



EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO SEM TANINO DE *CARYOCAR BRASILIENSE* CAMBESS (CARIOCARACEAE) NO CONTROLE *IN VITRO* DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*

Franciellen Morais-Costa, Luís Henrique Assunção, Kaike Magno de Macêdo, Sergio Murilo Duarte

Introdução

A pecuária ovina enfrenta problemas que promovem queda na produção, deficiência mineral, manejo inadequado e elevada incidência das helmintoses gastrintestinais, o que ocasiona grandes perdas econômicas [1]. A alta prevalência e patogenicidade, principalmente, devido ao hematofagismo fazem de *Haemonchus contortus* uma das principais espécies de endoparasitas de ovinos na região do Norte de Minas Gerais. A administração constante e em doses inadequadas favorece a seleção de populações resistentes aos princípios ativos e contribui para a contaminação dos produtos de origem animal com resíduos das drogas utilizadas [2].

Diante disso, o bioma Cerrado apresenta-se com uma grandeza natural de espécies vegetais, o que demonstra a importância dos estudos para a conservação e manejo desse bioma. Em consequência disso, grande parte da vegetação nativa foi derrubada e muitas espécies estão ameaçadas de extinção, as quais podem apresentar ampla utilização e manutenção da população local por seu valor alimentício, medicinal, ornamental, oleaginoso e tanífero.

Entretanto, poucos estudos têm avaliado o efeito anti-helmíntico dos compostos químicos das espécies vegetais do cerrado para o controle das helmintoses. *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae), popularmente conhecida como “pequi” é uma espécie nativa do Cerrado e apresenta grande valor econômico, uma vez todas as partes da planta são utilizadas pela população local [3].

A fitoterapia no controle de verminose é uma alternativa que poderá reduzir o custo com a aquisição de anti-helmínticos, bem como prevenir o aparecimento de resistência antihelmíntica. Portanto, objetivou-se avaliar a eficácia anti-helmíntica *in vitro* do extrato etanólico sem tanino das folhas de *C. brasiliense* no desenvolvimento embrionário de *Haemonchus contortus* de ovinos.

Material e métodos

A. Extrato etanólico

Para a produção do extrato etanólico, as folhas de *C. brasiliense* foram desidratadas e trituradas (100 g), acondicionadas em recipientes de vidro âmbar e acrescidas de etanol PA (1.000 mL) [4]. O frasco fechado foi conservado em local escuro e em temperatura ambiente durante 10 dias, após foi filtrado, em funil com algodão e gaze e foram levados à estufa de circulação forçada de ar a 40 °C até atingir peso constante. Quando secos foram raspados e acondicionados em local fresco, livre da incidência de luz e conservado em temperatura ambiente. Para a extração do tanino, o extrato é acerscido de água quente (95 °C) e a partir desta solução, 1 ml é misturado com 4 ml de solução de gelatina a 1%, após ocorreu a centrifugação e o sobrenadante foi testado [5].

B. Teste de eclodibilidade

Os ovos foram recuperados pela metodologia adaptada de Bizimenyera *et al.* [6]. Em placas de microdiluição, foram adicionados 100 µL de solução, com aproximadamente 90 ovos e 100 µL das diluições do extrato. As placas foram homogeneizadas, cobertas com filme plástico e incubadas em estufa BOD a 28 °C por 72 h. Após esse período, foram adicionados 100 µL de formaldeído 10 % (v/v) e as placas foram armazenadas sob refrigeração a aproximadamente 4 °C, para evitar a proliferação de fungos, posteriormente foi realizada a contagem.

O extrato etanólico sem tanino, das folhas de *C. brasiliense* foi diluído em água purificada estéril para a obtenção das concentrações a serem testadas. Subamostras desse extrato foram submetidas à determinação de matéria seca (MS), a 105 °C, para cálculo das concentrações testadas.



C. Análise de dados

Para a avaliação *in vitro* da redução da eclosão de ovos de *H. contortus*, utilizou-se metodologia modificada do teste de eclodibilidade de acordo Coles *et al.* [7]. Como tratamentos foram utilizados: I) Controle: 100 µL de fosfato de levamisol (0,3 mg/mL), II) Controle: 100 µL de água estéril e III-V) Concentrações do extrato etanólico sem tanino (6,8-26,84 mg/mL). O experimento foi realizado com cinco repetições por tratamento, em um delineamento inteiramente casualizado.

Procederam-se às análises em microscópio óptico na objetiva de 10 x, quantificando-se os ovos blastomerados, os ovos larvados e as larvas de 1º estágio (L1). A eficácia média de inibição da eclodibilidade foi calculada pela fórmula adaptada de Coles *et al.* [6]: % Eficácia = 100 x [1 - (L1 / número inicial de ovos)]. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste Duncan com 5% de probabilidade, no programa estatístico SAEG® 9.1.

Resultados

A eficácia do EEST das folhas de *C. brasiliense* foi de 26,84-60,17 %. A média de ovos blastomerados e larvados foi maior que o controle com água e o número médio de larvas foi menor, nas concentrações 13,5 e 26,9 mg/mL em relação ao controle água, na concentração 6,8mg/ml a média de larvas (73,2) foi superior ao controle com água (70,8) (Tab. 1).

Discussão

Outros estudos revelaram que a presença de metabólitos secundários podem ser responsáveis pela atividade antihelmíntica. O extrato aquoso das cascas dos frutos de *Caryocar brasiliense* contendo tanino, no teste de inibição de eclodibilidade, foi verificado que a eficácia anti-helmíntica foi de 98,7 % contra *H. contortus* de ovinos [8]. *In vitro* o extrato aquoso contendo tanino de *Annona squamosa* L. (pinha), espécie do cerrado, causou inibição da eclosão de larvas de 19,4 % contra nematódeos gastrintestinais de bovinos [9]. Ao extrair o tanino do extrato aquoso das folhas de *Lantana camara* e *Mentha villosa* houve eficácia na inibição da eclodibilidade de entre 19,7-18,3 e 97,6-24,7 % respectivamente nas concentrações entre 10-0,31 mg/ml [10].

As análises fitoquímicas do extrato de “pequi” indicaram a presença de saponinas, taninos totais, taninos catequéticos e flavonoides [8]. Os autores sugerem que a atuação sinérgica desses metabólitos poderia ser responsável pelo efeito anti-helmíntico. Nem todas as espécies do Cerrado que contem maior concentração de tanino, são as que promovem maior eficácia *in vitro* no controle de *H. contortus* [4].

Conclusão

Conclui-se que, ao retirar o tanino do extrato etanólico das folhas de *C. brasiliense*, esse é eficaz na embriogênese inicial e apresenta eficácia, no teste de eclodibilidade. É evidente que há outros compostos secundários que atuam junto ao tanino no controle do desenvolvimento de *H. contortus*. Diante disso, é necessário isolar o composto ativo de *C. brasiliense* para realizar novos testes de eficácia.

Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Desenvolvimento (CNPq), pelo apoio financeiro. Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa de estudo em pós-doutoramento. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Educação Tutorial- PET MEC/Sesu e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG).

Referências

- [1] DUARTE, E. R. *et al.* Diagnóstico do controle e perfil de sensibilidade de nematóides de ovinos ao albendazol e ao levamisol no norte de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 147-152. 2012.
- [2] SOUTELLO, R.V.G.; AMARANTE, A.F.T.; SENO, M.C.Z. **The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle in São Paulo state, Brazil.** In: international conference of the world association for the advancement of veterinary parasitology, 19, 2003, New Orleans. Proceedings... New Orleans: WAAVP. 2003. p. 257.
- [3] ARAUJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae): an economically valuable species of the central Brazilian cerrados. **Economic Botany**, New York, v. 49, n. 1, p. 40-48, 1995.



[4] MORAIS-COSTA, F. *et al.* Plants of the Cerrado naturally selected by grazing sheep may have potential for inhibiting development of *Haemonchus contortus* larva. **Trop Anim Health Prod.** DOI 10.1007/s11250-015-0866-8. 2015.

[5] NYMAN, U. *et al.* Ethnomedical information and in vitro screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 247–263. 1998.

[6] BIZIMENYERA, E. S., *et al.* In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.142, p. 336-343, 2006.

[7] COLES, G. C., *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) – methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 35–44, 1992.

[8] NOGUEIRA, F. A. *et al.* In vitro and in vivo efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. **Parasitology Research**, v. 111, p. 325-330. 2012.

[9] SOUZA, M. M. *et al.* Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. seeds. **Anais Academia Brasileira Ciências**, Rio de Janeiro, v.80, p. 271–277. 2008.

[10] MACEDO, I. T. F. *et al.* In vitro activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, p. 504–509. 2012.

Tabela 1. Valores médios de ovos blastomerados, ovos larvados e larvas rabiditoides de *Haemonchus contortus* em diferentes concentrações (mg/mL) do extrato etanólico sem tanino das folhas de *Caryocar brasiliense*

<i>C. brasiliense</i>	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas	Total de ovos + L1	Eficácia (%)
26,9	6,2 ^b	6,2 ^a	28,2 ^c	40,6	60,17
13,5	2,0 ^c	6,2 ^a	51,8 ^d	59,0	26,84
6,8	2,2 ^{bc}	4,4 ^b	73,2 ^c	79,6	--
Água estéril	0,0 ^c	0,0 ^d	70,8 ^c	70,8	--
Fosfato de levamisol (0,3 mg/mL)	79,2 ^a	0,0 ^d	0,0 ^f	78,0	100,0
CV	21,15 %	16,14 %	6,39 %		

Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas. Teste Duncan (p<0,05).

% Eficácia = 100 x [1 – (L1 / número inicial de ovos)].