

EFEITO *IN VITRO* DO EXTRATO DE ACÁCIA SOBRE LARVAS INFECTANTES DE *TRICHOSTRONGYLUS COLUBRIFORMIS*.

Minho A.P.^{1*}; Filippesen L.F.¹; Amarante A.F.T.²; Abdalla A.L.³

INTRODUÇÃO

A resistência aos anti-helmínticos caracteriza-se pelo declínio da eficiência de uma droga contra uma população de parasitos, anteriormente suscetível àquele tratamento (SANGSTER e GILL, 1999). Relatos de cepas de helmintos resistentes a vários grupos de drogas utilizadas é uma realidade mundial (MOLENTO e PRICHARD, 1999), incluindo multirresistência as três principais classes de produtos disponíveis comercialmente (KAMINSKY et al., 2008). Este fenômeno gera sérias conseqüências à criação ovina, até mesmo, inviabilizando sua produção em algumas regiões (BLAKE e COLES, 2007).

O aumento dos relatos de MRD em todo o mundo, associado ao aumento da procura dos produtos de origem animal provenientes de criações com sistemas orgânicos de produção incitam a procura de novas alternativas para redução ou até a exclusão das drogas anti-helmínticas no controle parasitário de pequenos ruminantes (ATHANASIADOU et al., 2000a). Com esta finalidade foram desenvolvidos programas integrados de controle parasitário, por meio de tratamentos estratégicos baseados na epidemiologia, diminuição do uso de produtos químicos, utilização de pastoreio alternado e diminuição na contaminação das pastagens (MOTA et al., 2003).

Várias pesquisas foram realizadas com o intuito de descobrir pontos vulneráveis na biologia ou ecologia desses parasitos (TYRREL et al., 2002). Alguns dos controles parasitários alternativos em ovinos incluem o uso de vacinas contra nematóides (MEEUSEN, 1996), controle biológico (LARSEN, 1999) e o uso de forragens taniníferas com propriedades anti-helmínticas (BUTTER et al, 2000). Entretanto, faz-se necessário o uso de manejos integrados para o controle efetivo das infecções parasitárias em ovinos. Porém não é possível no momento, a total exclusão das drogas anti-helmínticas (BESIER, 2007).

A suplementação dos ovinos com taninos condensados (TC), oriundos de plantas forrageiras ou dos extratos de quebracho e acácia, vêm sendo utilizados no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos, entre eles *T. colubriformis* (ATHANASIADOU et al., 2000a e 2000b) e *H. contortus* (MINHO et al., 2004, 2005 e 2007; NIEZEN et al., 2002). Os taninos compreendem um grupo de compostos

¹ Instituto Agrônomo do Paraná, Rod. Celso Garcia Cid, km 375, C.P. 481 CEP 86001-970, Londrina, PR. * apminho@iapar.br

² Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

³ Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

fenólicos encontrados principalmente em frutos verdes e plantas da família Leguminosae,

Esses compostos fenólicos são classificados conforme sua estrutura molecular em taninos hidrolisáveis (TH) ou taninos condensados (TC), sendo os condensados também conhecidos como proantocianidinas. TC são os taninos mais comumente encontrados em plantas forrageiras, árvores e arbustos (BARRY e MCNABB, 1999). Estruturalmente, os TC são polímeros de unidades de flavonóides unidos por ligações carbono-carbono (HAGERMAN e BUTLER, 1981).

Forrageiras com alto teor de TC, quando fornecidas a ovinos e bovinos, melhoram a digestão protéica e absorção dos aminoácidos. Atribui-se a maior absorção protéica: maior produção de lã, carne e leite, assim como melhora na taxa de ovulação das fêmeas. O estado nutricional do indivíduo é considerado um importante fator de equilíbrio na relação parasito-hospedeiro, assim como na patogênese da infecção parasitária (VALDERRÁBANO et al., 2002).

A diminuição do OPG em animais que receberam fontes de TC pode provir de duas origens: pela diminuição da carga parasitária, ou por redução da fecundidade das fêmeas de nematóides. Paolini et al. (2003a; 2003b), trabalhando com caprinos, relataram diminuição da fecundidade das fêmeas de *H. contortus* e *T. colubriformis*, porém o efeito direto sobre o parasito depende do estágio de evolução em que este se encontra. Segundo os mesmos autores, o efeito do extrato de quebracho pode durar 18 dias, após sua administração.

No Brasil utiliza-se o quebracho como fonte de TC, já que as árvores das quais é extraído o EQ estão em processo de extinção. Entre as espécies das quais se podem extrair o extrato de quebracho encontra-se a *Schinopsis brasiliensis*, a qual se encontra presente na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção². O EQ não acarretou efeitos tóxicos a ovinos, quando administrado intraruminalmente, nas doses de 0,5 e 1,5g de EQ/kg de PV, sendo potencialmente indicado para uso na suplementação animal (HERVÁS et al., 2003).

Este ensaio teve como objetivo avaliar o efeito inibitório do extrato de acácia sobre a mobilidade de larvas infectantes (L3) de *Trichostrongylus colubriformis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Extrato de acácia (EA)

Foi utilizado o extrato de *Acácia mearnsii*, o qual possui 15% de taninos condensados (TC), segundo o método de HCl-Butanol (Porter et al., 1986). Foram

² Através da Portaria Nº. 37-N, de 3 de abril de 1.992, o IBAMA torna pública a Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçada de Extinção. Encontrada no endereço eletrônico: <http://www2.ibama.gov.br/flora/extincao.htm> (acesso em 29/09/2005).

testadas diluições seriadas de 35 a 200 mg ml⁻¹. Para confirmar a ação do TC o experimento foi repetido na presença de polietilenoglicol (PEG), o qual tem a capacidade de ligar-se aos TC inibindo sua ação sobre as L3.

Larvas infectantes (L3)

Foram utilizadas larvas de *H.contortus* obtidas de dois cordeiros doadores com infecção monoespecífica. As fezes obtidas desses doadores foram cultivadas para obtenção da forma infectante (L3-terceiro estágio) segundo Roberts e O'Sullivan (1950) modificado segundo Ueno e Gonçalves (1994). As larvas obtidas das culturas foram mantidas em temperatura ambiente e utilizadas antes de completarem 21 dias de estocagem.

Inibição da migração larval

As L3 foram padronizadas em solução com 100 larvas µl⁻¹. Desta solução padrão foi adicionado 100µl em tubo tipo eppendorf contendo 1ml da solução de EA a ser testada. Esses tubos foram incubados durante duas horas à 37°C. Após a incubação as larvas em contato com o EA foram transferidas para uma placa de cultura de 24 poços, contendo as soluções de EA nas várias diluições e um filtro em cada orifício (diâmetro 25 µm). Após nova incubação de duas horas à 37°C os filtros foram removidos e o número de L3 que migraram através da malha foi avaliado.

A porcentagem de migração das larvas pelo filtro é dada pela fórmula:

$$Nm \times (Nm + Nr)^{-1} \times 100.$$

Onde: Nm = número de larvas que migraram pelo filtro.

Nr = número de larvas retidas no filtro.

Delineamento experimental e análises estatísticas

Foi realizado um ensaio fatorial 1x8x2 (uma espécie de nematóide; oito diluições de EA e dois tratamentos - com e sem PEG), ambos em duplicata. A porcentagem de L3 viáveis foi determinada para cada diluição de extrato. Foi realizada uma regressão linear para cálculo da dose letal 50% (DL₅₀). As análises de variâncias entre as medias de viabilidade (mobilidade) das L3 nas diferentes diluições (com e sem PEG) foi determinada pelo teste de Tukey ($P < 0.01$).

RESULTADOS

As porcentagens (média de duplicatas) das L3 que migraram através do filtro (larvas viáveis) são demonstradas com e sem a presença de PEG (**Tabela 1**). O valor preditivo para redução de 50% das L3 viáveis (DL₅₀) foi, aproximadamente, 40 mg mL⁻¹ ($R^2 = 0,902$) e na presença de PEG a DL₅₀ aumentou para 72 mg mL⁻¹ ($R^2 = 0,977$), evidenciando o efeito dos TC sobre as larvas de terceiro estágio.

Tabela 1 Média (duplicata) da percentagem (%) de larvas infectantes (L3) de *Trichostrongylus colubriformis* que na presença de extrato de acácia (EA) migraram através do filtro. Resultados com e sem a presença de Polietilenoglicol (PEG).

Diluições EA mg mL ⁻¹	<i>Trichostrongylus colubriformis</i> (L3)	
	EA (migração %)	EA + PEG (migração %)
Controle	80,11 ^a	81,78 ^a
200	4,22 ^c	5,56 ^d
150	4,48 ^c	13,84 ^d
100	15,02 ^{bc}	27,74 ^{cd}
75	20,60 ^{bc}	45,37 ^{bc}
65	27,09 ^b	59,78 ^{ab}
50	29,10 ^b	62,59 ^{ab}
35	75,43 ^a	83,20 ^a

Controle – água destilada

Letras diferentes na mesma coluna (P < 0.01).

DISCUSSÃO

Este ensaio evidenciou o efeito inibitório do EA sobre L3 de *T. colubriformis*. Apesar de não ser estudado o efeito de outras substâncias pertencentes a esse extrato a utilização do PEG comprova que grande parte dos efeitos inibitórios são oriundos dos TC.

Ao utilizar o extrato de acácia (EA) como fonte de TC, administrado por via oral, na dose de 1,6g de EA/kg de PV, Minho et al. (2004; 2005) obtiveram resultados conclusivos sobre a ação direta destes compostos sobre a carga parasitária e eclosão dos ovos de *H. contortus* e *T. colubriformis* em ovinos naturalmente e experimentalmente infectados. Além de ensaios *in vitro*, nos quais se constatou a ação do EA sobre a sobrevivência e viabilidade das larvas de primeiro estágio de *H. contortus*, *T. vitrinus* e *Teladorsagia circumcincta* (aceito para publicação: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária).

Como verificado em outros experimentos, o uso de fontes de TC, principalmente oriundas de extratos de acácia são promissoras e devem ser avaliadas cientificamente em ensaios *in vitro* e *in vivo* para terem seu uso indicado para o controle parasitário em ovinos.

CONCLUSÃO

Os resultados sugerem o efeito deletério do AE sobre larvas infectantes de *T. colubriformis* afetando sua mobilidade em ensaio *in vitro*, entretanto os TC não podem ser descritos como os únicos compostos bioativos neste experimento.

Agradecimentos: Ao CNPq e IAPAR pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R.L. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitised with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1025-1033, 2000a.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JAKSON, S.; COOP, R.L. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Record**, v.146, p.728-732, 2000b.

BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. The implication of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, v.81, p.263-272, 1999.

BESIER, R.B. New anthelmintics for livestock: the time is right. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 21-24, 2007.

BUTTER, N.L.; DAWSON, J.M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P.J. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. **Journal of Agricultural Science**, v.134, p.89-99, 2000.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v.256, p. 4494-4497, 1981.

HERVÁS, G.; PÉREZ, V.; GIRÁLDEZ, F.J.; MANTECÓN A.R.; ALMAR, M.M.; FRUTOS, P. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. **J. Comp. Path.** v.129, p. 44-54, 2003.

KAMINSKY R.; GAUVRY N.; SCHORDERET WEBER S.; SKRIPSKY T.; BOUVIER J.; WENGER A.; SCHROEDER F; DESAULES Y.; HOTZ R.; GOEBEL T.; HOSKING B. C.; PAUTRAT F.; WIELAND-BERGHAUSEN S. and DUCRAYP. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. **Parasitology Research**, 2008. Disponível on-line: <http://www.springerlink.com/content/b2q76x808x263807/> Data: 22/07/2008. DOI 10.1007/s00436-008-1080-7

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.139-146, 1999.

MEEUSEN, E.N.T. Rational Design of Nematode Vaccines; Natural Antigens. **International Journal for Parasitology**, v.26, n.8/9, p.813-818, 1996.

MINHO A.P.; GODOY, P.B.; GENNARI, S.M.; CASTILHO, L.A.; ABDALLA, A.L. Taninos condensados no controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos:

resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO DE LATINO-AMERICANO DE RICKETTISIOSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004.

MINHO, A.P.; ABDALLA, A.L.; GENNARI, S.M. The effect of condensed tannins on *Haemonchus contortus* in sheep experimentally infected In: BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE ANNUAL MEETING, York, 2005. In vitro and analytical techniques; **proceedings...** York: University of York, 2005.

MINHO, A.P.; BUENO, I.C.S.; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.; GENNARI, S.M.; ABDALLA, A.L., 2007. Effect of acacia tannin extract in the control gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, 2007. In press. Disponível on-line: www.sciencedirect.com. Data 22/07/2008.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

NIEZEN, J.H.; CHARLESTON, W.A.G.; ROBERTSON, H.A.; SHELDON, D.; WAGHORN, G.C.; GREN, R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.105, p.229-245, 2002.

PAOLINI, V.; FRAYSSINES, A.; DE LA FARGE, S.; DORCHIES, P.; HOSTE, H Effects of condensed tannins on established populations and in incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. **Veterinary Research**, v.34, p.331-339, 2003a

PAOLINI, V.; BERGEAUD, J.P.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; DORCHIES, PH.; HOSTE, Effects of condensed tannins on goats experimentally infect with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.113, p.253-261, 2003b.

Porter, L. J.; Hrstich, L. N.; Chan, B. G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, 25: 223-230.

SANGSTER, N.C.; GILL, J. Pharmacology of Anthelmintic Resistance. **Parasitology Today**, v.15, n.4, p.141-146, 1999.

TYRREL, K.L.; DOBSON, R.J.; STEIN, P.A.; WALKDEN-BROWN, S.W. **Veterinary Parasitology**, v.107, p.85-93, 2002.