

**Avaliação da eficácia *in vitro* de extratos vegetais sobre a inibição da migração de larvas infectante de *Haemonchus contortus*<sup>1</sup>**

***In vitro* evaluation of the efficacy of plant extracts on inhibition of the migration of infective larvae of *Haemonchus contortus***

Natalia Janovik<sup>2</sup>, Robert Domingues<sup>3</sup>, Patrício Azevedo dos Santos<sup>4</sup>, Rossana Leitzke Granada<sup>5</sup>, , Alessandro Pelegrine Minho<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Projeto financiado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Macroprograma 2 cadastrado sob nº 02.11.07.006.00.00.

<sup>2</sup> Aluna de Graduação de Medicina Veterinária, Universidade da Região da Campanha-URCAMP, Bagé/RS, Brasil. E-mail: [natalia.janovik@hotmail.com](mailto:natalia.janovik@hotmail.com)

<sup>3</sup> Analista, Embrapa Pecuária Sul, Bagé/RS, Brasil. E-mail: [robert.domingues@embrapa.br](mailto:robert.domingues@embrapa.br)

<sup>4</sup> Aluno de Graduação de Medicina Veterinária, Universidade da Região da Campanha-URCAMP, Bagé/RS, Brasil. E-mail: [patricio.azevedo@hotmail.com](mailto:patricio.azevedo@hotmail.com)

<sup>5</sup> Técnico, Embrapa Pecuária Sul, Bagé/RS, Brasil. E-mail: [rossana.granada@embrapa.br](mailto:rossana.granada@embrapa.br)

<sup>6</sup> Pesquisador, Embrapa Pecuária Sul, Bagé/RS, Brasil. E-mail: [alessandro.minho@embrapa.br](mailto:alessandro.minho@embrapa.br)

**Resumo:** Na ovinocultura, o *Haemonchus contortus* é o parasita de maior importância em regiões tropicais e subtropicais, causando perdas econômicas aos produtores. Na tentativa de encontrar uma alternativa para a resistência anti-helmíntica, foram avaliados extratos vegetais de 15 plantas utilizando-se o Teste de Inibição da Migração Larvar (TIML). Esse teste *in vitro* avalia a eficácia dos extratos vegetais sobre larvas infectantes de *H. contortus*. Os extratos que obtiveram melhores resultados foram os extratos aquosos de acácia negra, alecrim do campo e capimannoni, apresentando inibição máxima de migração (IMM) na concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup> (86,38%), e concentração inibitória para imobilizar 50% das larvas (CI50) em 22,64 mg.mL<sup>-1</sup>, IMM na concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup> (94,35%) e CI50 em 35,44 mg.mL<sup>-1</sup>, IMM na concentração de 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> (55,23%) e CI50 em 51,99 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes extratos possuem um potencial para serem posteriormente testados quanto a sua eficácia *in vivo*. Os demais extratos testados não obtiveram um resultado satisfatório, e não foi possível calcular sua CI 50%. Devido a eficácia dos extratos aquosos ter sido superior à dos extratos metanólicos e hexânicos, acredita-se que as substâncias responsáveis pela inibição da migração das larvas, sejam substâncias polares, pelo fato de sua afinidade com água.

**Palavras-chave:** anti-helmíntico, haemoncose, ovinos, fitoterapia

**Abstract:** In the sheep breeding, *Haemonchus contortus* is the most important parasite in tropical and subtropical regions, causing economic losses to producers. In an attempt to find an alternative for the anthelmintic resistance, it was evaluated plant extracts from 15 species, by larval migration inhibition test (LMIT). This *in vitro* test evaluates the effectiveness of plant extracts on infective larvae of *H. contortus*. The extracts that obtained a better result was the aqueous extracts of wattle, rosemary field and grassannoni, with maximum inhibition of migration (IMM) in the concentration of 100 mg.mL<sup>-1</sup> (86.38%), and inhibition concentration that paralyze 50% of the larvae (IC50) in 22.64 mg.mL<sup>-1</sup>, IMM in the concentration 100 mg.mL<sup>-1</sup> (94.35%) and IC50 in 35.44 mg.mL<sup>-1</sup>, IMM in the concentration 12.5 mg.mL<sup>-1</sup> (55.23%) and IC50 in 51.99 mg.mL<sup>-1</sup>, respectively. These extracts have the potential to be posteriorly tested for *in vivo* efficacy. The other tested extracts did not obtain a satisfactory result, and it was not possible to calculate their IC50%. Due effectiveness of the aqueous extracts was higher than of the methanol and hexane extracts, it is believed that substances responsible for the inhibition of migration of larvae, are polar substances, because of their affinity with water.

**Keywords:** anthelmintic, haemoncosis, ovine, phytotherapy

### Introdução

O uso indiscriminado de medicamentos anti-helmínticos tem acarretado no aparecimento de isolados resistentes às drogas disponíveis no mercado. Na tentativa de minimizar estabelecimento da resistência e controlar satisfatoriamente a haemoncose, neste trabalho foram avaliados extratos vegetais (frações aquosa, metanólica e hexânica) com o objetivo de determinar seu efeito anti-helmíntico sobre larvas infectantes (L3) de *H. contortus*. O Teste de Inibição da Migração Larvar (TIML) que simula a fase em que a larva infectante penetra no abomaso (início do estabelecimento da infecção) foi utilizado para avaliar o efeito *in vitro* dos extratos vegetais.

### Material e Métodos

Foram avaliados extratos obtidos de 15 plantas: acácia negra (*Acacia mearnsii*), alecrim do campo (*Braccharis dracunculifolia*), aroeira cinzenta (*Schinus lentiscifolius*), capimannoni (*Eragrostis plana*), caraguatá (*Bromelia pinguin*), carqueja (*Braccharis trimera*), carvalho (*Quercus robur*), chirca (*Eupatorium pinnatifidum*), cornichão (*Lotus cornicalatus*), embira (*Daphnopsis fasciculata*), erva lanceta (*Solidago chilensis*), maria-mole (*Senecio brasiliensis*), picão-preto (*Bidens pilosa*), pitangueira (*Eugenia uniflora*) e trevo vermelho (*Trifolium pratense*); e três formulações industriais de casca de acácia: Biotan®, SB BPS® e Seta Sun®. Os extratos aquosos foram obtidos a partir de mistura da planta *in natura*, seca a 40 °C e moída, com água deionizada sobre um agitador magnético com aquecimento a 40 °C, durante 30min. As frações metanólicas e hexânicas foram obtidas por extração por refluxo durante 8 horas seguido de rotaevaporação para a remoção do solvente. Para realização do TIML as larvas em estágio L3 foram desembainhadas e quantificadas; concomitantemente há o preparo das diluições seriadas do extrato a ser avaliado. Em placas de 24 poços são adicionados solução larvar (contendo aproximadamente 150 L3) e o extrato a ser avaliado (cada diluição teste foi avaliada em quadruplicata). Passadas 24h em estufa tipo B.O.D. à temperatura de 28 °C, a solução teste (larvas + extrato) é instilada em outro poço contendo uma peneira com malhas com abertura de 25 µm. Decorridas outras 24h é realizada a lavagem das peneiras e, com o auxílio de um microscópio óptico invertido, é realizada a determinação do número de L3 que migraram (larvas viáveis) ou que ficaram retidas na peneira (larvas mortas ou inviáveis). As larvas inviáveis não apresentariam potencial de infecção *in vivo*. A partir dos dados obtidos, foi calculada a porcentagem de inibição de migração, sendo que os valores obtidos nos tratamentos foram corrigidos pelos valores obtidos no controle negativo, de acordo com a forma proposta por Abbott (1925). Com os dados corrigidos, foi utilizado o software GraphPad Prism 6.0 para elaborar a curva dose resposta e, assim, determinar a concentração do extrato que causa efeito inibitório médio (CI50) e CI90, quando possível.

### Resultados e Discussão

Dentre os extratos testados, os que obtiveram resultados mais expressivos foram os extratos aquosos de acácia negra, alecrim do campo e capimannoni, com inibição máxima de migração (IMM) na concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup> (86,38%), e CI50 em 22,64 mg.mL<sup>-1</sup>; IMM na concentração de 100 mg.mL<sup>-1</sup> (94,35%) e CI50 em 35,44 mg.mL<sup>-1</sup>; IMM na concentração de 12,5 mg.mL<sup>-1</sup> (55,23%) e CI 50% em 51,99 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Na Tabela 1, os resultados dos extratos nos quais foi possível calcular a CI50 e CI90.

Tabela 1- Resultados do teste de inibição da migração larvar

Planta*	Extrato	CI50 mg.mL <sup>-1</sup>	R2 da Curva	CI90 mg.mL <sup>-1</sup>	Inibição Máxima	
					Concentração mg.mL <sup>-1</sup>	%
Acácia Negra	Aquoso	22,64	0,9372	84,06	100	86,38
	Aquoso	35,44	0,9777	95,73	100	94,35
Alecrim do Campo	Metanólico	16,70	0,1866	-	50	11,02
	Hexânico	16,58	0,9289	-	50	40,79
Aroeira Cinzenta	Aquoso	42,92	0,5774	-	100	14,39
Biotan (Seta)	Aquoso	13,00	0,3059	-	50	34,74
Capim Annoni	Aquoso	51,99	0,577	-	12,5	55,23
Caraguatá	Aquoso	22,78	0,4216	-	50	29,54
Carvalho	Aquoso	31,85	0,5566	-	100	25,44
Pitangueira	Hexânico	71,36	0,1022	-	12,5	14,84

\*Para os demais extratos testados não foi possível obter a CI50.

Na Figura 1 podemos observar a curva dose-resposta dos extratos aquosos de acácia negra e alecrim do campo, conforme a dose do extrato aumentava, o efeito passava a ser mais expressivo. Já na Figura 2 podemos observar que esse resultado não seguiu a lógica do efeito fármaco receptor, onde o aumento da dose acarreta aumento na eficácia do princípio ativo, esse fato pode ter sido acarretado pela competição entre as diversas moléculas presentes no extrato, as quais agiram em antagonismo, uma vez que em menores concentrações o efeito foi mais significativo. Os compostos antagonistas podem, em altas concentrações, se ligar aos receptores do parasito impedindo o efeito deletério das moléculas de interesse (composto vegetal com efeito anti-helmíntico).

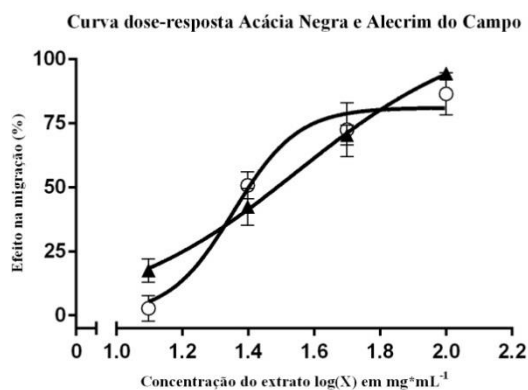


Figura 1 curva dose-resposta da inibição da migração larvar dos extratos aquosos de acácia negra (○) e alecrim do campo (▲).

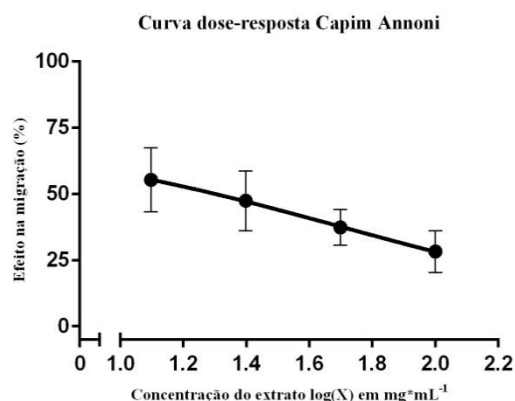


Figura 2 curva dose-resposta da inibição da migração larvar do extrato aquoso de capim annoni.

Devido à eficácia dos extratos aquosos ter sido superior a dos extratos metanólicos e hexânicos, acredita-se que as substâncias responsáveis pela inibição da migração sejam substâncias polares.

### Conclusões

O presente trabalho demonstra a potencial eficácia dos extratos de acácia negra e alecrim do campo na inibição da migração das larvas infectantes de *H. contortus*. Outros estudos devem ser realizados, tais como, avaliar qual a molécula específica tem o poder de inibir a migração, utilização de outros solventes para obtenção de outras frações desses extratos e ainda, avaliar a possível toxicidade destes extratos *in vivo*.

### Agradecimentos

À Embrapa pelo financiamento do projeto. Ao CNPq pela bolsa PIBIC.

### Literatura citada

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265-266.