

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIHelmíntica DO EXTRATO ALCOÓLICO DA TORTA DE NEEM

DIAS DE CASTRO, Luciana Laitano¹; CAPELLA, Gabriela de Almeida¹; BERNE, Natália¹; CATTO, João²; BERNE, Maria Elisabeth Aires Berne^{*1}

1 Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia – UFPel

2 Embrapa Gado de Corte, Campo Grande - MS

*bernemea@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O aumento da eficiência da produção de alimentos e potencializou-se com o desenvolvimento e transferência, principalmente na área da saúde animal. A saúde extensiva territorial é uma favorável e a produção de um alto potencial para tornar-se um importante produtor. Entre os principais problemas que acometem os ovinos e que limitam consideravelmente o aproveitamento econômico das helmintoses gastrintestinais (BUENO et al., 2002). O comprometimento da produção ocorre em decorrência da perda de peso, anemia e em casos severos, morte do animal (ATHANASIADOU & KYRIAZAKIS, 2004). Entre os nemátodos gastrintestinais de ovinos destaca-se o *Haemonchus contortus* devido à alta patogenicidade (STRAIN & STEAR, 2001) e resistência a maior parte dos medicamentos utilizados no seu controle.

A administração de antihelmínticos é a principal medida de controle adotada, para prevenir os prejuízos causados pelo parasitismo (ILLER & HOROHOV, 2006). Entretanto, uma das consequências do uso de fármacos foi o surgimento de nemátodos resistentes, que se disseminou mundialmente em ovinos (JACKSON & COOP, 2000; KAPLAN, 2004). Esse quadro tem motivado pesquisadores de diferentes regiões a buscar outras estratégias de controle que viabilizem a produção de pequenos ruminantes. A utilização de medicamentos pode representar uma alternativa para o controle das parasitoses gastrintestinais, apresentando a vantagem de serem mais ambientalmente aceitos (COSTA et al., 2008).

O Neem é uma planta tropical que apresenta grande importância para a saúde e, quando empregado com critério não produz efeitos tóxicos para os seres humanos e para o meio ambiente. Através das sementes a planta produz o alcaloide Azadiractina, extraída da semente do neem em pó, o qual é utilizado na fitoterapia. A ingestão apresenta alta toxicidade, podendo ser rapidamente absorvida e causar danos hepáticos (GREGORIO & KRITICOS, 1998). Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antihelmíntica do extrato alcoólico a partir da torta de Neem.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS no período de março a maio de 2011. Para a avaliação da atividade antihelmíntica foram utilizados os seguintes materiais:

artimintico do extrato alcohólico da erva e dos testes de edibilidade dos ovos e de migração das larvas (L3).

Obtenção do extrato alcohólico da erva

Para preparar o extrato foi colocado em um recipiente com tampa 150g da erva de Neem e 500 mL de álcool, após 24 horas a gástrica material foi adicionado na recipiente com tampa, a parte sólida adicionou-se novamente 500mL de álcool 96 -se o procedimento anterior. O conteúdo filtrado nas duas etapas, aproximadamente colocado no evaporador rotativo a pressão mmHg, a temperatura de 45°C, com velocidade de rotação suficiente para a contagem de material uniforme. Após 23 minutos -se 11,30g de extrato alcohólico da erva

Obtenção dos ovos

Os ovos foram obtidos através de fezes de apenas dois ovinos com infecção mista por nematóides e com a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) acima de 2000, para realizar este teste de Gordon & Whitlock (1939). As fezes foram amassadas e destilada, em seguida foram passadas através de uma grade de 0,2mm, foram recuperados obtidos de 25µm de diâmetro

Obtenção das larvas de estágio (L3)

As larvas de terceiro estágio foram obtidas a partir de coproculturas segunda a técnica de Roberts & O'Sullivan (1950) das fezes coletadas diretamente da ampola retal dos dois ovinos que apresentavam OPG acima de 2000.

Teste de eclosão dos ovos

Este teste foi realizado em placa de Petri (Costar - Corning Incorporated, NY). Em cada poço foi colocado aproximadamente o extrato testado nas concentrações de 25%, 12,5% e 6,25% triplicada. Para controle positivo foi utilizado albenidazol 0,2mg/mL e para controle negativo foi adicionado água destilada a 27°C por 48h, após este período foi feita a contagem de primeiro estágio eclosão observada por microscópio

Teste de migração das larvas de terceiro estágio

Foram utilizadas larvas de terceiro estágio com motilidade de 100%. Aproximadamente 100 larvas foram adicionadas em tubos tipo *ependorf* de 1,5mL, com extrato nas concentrações de 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, para o controle positivo foi utilizado levamisol 0,3mg/mL e para o controle negativo utilizou-se água destilada a 27°C por 24 horas para atuação sobre as larvas. Após este período das larvas foram adicionadas três vezes com água destilada, através da centrifugação. Todo o conteúdo do tubo (1mL) foi transferido para placa de microcultivo que estavam acopladas a placa de microcultivo. Esta placa foi incubada a 27°C por quatro horas, após este período foram feitas as observações

quantificado o número de larvas que migrar. Técnica descrita por Hubert & Kerbouef (1992).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando o teste de eclodibilidade observou-se que o controle positivo e os extratos nas concentrações de 2,52%, 0,625% e 0,3125% apresentaram 100% de inibição já no controle negativo todos os ovos semelhantes foram relatados por Pessoa et al. (2001) que observaram atividade ovicida *in vitro* de óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum gratissimum*, *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri*, bem como da *azadiractina*, princípio ativo da *Azadirachta indica* (Neem) sobre *H. contortus* de caprinos.

Já em estudos realizados por Costa et al. (2006) e Chagas & Vieira (2007) a atividade antihelmíntica de folhas secas de *Azadirachta indica*, administradas por via oral em ovinos, não apresentaram efeito contra os parasitos gastrintestinais. Entretanto, os mesmos autores ressaltam que os estudos da ação antihelmíntica do Neem devem se concentrar na ação biológica do óleo da semente, que possui maior quantidade de *azadirachta* nas folhas secas.

Em relação a o teste de eclodibilidade das larvas de *H. contortus* observou-se que o controle negativo, assim como os extratos nas concentrações de 2,52%, 0,625% e 0,3125% não tiveram efeito sobre as larvas. Já o controle positivo não apresentou efeito.

4 CONCLUSÃO

Nas condições de teste, o extrato alcoólico de Neem mostrou ter atividade *in vitro* na eclodibilidade dos ovos. No entanto, estudos mais detalhados são necessários para identificar e avaliar o mecanismo de ação do extrato, bem como, estudos de toxicidade *in vivo*.

5 REFERÊNCIAS

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, n.4, p.631-639, 2004.

BOEKE, S. J.; BOERSMA, M. G.; ALINK, G. M.; VAN LOON, J. J. A.; VAN HUIS, A.; DICKE, M., RIETJENS, M. C. M. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.25-41, 2004.

BUENO, M. S.; CUNHA, E. A.; VERISSIMO, C. J.; SANTOS, L. E.; LARA, M. A. C.; OLIVEIRA, S. M.; SPOSITO FILHA, E.; REBOUCAS, M. M. Infecção por nematodos em razas de ovelhas criadas intensivamente em la region del sudeste del Brasil. **Archivos de Zootecnia**, v.15, p.273-280, 2002.

CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. *Azadirachta indica* (Neem) em nematodos gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Veterinary Research Animal Science**, v.144, n.1, p.49-55, 2007.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M. World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, p.35-44, 1992.

- COSTA, C. T. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; MACIEL, M. V.; CAM - BÇ A
VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; MONTEIRO, M. V. B.; FARIAS, V. M.;
SILVA, V. M.; SOUZA, M. M. C. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss
against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.306-
310, 2006.
- COSTA, C. T. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAM - BÇ A
VASCONCELOS, A. L. F.;
MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; CASTRO, C. M. S.; BRAGA, R. R.; OLIVEIRA, L. M.
B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on
Haemonchus contortus. **Small Ruminant Research**, v.74, n.1-3, p.284-287, 2008.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in
sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v.12,
p.50-52, 1939.
- GUERRINI, V. H.; KRITICOS, C. M. Effects of azadirachtin on *Ctenocephalites felis*
in the dog and the cat. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p.289-297, 1998.
- HUBERT, J., KERBOUEF, D. A microlarval development assay for detection of
anthelmintic resistance in sheep nematodes. **The Veterinary Record**, v.131, p.5-7,
1992.
- JACKSON, F.; COOP, R. L. The development of anthelmintic resistance in sheep
nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.95-107, 2000.
- KAPLAN, R.M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status
report. **Trends in Parasitology**, v.20, p.477-481, 2004.
- MILLER, J. E.; HOROHOV, D. W. Immunological aspects of nematode parasite
control in sheep. **Journal of Animal Science**, v.84, p.124-132, 2006.
- PESSOA, L. M. Atividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus*
contortus. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -
Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for eggs-counts and larval cultures
for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of**
Agricultural Research, v.1, p.99-102, 1950.
- STRAIN, S. A. J.; STEAR, M. J. The influence of protein supplementation on the
immune response to *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, Oxford, v.23,
p.527-531, 2001.