EFEITOS DOS EXTRATOS AQUOSO E METANÓLICO DE ALGARROBA SOBRE CULTURAS DE LARVAS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE CAPRINOS

MARIA JOSÉ MOREIRA BATATINHA¹, GISELE NUNES ALMEIDA², LUCIANA FERREIRA DOMINGUES³, MONICA MATTOS DOS SANTOS SIMAS¹, MARIANA BORGES BOTURA⁴, ANA CARLA FERREIRA GUEDES DA CRUZ⁵, MARIA ANGELA ORNELAS DE ALMEIDA¹

¹Professora Doutora da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA - mjmb@ufba.br

²Graduanda em Veterinária, Laboratório de Toxicologia Veterinária - Hospital de Medicina Veterinária - UFBA, Salvador, BA

³Doutoranda em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Jaboticabal, SP.

⁴Doutoranda em Biotecnologia na Universidade Estadual de Feira de Santana, BA

⁵Pós-Graduanda em Ciência Animal Nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador BA.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* dos extratos metanólico e aquoso dos frutos e das folhas de *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. (algaroba), respectivamente, sobre cultivos de larvas de nematódeos gastrintestinais de caprinos. Seis concentrações do extrato metanólico (724,5; 557,3; 428,7; 329,8; 253,7; 195,1mg/mL) e uma concentração do extrato aquoso (110 mg/mL) foram utilizadas para o tratamento dos cultivos de larvas, realizados em triplicata. Como controle positivo e

negativo foram utilizadas doramectina e água destilada, respectivamente. Os resultados revelaram uma redução superior a 90% do número de larvas infectantes para os diferentes gêneros, nas concentrações de 724,5 a 253,7 mg/mL para o extrato metanólico e baixo percentual de redução (59,87%) para o extrato aquoso, demonstrando que, apenas o extrato metanólico da algaroba apresentou efeito no tratamento *in vitro* de nematódeos gastrintestinais de caprinos.

PALAVRAS-CHAVE: Anti-helmíntico; Caprinos; *Prosopis juliflora*.

EFFECTS OF AQUEOUS AND METHANOL EXTRACTS OF ALGARROBA ON CULTURES OF LARVAE OF GASTROINTESTINAL NEMATODES IN GOATS

ABSTRACT

The aim of this experiment was to evaluate the *in vitro* effects of the aqueous and methanol extracts of the leaves and fruits of *Prosopis juliflora* (Sw) D.C., respectively, on larvae cultures of gastrointestinal nematodes of goats. Six different concentrations of the methanol extract (724.5; 557.3; 428.7; 329.8; 253.7; 195.1mg/mL) and one of the aqueous extracts (110.0mg/mL) were used for the treatment of larvae cultures, in triple assays. Distilled water and doramectin were used to treat cultures

considered to be negative and positive control, respectively. The results revealed a reduction of more than 90% of the infective larvae between the concentrations of 724.5 up to 253.7 mg/mL for the methanol extract and a low percentage of reduction (59.87%) for the aqueous extract. Only the methanol extract of *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. was effective in the *in vitro* treatment of gastrointestinal nematodes of goat.

KEYWORDS: anthelmintic; goats; *Prosopis juliflora*.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade largamente explorada na pecuária brasileira, principalmente na região semi-árida, sendo responsável pela sobrevivência econômica de pequenas propriedades rurais, facilitando a fixação de populações nesta localidade (SOUZA, 2007). O rebanho caprino nacional é estimado em 9.164.421 animais (IBGE, 2009), com detenção de 90% apenas na região Nordeste. Entretanto, várias enfermidades têm limitado o crescimento deste rebanho, destacando-se as helmintoses gastrintestinais, especialmente a haemoncose, responsável por alta morbidade e mortalidade (VIEIRA, 2008).

A resistência desenvolvida pelos nematódeos aos anti-helmínticos comerciais, em decorrência principalmente do seu uso inadequado, tem incentivado a procura de métodos alternativos para o controle de parasitos, incluindo a utilização de medicamentos fitoterápicos (VIEIRA, 2008). Vários relatos sobre atividades farmacológicas de plantas medicinais, como a atividade anti-helmíntica, têm sido documentados em diversas partes do mundo (HYMETE et al., 2005; MARIE-MAGDELEINE et al., 2009; ADEMOLA & ELOFF, 2010).

Dentre as várias plantas com propriedades farmacológicas, *Prosopis juliflora* (algaroba) tem sido intensivamente investigada quanto às suas atividades antibacteriana (SATISH et al., 1999), antifúngica (SHANMUGAM, 2004) e inseticida (NAQVI et al., 1994). Os alcalóides piperidínicos, isolados das folhas (AHMAD & QAZI, 1985) e frutos (BATATINHA, 1997) desta planta, são referidos como os mais importantes compostos farmacologicamente ativos, tendo sido testados em diferentes sistemas biológicos, sendo-lhes atribuídas as atividades terapêuticas conferidas à planta (KANTHASAMY et al., 1989; NAQVI et al., 1994).

Até o momento, nenhum relato científico sobre os possíveis efeitos antiparasitários desta planta foi descrito. O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, os efeitos anti-helmínticos do extrato aquoso das folhas e do extrato metanólico dos frutos de algaroba sobre cultivos de larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais de caprinos, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de tratamentos alternativos no controle de parasitos e na pesquisa de novos princípios ativos de plantas com atividade anti-helmíntica.

MATERIAL E MÉTODOS

As folhas e os frutos de *P. juliflora* foram obtidos de propriedades rurais localizadas nas regiões metropolitanas de Salvador (Bahia) e João Pessoa (Paraíba), respectivamente. As amostras vegetais foram identificadas e armazenadas em exsiccata nº 550 no Laboratório de Botânica Dr. Antônio Nonato Marques na Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA, Salvador, Bahia.

Para obtenção do extrato aquoso, as folhas de algaroba foram secas à temperatura ambiente, trituradas em liquidificador industrial e submetidas a uma extração aquosa sob homogeneização mecânica, por um período de 24 horas. O material obtido foi filtrado, acondicionado em frasco de vidro âmbar, liofilizado e mantido sob congelamento até o momento da realização dos testes.

Na preparação do extrato metanólico, os frutos da planta previamente secos à temperatura ambiente, foram inicialmente submetidos a uma extração hexânica na proporção de 1,5L de hexano/Kg da planta durante um período de 24 horas, para remoção da fração lipofílica, procedendo-se, logo após, à filtração e evaporação do filtrado em rotaevaporador, sendo esse processo repetido três vezes. Em seguida, o resíduo dos frutos foi submetido a uma extração metanólica na proporção de 1,5L de metanol/Kg da planta durante um período de 24 horas, seguido de filtração. Esse processo também foi repetido três vezes e, da mesma forma, o filtrado obtido foi evaporado em aparelho de rotaevaporação à temperatura de aproximadamente 40°C, até obtenção do resíduo, o qual foi acondicionado em frascos âmbar e mantido sob refrigeração até o momento da sua utilização.

A determinação das concentrações dos extratos foi baseada em resultados obtidos de experimentos pilotos, através dos quais se obteve a mais alta e solúvel concentração possível do extrato aquoso (110 mg/mL) e metanólico (724,5 mg/mL). Para o extrato metanólico, a partir desta maior concentração, outras cinco menores foram estabelecidas, utilizando-se um intervalo numérico fixo de 1,3 entre as mesmas, até a obtenção da menor concentração efetiva, sendo testadas 724,5; 557,3; 428,7; 329,8; 253,7; 195,1 mg/mL. Para o extrato aquoso, apenas a mais alta concentração possível de ser obtida (110 mg/mL) foi avaliada, uma vez que a mesma não revelou efeito anti-helmíntico aceitável no estudo piloto.

Caprinos naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais e mantidos na Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia foram utilizados para obtenção de fezes, coletadas diretamente da ampola retal e submetidas individualmente à contagem de ovos por grama de fezes (OPG), segundo TAIRA et al. (2003). As amostras de fezes com OPG maior que 2000 foram misturadas formando um único homogeneizado para realização das coproculturas (UENO & GONÇALVES, 1998).

As diferentes concentrações dos extratos foram testadas em triplicata nos cultivos de larvas constituídos de 2g de fezes, 2g de serragem e 2 mL do extrato e incubadas durante sete dias em estufas a 34°C. Cultivos de larvas foram também tratados com doramectina (Dectomax) na concentração de 0,125 mg/mL e água destilada, representando os controles positivo e negativo, respectivamente. Após o sétimo dia, as larvas infectantes obtidas dos cultivos foram identificadas por gênero (UENO & GONÇALVES, 1998). Todo o delineamento experimental foi repetido três vezes para assegurar a validação dos resultados.

O efeito de cada concentração dos extratos sobre larvas de nematódeos gastrintestinais de

caprinos foi determinado pelo cálculo dos percentuais de redução através do teste de redução de larvas por grama de fezes (VIZARD & WALLACE, 1987).

As diferenças entre as respectivas concentrações dos extratos utilizados foram avaliadas pelo Teste de Variância Univariada, utilizando-se o programa estatístico SPSS (versão 10.0). Devido à grande variação do número de larvas da superfamília *Strongyloidea* observado nas diferentes concentrações testadas, os valores foram submetidos à transformação logarítmica, empregando-se a equação: $y = \log(x + 25)$ (BOX & COX, 1964).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento dos cultivos de larvas de caprinos com o extrato metanólico dos frutos da *P. juliflora* resultou em redução significativa ($p < 0,05$) do número de larvas de cada gênero avaliado em todas as concentrações testadas (Tabela 1). A atividade antiparasitária deste extrato foi refletida sobre o elevado percentual de redução para todos os gêneros de larvas avaliados nas cinco maiores concentrações utilizadas (Tabela 2).

Tabela 1. Média aritmética do número de larvas infectantes dos gêneros *Haemonchus*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*, obtidas de cultivos de larvas de caprinos tratados com extrato metanólico dos frutos de *Prosopis juliflora* (algaroba)

Gênero de larvas	Doramectina (0,125 mg/mL)	Concentrações (mg/mL)						Água destilada
		724,5	557,3	428,7	329,8	253,7	195,1	
<i>Haemonchus</i>	18,3 ^{ab}	3,3 ^a	31,1 ^{ab}	45,6 ^b	302,2 ^c	416,7 ^c	902,3 ^d	6703,3 ^e
<i>Oesophagostomum</i>	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,6 ^a	22,2 ^{ab}	57,8 ^b	180 ^c	1207,8 ^d
<i>Trichostrongylus</i>	1,1 ^a	3,3 ^a	11,1 ^a	18,9 ^a	88,2 ^b	86,11 ^b	183,3 ^c	1113,9 ^d
Total	19,4 ^{ab}	6,7 ^a	42,2 ^{ab}	65,0 ^b	406,7 ^c	560,6 ^c	1225,6 ^d	9025,0 ^e

Letras minúsculas comparam valores nas linhas ($p < 0,05$)

Tabela 2. Percentual de redução do número de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos após tratamento de cultivo de larvas com extrato metanólico dos frutos de *Prosopis juliflora* (algaroba)

Concentrações (mg/mL)	Percentual de redução			
	<i>Haemonchus</i>	<i>Oesophagostomum</i>	<i>Trichostrongylus</i>	Total de larvas
724,5	99,78	99,07	98,75	99,80
557,3	99,58	99,07	98,15	99,63
428,7	99,18	99,03	97,55	99,26
329,8	96,22	97,82	92,09	96,20
253,7	93,50	94,21	90,50	93,46
195,1	85,27	82,80	80,15	84,42
Doramectina	99,63	99,07	98,86	99,72
Controle	0	0	0	0

No tratamento dos cultivos com 110 mg/kg do extrato aquoso das folhas de algaroba observaram-se diferenças significativas do número de larvas referentes aos três gêneros testados e ao total de larvas (Tabela 3). No entanto, este tratamento resultou em um percentual de redução abaixo de 90%, com valores de 60,93; 50,92; 27,11 e 59,87% respectivamente, para as larvas dos gêneros *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Trichostrongylus*

e para o total de larvas (Tabela 4). O efeito anti-helmíntico de uma droga é assegurado quando o percentual de redução do número de larvas é superior a 90% (VERCRUYSSSE et al., 2001). A concentração testada deste extrato correspondeu à mais alta concentração possivelmente solúvel e, devido ao baixo efeito anti-helmíntico, concentrações menores não foram testadas.

TABELA 3. Média aritmética do número de larvas infectantes dos gêneros *Haemonchus*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*, obtidas de cultivos de fezes de caprinos tratados com extrato aquoso das folhas de *Prosopis juliflora* (algaroba)

Gênero de larvas	Doramectina (0,125 mg/mL)	Concentração (mg/mL)	Água destilada
		110	
<i>Haemonchus</i>	0 ^a	1845 ^b	3066 ^c
<i>Oesophagostomum</i>	0 ^a	332 ^b	426 ^c
<i>Trichostrongylus</i>	0 ^a	220 ^b	219 ^b
Total	0 ^a	2597 ^b	3711 ^c

Letras minúsculas comparam valores nas linhas (p<0,05)

TABELA 4. Percentual de redução do número de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos após tratamento de cultivo de larvas com extrato aquoso das folhas de *Prosopis juliflora* (algaroba)

Concentrações (mg/mL)	Percentual de redução			
	<i>Haemonchus</i>	<i>Oesophagostomum</i>	<i>Trichostrongylus</i>	Total de larvas
110	60,93	50,92	27,11	59,87
Doramectina	99,66	97,75	95,46	99,72
Controle	0	0	0	0

O efeito anti-helmíntico *in vitro* observado apenas no tratamento com o extrato metanólico dos frutos da *P. juliflora* pode estar relacionado à possível ação dos alcalóides piperidínicos presentes neste extrato, aos quais têm sido atribuídas as propriedades farmacológicas da planta (AHMAD et al., 1989; KANTHASAMY et al., 1989), sendo a juliflorina considerada como o principal alcalóide (AHMAD & QAZI, 1985), revelando atividades inseticida (NAQVI et al., 1994), antifúngica (KHURSHEED et al., 1986) e anti-bacteriana (AHMAD et al., 1986). Estudos utilizando a fração total de alcalóides da planta ou esses componentes isolados fazem-se necessários para a comprovação dos constituintes químicos responsáveis pela ação anti-helmíntica encontrada neste estudo.

Apesar da inexistência de relatos científicos sobre as propriedades anti-helmínticas da algaroba, resultados de pesquisas têm revelado atividade antiparasitária de plantas que também apresentam alcalóides piperidínicos na sua composição química

(PANTER & KEELER, 1989; TANIGUCHI & OGASAWARA, 2000; MOO-PUC et al., 2007). Esses alcalóides têm sido referidos como os constituintes ativos de maior importância farmacotoxicológica encontrados nas folhas e frutos da algaroba (AHMAD et al., 1989; KANTHASAMY et al., 1989; NAQVI et al., 1994).

Nenhum relato sobre a atividade anti-helmíntica do extrato aquoso da *P. juliflora* foi descrito, embora resultados de estudos demonstrem atividade antifúngica (CHAYA et al., 1979) e antibacteriana (SATISH et al., 1999) para o extrato sem que, no entanto, referência sobre os possíveis constituintes ativos presentes no mesmo e relacionados a tais atividades sejam relatadas.

Considerando-se, ainda, que a concentração testada deste extrato (110 mg/mL), correspondente à mais alta concentração possível de ser obtida, não tenha revelado eficácia sobre os cultivos de larvas de nematódeos gastrintestinais, nenhuma correlação direta com a menor concentração efetiva do extrato

metanólico (329,8 mg/mL) utilizada pôde ser realizada, uma vez que esta última equivale a 2,99 vezes a concentração do extrato aquoso.

CONCLUSÃO

O extrato metanólico dos frutos da *P. juliflora* tem efeito anti-helmíntico *in vitro* sobre larvas de nematódeos gastrintestinais de caprinos, enquanto que o extrato aquoso das folhas desta planta não apresentou tal atividade.

REFERÊNCIAS

- ADEMOLA, I.O.; ELOFF, J.N. In vitro anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. Ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae. **Veterinary Parasitology**, v.169, n.1-2, p.198-203, 2010.
- AHMAD, A.; KHURSHEED, A.K.; SABIHA, Q.; VIQARUDDIN, A. Antibacterial activity of juliflorine isolated from *Prosopis juliflora*. **Planta Medica**, v.52, n.4 p.285-288, 1986.
- AHMAD, A.; KHURSHEED, A.K.; SABIHA, Q.; VIQARUDDIN, A. Antifungal activity of some hydrosoluble *Prosopis juliflora* alkaloids. **Fitoterapia**, v.60, n.1, p.86-89, 1989.
- AHMAD, V.U.; QAZI, S. Studies on the structure of julifloricine. **Journal of the Chemical Society Pakistan**, v.7, n.7, p.347-350, 1985.
- BATATINHA, M.J.M. **Untersuchungen über toxische Einflüsse von *Prosopis juliflora* DC. (algarobeira) auf Zellkulturen sowie auf Pansenfermentation beim rind (in vitro)**. 1997. 189f. Tese (Doutorado)- Aus dem Chemischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Hannover.disponível em <http://library.vetmed.fu-berlin.de/diss-abstracts/99857.html>. Acesso em março 2008.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society, Série B**, v.26, n.2, p.211-243, 1964.
- CHAYA, M.A.S.; REDDY, S.M.; KUMAR, B.P.; REDDY, S.R. Laboratory evaluation of some plants extracts against two pathogenic fungi. **New Botanist**, v.6, n.4, p.171-174, 1979.
- HYMETE, A. ; IVERSEN, T.H.; ROHLOFF, J.; ERKO, B. Screening of *Echinops ellenbeckii* and *Echinops longisetus* for biological activities and chemical constituents. **Phytomedicine**, v.12, n.9, p.675-679, 2005.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Produção da Pecuária Municipal**, v.37, 2009. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/impressao/ppts/0000000222.pdf>, acesso em abril de 2010.
- KANTHASAMY, A.; SUBRAMANIAN, S.; GOVINDASAMY, S. Bacterial and fungicidal effects of *Prosopis juliflora* alkaloidal fraction. **Indian Drugs**, v. 26, n.8, p.390-394, 1989.
- KHURSHEED, A.K.; ARSHAD, H.F.; VIQARUDDIN, A.; SABIHA, Q. In vitro studies of antidermatophytic activity of juliflorine its screening as carcinogen in Samonel/Microsome Test system. **Arzneimittel Forschung Drug Research**, v.36, n.1, p.17-19, 1986.
- MARIE-MAGDELEINE, C.; HOSTE, H.; MAHIEU, M.; VARO, H.; ARCHIMEDE, H. In vitro effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.161, n.1-2, p.99-105, 2009.
- MOO-PUC, R.E.; MENA-REJON, G.J.; QUIJANO, L.; CEDILLO-RIVERA, R. Antiprotozoal activity of *Senna racemosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.415-416, 2007.
- NAQVI, S.N.H.; YASMIN, N.; MAHMOOD, R.A.; NIZAM, S.; AHMAD, V.U.; QAZI, S. Determination of toxicity and effect of juliflorine and Dimilin on fourth instar larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Zeitschrift fuer Angewandte Zoologie**, v.80, n.2, p.155-164, 1994.
- PANTER, K.E.; KEELER, R.E. Piperidine alkaloids of poison Hemlock (*Conium maculatum*). In: CHEEKE, P.R. **Toxicants of plant origin. Volume I – Alkaloids**. Florida: Boca Raton, 1989. p. 109-110.
- SATISH, S.; RAVEESHA, K.A.; JANARDHANA, G.R. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, n.2, p.145-147, 1999.
- SHANMUGAM, V. Efficacy of against storage seedborne fungal microflora of paddy. **Annals of Plant Protection Sciences**, v.12, n.1, p.83-86, 2004.
- SOUZA, W.H. O agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.1, n.1, p.51-58, 2007.
- TAIRA, N.; ANDO, Y.; WILLIAMS, J.C. Supplemental photographs, sketches and laboratory techniques. In: _____. **A color atlas of clinical helminthology of domestic animals**. Amsterdam: Elsevier, 2003. Cap.3. p.114-118.
- TANIGUCHI, T.; OGASAWARA, K. A Diastereocontrolled Synthesis of (+)-Febri-fugine: A Potent Antimalarial Piperidine Alkaloid. **Organic Letters**, v.2, n.20, p.3193-3195, 2000.
- UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4ª ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency. 1998. 150p.
- VERCRUYSSSE, J.; HOLDSWORTH, P.; LETONJA, T.; BARTH, D.; CONDER, G. HAMAMOTO, K.; OKANO, K. International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines. **Veterinary Parasitology**, v.96, n.3, p.171-193, 2001.

VIEIRA, L.S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.2, p.49-56, 2008.

VIZARD, A.L.; WALLACE, R.J. A simplified egg count reduction test. **Australian Veterinary Journal**, v.64, n.4, p.109-111, 1987.

Protocolado em: 02 abr. 2008. Aceito em: 27 jun. 2011.