
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OVICIDA E LARVICIDA DE DEZ EXTRATOS VEGETAIS ANTE *Ancylostoma* spp

Irene de Aguiar Santos¹, Fernando Júlio Miranda Azevedo Souza¹, Gokithi Akisue¹,
Francine Alves da Silva Coelho² e Matheus Diniz Gonçalves Coelho¹

RESUMO

Diversos inquéritos coproparasitológicos têm destacado *Ancylostoma* spp. como sendo a espécie de helmintos que mais frequentemente parasita o cão doméstico, podendo gerar uma série de danos ao hospedeiro como irritabilidade, anorexia, anemia severa e morte. Os ancilostomídeos são enteroparasitos que desenvolvem uma parte do seu ciclo de vida no solo, tratando-se de um curto período de maturação de ovos e eclosão e evolução de larvas. É fundamental que esses dois processos ocorram para que o parasito possa evoluir para a fase infectante em seus hospedeiros. No presente trabalho, objetivou-se avaliar, *in vitro*, a propriedade ovicida e larvicida de extratos vegetais de plantas tóxicas coletadas na região do Vale Paraiba ante a *Ancylostoma* spp. Foram obtidos extratos hidroalcoólicos de dez plantas pelo método de Soxhlet, que foram concentrados por evaporação do solvente, sendo a concentração final do extrato ajustada para 10% do extrato bruto. Amostras fecais de cães naturalmente infectados foram utilizadas, das quais foram purificados ovos de ancilostomídeos e, em paralelo, procedeu-se à cultura de larvas pelo método de Harada-Mori. Das plantas avaliadas, quatro apresentaram resultados promissores: *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), *Nerium oleander* L. (Apocynaceae), *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) e *Brugmansia suaveolens* Willd. (Solanaceae). Merecem destaque as duas últimas, pois apresentaram 100% de atividade larvicida na diluição de 12,5mg/mL, demonstrando, desse modo, o potencial da aplicabilidade destes extratos na descontaminação ambiental no que diz respeito ao controle de larvas de *Ancylostoma* spp.

DESCRITORES: Ancylostomidae; extratos vegetais; larvicida; ovicida.

1 Curso de Farmácia, Faculdade de Pindamonhangaba (FAP), Brasil.

2 Departamento de Biologia, Instituto Básico de Biociências, Universidade de Taubaté (UNITAU), Brasil.

Endereço para correspondência: Matheus Diniz Gonçalves Coelho, Rua Ari Ferreira da Silva, 101, Jardim Continental I, Taubaté, SP, CEP 12092-816, Brasil. E-mail: matheusdgc@yahoo.com.br

Recebido para publicação em: 26/11/2012. Revisto em: 27/5/2013. Aceito em: 28/6/2013.

ABSTRACT

Evaluation of ovicidal and larvicidal activity of ten plant extracts against *Ancylostoma* spp.

Several investigations have highlighted coproparasitological *Ancylostoma* spp. as the helminth species that most frequently parasitize the domestic dog, causing possible damage to the host such as irritability, anorexia, severe anemia and death. Hookworms are intestinal parasites that spend part of their life cycle in the soil, with short periods for egg hatching and larval maturation. It is essential that these two processes occur, so that the parasites may reach their infective stage. The present study aimed to evaluate the *in vitro* ovicidal and larvicidal properties of extracts from toxic plants collected in the Paraíba Valley region, Brazil, against *Ancylostoma* spp. Hydroalcoholic extracts were obtained from 10 plants, by the Soxhlet method, concentrated by solvent evaporation, and the final concentration of extract was adjusted to 10% of the crude extract. Fecal samples from naturally infected dogs were used, from which hookworm eggs were purified, and in parallel culture of larvae was performed using the method of Harada-Mori. Between the plants evaluated, four showed promising results, namely: *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), *Nerium oleander* L. (Apocynaceae), *Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) and *Brugmansia suaveolens* Willd. (Solanaceae), particularly the last two, which showed 100% larvicidal activity at a dilution of 12.5mg/ml, thereby demonstrating the potential use of these extracts for environmental decontamination and the control of *Ancylostoma* spp. larvae.

KEY WORDS: Hookworms; plant extracts; eggs; larvae.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O cão doméstico (*Canis familiaris*) tem sido amplamente difundido como animal de estimação e traz benefícios para a espécie humana. Entretanto, diversos fatores relacionados ao comportamento desse animal o tornam extremamente susceptível a infecções por uma ampla quantidade de patógenos. Entre os helmintos, diversos inquéritos coproparasitológicos têm destacado os nematoides da família Ancylostomidae que, frequentemente, geram uma série de danos ao hospedeiro canino como o desenvolvimento de anemia severa, irritabilidade, perda de peso e morte (9).

Cabe ressaltar que, para que os ancilostomídeos infectem um hospedeiro, é necessário que uma parte de sua evolução ocorra no solo, local onde os cães costumam defecar e onde ovos desse parasito encontram condições favoráveis para que haja eclosão da larva de primeiro estágio (L1 rabditoide), que irá evoluir para o terceiro estágio (L3 filarioide), no qual esta passa a ser infectante de um novo hospedeiro (14).

Em razão da elevada contaminação ambiental propiciada pelos cães e da reinfecção decorrente de maus hábitos de higiene e alimentação desses animais, uma das medidas profiláticas mais importantes é a adoção do tratamento antiparasitário. Entretanto, apesar da grande disponibilidade de medicamentos alopáticos para este fim, há uma clara dificuldade em combater a ancilostomíase canina. Isso ocorre principalmente por causa da contaminação do meio ambiente provocada por fezes e da grande quantidade de cães errantes que, raramente, são tratados e acabam difundindo larvas e ovos deste helminto (5, 15).

Por outro lado, o tratamento com os anti-helmínticos disponíveis no mercado requer administração em várias doses e uma série de repetições ao longo da vida do animal. Este longo processo faz com que o tratamento seja negligenciado ou abandonado, ou, por outro lado, acarreta o desenvolvimento de resistência em virtude do tratamento abusivo em consequência da constante reinfecção do animal (17).

O estudo de extratos de plantas com atividade parasiticida também tem trazido grandes perspectivas para o controle da ancilostomíase, apesar das poucas evidências de eficácia antiparasitária da maioria das plantas estudadas até o presente momento. No entanto, alguns compostos provenientes do metabolismo dessas plantas, mormente metabólitos secundários, dentre os quais, alcaloides, glicosídeos e taninos, têm demonstrado atividade antiparasitária dose-dependente (7, 18).

Wolpert et al. (2008) observaram que alguns extratos de plantas provenientes do Haiti apresentaram atividade inibitória contra larvas infectantes de *Ancylostoma caninum*, interferindo em mecanismos fisiológicos envolvidos na sua alimentação. Este achado demonstra a importância do desenvolvimento de pesquisas em fitoquímica que levem ao incremento de novos medicamentos e saneantes úteis para o controle da transmissão desta parasitose.

No presente trabalho, objetivou-se avaliar, *in vitro*, a atividade ovicida e larvicida de extratos hidroalcoólicos de dez plantas coletadas na região do Vale do Paraíba ante ovos e larvas de *Ancylostoma* spp. obtidos de cães naturalmente infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas dez espécies vegetais para a realização da presente pesquisa: Arruda (*Ruta graveolens* L. (Rutaceae) – G. Akisue 042), Onze-horas (*Portulaca grandiflora* Hook. (Portulacaceae) – G. Akisue 044), Alamanda (*Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae) – G. Akisue 041), Espirradeira (*Nerium oleander* L. (Apocynaceae) – G. Akisue 040), Maravilha (*Mirabilis jalapa* L. (Nyctaginaceae) – G. Akisue 045), Trombeteira (*Brugmansia suaveolens* Willd. (Solanaceae) - G. Akisue 030 & L.M.L. Cardoso), Coroa-de-Cristo (*Euphorbia milii* var. *splendens* Des Moul. (Euphorbiaceae) – G. Akisue 038), Picão Preto (*Bidens pilosa* L. (Asteraceae) – G. Akisue 039), Comigo-ninguém-pode (*Dieffenbachia picta* Schott (Araceae) G. Akisue 043) e Mamona (*Ricinus communis* (Euphorbiaceae) L. – G. Akisue 046). O critério de seleção dos vegetais foi baseado em dados científicos consagrados na literatura, segundo os quais estes apresentam toxicidade para insetos ou outros organismos (12).

Para confirmação da identidade botânica, foram depositadas exsicatas no herbário SPF da Universidade de São Paulo, cujos respectivos números estão citados acima após o nome científico de cada espécie avaliada.

Para obtenção dos extratos, as partes aéreas de cada vegetal foram processadas na forma de *mix* (folhas, flores e talos), de modo que se obtivesse um

extrato para cada espécie. O material vegetal coletado foi processado no laboratório de Farmacognosia (LAFAPLAN) da Faculdade de Pindamonhangaba.

Após secagem em estufa a 45° C e pulverização em moinho de café elétrico (Cuisinart®), foram preparados extratos alcoólicos, utilizando-se álcool etílico (etanol 70° GL) como líquido extrator, pelo método de Soxhlet, segundo as normas da Farmacopeia Brasileira, em sua quinta edição. O extrato alcoólico obtido foi concentrado em aparelho de rotavapor por evaporação do solvente, com obtenção do extrato bruto, que, por sua vez, foi diluído em água destilada para obter uma concentração de 10% (m/v), sendo este denominado de extrato a 10%.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Pindamonhangaba, sendo divididos em duas etapas. A primeira consistiu em uma triagem preliminar das plantas em relação às atividades larvicida e ovicida, quando os extratos foram testados em duplicata e em três diferentes diluições (50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL).

Nesta triagem preliminar para realização do teste ovicida, ovos de *Ancylostoma* spp. foram obtidos após seleção de cães naturalmente infectados, sendo purificados por meio de modificação do método de Sheather's (centrífugo-flutuação a 1.600 rpm/minuto em solução saturada de sacarose d=1.2), com posterior coleta de 2 mL do sobrenadante e lavagens sucessivas com água destilada (por centrifugação a 1.600 rpm/5 minutos) (11).

Após a purificação dos ovos, foi preparada uma suspensão contendo aproximadamente 1.500 ovos/ mL, sendo esta aliqüotada para se obter 5mL para cada diluição dos extratos avaliados, os quais foram transferidos para tubos de centrifuga (tubos Falcon) com capacidade para 15mL.

Foram, então, adicionados volumes dos extratos a 10% de modo que permitissem submergir os ovos nas três diferentes diluições avaliadas (50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL), tendo permanecido em contato com estes por 48 horas, em temperatura ambiente (aproximadamente 28° C). Foram realizadas três leituras: 24 e 48 horas após o início do experimento e uma avaliação complementar após uma semana de submersão nos extratos citados. Para cada leitura, foram confeccionadas lâminas contendo uma alíquota de 20µL, com observação e avaliação de 30 ovos, com uso de microscópio óptico nos aumentos de 100x e 400x para a análise da eficácia do extrato vegetal no que diz respeito à evolução e viabilidade dos ovos. Foram considerados viáveis aqueles que se apresentaram intactos e com presença de blástula ou larva formada e inviáveis os ovos eventualmente rompidos ou com destruição do embrião. Cabe ressaltar que, para assegurar critérios de comparação e observar a evolução dos ovos, foram avaliados dois grupos de controle, ou seja, sem a adição de extrato.

Para realização do teste larvicida, foi desenvolvido o método de Harada-Mori para cultura de larvas de Ancylostomidae, utilizando-se amostras fecais de cães naturalmente infectados (11). Após cultura, foi preparada uma suspensão contendo, aproximadamente, 1.500 larvas rãbitoides/mL, sendo aliqüotadas de modo que se obtivessem 5 mL para cada diluição dos extratos

avaliados, os quais foram transferidos para tubos de centrífuga (tubos Falcon) com capacidade para 15 mL. Foram, então, adicionados volumes dos extratos a 10% de modo que permitissem submergir as larvas nas três diferentes diluições avaliadas (50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL), tendo permanecido em contato com estas por 48 horas em temperatura ambiente (aproximadamente 28° C). Dessa forma, foi possível assegurar critérios de comparação e observar a viabilidade das larvas e avaliar um grupo de controle, ou seja, sem a adição de extrato.

A partir do contato das larvas com os diferentes extratos, a cada 24 horas foi confeccionada uma lâmina de cada tubo contendo alíquotas de 20µL, cada uma, e realizada a leitura no microscópio nos aumentos de 100x e 400x, com observação de 20 larvas rabaditoides para a análise da eficácia do extrato vegetal, no que diz respeito à mortalidade, que foi determinada por observação de desembainhamento ou ausência de motilidade. Foram considerados ativos os princípios que induziram 100% de morte e parcialmente ativos os que tiveram mortalidade inferior.

Após a etapa de triagem preliminar, as plantas que apresentaram atividade larvicida ou ovicida foram reavaliadas em teste complementar, porém utilizando-se a diluição máxima que apresentou atividade satisfatória (12,5 mg/mL), bem como quatro tubos para cada diluição máxima e quatro grupos de controle para avaliar, estatisticamente, diferenças entre as médias de atividade obtidas.

Os resultados encontrados foram avaliados conforme as características da distribuição amostral. Foram utilizados testes paramétricos (ANOVA) e não paramétricos (Kruskall-Wallis), empregados de acordo com a normalidade dos resultados, ao nível de significância de 5%, e para avaliar diferenças entre médias, o teste de Tukey ou o teste de Student, Newman, Keuls, utilizando-se como ferramenta de apoio o *software* BIO ESTAT 5.0.

RESULTADOS

No teste preliminar de atividade larvicida, foi possível observar que, dentre as dez espécies avaliadas, quatro apresentaram atividade larvicida nas diluições de 50 mg/mL, 25 mg/mL e 12,5 mg/mL, a saber, *Nerium oleander*, *Allamanda cathartica*, *Mirabilis jalapa* e *Brugmansia suaveolens*, já que induziram mortalidade em 100% das larvas (Tabela 1).

Após a realização do teste complementar, dentre os extratos vegetais supracitados, apenas dois foram considerados ativos na concentração de 12,5 mg/mL, já que induziram 100% de mortalidade nas larvas de Ancylostomidae – *Mirabilis jalapa* e *Brugmansia suaveolens* –, o que difere significativamente em relação ao grupo de controle ($p < 0,001$) (Tabela 2).

Com relação ao teste ovicida, nenhum dos extratos apresentou atividade ante a Ancylostomidae nas diluições avaliadas no presente trabalho, já que todos os ovos evoluíram com formação de larva, da mesma maneira que ocorreu com os grupos de controle.

Tabela 1. Triagem preliminar da atividade larvicida de extratos hidroalcoólicos de 10 plantas tóxicas (C=12,5 mg/mL) frente a larvas de *Ancylostoma* sp. obtido de cães naturalmente infectados (Pindamonhangaba, 2012).

Espécie	Nº de óbitos	Resultado
<i>Ruta graveolens</i>	16/20	Parcialmente ativo
<i>Portulaca grandiflora</i>	17/20	Parcialmente ativo
<i>Allamanda cathartica</i>	20/20	Ativo
<i>Nerium oleander</i>	20/20	Ativo
<i>Mirabilis jalapa</i>	20/20	Ativo
<i>Brugmansia suaveolens</i>	20/20	Ativo
<i>Euphorbia milii</i>	10/20	Parcialmente ativo
<i>Bidens pilosa</i>	17/20	Parcialmente ativo
<i>Dieffenbachia picta</i>	18/20	Parcialmente ativo
<i>Ricinus communis</i>	14/20	Parcialmente ativo
controle	0/20	-

Tabela 2. Avaliação complementar da atividade larvicida de extratos vegetais frente a *Ancylostoma* sp. na concentração de 12,5 mg/mL (v/v)

Extratos vegetais	tubo 01		tubo 02		tubo 03		tubo 04		Total	
	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V
<i>Allamanda catártica</i>	21	9	25	5	24	6	24	6	82,5%	17,5%
<i>Nerium oleander</i> L	27	3	28	2	27	3	27	3	90,83%	9,17%
<i>Mirabilis jalapa</i>	30	0	30	0	30	0	30	0	100%*	0%
<i>Brugmansia suaveolens</i>	30	0	30	0	30	0	30	0	100%*	0%
Controle	0	30	0	30	0	30	0	30	0%	100%

M – larvas mortas; L – Larvas vivas;

* diferença significativa (p=0,0009) ANOVA de Kruskal-Wallis/ Student-Newman-Keuls

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

São escassos os trabalhos que avaliam ou demonstram atividade antiparasitária de plantas *in vitro* ante as espécies da família Ancylostomidae. Grande parte das pesquisas é mais comumente direcionada para a avaliação de atividade de fungos nematófagos, dentre os quais *Pochonia chlamydsoporia* e fungos do gênero *Pleurotus* que, em sua maioria, produzem proteases capazes de destruir ovos de nematoides (2, 4).

Um fator que limita a prevenção da transmissão desses parasitos através do uso de extratos vegetais, no que concerne à propriedade ovicida, está relacionado com a composição química do envoltório dos ovos. Este é extremamente resistente, o que hipoteticamente torna necessário para este fim o uso de substâncias com propriedade lipolítica ou proteolítica, conforme se tem demonstrado ao avaliar a atividade ovicida de extratos brutos enzimáticos de fungos (2).

Desse modo, a busca por substâncias com propriedades larvicidas consiste em uma alternativa viável, haja vista a maior susceptibilidade das larvas à ação

destrutiva de componentes químicos, já que, nesta forma evolutiva, não mais se encontram protegidas pelo envoltório do ovo.

Alguns extratos vegetais têm sido amplamente testados no que diz respeito à atividade larvicida nos nematoides de pequenos ruminantes, dentre os quais *Haemonchus contortus*, um parasito geohelminto que, assim como os ancilostomídeos, tem como condição essencial para transmissão, eclosão de ovos e evolução das larvas no meio ambiente. Difere apenas no seu mecanismo de transmissão, visto que, neste caso, as larvas precisam ser ingeridas pelo hospedeiro, ao passo que, na ancilostomíase, a transmissão ocorre principalmente por penetração transcutânea (4, 11).

De acordo com Oliveira et al. (2011), atualmente os compostos ativos de vegetais têm sido amplamente estudados para o controle de parasitos intestinais, destacando-se os taninos, que são os metabólitos secundários mais encontrados em plantas.

Desde tempos remotos os metabólitos secundários de vegetais têm sido utilizados no controle de parasitismo em diversas regiões do mundo, principalmente os taninos condensados, que são capazes de reduzir a eclosão, o desenvolvimento, a motilidade e o desembainhamento larvar de nematoides (1, 8).

Em um estudo de revisão bibliográfica, Nery et al. (2009) destacaram alguns extratos vegetais com propriedade larvicida em *H. contortus*, demonstrando que plantas, em cuja composição fitoquímica continham taninos, apresentaram elevado potencial de inibição da motilidade e destruição de bainha das larvas, dentre as quais *Chenopodium ambrosioides* (3,3 µg/mL), *Cymbopogon citratus* (224 mg/mL) e *Digitaria insularis* (355 mg/mL).

Muito embora dentre os vegetais estudados no presente trabalho, apenas um deles apresente taninos em sua composição fitoquímica – *Nerium oleander* – a significativa atividade larvicida que os extratos apresentaram na concentração de 12,5 mg/mL demonstra o potencial de outros componentes presentes nos vegetais avaliados neste trabalho. Entre esses outros destacam-se os alcaloides (*Brugmansia suaveolens*, *Nerium oleander*), glicosídeos cardiotônicos (*N. oleander*) terpenoides e flavonoides (*Allamanda cathartica*) no que diz respeito à profilaxia de parasitoses intestinais por meio da destruição ou inviabilização de larvas presentes no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

1. Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F, Coop RL. Effects of short term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Rec* 146: 728-732, 2000.
2. Braga FR, Araujo JM, Silva AR, Araújo JV, Carvalho RO, Soares FEF, Queiroz JH de, Gênier HLA. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 116-118, 2011.
3. Carvalho RO. Controle Biológico de *Ancylostoma* spp. e de *Toxocara canis* por fungos Nematofagos. Viçosa, MG [Tese de Doutorado em Medicina Veterinária-UFV], 2010.

4. Carvalho CO de. Eficácia de extratos vegetais em nematódeos parasitas: avaliação *in vitro* em *Haemonchus contortus* e avaliação *in vivo* em *Strongyloides venezuelensis*, Botucatu [Dissertação de Mestrado em Biologia Geral e Aplicada-UNESP], 2011.
5. Capuano DM; Rocha GM. Ocorrência de parasitas com potencial zoonótico em fezes de cães coletadas em áreas públicas do Município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev Bras Epidemiol* 9: 81-86, 2006.
6. Farmacopéia Brasileira – 5ª edição.
7. Gilthorpe JB; Athanasiadou S; Thamsborg SM. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol* 139: 308-320, 2006.
8. Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol* 22: 253-261, 2006.
9. Labruna MB, Pena HFJ, Pena, Souza SLP, Pinter A, Silva JCR, Ragozo AMA, Camargo LMA, Gennari, SM. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do Município de Montenegro, Rondônia. *Arq Inst Biol* 73: 183-193, 2006.
10. Nery OS, Duarte ER, Martins ER. Eficácia de plantas para o controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. *Rev Bras Pl Med* 11:330-338, 2009.
11. Neves DP. *Parasitologia humana*. Atheneu. São Paulo, 2010.
12. Oliveira BR, Godoy SAP, Costa FB. *Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes*. Ver curiosidades, São Paulo, 2003.
13. Oliveira LMB de, Bevilaqua CML; Morais SM de, Vasconcelos ALFC, Macedo ITF. Plantas taniníferas e o controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Cienc Rural* 41: 1967-1974, 2011.
14. Rey L. *Parasitologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
15. Salb AL, Barkema HW, Elkin BT, Thompson RCA, Whiteside DP, Black RB, Dubey JP, Kutz SJ. Dogs as sources and sentinels of parasites in humans and wildlife, Northern Canada. *Emerg Infect Dis* 14: 60-63, 2008.
16. Santos FAG, Yamura MH, Vidotto O, Camargo PL de. Ocorrência de parasitos gastrintestinais em cães (*Canis familiaris*) com diarreia aguda oriundos da região metropolitana de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Ciênc Agrar* 28: 257-268, 2007.
17. Stull JW, Carr AP, Chomel BB, Berghaus RD, Hird DW. Small animal deworming protocols, client education and veterinarian perception of zoonotic parasites in western Canada. *Can Vet J* 48: 269-276, 2007.
18. Wolpert BJ, Beauvoir MG, Wells EF, Hawdon JM. Plant vermicides of Haitian Vodou show *in vitro* activity against larval hookworm. *J Parasitol* 94: 1155-1160, 2008.