



REBIOL

<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol>



Inhibición de la embrionación *in vitro* de huevos de *Toxocara canis* expuestos al extracto hidroalcohólico del fruto de *Punica granatum* (Lythraceae)

In vitro inhibition of embryonation of *Toxocara canis* eggs exposed to hydroalcoholic extract of *Punica granatum* (Lythraceae) fruit

Deysi Elizabeth Gerónimo Escobal¹, Hernán Rodríguez Quezada¹, César Augusto Jara Campos^{1*}

¹Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n – Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú. * Autor de

Deysi Elizabeth Gerónimo Escobal

 <https://orcid.org/0009-0003-9853-1175>

Hernán Rodríguez Quezada

 <https://orcid.org/0009-0001-6808-0209>

César Augusto Jara Campos

 <https://orcid.org/0000-0002-8864-4876>

Artículo Original

Recibido: 28 de febrero de 2024
Aceptado: 30 de abril de 2024

Resumen

Toxocara canis es un nematodo responsable de la toxocariasis, una zoonosis frecuente en niños de países en desarrollo. El tratamiento convencional con antiparasitarios sintéticos, aunque eficaz, presenta toxicidad, efectos adversos y riesgo de resistencia, lo que impulsa la búsqueda de alternativas como la fitoterapia. La cáscara de *Punica granatum* L. posee compuestos bioactivos con propiedades antiparasitarias, pero los estudios con material botánico del norte del Perú son limitados. Este estudio evaluó *in vitro* el efecto del extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto maduro de *P. granatum* (EHP) de Poroto (La Libertad, Perú) sobre la embrionación de huevos de *T. canis*. Los huevos se incubaron con EHP (0.5 y 1.0 mg/mL) y en formol salino al 2% (control) durante 15 días a 18-25 °C. El EHP inhibió la embrionación en un 91.3% (1.0 mg/mL) y 43.3% (0.5 mg/mL) ($p < 0.05$). Se concluye que el EHP presenta actividad inhibitoria dosis dependiente, posiblemente asociada a flavonoides.

Palabras clave: Embrionación, extracto hidroalcohólico, *Punica granatum*, *Toxocara canis*.

Abstract

Toxocara canis is a nematode responsible for toxocariasis, a common zoonosis in children in developing countries. Conventional treatment with synthetic antiparasitic drugs, although effective, has toxicity, adverse effects, and risk of resistance, prompting the search for alternatives such as phytotherapy. The peel of *Punica granatum* L. contains bioactive compounds with antiparasitic properties, but studies with botanical material from northern Peru are limited. This study evaluated *in vitro* the effect of hydroalcoholic extract of the peel of ripe fruit of *P. granatum* (EHP) from Poroto (La Libertad, Peru) on the embryonation of *T. canis* eggs. The eggs were incubated with EHP (0.5 and 1.0 mg/mL) and 2% saline formalin (control) for 15 days at 18-25 °C. EHP inhibited embryogenesis by 91.3% (1.0 mg/mL) and 43.3% (0.5 mg/mL) ($p < 0.05$). It is concluded that EHP has dose-dependent inhibitory activity, possibly associated with flavonoids.

Keywords: Embryo development, hydroalcoholic extract, *Punica granatum*, *Toxocara canis*.

*Autor para correspondencia: Email: cjara@unitru.pe

DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/rebiol.2024.44.01.05>

Citar como:

Gerónimo-Escobal, D., Rodríguez-Quezada, H., & Jara-Campos, C. (2024). Inhibición de la embrionación *in vitro* de huevos de *Toxocara canis* expuestos al extracto hidroalcohólico del fruto de *Punica granatum* (Lythraceae). *REBIOL*, 44(1), 56–63.



1. Introducción

Toxocara canis Werner, 1782 (Nematoda, Ascaridida) es un parásito común de perros los cuales albergan a la forma adulta en su intestino en donde las hembras grávidas colocan miles de huevos diariamente que, aun no infectivos, son eliminados al medio externo con las heces; en el suelo, embrionan y adquieren la condición de infectantes (huevos conteniendo las larvas L3) en aproximarte tres semanas (García Moreira *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2018; Bowman, 2021). Los huevos pueden sobrevivir largos periodos de tiempo en el medio externo gracias a que tienen una capa protectora que les permite resistir las condiciones ambientales no propicias para su evolución y el efecto de varias soluciones utilizadas como desinfectantes, entre ellas, el hipoclorito de sodio al 7%, permanganato de sodio al 1% o alcohol etílico al 70% (Wu & Bowman, 2022; Mkandawire *et al.*, 2022).

La infección humana por *T. canis* ocurre por la ingestión de alimentos contaminados, principalmente verduras y frutas, con huevos infectantes o por ingestión de carne con cocción deficiente contaminada con las L3 encapsuladas (Bowman, 2021; Healy *et al.*, 2022). Estas L3 son liberadas en el intestino delgado y, debido a que no pueden aun vivir en el ambiente intestinal, penetran la pared y acceden al torrente sanguíneo que las conduce a diversos órganos tales como hígado, músculos, ojo y cerebro; durante la migración causan una intensa respuesta inflamatoria con marcada eosinofilia y diversas manifestaciones tales como, mialgia, ceguera, asma, alergias cutáneas, meningitis y vasculitis cerebral con déficit cognoscitivos (Ma *et al.*, 2018; Fakhri *et al.*, 2019).

La infección humana por *T. canis* es un fenómeno frecuente que se relaciona con la edad, aspectos demográficos de la población y ubicación geográfica; estudios recientes han estimado que la seroprevalencia global es de 19% (Rostami *et al.* 2019; Wu & Bowman, 2022), que en niños varia de 3 a 79% (Abedi *et al.*, 2021), que en países desarrollados son bajas (0.0 a 2.4%) y que en países en vías de desarrollo y tropicales son, por el

contrario, marcadamente elevadas: entre 81.0 y 92.0% (Bolívar-Mejía *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2018; Abhedí *et al.*, 2021). En el Perú la seroprevalencia estimada varía de 20.0 a 40.0% (Bolívar-Mejía *et al.*, 2014, Ramírez, 2019). La contaminación de parques públicos, principales fuentes de contaminación, es también de alta frecuencia; la revisión sistemática hecha por Fhakri *et al.* (2018) dio a conocer que la prevalencia mundial y en Sudamérica es del 21.0% (16-27%) y del 25% (18-33%), respectivamente; en el Perú, según Malca *et al.* (2019) varía de 0.7 a 100%. Los benzimidazoles, lactonas macrolíticas, levimasoles y piperazina, o sus derivados, son drogas sintéticas utilizadas como la más importante estrategia de control de la toxocariasis en todo el mundo debido a su reconocida efectividad; sin embargo, los inconvenientes relacionados con la presencia de efectos colaterales (la mayoría provocan diarreas, náuseas, vómitos, mareos y dolores estomacales), la generación de resistencia, el aumento del costo en el tratamiento y de la contaminación del ambiente (García Moreira *et al.*, 2014; Idris *et al.*, 2019; Magnaval *et al.*, 2022; Schwartz *et al.*, 2022) han conducido a buscar estrategias alternativas o complementarias para el tratamiento de esta zoonosis. Tales estrategias incluyen el uso de plantas ricas en metabolitos secundarios que representan una prometedora opción y que podrían ser utilizadas como un tratamiento natural en forma de extractos o aceites esenciales o de alimento suplementario (Magnaval *et al.*, 2022). Se ha informado que los extractos de *Chenopodium ambrosoides* (Reis *et al.*, 2010), *Nigella sativa* (Musa *et al.*, 2011) y *Zingiber officinale* (El-Sayed *et al.*, 2017) presentan flavonoides en suficiente cantidad como para tener efecto ovicida y larvicida contra *T. canis*. Sin embargo, hay otras especies de vegetales ricas en flavonoides, entre ellas *Punica granatum*, pendientes de ser probadas.

Nativa de Irán y perteneciente a la familia Punicaceae (Syn. Lythraceae), *P. granatum* L. (granada) es un arbusto que crece en áreas templadas y subtropicales y presenta frutos grandes, de cáscara gruesa y de color rojizo

cuando están maduros. Estos frutos contienen en un alto porcentaje de compuestos polifenólicos y taninos de tipo elagitaninos que tienen potente actividad antitumoral, antiinflamatoria y antioxidante (Eghbali *et al.*, 2021; Zhi Chao, 2022); también son antibacterianos (Betanzos-Cabrera *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2017; Valdes *et al.*, 2020; Sosa *et al.*, 2022), anti-micóticos (Anibal *et al.*, 2013; Bousaine *et al.*, 2022), anti-protozoos (Amer *et al.*, 2015; Mubarak *et al.*, 2016; Alkathiri *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2022) y anti-helminthos (Yones *et al.*, 2016; Siles-Lucas *et al.*, 2018; El-Bahi *et al.*, 2019; Castagna *et al.*, 2022). Extractos de la cascara del fruto de *P. granatum* mostró tener actividad ovicida contra *Ascaris suum*, un nematodo zoonótico perteneciente a la misma Familia que *T. canis* (Williams *et al.*, 2016)

Debido a que la infección por *T. canis* es frecuente en niños de países en vías de desarrollo como el Perú, resulta conveniente buscar alternativas al tratamiento que clásicamente se hace con medicamentos sintéticos cuyo uso tiene consecuencias negativas tales como la contaminación ambiental, la generación de resistencia y los efectos secundarios. Se ha documentado que *P. granatum* presenta una serie de sustancias bioactivas tales como, ellagitaninos, gallitaninos, antocianinas y flavonoides, las últimas de las cuales tienen actividad ovicida contra *A. suum*, por lo que se asume que también tiene el mismo efecto contra los huevos de la última especie.

La presente investigación tuvo el objetivo de evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de las cáscaras del fruto maduro de *Punica granatum* de Poroto (La Libertad, Perú), a las concentraciones de 05 y 1.0 mg/mL, sobre la embrionación (formación de la larva dentro del huevo) de los huevos de *Toxocara canis* in vitro

2. Materiales y Métodos

Diseño de la investigación

Se llevó a cabo una investigación experimental con el propósito de evaluar la actividad del extracto

hidroalcohólico de las cáscaras de *P. granatum* sobre la formación de la larva dentro del huevo (embrionación) de *T. canis* in vitro. Se utilizaron huevos viables del parásito los cuales fueron incubados en 12 pocillos de una placa de cultivo celular: tres con el extracto a la concentración A, tres a la concentración B y tres para el control (solución sin extracto) de cada concentración probada. La evaluación de la actividad contra los huevos se hizo en el día 15 de incubación en todos los casos; para ello, se determinó el porcentaje de huevos con larva (embrionados) y el promedio de las tres repeticiones se comparó estadísticamente para determinar si había diferencia

Obtención e identificación del material vegetal

Frutos maduros de *P. granatum* fueron cosechados de plantaciones de cultivo de la localidad de Poroto (8°00'41" S, 78°46'05" O) ubicado en el distrito de Poroto, provincia de Trujillo (Perú). Esta localidad agrícola forma parte del Valle costero de Moche y se ubica a 40 km de la ciudad de Trujillo, capital de La Región La Libertad. El material botánico fue identificado como *P. granatum* en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo-Perú y las estructuras de la planta requeridas para tal propósito fueron depositadas en dicha Institución con el código 60558. Los frutos maduros fueron recolectados manualmente de siete plantas de la plantación y depositados en bolsas de plástico nuevas con cierre hermético. En el Laboratorio, los frutos fueron lavados con agua destilada para retirar materiales extraños como tierra, grava y restos vegetales y luego descascarados; las cáscaras fueron finamente rebanadas hasta alcanzar partículas de aproximadamente 3 mm, colocadas en papel de filtro Whatman N° 1 y secadas en estufa a 40°C. Las partículas secas fueron pulverizadas utilizando un molino de mano comercial y el producto fue tamizado a través de un colador de metal con aberturas de 414 μ hasta obtener un pulverizado.

Preparación del extracto hidroalcohólico

El extracto hidroalcohólico se obtuvo del polvo tamizado de la cascara del fruto maduro de *P. granatum* mediante el método de maceración, según la metodología señalada por Pulido Suarez *et al.* (2013) y por Sosa *et al.* (2021): el polvo tamizado (180 g) se mezcló con alcohol

etílico al 70% y se dejó macerar durante 10 días a temperatura ambiente (18-22°C); la mezcla se agitó manualmente cada día. El extracto hidroalcohólico se obtuvo por evaporación del solvente utilizando un Rotavapor; finalmente, el material fue filtrado a través de papel whatman N° 1 a frascos de color ámbar y conservado a -4°C hasta su utilización.

Obtención de Huevos de *T. canis*

Se obtuvieron huevos no embrionados de *T. canis* del tercio superior de úteros de hembras obtenidas del intestino de cachorros de perro, *Canis lupus familiaris*, infectados naturalmente. Los úteros seleccionados luego de la disección de las hembras del parásito fueron colocados en placas de Petri con solución salina al 0.85% y cortados transversalmente con finos estiletes para liberar los huevos. La purificación de éstos se hizo por filtrado a través de gasa doblada en cuatro a tubos de centrifuga y el lavado, para separar los detritos, se hizo y por centrifugación a 1000 rpm, por tres min, tres veces, utilizando la misma solución. Finalmente, se agregó al sedimento agua destilada estéril y se determinó la concentración de huevos por mL (aproximadamente 1000 huevos/mL) utilizando la Cámara de MacMaster (El-Sayed, 2017). La determinación de la viabilidad de los huevos se hizo por observación microscópica de la presencia de dos o más células en el interior a los dos días de incubación en una solución de formol-salino (Fig. 1).

Evaluación de la inhibición de la embrionación

La evaluación de la inhibición de la embrionación in vitro se hizo en una placa de cultivo celular (Eulabor S.L.) de 24 pocillos (6 filas x 4 columnas), según el siguiente diseño: **Fila 1:** tres pocillos con 200 uL de la suspensión de huevos en FS (formol-salino: solución salina al 0.85% y formol al 2%); **Fila 2:** tres pocillos con 100 uL de la suspensión de huevos y 100 uL del extracto a 0.5 mg/mL; **Fila 3:** tres pocillos con 200 uL de la suspensión de huevos en FS; **Fila 4:** tres pocillos con 100 uL de la suspensión de huevos y 100 uL del extracto a 1.0 mg/mL. La placa fue tapada y dejada a temperatura ambiente (18 ± 25°C) y agitada manualmente cada día mientras duró el experimento a fin de evitar que los huevos se peguen unos con otros. A los 15 días se hizo la evaluación que consistió en hacer un recuento, utilizando un microscopio invertido, del

número de huevos con larva en cada uno de los pocillos de la placa y luego se calculó el promedio aritmético en cada **Fila** para calcular el porcentaje de eficacia (% de inhibición de la formación de la larva): % de inhibición = número de huevos embrionados en el control – número de huevos embrionados expuestos a *P. granatum* / número de huevos embrionados en los controles x 100.

Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos se presentan como porcentajes de inhibición, promedio (M) ± la Desviación Standard (DE). Los porcentajes promedio fueron analizados utilizando el ANOVA unidireccional seguido del Test *t* de Student, con un nivel de confianza del 95%, para hacer las comparaciones estadísticas entre ambos grupos, utilizando el Programa SPSS v. 22 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) para Windows. Todos los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos para todos los análisis.

Aspectos éticos y regulatorios

El tratamiento de animales, plantas y de desechos se hizo de acuerdo a lo establecido por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, que aprobó el protocolo de esta investigación.

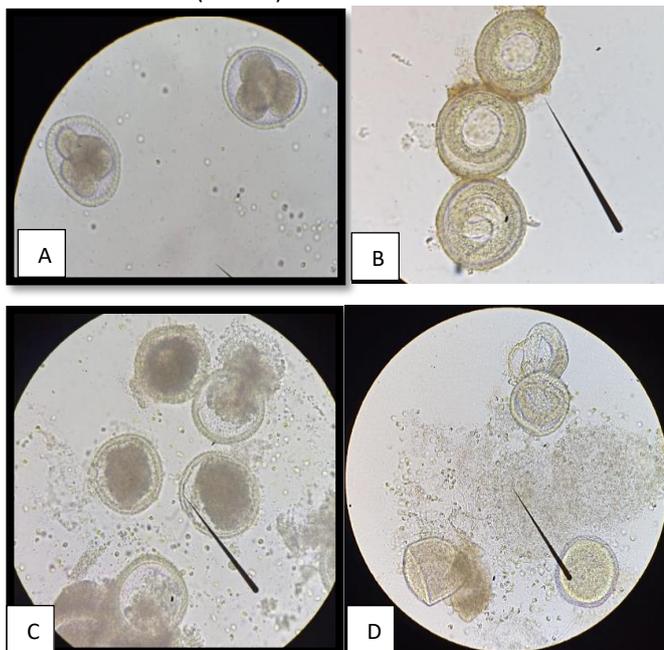
3. Resultados

Los resultados mostraron que el extracto hidroalcohólico de los frutos maduros de *P. granatum* procedentes de Poroto (Trujillo, Perú) a las concentraciones probadas (1.0 mg/mL y 0.5 mg/mL) presentan actividad contra los huevos de *T. canis* recientemente extraídos de los úteros. Los huevos incubados en formol-salino (testigo) embrionaron normalmente (Fig. 1).

La inhibición de la embrionación fue mayor (91.3%) cuando la incubación se hizo en el extracto a la concentración del 1.0 mg/mL que resultó ser significativamente mayor ($p < 0.05$) al 53.3% de inhibición observada cuando se incubó en el extracto al 0.5% (Tabla 1).

Figura 1

Observación microscópica (400A) de huevos de *Toxocara canis* en diversas condiciones



Nota: (A). huevos con embrionación inicial incubado en solución de formol-salino (3%) durante 72. (B) huevo completamente embrionado (con larva) incubados en solución de formol-salino (3%) durante 15 días. (C) huevos no embrionados incubados durante 15 días en el extracto hidroalcohólico de frutos maduros de *Punica granatum* de Poroto (Perú) al 0.5 mg/mL. (D) huevos no embrionados incubados durante 15 días en el extracto hidroalcohólico de frutos maduros de *Punica granatum* de Poroto (Perú) al 1.0 mg/mL.

Tabla 1

Porcentaje de inhibición de la embrionación de los huevos de *Toxocara canis* incubados en el extracto hidroalcohólico de la cascara del fruto maduro de *Punica granatum* cultivada en Poroto (Trujillo-Perú), a dos concentraciones durante 15 días a temperatura ambiente (18-22°C)

Concentraciones del extracto	M ± DE	% de inhibición	Valor de p*
Huevos de <i>Toxocara canis</i> + FS (Control)	1,88±1.299	02.3	<0,05
Huevos de <i>Toxocara canis</i> + <i>Punica granatum</i> 0.5mg/mL	0,88±0.703	53.3	<0.05
Huevos de <i>Toxocara canis</i> + FS (Control)	1,92±1.334	03.6	<0,05
Huevos de <i>Toxocara canis</i> + <i>Punica granatum</i> 1.0 mg/mL	0,17±0.377	91.3	<0,05

Nota: FS= formol-salino al 2%, *t de Student

4. Discusión

Existe un creciente interés en el uso de hierbas medicinales en el tratamiento de enfermedades zoonóticas causadas por helmintos, debido al problema de la resistencia a los antihelmínticos y la acumulación de las drogas en alimentos y medio ambiente (Williams *et al.*, 2016; Magnaval *et al.*, 2022). El uso de plantas con propiedades antihelmínticas es considerado un enfoque adecuado para el control de helmintos zoonóticos y endémicos, particularmente en lugares con escasos recursos económicos porque dicho enfoque tiene el potencial de ser sostenible (Zhi Chao, 2022).

La elección de los frutos de *P. granatum* se basó en las numerosas publicaciones de la actividad biológica de esta planta, la cual ha mostrado ser antitumoral, antiinflamatoria y antioxidante (Eghbali *et al.*, 2021; Zhi Chao, 2022), bactericida (Betanzos-Cabrera *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2017; Valdes *et al.*, 2020; Sosa *et al.*, 2022), fungicida (Anibal *et al.*, 2013; Bousaine *et al.*, 2022), protozoocida (Amer *et al.*, 2015; Mubarak *et al.*, 2016; Alkathiri *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2022) y helmíntica (Yones *et al.*, 2016; Siles-Lucas *et al.*, 2018; El-Bahi *et al.*, 2019; Castagna *et al.*, 2022). Estos antecedentes lo convierten en una planta antihelmíntica prometedora.

Teniendo en cuenta el rol significativo que presenta *T. canis* en salud pública, en particular los huevos que son las formas infectantes, en la presente investigación se evaluó la actividad del extracto de la cascara del fruto de una especie vegetal reconocida por sus efectos y utilizada en muchas partes, como parte de la medicina tradicional, para el tratamiento de diversas dolencias digestivas (Eghbali *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos evidencian que la concentración del extracto hidroalcohólico *P. granatum* a las dos concentraciones probadas evidencian actividad ovicida (inhibe la embrionación) estadísticamente significativa mayor comparada con el control; sin embargo, el mejor efecto se observó a la concentración mayor (1.0 mg/mL) a los 15 días de incubación con una actividad inhibitoria del 91.3%.

Se ha documentado que *P. granatum* presenta componentes bioactivos que corresponden al grupo de polifenoles y taninos y que muchos de ellos son hidrolizables; los taninos corresponden a gallotaninos,

ellagitaninos, ácido elágico y antocianinas y las sustancias bioactivas presentes en los frutos son de modo particular, ácido elágico, ácido gálgico punicalinas y punicalinas (Lim, 2013; Siles-Lucas *et al.*, 2018; El-Bahi, 2019). La actividad inhibitoria del extracto de los frutos maduros podría deberse a la difusión del extracto a través del cascarón de los huevos y la destrucción del parásito por los ácidos y otros componentes bioactivos.

A pesar de las bondades terapéuticas que presenta *P. granatum*, no se ha evaluado su actividad in vitro contra los huevos de parásitos que ocasionan enfermedades zoonóticas en poblaciones infantiles de países en vías de desarrollo y tropicales, tales como la ascariasis y toxocariasis. Williams *et al.* (2016) sostienen que la granada tiene una potente actividad contra las larvas L3 de *Ascaris suum*, una especie de nematodo de la misma familia que *T. canis*, luego de investigar el efecto de 31 especies vegetales de África y El Caribe. Estas especies de nematodos corresponde a la misma familia Ascarididae y presentan una biología similar, en particular la relacionada con la embrionación y eclosión de los huevos (Mkandawire *et al.*, 2022). En este contexto, este el primer registro de la actividad in vitro del fruto maduro de la granada contra los huevos de *T. canis*.

De alguna manera los resultados de la presente investigación pueden ser armonizados con estudios previos en los que se utilizó a los huevos de *T. canis* como blanco de extractos de especies vegetales. El-Sayed (2017) investigó la eficacia del extracto alcohólico de *Zingiber officinale* sobre la embrionación de los huevos de esta especie de nematodo y atribuyó el efecto a los componentes fitoquímicos flavonoides y taninos. Estas sustancias, como se sabe, no son exclusivas de un especie en particular, sino de grupos de plantas y, como se ha mencionado, los frutos de la granada son ricas en este tipo de sustancias (Lim, 2013; Eghbali *et al.*, 2021).

La mayoría de antecedentes relacionados con el efecto de extractos de vegetales sobre estos ascaridos se refieren a su actividad contra las larvas L3, entendiéndose que es la forma que parasita distintos órganos y que ocasionan la patogenia en el hospedero, incluyendo al humano (Reis *et al.*, 2010; Musa *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2016); sin embargo, los huevos tienen una importante implicancia epidemiológica dentro de la toxocariasis,

porque son las formas infectantes que alcanzan este estado en el suelo, aspecto que permite orientar investigaciones que permitan hacer el control en este ambiente, en donde encajan los extractos de vegetales o en el interior del hospedero definitivo, debido a que los huevos son colocados en el intestino y permanecen algunas horas ahí (Yones *et al.* 2016; Ma *et al.*, 2018). En este contexto, este es el primer registro de la actividad del extracto hidroalcohólico de los frutos maduros de *P. granatum*, es la parte más utilizada de este vegetal en la medicina tradicional, (Zhi Chao, 2022) contra huevos de *T. canis*.

Los resultados también indican que el extracto hidroalcohólico de los frutos maduros de *P. granatum* efectivamente inhiben la embriogénesis de los huevos de *T. canis* a la concentración de 1.0 mg/mL, porque el porcentaje es elevado (91.3%) y que la actividad es dosis dependiente, porque al evaluar la sustancia a la mitad (0.5 mg/mL) la actividad inhibitoria disminuye a un porcentaje mucho menor, del 53.3% ($p < 0,05$). Williams *et al.* (2016) en investigación con *Z. officinale* contra huevos de *T. canis* encontró la misma tendencia de dependencia respecto a la dosis, aunque utilizó 100 mg/mL. Esta comparación enfatiza la elevada concentración de sustancias fitoquímicas activas contra los huevos, que están presentes en la cascara del fruto de la granada.

El efecto contra *T. canis* del extracto hidroalcohólico de los frutos maduros de *P. granatum* podría atribuirse a la actividad que presentan los flavonoides, taninos, alcaloides y saponinas presentes en el extracto. Según Williams *et al.* (2016), Alkathiri *et al.* (2017) y Valdes *et al.* (2020) estos componentes fitoquímicos han mostrado ser activos contra bacterias, hongos, protozoarios y helmintos. Sostienen, asimismo, que los componentes contenidos en el extracto de *P. granatum* ingresan al interior de los huevos e impiden que las enzimas relacionadas con el metabolismo de lípidos no cumplan su función, esto origina que las reacciones metabólicas necesarias para el desarrollo embrionario no se completen provocando que la división celular no se produzca: los taninos inhiben la formación de la cutícula, los flavonoides del DNA/RNA, las saponinas afectan la permeabilidad de la membrana y los alcaloides la actividad del DNA. Los efectos mencionados, en parte

todos ellos, podrían estar involucrados en la inhibición de la embrionación de los huevos de *T. canis* en presencia del extracto hidroalcohólico de la cáscara de frutos maduros de *T. canis*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la presente investigación, es evidente que el extracto evaluado tiene actividad dosis-dependiente sobre la embrionación de los huevos de *T. canis* in vitro, debido a que a la concentración más alta empleada (1.0 mg/mL) la inhibición alcanzó un porcentaje de 91.3%, por lo tanto se puede considerar potente ovicida. Sin embargo se requiere de nuevas investigaciones para establecer cuáles son las sustancias fitoquímicas activas y el mecanismo de acción específico.

5. Conclusiones

El extracto hidroalcohólico de la cáscara del fruto maduro de *P. granatum* de Poroto (Perú), a las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/mL, inhiben la embrionación del huevo a los 15 días de incubación a $18 \pm 25^\circ\text{C}$ en porcentajes de 53.3 y 91.3%, respectivamente. La actividad mostrada es dosis dependiente: a mayor concentración, mayor actividad antiparasitaria ($p < 0,05$).

6. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

7. Referencias Bibliográficas

- Abhedhi, B., Akbari, M., Shedas, S. K., Tabibzadeh, A., Abedi, A., Ghazamikhah, R., Shoeli, M., Bayasidi, S., & Moradi, Y. (2021). The global prevalence of *Toxocara* spp. in pediatrics: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Experimental Pediatrics*, *64*(11), 575–581.
- Alkathiri, B., El-Khadragy, M. F., Metwally, D. M., Al-Olayan, E. M., Bakhrebah, M. A., & Moneim, A. E. A. (2017). Pomegranate (*Punica granatum*) juice shows antioxidant activity against cutaneous leishmaniasis-induced oxidative stress in female BALB/c mice. *International Journal of Environmental Research in Public Health*, *14*, 1592.
- Amer, O. S. O., Dkhil, M. A., Hikal, W. M., & Al-Quraishy, S. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activities of pomegranate (*Punica granatum*) on *Eimeria papillata*-induced infection in mice. *BioMed Research International*, Article ID 219670.
- Anibal, P. C., Alves Peixoto, I. T., Foglio, M. A., & Hofling, J. F. (2013). Antifungal activity of ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(3), 839–848.
- Betanzos-Cabrera, G., Montes-Rubio, Y., Fabela-Illescas, H. E., Belefant-Miller, H., & Cancino-Díaz, J. C. (2015). Antibacterial of fresh pomegranate juice against clinical strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Food & Nutrition Research*, *59*, 27620.
- Bolivar-Mejia, A., Alarcon-Olave, C., Calvo-Betancourt, L. S., Paniz-Mondolfi, A., Delgado, O., & Rodriguez-Morales, A. J. (2014). Toxocariasis in the Americas: Burden and disease control. *Current Tropical Medicine Reports*, *1*, 62–68.
- Bousaine, T., Daouia, H., & Soumia, A. (2022). Antifungal activity of the extracts of *Punica granatum* L. obtained by reflux method against *Fusarium oxysporum* albedenis in South West of Algeria. *Advances in Biology & Health Sciences*, *7*(3), 178–191.
- Bowman, D. D. (2021). Ascaris and *Toxocara* as foodborne and waterborne pathogens. *Research in Veterinary Science*, *135*, 1–7.
- Castagna, F., Bava, R., Musolino, V., Piras, C., Cardamone, A., Carresi, C., Lupia, C., Bosco, A., Rinaldi, L., Cringoli, G., Palma, E., Muzella, V., & Britti, D. (2022). Potential new therapeutic approaches based on *Punica granatum* fruits compared to synthetic anthelmintics for the sustainable control of gastrointestinal nematodes in sheep. *Animals*, *12*, 2883.
- Eghbali, S., Askari, S. F., Avan, R., & Sahebkar, A. (2021). Therapeutic effects of *Punica granatum* (pomegranate): An updated review of clinical trials. *Journal of Nutrition and Metabolism*, Article ID 5297162.
- El-Bahi, N. M., Abdelaziz, A. R., & Khalafalla, R. E. (2019). In vitro evaluation of *Nigella sativa* and *Punica granatum* effect on proscolices of hydatid cysts. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, *28*(2), 210–214.
- El-Sayed, N. M. (2017). Efficacy of *Zingiber officinale* ethanol extract on the viability, embryogenesis and infectivity of *Toxocara canis* eggs. *Journal of Parasitology Disease*, *4*(4), 1020–1027.
- Fhakri, Y., Gasser, R. B., Rostami, A., Fan, C. K., Gasemi, S. M., & Jvanian, M. (2018). *Toxocara* eggs in public places worldwide – A systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*, *242*, 1467–1475.
- García Moreira, G. M. S., Telmo, P. L., Mendonca, M., Nunes Moreira, A., McBride, A. J. A., Scaini, J., & Conceicao, F. R. (2014). Human toxocariasis: Current advances in diagnosis, treatment and interventions. *Trends in Parasitology*, *30*(9), 456–464.
- Han, M., Hu, W., Chen, T., Guo, H., Zhu, J., & Chen, F. (2022). Anti-coccidial activity of natural plant extracts mixture against *Eimeria tenella*: An in vitro and in vivo study. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 1066543.
- Healy, S. R., Morgan, E. R., Prada, J. M., & Betson, M. (2022). Brain food: Rethinking food-borne toxocariasis. *Parasitology*, *149*, 1–9.
- Idris, O. A., Wintola, O. A., & Afolayan, A. J. (2019). Helminthiasis: Prevalence, transmission, host-parasite interactions, resistance to common synthetic drugs and treatment. *Heliyon*, *5*, e01161.
- Lim, T. K. (2013). *Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 5, fruits*. Springer Science, London, UK.
- Lu, C.-J., Chan, L.-C., Liang, W.-L., & Wang, C.-C. (2017). Multiple activities of *Punica granatum* Linne against *Acnes vulgaris*. *International Journal of Molecular Science*, *18*, 141.
- Ma, G., Holland, C. V., Wang, T., Hofmann, A., Fan, C.-K., Maizels, K. M., Hotez, P. J., & Gasser, R. B. (2018). Human toxocariasis. *Lancet Infectious Disease*, *18*, e14–e24.
- Magnaval, J. F., Boushira, E., & Fillaux, J. (2022). Therapy and prevention of human toxocariasis. *Microorganisms*, *10*, 241.
- Mkandawire, T. T., Grecis, R. K., Berriman, M., & Duque-Correa, M. A. (2022). Hatching of parasitic nematode eggs: A crucial determining infection. *Trends in Parasitology*, *38*(2), 174–187.
- Mubaraki, M. A., Hafiz, T. A., Dkhil, M. A., & Al-Quraishy, S. (2016). Beneficial effect of *Punica granatum* peel extract on murine malariae-induced spleen injury. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*, 221.
- Musa, D., Senocak, G., Borazan, G., Altas, M., Ozgonul, A., Sogut, O., & Guldur, M. E. (2011). Effects of *Nigella sativa* and albendazole alone and in combination in *Toxocara canis* infected mice. *Journal of Pakistan Medical Association*, *61*, 866–870.
- Pulido Suárez, N. J., & Cruz Carrillo, A. (2013). Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, *14*(1), 91–97.
- Ramírez Reyes, R. (2019). *Seroprevalencia de anticuerpos contra Toxocara*

- sp. en niños del "Sector Manuel Arévalo", La Esperanza (Trujillo-Perú).* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Trujillo].
- Reis, M., Trinca, A., Ferreira, M. J., Monsalve-Puello, A. R., & Gracio, M. A. (2010). *Toxocara canis*. Potential activity of natural products against second-stage larvae in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*, *126*, 191–197.
- Rostami, A., Riahi, S. M., Holland, C. V., Taghipour, A., Khalili-Fomeshi, M., Fakhri, Y., Omrani, V. F., Hotez, P. J., & Gasser, R. B. (2019). Seroprevalence estimates for toxocarasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(12), e0007809.
- Schwartz, R., Bidaise, S., Fields, P. J., Maxine, L., Macpherson, A., & Macpherson, C. N. L. (2022). The epidemiology and control of *Toxocara canis* in puppies. *Parasite Epidemiology and Control*, *16*, e00232.
- Siles-Lucas, M., Casulli, A., Cirilli, R., & Carmena, D. (2018). Progress in the pharmacological treatment of human cyst and alveolar echinococcosis: Compounds and therapeutic targets. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(4), e0006422.
- Sosa, M. N., Macedo, A. T., Ferreira, G. F., Furtado, H. L. A., Pinheiro, A. J. M., Lima-Neto, L. G., Fontes, V. C., Ferreira, R. L. P., Monteiro, C. A., Falcai, A., Gomes, L. N., Braganca, Q. R. S., Torres, D. S. B., Galvao, L. C. C., Holanda, R. S., & Santos, J. R. A. (2022). Hydroalcoholic leaf extract of *Punica granatum*, alone and in combination with calcium-hydroxide, is effective against mono- and polymicrobial biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Antibiotics*, *11*, 584.
- Valdés, A., García-Serna, E., Martínez-Abad, A., Vilaplana, F., Jimenez, A., & Carrigos, M. C. (2020). Gelatin-based antimicrobial films incorporating pomegranate (*Punica granatum* L.) seed juice-product. *Molecules*, *25*, 166.
- Williams, A. R., Soelberg, J., & Jager, A. K. (2016). Anthelmintic properties of African and Caribbean medicinal plants: Identification of extracts with potent activity against *Ascaris suum* in vitro. *Parasite*, *23*, 24.
- Wu, T. K., & Bowman, D. D. (2022). *Toxocara canis*. *Trends in Parasitology*, *38*, 8.
- Yones, D. A., Badary, D. A., Sayed, H. M. B., Bayoumi, S. A. H., Khalifa, A. A., & El-Moghazy, A. M. (2016). Comparative evaluation of anthelmintic activity of edible and ornamental pomegranate extracts against *Schistosoma mansoni*. *BioMedicine Research International*, Article ID 2872708.
- Zhi Chao, Z. Y. (2022). A review of phytochemical, metabolic profiles and pharmacokinetics studies of the different parts (juice, seeds, peel, flowers, leaves and bark) of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chemistry*, *395*, 1336900.