

Atividade ovicida *in vitro* do extrato de Ingá (*Inga edulis*) em nematódeos gastrintestinais de ovinos.

Eidi Yoshihara¹, Andréia Luciane Moreira¹, Terezinha de Jesus Monteiro², Sandy C. Rieder Zironi³, Alessandro Pelegrine Minho⁴.

¹ Pesquisador Científico - Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Presidente Prudente, Brasil.
e-mail: eidi@apta.sp.gov.br

² Docente - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil

³ Docente - ETEC Pedro D'Arcádia Neto, Assis, Brasil

⁴ Pesquisador A - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Bagé, Brasil

Resumo: As helmintoses gastrintestinais representam um dos principais problemas de sanidade para o rebanho ovino. O uso de plantas com potencial anti-helmíntico apresenta-se como uma alternativa promissora no controle de helmintos em ovinos, reduzindo o uso de produtos químicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* dos extratos (frações) etanólico e acetato de etila provenientes das folhas de Ingá (*Inga edulis*) sobre a eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos. Foi realizado o teste de eclodibilidade de ovos. Foram avaliados com os extratos diluídos em DMSO acrescido de água destilada nas concentrações: 15,62; 23,43; 31,25; 46,87; 62,50; 93,75 e 125 µg mL⁻¹. No controle negativo utilizou-se água destilada + DMSO. As inibições das eclosões quando utilizou o extrato acetato de etila foram 12,78; 14,92; 17,69; 28,96; 57,64; 69,87; 94,69%, respectivamente. Utilizando o extrato etanólico, as inibições foram de 10,20; 14,72; 25,76; 56,34; 84,78; 95,54 e 97,65%. No controle negativo a inibição foi de 11,74% para o extrato etanólico e de 11,92% para o extrato acetato de etila. Os dados encontrados no presente trabalho indicam a ação anti-helmíntica do extrato de Ingá, apresentando potencial para sua aplicação no controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes.

Palavras-chave: atividade anti-helmíntica, fitoterapia, teste *in vitro*.

***In vitro* ovicidal activity of *Inga edulis* (Ingá) extract on gastrointestinal nematode infestations in sheep**

Abstract: Gastrointestinal helminthosis are one of the main health problems of sheep flock. The usage of plants with anthelmintic effect is a promising alternative for the control of sheep helminths, reducing the chemical products use. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* effect of ethanolic and ethyl acetate extract (fraction) from *Inga edulis* on the egg hatch test (EHT). The EHT were performed with the extract diluted with DMSO and distilled water in the concentrations: 15.625; 23.43; 31.25; 46.87; 62.50; 93.75 and 125 µg mL⁻¹. Distilled water mixed with DMSO was used as negative control. The egg hatch inhibition (EHI) using the ethyl acetate extract were 12.78 ; 14.92 ; 17.69 ; 28.96 ; 57.64 ; 69.87 ; 94.69 %, respectively. Using the ethanolic extract, inhibitions were 10.20; 14.72; 25.76; 56.34; 84.78; 95.54 and 97.65 %. In the negative control group the EHI were 11.74 % for the ethanolic extract and 11.92 % for the ethyl acetate extract. These results suggesting the anthelmintic effect of Ingá extracts on gastrointestinal nematodes, presenting potential use for the control of small ruminant internal parasites.

Keywords: anthelmintic activity, phytotherapy, *in vitro* test.

Introdução

Um dos principais problemas encontrados na ovinocultura, limitando a criação destes animais, são as infecções parasitárias, sendo os nematódeos gastrintestinais (NGI) os de maior importância. Dentre os NGI destacam-se *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides spp.*, *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum*. Os ovinos são parasitados em todas as faixas etárias e os cordeiros desmamados constituem a categoria etária mais acometida pela verminose, acarretando não somente atraso no desenvolvimento corporal, mas também na produção e qualidade da carne, lã e, até mesmo, aumento da mortalidade dos animais jovens. Visando o controle das infecções parasitárias, utilizam-se anti-helmínticos sintéticos, entretanto, quando administrados de maneira incorreta ou indiscriminada podem selecionar isolados de parasitos resistentes (Santos et al., 2012). O

desenvolvimento de isolados de parasitos resistentes às várias classes de anti-helmínticos é um fenômeno comum em muitos países e identificado em muitas espécies de nematódeos. Além disso, os anti-helmínticos disponíveis no mercado possuem algumas limitações, tais como alto custo, presença de resíduos nos alimentos, riscos de poluição ambiental e redução na produção de ovinos, devido a sua baixa eficácia.

Na busca de novas alternativas de controle efetivo de NGI em pequenos ruminantes, vários pesquisadores têm se empenhado em testar plantas com compostos bioativos que possam ser empregados no manejo integrado de parasitoses, com menos efeitos deletérios ao meio ambiente, na tentativa de redução de problemas sanitários que comprometem a produtividade dos animais.

A fitoterapia tem sido indicada, principalmente, para reduzir os custos dos tratamentos químicos e prolongar a vida útil dos produtos anti-helmínticos disponíveis no mercado, pois diminui a pressão de seleção sobre os isolados de nematódeos. Apesar de muitas plantas já terem sido descritas como possuidoras de atividade anti-helmíntica, poucas foram avaliadas cientificamente.

A utilização de extratos de plantas com efeito anti-helmíntico no controle dos nematódeos gastrintestinais de ruminantes traz grandes perspectivas, pois podem acarretar a redução da utilização de anti-helmínticos sintéticos e a diminuição do estabelecimento de isolados de parasitos resistentes às drogas anti-helmínticas nas propriedades, assim como promover um grande avanço terapêutico na cadeia produtiva dos animais mantidos em sistemas de produção orgânica.

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a eficácia dos extratos etanólico e acetato de etila na inibição da eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

Material e Métodos

Para a obtenção dos extratos, foram utilizadas folhas de ingá (*Inga edulis*). As folhas foram secas e moídas e, em seguida realizou-se a extração das frações, utilizando os solventes acetato de etila e etanol. Para o teste de inibição da eclosão dos ovos de nematoides (IEO), utilizou fezes de ovinos naturalmente infectados. As fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais, desse material foram isolados os ovos. A recuperação dos ovos foi realizada segundo metodologia descrita por Coles et al. (1992) adaptado por Bizimnyera et al. (2006). As fezes foram homogeneizadas em água destilada e filtradas em um conjunto de peneiras, sendo que na peneira de 25 μm os ovos foram retidos, lavados com água destilada e centrifugados a 1.100 x g por 5 min. em tubos de 50 mL completados com água. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionada solução salina saturada para a ressuspensão do sedimento. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi recuperado e lavado na peneira de 25 μm para eliminação dos resíduos de sal. Os ovos coletados foram armazenados em cálice de sedimentação por 2 h. Após o período de sifonação, a quantidade de ovos foi mensurada em cinco alíquotas de 50 μL .

O teste IEO foi baseado no método descrito por Von Samson-Himmelstjerna et al. (2009). Diluições dos extratos de folhas de ingá foram preparadas usando água destilada. As concentrações finais dos extratos foram 15,62; 23,44; 31,25; 46,87; 62,50; 93,75 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, 100 μL de suspensão de ovos, contendo aproximadamente 150 ovos, foram incubados em placas de cultivo celular de 24 poços por 48 horas a 27 °C com 400 μL de cada concentração. O teste foi realizado em três repetições para cada concentração testada. Como controle positivo utilizou Sulfóxido de albendazole e como controle negativo água destilada acrescida de DMSO. Após o período de incubação, os ovos e larvas eclodidas (larvas de primeiro estágio – L₁) foram quantificados para o cálculo da porcentagem de inibição da eclodibilidade larval.

Resultados e Discussão

No teste *in vitro* realizado no presente trabalho, a ação anti-helmíntica dos extratos etanólico e acetato de etila foram determinados pela inibição da eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos naturalmente infectados. As porcentagens de IEO dos nematódeos gastrintestinais utilizando diferentes concentrações do extrato de ingá estão apresentadas na Tabela 1. No controle negativo a média de inibição foi de 11,92% e 11,74% para os extratos acetato de etila e etanólico, respectivamente. Os extratos vegetais testados apresentaram significativa ação na inibição da eclosão de ovos no teste *in vitro*.

A inibição acima de 90% foi obtida quando se utilizou o extrato etanólico na concentração de 93,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato acetato de etila. Os valores de inibição de eclosão encontrados no presente trabalho diferem dos relatados em trabalhos anteriormente realizados utilizando diferentes extratos (Oliveira et. al., 2011). As diferenças entre os resultados deste trabalho e a literatura podem estar relacionadas com a fonte do extrato, métodos de extração e isolados de parasitos avaliados.

Tabela 1. Média de inibição de eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos após contato prévio com extratos de *Inga edulis* em concentrações crescentes.

Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média de inibição de eclosão (%)	
	Extrato etanólico	Extrato acetato de etila
Controle negativo*	11,74	11,92
15,62	10,21	12,78
23,44	14,71	14,92
31,25	25,76	17,70
46,87	56,34	28,96
62,50	84,78	57,64
93,75	95,54	69,87
125	97,65	94,69

*(água destilada + DMSO)

A principal contribuição deste composto, em longo prazo, seria a diminuição no número de aplicações de anti-helmínticos, aumentando o intervalo entre os tratamentos. Isso diminuiria a pressão de seleção sobre as populações de parasitos, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de isolados resistentes às drogas utilizadas e seu estabelecimento nos rebanhos ovinos.

Conclusões

Os resultados encontrados mostraram-se promissores, indicando que os extratos de ingá oferecem uma alternativa para o desenvolvimento de programas de controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para avaliar os mecanismos de ação dos extratos, parte da planta utilizada e métodos de extração. Avaliações dos efeitos *in vivo* e toxicidades celulares são necessárias para estimar o potencial de utilização desses compostos bioativos como alternativa de tratamento efetivo aos compostos químicos com ganhos econômicos e ambientais.

Literatura citada

BIZIMENYERA, E.S.; GITHIORI, J.B.; ELOFF, J.N.; SWAN, G.E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p.336-343, 2006

COLES, G.C.; BAUER, C.; BOTGSTEEDE, 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.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, p.35-44, 1992

OLIVEIRA, L.M.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MACEDO, I.T.F. Plantas taniníferas e o controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, v.41, n.11, p.1967-1974, 2011.

SANTOS, F.C.C.; VOGEL, F.S.F.; MONTEIRO, S.G. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum*) sobre nematoides gastrintestinais de ovinos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.7, n.1, p.139 - 144, 2012

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; COLES, G.C.; JACKSON, F. Standardization of egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitology Research**, v.105, p.825-834, 2009.