

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE OVOS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

SOARES, P.^{1(*)}; SILVA, E. V.²; CANABRAVA, H. . N.³; CABRAL, D. D.⁴.

RESUMO

As parasitoses gastrintestinais ocasionam perdas econômicas significativas para os ovinos e o desenvolvimento da resistência parasitária aos medicamentos disponíveis alerta para um esgotamento dos compostos disponíveis. Assim, torna-se importante o estudo de novas alternativas para o controle parasitário. Entre estas, as plantas medicinais e o dimetilsulfóxido (DMSO) podem apresentar resultados promissores, podendo as plantas medicinais incentivar a criação orgânica. Este trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a ação dos extratos de *Chenopodium ambrosioides*, *Baccharis trimera*, *Momordica charantia*, *Artemisia absinthium* e *Carica papaya* e do DMSO sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrintestinais de helmintos. Os testes foram realizados incubando-se 200µg dos extratos brutos diluídos em 200µL de solução salina 0,9% e igual volume da suspensão de ovos, controles negativo (diluentes e solução salina) e positivo (levamisol) e DMSO nas concentrações de 40%, 30%, 20% e 10%, sendo realizada leitura após 24h. O efeito *in vitro* dos extratos vegetais e do DMSO sobre o desenvolvimento dos ovos foi analisado utilizando-se o teste de eclodibilidade para determinação de eficácia anti-helmíntica. Os resultados obtidos evidenciaram uma atividade anti-helmíntica de todos os produtos testados, sendo esta de 100% tanto para inibição de desenvolvimento quanto de eclosão dos ovos. Estes resultados podem ser considerados altamente efetivos contra fases iniciais de desenvolvimento de trichostrongilídeos, pois estão acima dos 90% de ação desejada para produtos antiparasitários.

PALAVRAS-CHAVE: Anti-helmíntico, dimetilsulfóxido, nematódeos, ovinos, plantas medicinais.

INTRODUÇÃO

As verminoses acometem intensamente os rebanhos ovinos e caprinos, representando prejuízos na produção de leite e carne e, muitas vezes, levando os animais ao óbito.

Entre os parasitas que infectam pequenos ruminantes, estão os chamados trichostrongilídeos, pertencentes à família Trichostrongylidae, que compreende os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus* e *Cooperia* (FORTES, 1997).

¹ Médica Veterinária - Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Av. Pará, 1720. CEP: 38400-902 - Uberlândia, MG – Brasil. E-mail: psoares.vet@hotmail.com.

² Médico Veterinário - Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Av. Pará, 1720. CEP: 38400-902 - Uberlândia, MG – Brasil. E-mail: euripedes_vilela@hotmail.com.

³ Prof. Dr. - Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas. Av. Pará, 1720- Bloco 2A- Setor de Farmacologia- Campus Umuarama. CEP: 38400-902 - Uberlândia, MG – Brasil. E-mail: canabrava@ufu.br.

⁴ Prof.^a MS^a - Universidade Federal de Uberlândia - Av. Pará, 1720. Campus Umuarama Laboratório Parasitologia sala 4C 16. CEP: 38400-902 - Uberlândia, MG – Brasil – E-mail: ddcabral@ufu.br.

O controle efetivo destes parasitas pelo uso de produtos químicos convencionais tem encontrado dois grandes problemas: o desenvolvimento de resistência ao princípio ativo e a preocupação da população e dos órgãos governamentais com os resíduos nos produtos de origem animal. O crescente interesse de países desenvolvidos em fitoterápicos é uma conjuntura propícia para o estímulo à pesquisa de plantas medicinais e desenvolvimento de medicamentos delas derivados (CHAGAS, 2004).

No entanto, apesar de bastante promissor, este campo resente-se da falta de estudos farmacológicos, em especial no Bioma Cerrado que ocupa cerca de dois milhões de quilômetros quadrados no interior do país, o que representa 25% do território nacional, abrangendo 13 estados e Distrito Federal, apresentando uma biodiversidade pouco conhecida e superada apenas pela Amazônia (NETO e MORAIS, 2003).

Várias espécies vegetais nativas ou naturalizadas do cerrado apresentam interessante potencial de uso medicinal como anti-helmínticos. Dentre muitas, apontadas em levantamentos etnobotânicos, podemos listar: *Carica papaya* (mamão papaia), *Chenopodium ambrosioides* (Erva - de - Santa - Maria), *Momordica charantia* (Melão - de - São - Caetano), *Baccharis trimera* (carqueja), *Artemisia absinthium* (losna), as quais foram objeto de investigação neste estudo.

Historicamente as plantas se constituem na principal fonte primária de substâncias biológicas e farmacologicamente ativas, além de alimentares.

A pesquisa com plantas e a produção de medicamentos originados a partir de plantas com atividade medicinal comprovada cientificamente envolve várias etapas desde a seleção da planta até a comercialização do produto final (RATES, 2001).

A etapa de validação de uma planta envolve vários testes que visam confirmar a sua eficácia e determinar a segurança de sua utilização em organismos vivos. Os testes de eficácia podem ser realizados, *in vitro* e *in vivo* (CAMURÇA-VASCONCELOS *et. al.*, 2005).

Estes testes servem como uma indicação inicial da atividade que está sendo pesquisada e, quando utilizados no início de uma triagem, permitem selecionar as plantas que apresentam melhores resultados, diminuindo gastos, evitando perda de tempo e uso indiscriminado de animais de experimentação.

Para determinação do potencial anti-helmíntico de plantas podem ser realizados os testes de inibição de eclosão de ovos, de motilidade ou de desenvolvimento larvar de nematóides, além de ensaios com nematóides de vida livre (CAMURÇA-VASCONCELOS *et. al.*, 2005).

Aliada à utilização de plantas medicinais, uma substância que têm sido utilizada intensivamente em medicina veterinária é o dimetilsulfóxido. Já foram verificadas acima de trinta propriedades farmacológicas e terapêuticas do DMSO as quais resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucléicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas, sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (SOJKA *et. al.*, 1990), o que o torna um excelente solvente.

A ação permeante do DMSO em membranas biológicas tem permitido a sua utilização como potencializador de drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias (BRAYTON, 1986).

O objetivo fundamental desta proposta é verificar a eficácia de plantas medicinais do cerrado brasileiro e do DMSO como recurso potencial no controle de helmintos gastrintestinais de ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras das partes aéreas, raízes, caules e sementes foram coletadas em campos de cultivo e no ambiente natural na região do Triângulo Mineiro - Minas Gerais.

Os materiais foram acondicionados e transportados adequadamente aos laboratórios da Universidade Federal de Uberlândia, onde, depois de herborizados e identificados por especialista, foram depositadas as suas exsiccatas no *Herbarium Uberlandenses* da Universidade Federal de Uberlândia.

Os materiais coletados foram lavados em solução alcoólica a 70 % e, em seguida, imersos em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% por 5 minutos, secados em estufa, em temperatura controlada (40°C), moídos e homogeneizados, obtendo-se um pó ou farinha.

Os extratos foram preparados pelo processo de turbólise, utilizando os solventes: água 50% p/v, solução etanólica 50 % p/v e solução hidroetanólica 50% p/v. O macerado foi filtrado e submetido à evaporação rotativa, sob vácuo, para retirada dos solventes. O material resultante foi liofilizado em equipamento específico para posterior armazenamento.

Para a obtenção dos ovos de helmintos utilizou-se ovinos com aproximadamente oito meses de idade de uma propriedade particular da região do Triângulo Mineiro/MG, criados em sistema semi-intensivo e com status parasitológico de contagem média de 5000 ovos por grama de fezes (OPG), segundo o método de Gordon & Whitlock modificado (JENO & GUTIERRES, 1983).

Os ovos encontrados possuíam características morfológicas típicas da superfamília Strongyloidea, família Trichostrongylidae.

Foram coletadas cerca de 10 g de fezes diretamente da ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas sob temperatura ambiente ao laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

O material foi triturado em graal contendo solução salina hipersaturada, filtrado em tamizes de malhas de 250 mn/µm.

O material obtido foi centrifugado a 2.000 RPM por cinco minutos e o sobrenadante foi submetido a três lavagens consecutivas com água destilada (2.000 RPM/5 min).

Na última lavagem o sedimento foi mantido com um pequeno volume de líquido, ressuspenso e transferido para tubos de ensaio em alíquotas de 200µL, de modo a comporem uma suspensão com aproximadamente 1500 ovos de helmintos por tubo.

O efeito *in vitro* dos extratos vegetais sobre o desenvolvimento dos ovos foi analisado utilizando-se o teste de eclodibilidade para determinação de eficácia anti-helmíntica proposto por Batista et. al. (1999), modificado.

Placas de PCR com 96 pocinhos receberam, em duplicata, 200 µL da suspensão de ovos, igual volume de extrato vegetal, DMSO nas concentrações de 40%, 30%, 20% e 10% e controles negativos com solução salina 0,9% e diluentes, também em duplicata, controle positivo com 1 (um) mL de levamisol (Protall VP, da Vallée 18,8 %), sendo incubados em estufa à temperatura de 26 ± 1° C, com umidade controlada. Decorridas 24h, o material foi analisado em microscopia de luz invertida classificando-se todos os ovos presentes na amostra de acordo com o estágio de desenvolvimento em que se encontravam.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação do desenvolvimento dos ovos em 24 horas de incubação foram encontrados 100% dos ovos com alteração no desenvolvimento - deformados (não foi observada blastomeração) - quando submetidos ao teste com os extratos aquoso, alcoólico e hidroalcoólico de *Carica papaya* L., *Chenopodium ambrosioides* L., *Baccharis trimera* L., *Momordica charantia* L. e *Artemisia absinthium* L. e nos pocinhos que continham DMSO, em todas as concentrações testadas.

A alteração no desenvolvimento dos ovos de nematódeos pode ser observada na Figura 1.

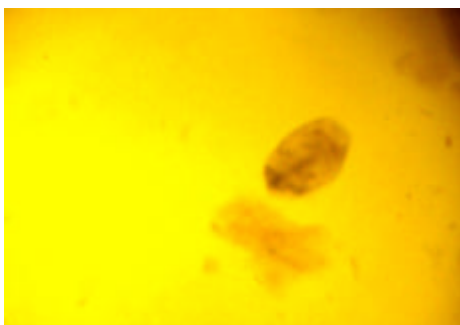


Figura 1 – Ovo deformado e com desenvolvimento inibido pela ação de *C. ambrosioides*.

Não houve diferença quanto ao solvente utilizado para extração dos princípios e não ocorreu nenhuma influência dos mesmos sobre o desenvolvimento dos helmintos, uma vez que a eclosão procedeu-se normalmente.

Quando submetidos à ação da solução salina foram encontrados 50% dos ovos larvados/eclodindo e 50% de larvas livres, conforme Figuras 2 e 3, respectivamente.

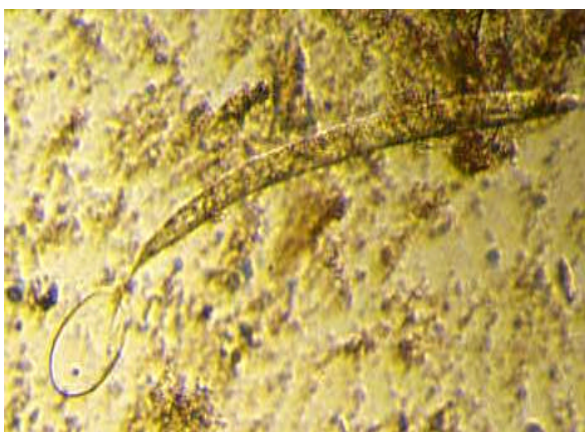


Figura 2 – Larva eclodindo observada no teste com solução salina.



Figura 3 – Larva livre observada no teste com Solução salina (seta).

Considerando-se que para um tratamento anti-helmíntico ser eficiente ele deve alterar o desenvolvimento normal dos ovos impedindo que os mesmos eclodam e liberem as larvas que se tornarão infectantes, o ideal é que se tenha

um produto que impeça que a fase de blastomeração prossiga, como ocorreu neste experimento.

Segundo a classificação do índice de eficácia proposto pela World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology - W.A.A.V.P. - (POWERS et. al., 1982) um produto seria altamente efetivo se apresentasse mais de 90% de ação contra o parasita tratado, moderadamente efetivo quando atuasse entre 80 a 90%, pouco efetivo quando a ação fosse entre 60 e 80% e não efetivo em níveis abaixo de 60%.

Analisando-se os resultados obtidos em 24h de incubação dos ovos em relação à ação antiparasitária de *Carica papaya L.*, *Chenopodium ambrosioides L.*, *Baccharis trimera L.*, *Momordica charantia L.* e *Artemisia absinthium L.* conclui-se que as mesmas possuem alta eficácia frente aos nematódeos testados, assim como o DMSO em qualquer uma das concentrações utilizadas.

O controle positivo com levamisol promoveu a inibição de 100% da eclosão de ovos. O que sugere que na propriedade em questão não há resistência dos parasitos à base testada.

Resultado semelhante foi observado por Veríssimo et. al. (2002) em uma ovinocultura no estado de São Paulo - Brasil, no qual o cloridrato de levamisol apresentou eficácia de 99,6% sobre helmintos da família Trichostrongylidae.

De acordo com os resultados obtidos, o DMSO poderá atuar tanto como uma alternativa de combate às verminoses como um solvente para os extratos de plantas, uma vez que sua permeabilidade às membranas biológicas pode potencializar a ação destes extratos, como já o faz com produtos antimicrobianos.

Vale salientar que o teste *in vitro* é apenas uma etapa inicial na pesquisa sobre atividade medicinal e, portanto, os resultados positivos obtidos com este teste, isoladamente, não são suficientes para validação científica de qualquer atividade pesquisada.

Os testes de eficácia *in vitro* servem como uma indicação inicial da atividade que está sendo pesquisada, e quando utilizados no início de uma triagem, permitem selecionar as plantas que apresentam melhores resultados diminuindo gastos, evitando perda de tempo e uso indiscriminado de animais de experimentação.

CONCLUSÃO

Os resultados *in vitro* evidenciaram atividade anti-helmíntica de 100% de todas as plantas testadas e do DMSO sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvares, o que justifica a continuidade de pesquisas que visem validar estas plantas medicinais como alternativa para o tratamento de parasitoses gastrintestinais de ovinos.

A análise fitoquímica das plantas, os testes para a comprovação da ação efetiva dos princípios ativos sobre os parasitas e um conhecimento mais amplo das estratégias de controle, podem oferecer novas oportunidades de controle efetivo e econômico das doenças parasitárias.

A condução de novos experimentos deve ser realizada de maneira que todas as etapas de desenvolvimento de um novo produto sejam investigadas para que possa ocorrer sua real aplicação.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, I. M. **Atividade ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* sobre o nematódeo de ovinos *Haemonchus contortus***. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, 1999. 67 p.
- BRAYTON, C. F. Dimethylsulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinary Medicine**, v.76, p.61-90, 1986.
- CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 156-160, 2004.
- NETO, G. G.; MORAIS, R. G. Recursos Medicinais de Espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.17, n. 4, p. 561-584, 2003.
- POWERS, K. G.; WOOD, I. B.; ECKERT, J.; GIBSON, T.; SMITH, H. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, v. 10, p. 265-284, 1982.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Journal of the International Society on Toxinology**, v.39, p.603-13, 2001.
- SOJKA, E. J., KIMMICK, S. V. B., CARISON, G. P. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. **Proceedings American Associated Equine Practit**, v.36, p.683-690,1990.
- UENO, H.; GUTIERRES, V. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1983.