

# Actividad *in vitro* de la planta endémica canaria *Ruta pinnata* frente al coccidio caprino *Eimeria ninakohlyakimovae*

López, A.M. (1); Muñoz, M.C. (1); Molina, J.M. (1); Hermosilla, C. (2); Taubert, A. (2); Pérez, D. (1); Matos, L. (1); Guedes, A.C. (1); Martín, S. (1); Ruiz, A. (1\*)

(1) Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, España

(2) Institute of Parasitology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

**RESUMEN:** La coccidiosis parasitaria causada por *Eimeria ninakohlyakimovae* constituye una de las enfermedades parasitarias que origina mayores pérdidas económicas en la producción caprina, muchas veces asociada a las altas tasas de mortalidad en animales jóvenes. La utilización continua de antisépticos y anticoccidiósicos para el control y tratamiento de la coccidiosis ha dado lugar tanto a la aparición de resistencias, fenómeno creciente y global. Este hecho, junto a la demanda de nuevos productos efectivos, de bajo costo y carentes de toxicidad, hace necesario el estudio y descubrimiento de nuevos agentes anticoccidiósicos. El presente trabajo tuvo como objetivo la valoración del efecto anticoccidiósico de extractos de la planta endémica canaria *Ruta pinnata* frente a *Eimeria ninakohlyakimovae*. Con este propósito se realizaron dos ensayos, el test de inhibición de la esporulación de ooquistes y el test de viabilidad de esporozoítos. En el test de inhibición de la esporulación, los ooquistes fueron tratados con diferentes concentraciones de extractos (diluidos en DMSO). Como control positivo se utilizó formaldehído al 10% y como negativo las correspondientes diluciones de DMSO. Para la realización del test de viabilidad de esporozoítos, éstos fueron incubados durante 3 horas con diferentes concentraciones de extracto de *Ruta pinnata* diluidos en DMSO. Tras este periodo de exposición, se evaluó la viabilidad de los esporozoítos, previamente teñidos con Sytox Orange, mediante fluorescencia. Como control negativo se usaron las correspondientes diluciones de DMSO y como control positivo una solución de esporozoítos inactivados por calor. La inhibición de la esporulación de los extractos de *Ruta pinnata* tras 30 minutos de incubación fue sólo moderada, pero a las 24 horas la inhibición fue similar a la obtenida en el control positivo. También se observó un efecto de los extractos frente a la viabilidad de los esporozoítos a concentraciones mayores de 1 mg/ml, siendo similar la mortalidad a la obtenida en el control positivo tras la inactivación con calor para concentraciones superiores a 5 mg/ml. Estos resultados abren la posibilidad de que *Ruta pinnata* pueda ser utilizada como anticoccidiósico para reducir la carga parasitaria del medio, así como en el tratamiento de afecciones producidas por este tipo de parásitos, no descartándose que esta actividad pueda ser trasladable a otros parásitos animales o humanos.

**SUMMARY:** Coccidiosis caused by the protozoan parasite *Eimeria ninakohlyakimovae* causes major economic losses in goat production, often associated with high mortality rates in young animals. Continuous and indiscriminate use of antiseptics and anticoccidials for the control and treatment of coccidiosis has resulted in the development of resistance, a growing global phenomenon. This fact, together with the demand for new drugs which are effective, economic and free of toxicity emphasize the necessity of investigation and discovery of new anticoccidial agents. This study aimed to evaluate the anticoccidial effects of extracts derived from the Canarian endemic plant *Ruta pinnata* against *E. ninakohlyakimovae*. For this purpose, an assay for the evaluation of sporulation rates of oocysts treated with different concentrations of plant extracts (diluted in DMSO) was employed. Different dilutions of formalin and DMSO were used as positive and negative controls, respectively. The anticoccidial activity was further examined testing the viability of the sporozoites after 3 h incubation with different concentration of plant extracts, using DMSO as negative and heat inactivated sporozoites as positive controls, respectively. The viability of the sporozoites was tested by fluorescence microscopy after Sytox Orange staining. The inhibition of oocyst sporulation of the plant extracts of *Ruta pinnata* after 30 min incubation was moderate, but a longer 24 h incubation induced an inhibition similar to that of positive control. Concentrations higher than 1 mg/ml of the plant extracts also affected the viability of the sporozoites, with mortality rates being similar to those found for heat inactivated sporozoites at concentrations higher than 5 mg/ml. These results suggest *Ruta pinnata* as a potential anticoccidial drug candidate for reduction of parasite environmental load and treatment of the disease caused by coccidian parasites. Potential effects of this plant against other animal or human parasites remain to be elucidated.

## Introducción

Los coccidios del género *Eimeria* son parásitos que se desarrollan fundamentalmente en las células epiteliales de aparato digestivo, siendo la principal acción patógena del parásito la destrucción de dichas células. Algunas especies como *Eimeria ninakohlyakimovae* (*E. ninakohlyakimovae*) también incluyen en su desarrollo endógeno la multiplicación asexual en células endoteliales (28) del intestino, todo lo cual provoca diarreas y deshidratación, y en ocasiones la muerte, principalmente en animales jóvenes. En general, el daño producido por la coccidiosis se traduce en cuantiosas pérdidas económicas en la producción ganadera (11). *E. ninakohlyakimovae*, considerada una de las especies de *Eimeria* más patógenas para el caprino (8), presenta una distribución mundial, siendo la tercera especie más frecuentemente encontrada en los caprinos canarios (30% aproximadamente) después de *E. arloingi* e *E. alijevi* (26).

Existen diversos factores que influyen en la distribución y presencia de *Eimeria spp.* en los sistemas de producción caprina, entre ellos: 1) el régimen de explotación (intensivo/extensivo), 2) las condiciones climáticas, 3) la edad de los animales y 4) el manejo, incluyendo las prácticas higiénico-sanitarias (7, 10, 16, 26). El conocimiento de todos estos factores, en combinación con la profilaxis terapéutica, ha sido tradicionalmente la base para el diseño de estrategias de control eficaces. Entre los anticoccidiósicos y anticoccidiostáticos más comúnmente utilizados en rumiantes destacan las sulfonamidas (31), derivados del acetonitrilo de benceno como el tortrazuril (22) o el diclazuril (27, 33) o el decoquinato (35).

El empleo de fármacos comerciales en el control de la coccidiosis en rumiantes, al igual que ocurre en otras parasitosis, presenta algunas limitaciones, como el elevado coste de los pro-

ductos disponibles en el mercado, los residuos de dichos fármacos en leche o carne y, sobre todo, la creciente aparición de resistencias (23). Todo lo anterior ha incentivado la búsqueda de nuevas alternativas, como el empleo de plantas medicinales que, por tratarse de un recurso más sostenible, está experimentando un especial resurgimiento. La mayoría de los trabajos de investigación realizados hasta el momento se han enfocado al estudio de la actividad antihelmíntica de diferentes plantas frente a nematodos gastrointestinales, como *Annosa squamosa* (30) o *Ziziphus nummularia* y *Acacia nilotica* (3). En cambio, los estudios realizados con parásitos pertenecientes al *Phylum Apicomplexa* no son tan numerosos. Éstos han sido dirigidos principalmente a la realización de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad frente a *Plasmodium* (1, 2). Otros estudios se han centrado en la búsqueda de plantas con actividad anticoccidiósica, especialmente ensayos *in vivo* con especies de coccidios que parasitan a aves. Así, extractos procedentes de *Artemisia annua* y el aceite esencial del orégano usado como suplemento en la dieta de broilers infectados experimentalmente con *Eimeria tenella* disminuyeron los recuentos de ooquistes por gramo de heces de los animales (9, 12).

El Archipiélago Canario constituye, por su localización geográfica, uno de los enclaves de mayor diversidad florística y riqueza en especies autóctonas del país (4, 5). En un importante número de plantas de esta flora autóctona la sabiduría tradicional ha atribuido propiedades medicinales, entre las cuales se encuentra *Ruta pinnata*, de la familia de las Rutaceae, también conocida como ruda salvaje. En general el uso de las rutáceas en medicina está extendido por todo el mundo, especialmente en el área del mediterráneo. Un ejemplo de esto es un ensayo realizado a partir de extractos obtenidos por la cocción de *Ruta graveolens* en el Norte de Italia, en el cual se comprobó

una alta actividad frente a nematodos de rumiantes, ectoparásitos del perro productores de sarna o eliminando moscas en granjas de porcino. (13). Otros estudios realizados en Canadá han demostrado el empleo de *R. graveolens* en la práctica etnoveterinaria, concretamente en el tratamiento de endoparásitos de cerdos, gatos y perros, como *Giardia* y *Toxoplasma* (18). El objetivo del presente estudio ha sido la evaluación *in vitro* del efecto anticoccidiósico de extractos metanólicos procedentes de *Ruta pinnata* frente al coccidio caprino *Eimeria ninakohlyakimovae*.

## Material y métodos

### Obtención del material vegetal y preparación de los extractos

El material vegetal de partida fueron frutos maduros de la planta endémica canaria *Ruta pinnata*. Inmediatamente después de su recogida, las muestras vegetales fueron enviadas al Instituto Universitario de Bioorgánica Antonio Padrón (Universidad de La Laguna), donde se realizó la preparación del extracto. Tras su secado y homogeneización, el material vegetal se sometió a un proceso de extracción usando metanol como disolvente. La extracción se realizó en columna hasta agotamiento utilizando un equipo Soxhlet, para lo cual se emplearon 1,5 litros de disolvente por cada 70 g de fruto seco y homogenizado.

El extracto obtenido fue utilizado a diferentes concentraciones en los ensayos *in vitro*, diluidos con DMSO 99% p/v (Sigma-Aldrich) a concentraciones que no afectasen a la viabilidad de los parásitos. El DMSO que se utilizó para disolver el extracto tuvo una concentración final máxima del 3% v/v.

### Animales donantes

Como animales donantes de parásitos se usaron cabritos de raza Majora de

## Correspondencia

Antonio Ruiz Reyes (Unidad de Parasitología). Tf.: 928 451113; Fax: 928 454341; Email: aruiz@dpat.ulpgc.es

1 a 3 días de edad. Los cabritos fueron criados en condiciones de esterilidad en boxes previamente desinfectados y alimentados mediante lactancia artificial, agua, pienso para cabritos y heno estéril. A las 4 semanas de vida los animales se infectaron oralmente con  $2 \times 10^5$  ooquistes esporulados de la cepa GC de *Eimeria ninakohlyakimovae* aislada inicialmente en la isla de Gran Canaria.

#### **Obtención de los parásitos**

Para la obtención de ooquistes de *E. ninakohlyakimovae* se recogieron las heces de los animales infectados desde el día 14 post-infección durante aproximadamente una semana. Para la concentración de los ooquistes se usó un método de flotación en solución concentrada de azúcar (1,5 g/l) mezclando al 50% la solución de azúcar con una solución de heces previamente filtrada a través de varios filtros con poro decreciente para disminuir al máximo la cantidad de detritus. Los ooquistes obtenidos tras la flotación se volvieron a concentrar por centrifugación en tubos de 50 ml a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos.

Parte de los ooquistes no esporulados se destinaron a la realización de los ensayos de inhibición de la esporulación, para lo cual se transfirieron a botellas de cultivo y se mantuvieron a 4°C hasta el comienzo del ensayo, que nunca excedió los 3 días desde su recogida. El resto de ooquistes no esporulados se incubaron a temperatura ambiente (TA) en una solución de dicromato potásico al 2% durante una semana con aireación forzada para favorecer la esporulación. Los ooquistes esporulados se usaron para la obtención de esporozoítos con los cuales realizar el ensayo de viabilidad de esporozoítos. Para la purificación de los ooquistes esporulados se utilizaron gradientes de Percoll y la exquistación tuvo lugar en dos fases. En una primera fase los ooquistes se suspendieron en L-cisteína HCl estéril 0,02 M y  $\text{NaHCO}_3$  0,02M y se incubaron a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  durante

20 horas. A continuación los ooquistes se mezclaron en solución balanceada de Hank's con 0,4 % de tripsina (Sigma, Aldrich) y 8% de bilis bovina filtrada obtenida de muestras de matadero, y se incubaron a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  durante un máximo de 4 horas. Los esporozoítos libres se lavaron 3 veces con medio RPMI centrifugando a 1500 x g durante 20 minutos.

#### **Ensayo de inhibición de la esporulación**

Este test determina la capacidad del extracto muestreado para inhibir el proceso de esporulación de los ooquistes. Para la realización del ensayo se incubaron en tubos Eppendorf a TA 5.000 ooquistes no esporulados con diferentes concentraciones de extracto. En cada tubo se dispensaron 20  $\mu\text{l}$  de solución con los ooquistes, 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ , 50  $\mu\text{l}$  de dicromato potásico al 10% y 100  $\mu\text{l}$  de cada dilución de extracto. Los periodos de incubación seleccionados fueron 30 minutos, 4 horas y 24 horas. Después de que transcurriese el tiempo seleccionado, los ooquistes se lavaron con  $\text{dH}_2\text{O}$  mediante centrifugación (1.500 x g, 5 mi). Tras el último lavado, los ooquistes se dispensaron en una placa de 24 pocillos en una solución de dicromato potásico al 2% (C.F.). Como control negativo se usó el DMSO a diferentes concentraciones, atendiendo a las diluciones de los extractos, y como control positivo se emplearon diluciones seriadas de formaldehído al 4%. La lectura de los resultados se realizó después de incubar las placas a TA durante 48 horas. Se realizaron triplicados de cada condición y el ensayo se repitió en dos días diferentes; para todas las condiciones se contaron al menos 100 ooquistes, diferenciando entre esporulados y no esporulados.

#### **Ensayo de viabilidad de esporozoítos**

Este ensayo permite determinar si un extracto vegetal es capaz de producir daños irreversibles que conduz-

can a la muerte de los esporozoítos. Para realizar este ensayo se dispensaron 5.000 esporozoítos diluidos en medio RPMI (Sigma) en placas de 96 pocillos con diferentes concentraciones de extracto metanólico de *Ruta pinnata* y las correspondientes diluciones del control negativo (DMSO). Como control positivo se usaron esporozoítos inactivados por calor a 60° C durante 30 minutos. Tras 3 horas de incubación se retiraron cuidadosamente 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante y los esporozoítos se tiñeron añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de Sytox Orange (Invitrogen) diluido en medio RPMI a concentración 5  $\mu\text{M}$ , resultando una concentración final de Sytox Orange de 2,5  $\mu\text{M}$ . Tras 15 mi de incubación adicional, se procedió a la lectura de los resultados utilizando un microscopio de fluorescencia (Olympus, Eclipse 80i) usando una longitud de onda de excitación de 510-560 nm y 575-590 nm de emisión. Se realizaron triplicados de cada condición y el ensayo se repitió en dos días diferentes; para todas las condiciones se contaron al menos 100 esporozoítos, diferenciando entre viables (no teñidos) y no viables (teñidos).

#### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos se agruparon todas las repeticiones para cada uno de los correspondientes ensayos y se estimaron las diferencias mediante el test no paramétrico Chi-cuadrado. El efecto de las diferentes concentraciones de extracto se comparó con los correspondientes controles DMSO y se consideraron significativas las diferencias para  $P < 0,05$ . En todos los análisis se utilizó el programa estadístico Sigmatat 3.1 bajo entorno Windows.

#### **Resultados y discusión**

En el presente trabajo se ha evaluado la actividad anticoccidiósica *in vitro* de extractos metanólicos de la planta endémica canaria *Ruta pinnata* y, en su conjunto, los resultados obtenidos demuestran que los extractos vegetales

poseen una importante actividad frente al coccidio de caprino *Eimeria ninakohlyakimovae*, inhibiendo la esporulación de los ooquistes y disminuyendo la viabilidad de los esporozoítos.

El grado de inhibición de la esporulación varió en función del tiempo de exposición de los ooquistes no esporulados con los extractos de *Ruta pinnata*. Tal y como puede observarse en la Fig. 1A, a los 30 minutos de incubación la mayoría de los ooquistes habían esporulado (80-90%) en los controles negativos y en la mayoría de las concentraciones del extracto de *Ruta pinnata* ensayadas, con excepción de la concentración de 3 mg/ml, en la que sí se apreció una reducción significativa ( $P < 0,01$ ) del porcentaje de esporulación. Tras 4 horas de incubación, el porcentaje de ooquistes esporulados disminuyó de forma significativa ( $P < 0,001$ ) a concentraciones de extracto de 1,5 y 3 mg/ml y ligeramente, pero sin significación estadística, para las concentraciones C3 y C4 (Fig. 1B). Por último, después de 24 horas de exposición de los ooquistes no esporulados a los extractos de la planta el efecto inhibitorio se observó a concentraciones finales de extracto por encima de 0,75 mg/ml ( $P < 0,001$ ), presentando la concentración de 3 mg/ml del extracto una actividad similar a la del control positivo (formaldehído 2% en este caso) (Fig. 1C).

La importancia de este hallazgo radica en la capacidad del extracto metanólico de *Ruta pinnata* para detener la evolución de los ooquistes, y por tanto, abortar el ciclo exógeno del parásito. Los ooquistes de *E. ninakohlyakimovae*, como ocurre con el resto de especies del género *Eimeria*, son eliminados al medio por las heces de los animales infectados en forma no esporulada y al cabo de 48 horas sufren un proceso de reproducción asexual (esporogonia) que los convierten en elementos infectantes (19). Los extractos de *Ruta pinnata* reducirían de esta forma las posibilidades de contagio de nuevos hospedadores, con un efecto similar al

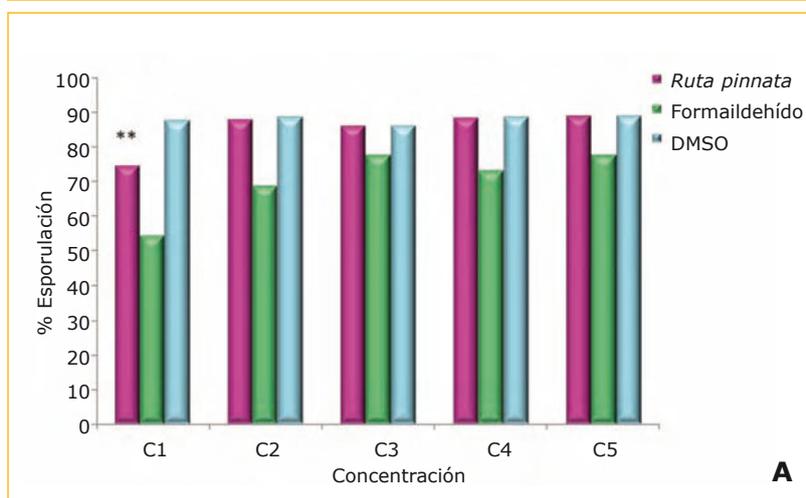
**Tabla 1.** Concentraciones finales de un extracto metanólico de *Ruta pinnata*, control positivo (formaldehído) y control negativo (DMSO) utilizadas en los ensayos de inhibición de la esporulación de ooquistes.

Concentraciones	<i>Ruta pinnata</i> (mg/ml)	Control negativo DMSO (%)	Control positivo Formaldehído (%)
<b>C1</b>	3	3	2
<b>C2</b>	1,5	1,5	1
<b>C3</b>	0,75	0,75	0,5
<b>C4</b>	0,18	0,18	0,1
<b>C5</b>	0,02	0,02	0,01

**Tabla 2.** Concentraciones finales de extracto metanólico de *Ruta pinnata* y control negativo (DMSO) utilizadas en los ensayos de viabilidad de esporozoítos.

Concentraciones	<i>Ruta pinnata</i> (mg/ml)	Control negativo DMSO (%)
<b>C1</b>	10	0,6
<b>C2</b>	5	0,3
<b>C3</b>	2,5	0,15
<b>C4</b>	1,25	0,03
<b>C5</b>	0,625	0,006
<b>C6</b>	0,5	0,0075
<b>C7</b>	0,025	0,0015

**Figura 1A.** Ensayo de inhibición de la esporulación de ooquistes de *Eimeria ninakohlyakimovae*. Se evaluó el efecto anticoccidiósico del extracto metanólico de *Ruta pinnata* a diferentes concentraciones tras 30 mi (Fig. 1A), 4 h (Fig. 1B) y 24 h (Fig. 1C) de incubación. Como control negativo se empleó DMSO y como control positivo formaldehído (formol). El porcentaje de esporulación se determinó tras lavar y posteriormente incubar los ooquistes a TA durante 48 h. Nivel de significación estadística al comparar los extractos con el control negativo:  $P < 0,01$  (\*\*) y  $P < 0,001$  (\*\*).



que presentan ciertos antisépticos que se usan para la desinfección de los corrales, algunos de los cuales han sido evaluados *in vitro* frente a ooquistes de *E. tenella* (14). Recientemente se ha estudiado también el efecto antiséptico *in vitro* de determinados aceites esen-

ciales de origen vegetal en base a su capacidad de destrucción de ooquistes de *Eimeria spp.* aviáres, siendo los aceites de artemisa, té, tomillo y clavo los más efectivos (24). También del Cacho et al. (9), al evaluar extractos procedentes de *Artemisia annua*,

encontraron una gran inhibición en el desarrollo y esporulación de los ooquistes de *E. tenella* debido a una alteración de la pared de los mismos. En cambio, Saratsi et al. (29) no lograron inhibir la esporulación de ooquistes *in vitro* de especies de *Eimeria* ovinas más allá de un 10,7% empleando diferentes extractos de la planta forrajera conocida como esparceta o pipirigallo (*Onobrychis viciifolia*).

El efecto de los extractos de *Ruta pinnata* sobre la viabilidad de los esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae* fue dosis dependiente tal y como puede apreciarse en la Fig. 2. A concentraciones de 5 y 10 mg/ml los extractos produjeron la muerte del 100% de los esporozoítos, con efecto similar a la inactivación por calor ( $P < 0,001$ ). A diluciones más altas del extracto siguió observándose el mismo efecto, siendo significativas las diferencias en todos los casos ( $P < 0,001$ ); la menor concentración que produjo una inhibición significativa de la viabilidad de los esporozoítos (30%) fue de 0,1 mg/ml (Fig. 2). El interés científico de la actividad de los extractos de *Ruta pinnata* frente a los esporozoítos radica en el potencial de la planta como anticoccidiósico o anticoccidiostático, ya que los esporozoítos constituyen el estado evolutivo del parásito que en primera instancia infecta las células del hospedador, las células endoteliales de los vasos linfáticos del ileon distal en el caso de *E. ninakohlyakimovae* (34). Hasta el momento no se han publicado estudios donde se evalúe la actividad anticoccidiósica *in vitro* de material de origen vegetal frente a esporozoítos de *Eimeria spp.* de rumiantes, aunque sí se han realizado algunos ensayos *in vitro* en aves. Así, se ha demostrado que la curcumina presenta un marcado efecto inhibitorio *in vitro* frente a esporozoítos de *E. tenella* induciendo cambios morfológicos y reduciendo su viabilidad e infectividad (17). Del mismo modo, Burst et al. (6) han observado que la viabilidad de los esporozoítos de *E. tenella* es inhibida por el efecto del carvacrol, la curcumi-

Figura 1B

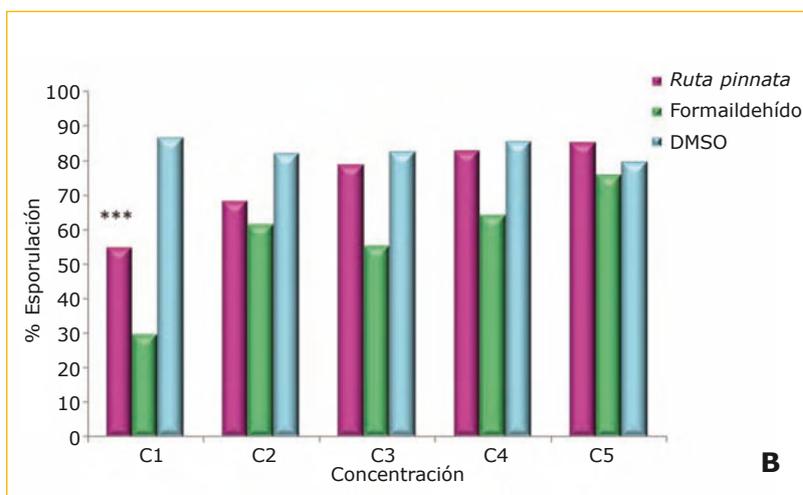
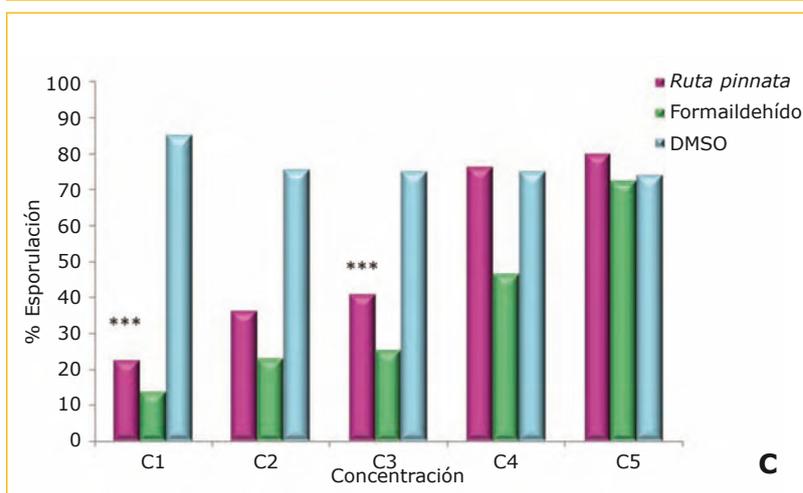


Figura 1C

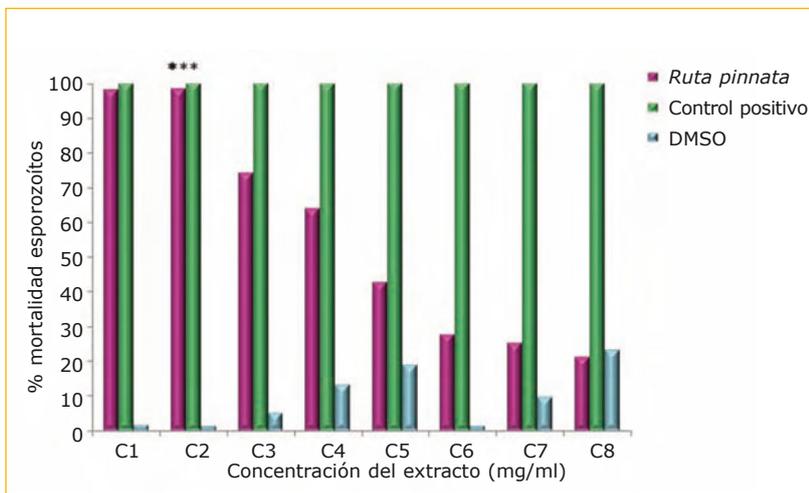


na y extractos de *Echinacea purpurea*, por lo que podrían ser utilizados como aditivos anticoccidiósicos en el pienso o en el agua de bebida en el control de la coccidiosis aviar.

El mecanismo de acción de los extractos de *Ruta pinnata* frente a los esporozoítos de *E. ninakohlyakimovae* no es posible determinarlo en base a ensayos realizados en el presente estudio. Este mecanismo no necesariamente tendría que ser el mismo que el responsable de la inhibición de la esporulación de *E. ninakohlyakimovae*. En cualquier caso, resulta evidente que, a igual concentración, el esporozoíto es más susceptible que el ooquiste, al tratarse este último de un elemento de

resistencia. Este hecho podría justificar la ausencia de efecto inhibitorio de la esporulación de ooquistes de origen ovino descrito previamente por Saratsi et al. (29) al utilizar forraje de *Onobrychis viciifolia* a pesar de que estos mismos autores pudieron constatar un importante efecto anticoccidiósico *in vivo* utilizando extractos de esta misma planta. También en ganado caprino se han realizado algunos estudios *in vivo* para evaluar la actividad anticoccidiósica de extractos vegetales. Así, se ha demostrado que extractos de *Aloe ferox*, *Elephantorrhiza elephantina* y *Leonotis leonurus* presentan un efecto antiparasitario en infecciones mixtas por helmintos y coccidios

**Figura 2.** Ensayo de esporozoítos de *Eimeria ninakohlyakimovae*. Se evaluó el efecto anticoccidiósico del extracto metanólico de *Ruta pinnata* a diferentes concentraciones tras 30 mi (de incubación). Como control negativo se empleó DMSO y como control positivo esporozoítos inactivados por calor. La viabilidad de los esporozoítos se determinó mediante tinción vital con Sytox Orange y observación en microscopio de fluorescencia. Nivel de significación estadística al comparar los extractos con el control negativo: P < 0,01 (\*\*) y P < 0,001 (\*\*\*).



caprinos en Sudáfrica (20). Del mismo modo, Markovics et al. (21) han publicado que el consumo de plantas ricas en taninos como *Pistacia lentiscus* mejoran la respuesta frente a la coccidiosis en cabritos en torno al destete.

En este tipo de estudios, no sólo es importante conocer la actividad antiparasitaria del extracto utilizado, sino también evaluar su citotoxicidad. Aunque no se ha evaluado en profundidad a nivel de laboratorio la citotoxicidad de *Ruta pinnata*, éste no sería en principio un factor limitante de su uso como antiparasitario. Así, en un estudio coprológico realizado en lagartos endémicos de Canarias se encontró que las semillas de las rutáceas se hallaban entre las más frecuentemente encontradas en las heces, concluyendo así que éstas formaban parte de la alimentación de los lagartos (25).

Los hallazgos obtenidos en el presente estudio suponen una contribución al descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antiparasitaria como alternativa al uso de anticoccidiósicos y anticoccidiostáticos convencionales. El efecto frente a la inhibición de la esporulación de ooquistes y de la viabilidad de los

esporozoítos podría implementarse valorando diferentes métodos de extracción, diferentes partes de la planta e incluso distintos momentos de maduración del fruto, además de realizar una comparación de la actividad anticoccidiósica entre diferentes rutáceas, como *R. graveolens* y *R. pinnata*. En este sentido, existen estudios que demuestran la actividad antihelmíntica del extracto crudo metanólico de *Calatropis procera* es menor que el efecto obtenido por el extracto acuoso de la misma planta en los mismos días de tratamiento (15). También existen ejemplos de plantas que muestran diferentes niveles de actividad antihelmíntica según los extractos procedan de una parte de la planta u otra, como ocurre con *Maesa lanceolata* (32). Finalmente, con el fin de validar el empleo de los extractos habría que realizar estudios *in vivo* utilizando la especie hospedadora de destino.

En resumen, los resultados del presente estudio demuestran que la planta endémica canaria *Ruta pinnata* presenta una importante actividad anticoccidiósica *in vitro* frente a *Eimeria ninakohlyakimovae*, lo cual abre la posibi-

lidad de diseñar nuevas alternativas de control frente a la coccidiosis caprina, no descartándose que la actividad de la planta pueda ser trasladable a otros parásitos animales o humanos.

## Agradecimientos

El presente trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (MEC, proyecto n° AGL2007-63415) y los Fondos FEDER, así como por la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACII-SI) (Ref. SolSubC200801000244).

## Bibliografía

- 1.- Abdel-Sattar E, Maes L, Salama MM (2010) In vitro of plants from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytother Res.* 24:1322-8.
- 2.- Astelbauer F, Gruber M, Brem B, Greger H, Obwallner A, Wernsdorfer G, Congpoung K, Wernsdorfer WH, Walochnik J (2012) Activity of selected phytochemicals against *Plasmodium falciparum*. *Acta Trop.* 123(2): 96-100.
- 3.- Bachaya HA, Iqbal Z, Khan MN, Sindhu ZU, Jabbar A (2009) Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against *Trichostrongylid* nematode of sheep. *J. Entopharmacol.* 123 (2): 325-329.
- 4.- Bramwell D (1998) *Flora of the Canary Islands English version pocket guide*. Rueda 1st edition.
- 5.- Bramwell D, Bramwell Z (2002) *Flores silvestres de las Islas Canarias*. Rueda 2, 4ª
- 6.- Cordero del Campillo M, Rojo FA, Martínez AR, Sánchez MC, Hernández S, Navarret I, Díez P, Quiroz H y Carvalho M (2000) Parasitosis del aparato digestivo. *Trichostrongiloidosis* y otras nematodosis. *Parasitología Parasitaria*. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. España.

7. Burt SA, Tersteeg-Zijderveld MH, Jongerius-Gortemaker BG, Vervelde L, Vernooij JC (2012) In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. *Vet. Parasitol.* (in press).
- 8.- Dai YB, Liu XY, Lium M, Tao JP (2006) Pathogenic effects of the coccidium *Eimeria ninakohlyakimovae* in goats. *Vet Res Commun.* 30 (2): 149-60.
- 9.- Dwinght D. Bowman (2004) *Parasitología para veterinarios.* Elsevier. España.
- 10.- Del Cacho E, Gallego M, Francesch M, Quilez J, Sánchez-Acedo C (2010) Effect of artemisinin on oocyst wall formation and sporulation during *Eimeria tenella* infection. *Parasitol Int.* 59(4): 506-11.
- 11.- De la Fuente C, Alunda JM (1992) A quantitative study of *Eimeria* infections of goats from central Spain. *Vet. Parasitol.* 41(1-2):7-15.
- 12.- Guarrera PM (1999) Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol.* 68:183-292.
- 13.- Guimarães JS Jr, Bogado AL, da Cunha TC, Garcia JL (2007) In vitro evaluation of the disinfection efficacy on *Eimeria tenella* unsporulated oocysts isolated from broilers. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 16:67-71.
- 14.- Jalila A, Dorny P, Sani R, Salim NB, Vercruysse J (1998) Coccidial infections of goats in Selangor, peninsular Malaysia. *Vet Parasitol.* 74(2-4):165-72.
- 15.- Khalafalla RE, Müller U, Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Desouky AY, Alber G, Dausgchies A. (2011) Effects of curcumin (diferuloylmethane) on *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. *Parasitol. Res.* 108:879-886.
- 16.- Levine ND, Ivens V (1970) The coccidian parasites (Protozoa, Spo-rozoa) of ruminants. *Biological Monographs* 3:1-278.
- 17.- Maphosa V, Masika PJ (2012) In vivo validation of *Aloe ferox* (Mill). *Elephantorrhiza elephantina* Bruch. Skeels. and *Leonotis leonurus* (L) R. BR as potential anthelmintics and antiprotozoals against mixed infections of gastrointestinal nematodes in goats. *Parasitol. Res.* 110:103-108.
- 18.- Markovics A, Cohen I, Muklada H, Glasser TA, Dvash L, Ungar ED, Azaizeh H, Landau SY (2012) Consumption of *Pistacia lentiscus* foliage alleviates coccidiosis in young goats. *Vet. Parasitol.* 186: 165-169.
- 19.- Mundt HC, Dausgchies A, Uebe, Rinke M (2003) Efficacy of toltrazuril against artificial infections with *Eimeria bovis* in calves. *Parasitol. Res* 90: 166-167.
- 20.- Müller J, Hemphill A (2012) In vitro culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *Int. J. Parasitol.* (in press).
- 21.- Peek HW, Landman WJ (2005) Resistance of anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. Field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol.* 32: 391-401.
- 22.- Rodríguez A, Nogales M, Rumeu B, Rodríguez B (2008) Temporal and spatial variation in the diet of the endemic lizard *Gallotia galloti* in an Insular Mediterranean Scrubland. *J. Herpetol.* 42:213-222.
- 23.- Ruiz A, González JF, Rodríguez E, Martín S, Hernández YI, Almeida R, Molina JM (2006) Influence of climatic and management factor on *Eimeria* infections in goats from semi-arid zones. *J Vet Med B* 53: 399-402.
- 24.- Ruiz A, Guedes AC, Muñoz MC, Molina JM, Hermosilla C, Martín S, Hernández YI, Hernández A, Pérez D, Matos L, López AM, Taubert A (2012) Control strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids. *Parasitol Res* 110 (6): 2131-6.
- 25.- Ruiz A, Matos L, Muñoz MC, Hermosilla C, Molina JM, Andrada M, Rodríguez F, Pérez D, López A, Guedes A, Taubert A (2012) Isolation of an *Eimeria ninakohlyakimovae* field strain (Canary Islands) and analysis of its infection characteristics in goat kids. *Res Vet Sci* S0034-5288 (12): 00246-9.
- 26.- Saratsis A, Regos I, Tzanidakis N, Voutzourakis N, Stefanakis A, Treuter D, Joachim A, Sotiraki S (2012) In vivo and in vitro efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Eimeria* spp in lambs. *Vet. Parasitol.* 188:1-9.
- 27.- Souza MMC, Bevilacqua CML, Morais SM, Costa CTC, Silva ARA, Braz-Filho R (2008) Anthelmintic cetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 80: 271-277.
- 28.- Svensson C (1998) Prevention of *Eimeria alabamensis* coccidiosis by a long-acting baquiloprim/sulphadimidine bolus. *Vet Parasitol* 74 (2-4): 143-52.
- 29.- Taylor MA, Marshall RN, Marshall JA, Catchpole J, Bartram D (2011) Dose- response effects of diclazuril against pathogenic species of ovine coccidian and the development of protective immunity. *Vet Parasitol* 178 (1-2): 48-57.
- 30.- Vieira LS, Lima JD, Rosa JS (1997) Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* Yakimoff & Rastegaieff, 1930 emend. Levine 1961 in experimentally infected goats (*Capra hircus*). *J. Parasitol.*, 83:1015-1018.
- 31.- Watkins LE, Wray MI, Basson R.P, Feller DL, Olson RD, Fitzgerald PR, Stromberg BE, Davis GM (1986) The prophylactic effects of monensin fed to cattle inoculated with coccidian oocysts. *Agric. Pract* 7:18-20.