lombrices; siendo mayor para la dilución al 1%, mediano con dilución al 10% y mucho menor tiempo con el mebendazol al 10% en comparación a los extractos alcohólico y acuoso de la SRB.

Con el control negativo (solución fisiológica) se mantuvieron con vida las lombrices durante 2022 minutos promedio o sea, más de 33 horas. Datos que descartan la muerte por otros factores causales que no fuese la acción de la sustancia de ensayo. Esto se observa claramente en la **Tabla N° 1** y el análisis estadístico en la **Tabla N° 2**.

Se encontró una relación directa entre la concentración de los extractos alcohólicos y acuoso y el % de eficacia sobre la lombriz vale la pena recalcar que la acción de la SRB es mayor que los preparados farmacéuticos Mebendazol y Albendazol.

Nuestro estudio permitió apreciar una efectividad superior al comparar la actividad de los extractos alcohólico y acuoso de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (SRB) con las formulaciones farmacéuticas disueltas y diluidas al 1% y 10% del albendazol y mebendazol con una dilución al 10%.

La importancia del estudio y los resultados actuales nos obligan a continuar el desarrollo de los ensayos in vivo.

CONCLUSIONES

Las condiciones del ensayo nos permiten concluir:

- 1) Las soluciones del extracto etanólico y acuoso de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (SRB) ka'á he'ê redujeron significativamente la sobre vida de lombrices de tierra, in Vitro siendo la más efectiva en todos los casos, con diferencias significativas en comparación a las demás.
- 2) A los extractos de la S.R.B. le siguen el mebendazol al 10% en formulación farmacéutica y luego el albendazol al 10%
- 3) El steviósido (Steviafarma industrial) en polvo diluido al 10% no tuvo el efecto esperado expresado en comparación con los otros tratamientos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Investigación Tecnológica y Científica del Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción, por la ayuda económica para el financiamiento del proyecto. Al Prof. Dr. Guillermo Agüero, al Prof. Dr. Jorge T. Jiménez, a la Dra. Graciela Velázquez, a la Dra. Amalia Vatteone de Scappini, al Dr. Jorge Miret, Ms Science y a los siguientes Sr. Javier Zarate, Sra. Celia Salinas, Srta. Felicitia Torales, Sr. David González, la Sra. Cristina López y a la Lic. Marta Brizuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avello Oliver E, Silveira Prado EA, Pena Rodriguez FI, Camacho Escandon MC, Arce González MA. Actividad antihelmíntica in vitro de extractos de *Azadirachta indica* A Juss, *Momordica charantia* L. y *Chenopodium (Teloxys) ambrosioides* L. Weber. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. 2006; 7 (11): 1 - 10
2. De la Paz Naranjo J, Maceira Cubiles MA, Corral Salvado A, et al. Actividad antiparasitaria de una decocción de *Mentha piperita* Linn. Rev Cub Med Mil. 2006; 35 (3). ISSN 0138-6557
3. López de Guimaraes D, Neyra Llanos, RS, Romero Acevedo JH. Ascariasis: comparación de la eficacia terapéutica entre paico y albendazol en niños de Huaraz. Rev. gastroenterol. Perú, jul./set. 2001; 21 (3): 212-219
4. Kabatereine N, Brooker S, Kovkolinari A, Kazibwe F, Tukahebwa E, Fleming F, et al. Impacto de un programa nacional de lucha antihelmíntica en la intensidad de la infección y la morbilidad entre escolares de Uganda. Bol. OMS. 2007, vol 85: 85 – 160
5. Cortes JR, Sierra PA. Una mirada nueva a un problema antiguo. ¿Influye la infección por helmintos en la ejecución mental y en los logros académicos del escolar? Pediatría. Colombia, Feb 2005: 1 – 5
6. Hotez P, Brooker S, Bethony JM. Hookworm Infection. NEJM. Ago 2004; 351 (8): 799 – 807
7. Solana H. El fenómeno de la resistencia antihelmíntica. FCV. UNICEN. 2007: 1 – 20
8. Walson JL, Stewar G. Tratamiento de la coinfección con helmintos en pacientes con infección por VIH-1 en ámbitos de recurso limitados (Revisión Cochrane Plus). 2008; N° 3
9. Informe del Comité de Expertos de la OMS. Prevención y control de la esquistosomiasis y las geohelmintiasis. Serie de Informes Técnicos OMS N° 912. 2005, 66 pág
10. Ferreira EB, De Asis Rocha Neves F, Da Costa MA, Do Prado WA, De Araújo Funari L, Basotte RB. Comparative effects of *Stevia rebaudiana* leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis. Planta Med. 2006; 72 (8):691-6
11. Ferri LA, Alves Do Prado W, Yamada SS, Gazola S, Batista MR, Bazotte RB. Investigation of the antihypertensive effect of oral crude stevioside in patients with mild essential hypertension. Phytother Res. 2006; 20 (9):732-6
12. Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. Metabolism. 2004; 53 (1):73-6

13. Hsieh MH, Chan P, Sue YM, LIU JC, Liang TH, Huang TY, Tomlinson B, Chow MS, Kao PF, Chen YJ. Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clin Ther.* 2003; 25 (11):2797-808
14. Koyama E, Sakai N, Ohori Y, Kitazawa K, Izawa O, Kakegawa K, Fujino A, Ui M. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. 1: *Food Chem Toxicol.* 2003 Jun; 41(6):875-83
15. Jeppesen PB, Gregersen S, Rolfsen SE, Jepsen M, Colombo M, Agger A, Xiao J, Kruhoffer M, Orntoft T, Hermansen K. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism.* 2003; 52 (3):372-8
16. Ochoa C, Rodríguez M, Domínguez M, Domínguez L, Saldaña L, Di Maio R, Alonso-Villalobos P, Martínez Grueiro MM. Nematocide activity of 6,7-diarylpteridines in three experimental models. *Journal of Helminthology.* 1999; 73: 333 – 336
17. Salazar W, Cardenas J, Núñez M, Fernández I, Villegas L, Pacheco L, Untiveros G. Estudio fitoquímico de la actividad antihelmíntica de los extractos de *Euphorbia huanchahana* y *Baccharis salicifolia*. *Rev Soc Quim Perú.* 2007; 73 (3): 150 - 157