

EFICÁCIA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Eugenia uniflora* NA INIBIÇÃO DA ECLOSÃO DE OVOS DE *Haemonchus contortus*

LUCIANA LAITANO DIAS DE CASTRO¹; ISABEL MARTINS MADRID²; LUCIANA FARIAS DA COSTA DE AVILA³; ROGÉRIO ANTONIO FREITAG³; MARIA ELISABETH AIRES BERNE³; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹Universidade Federal de Pelotas – lu.lcastro@gmail.com

²Centro de Controle de Zoonoses de Pelotas

³Universidade Federal de Pelotas

1. INTRODUÇÃO

A nematodiose gastrointestinal constitui um dos principais problemas sanitários na criação de ovinos, principalmente as causadas por *Haemonchus contortus*. Esta parasitose prejudica a saúde dos animais por levar a perda de apetite, diarreia, anemia e, em casos graves, a morte (ATHANASIADOU E KYRIAZAKIS, 2004). Os métodos tradicionais para o controle dos nematódeos em ovinos esta baseado na utilização de antihelmínticos (MENDONZA DE GIVES et al., 1998), porém diversos estudos descrevem a resistência dos parasitas a estes fármacos (MELO et al., 2009). Muitas pesquisas buscam alternativas de controle como o desenvolvimento de vacinas (LEJAMBRE et al., 2008), a utilização de controle biológico através de fungos e bactérias (WALLER E FAEDA, 1996; SINOTT et al., 2012) e o uso de extratos vegetais com potencial antiparasitário (GITHIORI et al., 2004). Para a utilização de plantas medicinais é necessário que sua eficácia e segurança sejam avaliadas e confirmadas através de testes *in vitro* e *in vivo* (RATES, 2001). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação antihelmíntica *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* (pitangueira) em *Haemonchus contortus* e sua toxicidade em células eucariótica.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção da planta e do extrato hidroalcoólico

Folhas frescas da planta *Eugenia uniflora*, pertencentes à família Myrtaceae, foram coletadas no 3º distrito de Canguçu/RS, em dezembro de 2012. *Eugenia uniflora* foi identificada pela Prof.^a Raquel Lüdtkke e depositada no acervo do Herbário PEL, Departamento de Botânica/UFPEL, sob o número voucher 25.872. As folhas foram desidratadas em estufa com circulação de ar a 35°C por cerca de três dias.

O extrato foi obtido a partir da homogeneização de 20 g da planta com 200 mL de álcool de cereais 70° GL, sob agitação constante e em banho maria em óleo na temperatura de 65°C por uma hora. Após este período, o material foi filtrado e o procedimento repetido por duas vezes com a mesma planta. As três partidas foram homogeneizadas e congeladas a -75°C, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

2.2 Teste de Inibição da Eclodibilidade

Os ovos foram obtidos através da coleta de fezes diretamente da ampola retal de ovinos com a contagem de ovos por grama de fezes acima de 2000. Para a recuperação dos ovos foi utilizada a técnica de HUBERT & KERBOEUF (1992) adaptada, sendo as fezes maceradas, diluídas em água destilada e passadas através de quatro tamises, dispostas em ordem decrescente de abertura de malha (1 mm, 105 µm, 55 µm, 25 µm). Os ovos foram recuperados do tamis de 25 µm,

diluídos em água destilada e quantificados três vezes a partir de uma alíquota de 50 µL da suspensão. O gênero das larvas dos nematódeos presentes nas fezes foi determinado através da técnica de ROBERTS E O`SULLIVAN (1950).

O teste foi realizado em placa de microcultivo de 24 poços com quatro repetições, segundo a técnica de COLES et al. (1992). Em cada poço foi colocado aproximadamente 150 ovos e o produto a ser testado em seis concentrações sucessivas em log₂ de 40 a 1,25 mg/mL. Como controles foram utilizados tiabendazol (0,025 mg/mL) e água destilada estéril. As placas foram incubadas em estufa B.O.D a 28°C com umidade relativa de 80% por 24h para a posterior quantificação de ovos e larvas de primeiro estágio. Os resultados foram expressos pela média percentual da inibição da eclodibilidade da quadruplicata.

2.3 Teste de Citotoxicidade

O efeito citotóxico dos extratos foi avaliado através do ensaio de MTT (brometo tiazoli azul de tetrazólio), descrito por MOSMANN (1983) com modificações. Células VERO foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino 10%, em uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C. Uma suspensão de células contendo 2 x 10⁵ cel/mL foi semeada em microplacas de 96 poços, esta foi incubada por 24h nas mesmas condições citadas acima. Posteriormente, 100 µL de cada extrato em 12 concentrações sucessivas de 4 a 0,001 mg/mL foram adicionados à microplaca, a qual permaneceu por 48h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O teste foi acompanhado por controle utilizando RPMI 1640 e cada concentração foi testada em triplicata. Após este período, 50 µL de MTT (2,5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e incubado durante duas horas e trinta minutos, posteriormente foi removido e 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram acrescentados sob agitação durante cinco minutos para solubilizar os cristais de formazan formados pelas células viáveis que metabolizam o MTT. A absorbância das amostras foi mensurada através de espectrofotômetro de microplaca em comprimento de onda de 540nm. Os resultados foram expressos através da porcentagem de células viáveis relativa às células do controle (considerado como 100%).

2.4 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando ANOVA e as médias comparadas através do teste de Tukey (P≤0,05), usando o software Statistix 9.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste *in vitro* de inibição da eclodibilidade os controles com água destilada e antihelmíntico demonstraram percentual médio de inibição de 9,9% e 98,58%, respectivamente. O resultado da coprocultura revelou a presença dos gêneros *Haemonchus* (97%) e *Trichostrongylus* (3%).

Os valores de inibição da eclodibilidade do extrato variaram de 100 a 20,36%, sendo que o extrato não diferiu estatisticamente do controle com antihelmíntico nas concentrações de 40 e 20 mg/mL. Nas concentrações seguintes verificou-se diferença significativa nos percentuais de inibição entre as concentrações testadas, sendo este efeito diretamente proporcional à concentração (p<0,05), Figura 1.

No teste de citotoxicidade, a porcentagem de células viáveis variou de 55,63 a 100%, sendo que a partir da concentração de 0,015 até 0,001 mg/mL 100% das células estavam viáveis.

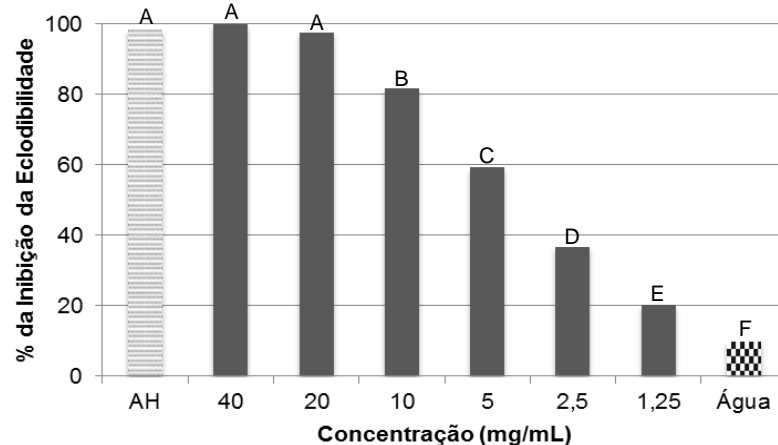


Figura 1 – Percentual médio de inibição da eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus* pelo extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* e controles com o antihelmíntico (AH) e água.

Embora a pitangueira seja recomendada pela medicina popular para o controle de verminoses, existem poucos estudos científicos avaliando o potencial antiparasitário desta planta. Estudo realizado por FURTADO (2006) demonstrou atividade do extrato hidroalcoólico de *E. uniflora* na concentração de 108,4 mg/mL sobre trichostrongilídeos com taxa de inibição da eclodibilidade dos ovos superior a 80%, resultado semelhante verificado no nosso estudo nas concentrações de 40, 20 e 10 mg/mL. HASSUM et al. (2013) avaliaram a ação do extrato hidroalcoólico de *E. uniflora* na inibição do desenvolvimento de larvas do primeiro ao terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais, especialmente *H. contortus* e *Trichostrongylus* spp., e obtiveram uma redução de 90,5% no número de larvas na concentração de 200 mg/mL. Os resultados destes dois estudos mostram que as concentrações para obter resultados semelhantes ao do presente trabalho, foram muito superiores, provavelmente isto ocorreu devido a diferenças na metodologia utilizada para a extração dos princípios ativos das plantas, visto que na concentração de 20 mg/mL o extrato hidroalcoólico de *E. uniflora* revela eficácia próximo a 100%.

4. CONCLUSÕES

Nas condições testadas o extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* apresentou efeito antiparasitário sobre os ovos de *Haemonchus contortus*. Quanto a sua toxicidade celular, os resultados sugerem que o extrato possui ação tóxica de moderada a nula.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, p.631–639, 2004.

COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS, S.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, n.1-2, p.35-44, 1992.

- FURTADO, K.S. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 2006. 147f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná.
- GITHIORI, J.B.; HOGLUND, J.; WALLER, P.J.; BAKER, R.L. Evaluation of anthelmintic properties of some plants used as livestock dewormers against *Haemonchus contortus* infections in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.129, p.245–253, 2004.
- HASSUM, I.C.; VENTURI, C.R.; GOSMANN, G.; DEIRO, A.M.G. Ação dos extratos de quatro plantas sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.18, n.2, p.278-287, 2013.
- HUBERT, J.; KERBOEUF, D.A. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Research**, v.130, n.20, p.442-446, 1992.
- LEJAMBRE, L.F.; WINDON, R.G.; SMITH, W.D. Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.302–312, 2008.
- MELO, A.C.F.L.; BEVILAQUA, C.M.L.; REIS, I.F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do Semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.294–300, 2009.
- MENDONZA DE GIVES, P.; CRESPO, J.F.; RODRIGUEZ, D.H.; PRATS, V.V.; HERNANDEZ, E.L.; FERNANDEZ, G.E.O. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. **Journal of Helminthology**, v.72, p.343–347, 1998.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55–63, 1983.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603–613, 2001.
- ROBERTS, F.H.S.; O’SULLIVAN, S.P. Methods for egg counts and larvae cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, p.99-102, 1950.
- SINOTT, M.C.; CUNHA FILHO, N.A.; CASTRO, L.L.D.; LORENZON, L.B.; PINTO, N.B.; CAPELLA, G.A.; LEITE, F.P.L. *Bacillus* spp. Toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures. **Experimental Parasitology**, v.132, p.103-108. 2012
- WALLER, P.J.; FAEDA, M. The prospects of biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v.26, p.915–925, 1996.