

Prospecção fitoquímica, potencial anti-helmíntico e análise toxicológica do extrato etanólico de *Croton* sp. sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos no estado do Acre, Amazônia ocidental

Adriano Monteiro de Souza¹, Wallef Bandeira Rodrigues¹, Thayna Ferreira Bispo dos Santos¹, Joelton da Silva Barata², Alex Cicinato Paulino de Oliveira³, Sara Lucena de Amorim^{3*}

¹Discente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre.

²Engenheiro Agrônomo graduado pela Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre. ³Docente do Curso de Medicina Veterinária, campus Rolim de Moura, da Universidade Federal de Rondônia, Brasil.

*saravet.la@bol.com.br

Recebido em: 30/01/2021

Aceito em: 18/02/2021

Publicado em: 20/03/2021

RESUMO

O controle de nematódeos gastrintestinais em ovinos ainda se mostra um grande desafio para o avanço da produção brasileira. Faz-se uso de moléculas sintéticas amplamente distribuídas no mercado, entretanto, a resistência a elas mostra-se cada vez mais comum. Sendo, portanto, o uso de novos métodos efetivos de controle das parasitoses. Logo, uso de plantas como agentes antiparasitários se mostra promissor. Portanto, esse estudo tem a finalidade de investigar o uso de extrato de *Croton* sp, como agente antiparasitário, comprovando cientificamente a sua utilização frente a larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos. Para avaliação antiparasitária foram utilizadas dois ml nas doses CL50% (197µg/ml) e CL100%(394µg/ml) e adicionadas nas fezes(2g) dos animais parasitados naturalmente. A dose foi determinada a partir do teste de toxicidade com *Artemia salina*. A eficácia demonstrada pela planta para o tratamento dos ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos, em média geral, se mostrou de 20% na DL50% e – 46% na DL100%. Na identificação dos gêneros de nematódeos gastrintestinais de ovinos através da coprocultura identificou a predominância do gênero *Haemonchus* sp. em todos os grupos tratados e no grupo controle. Conclui-se que o extrato etanólico de *Croton* sp na concentração 197µg e 394µg apresentaram baixa eficiência sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos, sugerindo que outras concentrações sejam testadas para que se observe uma atividade anti-helmíntica.

Palavras-chave: *Croton*. Antiparasitário. Ovinos.

Phytochemical prospecting, anthelmintic potential and toxicological analysis of the ethanol extract of *Croton* sp. on eggs and larvae of gastrointestinal nematodes of sheep in the state of Acre, western Amazon

ABSTRAT

The control of gastrointestinal nematodes in sheep is still a great challenge for the Brazilian production. Synthetic molecules widely distributed in the market are used, however, resistance to them is increasingly common. Therefore, the use of new effective methods of parasitic control. Therefore, use of plants as antiparasitic agents shows promise. Therefore, this study aims to investigate the use of extract of *croton*

sp as an antiparasitic agent, scientifically proving its use against larvae of gastrointestinal nematodes of sheep. For the antiparasitic evaluation, two mls were used at doses CL50 (197ug / ml) and CL100 (394ug / ml) and added in the faeces (2g) of naturally parasitized animals. The dose was determined from the toxicity test with *Artemia salina*. The efficacy demonstrated by the plant for the treatment of eggs and larvae of gastrointestinal nematodes of sheep, was 20% in LD50% and - 46% in DL100%. In the identification of the genera of gastrointestinal nematodes of sheep through coproculture identified the predominance of the genus *Haemonchus* sp. in all treated groups and in the control group. It is concluded that the ethanolic extract of croton sp in the concentration 197µg and 394µg showed low efficiency on gastrointestinal nematodes of sheep, suggesting that other concentrations are tested for an anthelmintic activity.

Keywords: Cróton. Antiparasitic. Sheep.

INTRODUÇÃO

A população de ovinos no Estado do Acre, em 2006 era de mais de 53.000 animais (LIMA, 2008). Sendo assim, o estado ainda apresenta uma pequena quantidade de animais em comparação com outros estados da federação, porém, as infecções por parasitose mostram-se como uma das maiores causas de perda na produção, atacando animais de rebanhos de todo o país (ARO, 2006). É comum a criação destes animais em pequenas aéreas onde ocorre a superlotação, isso faz com que a propagação das verminoses seja facilitada (AMARANTE, 2004). Soma-se, a isso, a falta de preparado no manejo, alimentação precária e o aumento normal de parasitas em épocas de chuva. Outro importante fator agravante da situação é a resistências parasitárias para princípios ativos tradicionais (SOTOMAIOR; THOMAZ-SOCCOL, 1998). Por ser um dos principais problemas envolvendo a criação de pequenos ruminantes, a busca por novas formas de tratamento vem ganhando cada vez mais espaço no campo científico (ARO, 2006). Pois, a eficácia dos princípios ativos presentes no mercado se mostra cada vez menor (VIEIRA, 2008). Por isso, o uso de plantas como substituto aos medicamentos químicas vem ganhando destaque, pois, além de serem produtos naturais elas apresentam maior margem de segurança e menor perigo de deixar resíduos nos produtos cárneos e no meio ambiente (CHAGAS, 2004). Para comprovar que uma planta realmente possui características que podem enquadrar ela como um possível agente antiparasitário deve-se realizar uma série de testes, a fim de avaliar seu caráter tóxico e quais são os componentes delas que possuem tal fator de inibição parasitaria (WOLSTENHOLME et al., 2004). Entre esses testes estão os *in vivo* e *in vitro*, eles servem como triagem, para saber se dada planta possui ação desejada (OLIVEIRA, 2013). Os testes *in vitro*, são de vital importância na rotina laboratorial, tendo em vista, que não requerem grandes investimentos, simples de realizarem e não sofrem influência do organismo animal, como nos casos dos testes *in vivo* (DEMELER et al., 2012). O

presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiparasitária do extrato etanólico do *Croton* sp. sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos infectados naturalmente na região de Rio Branco, AC.

METODOLOGIA

Comissão de ética

O experimento foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Acre-UFAC (protocolo número 10/2018).

Localização e caracterização da área em estudo

O experimento foi desenvolvido nos laboratórios de Toxicologia e Plantas Tóxicas da UFAC, no laboratório de Produtos Naturais da Fundação de apoio de Pesquisa do estado do Acre – FAPAC e no centro de confinamento de ovinos/UFAC.

Material vegetal

A coleta do material botânico foi realizada baseando-se nas metodologias de Cartaxo et al., (2010). A planta foi coletada no parque zoobotânico do Campus da UFAC de Rio Branco (9,5°39'29" sul e a 67°48'36" oeste), sendo identificadas e depositadas no herbário desta instituição.

Obtenção do extrato orgânico

Folhas do *Croton* sp foi coletado e colocado para secagem ao ar livre por 48 horas, em seguida levado à estufa de ventilação forçada a 60 °C por 24 horas, logo após, pesado e moído. A obtenção dos extratos etanólicos seguiu a metodologia descrita por Mattos (1997) e foram realizadas no laboratório de produtos naturais da Fundação de apoio de Pesquisa do estado do Acre –FUNTAC.

Experimento in vitro

Ensaio de toxicidade – Artemia salina Leach

Para análise de toxicidade do extrato do *Croton* sp. utilizou a metodologia de Araújo et al., (2010). Uma solução salina (com sal marinho) na concentração 3,5% (m/v) foi preparada, sendo o pH ajustado entre 8,0 – 9,0 acondicionando-se gotas de uma solução 0,1 mol L⁻¹ NaOH (Merck). Esta solução foi utilizada para a eclosão dos

ovos da *A. salina* L. e no preparo das outras diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina, por 48 horas, com aeração constante e temperatura controlada de 25°C. Serão transferidas 10 larvas de *A. salina* L. para tubos de ensaio contendo a solução salina e amostras a serem testadas, nas seguintes concentrações dos extratos (100 ug, 500 ug, 1000 ug). A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 h. Por se tratar de um crustáceo ativo em água salina, a falta de movimento e sedimentação são os indicadores de morte do mesmo. Os testes foram acompanhados de controle negativo, somente com água salina, e positivo com uma solução de $K_2Cr_2O_7$ 0,1 mol L⁻¹ (dicromato de potássio). DL 50 foi estimada a partir da regressão linear simples, por meio da correlação entre a porcentagem de indivíduos mortos e a concentração do extrato. Para o cálculo da CL50% utilizou-se o método de Análise de Probits, de acordo como o teste de Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) com intervalos de confiança de 95%, utilizando o software TRIMMED (versão 1.5).

Prospecção fitoquímica

O extrato etanólico foi submetido a uma série de reações de caracterização fitoquímica: açúcares redutores, alcaloides, compostos fenólicos, flavonóides, ácidos orgânicos, antraquinonas, saponinas, taninos e triterpenos e esteroides, sendo realizadas em triplicatas. Os testes fitoquímicos foram realizados com base nas reações cromáticas e de precipitação conforme descrito por Simões et al., (2001). Os testes foram realizados no laboratório de química da UFAC.

Atividade biológica dos extratos do *Croton* sp sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos infectados naturalmente

Para obtenção dos ovos e larvas de helmintos, foram utilizados seis ovinos adultos mestiço Santa Inês/Doorper naturalmente infectados e mantidos sem tratamento anti-helmíntico por pelo menos 60 dias, provenientes de uma propriedade particular da região do Baixo Acre criados em sistema semi-intensivo e com indicador parasitológico de contagem média de 1000 ovos por gramas de fezes (OPG), segundo o método de Gordon e Whitlock modificado (UENO; GUTIERRES, 1983). Para avaliar sua atividade ovicida e larvicida, foram realizadas coproculturas usando a metodologia de Robert e O'Sullivan (1950). Adicionou 2 ml do extrato etanólico a uma concentração a

ser determinada de acordo com o teste de toxicidade (citada anteriormente) às culturas fecais contaminadas naturalmente por nematódeos gastrintestinais. No grupo controle negativo utilizou água destilada. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas. As amostras foram colocadas em estufas BOD para o controle da temperatura e umidade. Após sete dias, realizou a recuperação e contagem de larvas infectantes (L3) em microscópio óptico. Para avaliar a eficiência do extrato sobre ovos e larvas nos diferentes tratamentos, utilizou a fórmula adaptada descrita por Camurça-Vasconcelos et al. (2007): $ET: L3 \text{ inicial} - L3 \text{ do grupo tratado} / L3 \text{ inicial}$ onde: L3 inicial corresponde a estimativa do número de larvas em cada coprocultura L3 do grupo tratado corresponde o número de larvas recuperadas após oito dias de incubação nos diferentes tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados fitoquímicos demonstraram a presença de compostos bioativos indicativos de atividade anti-helmíntica (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados dos testes de Prospecção Fitoquímica.

Fenóis e Taninos: +
Saponinas: +
Esteróides Triterpenóides: +
Alcalóides (Dragendorff): -
Alcalóides (Bouchardat): Não Realizado
Alcalóides (Mayer): -
Alcalóides (Bertrand): -
Flavonóides: Inconclusivo
Açúcares Redutores: Inconclusivo
Ácidos Orgânicos: -

+ reação positiva, - reação negativa

A prospecção fitoquímica tem como finalidade ter conhecimento dos metabolitos secundários presentes na planta e ter uma base se ela tem potencial como agente antihelmíntico. O principal metabolito encontrado foram os taninos, principal composto bioativo com atuação antiparasitária.

O teste comprovou que o *Croton* possui taninos e alguns outros componentes de interesse. Várias pesquisas têm confirmado que taninos condensados têm participação direta no controle de nematódeos de pequenos ruminantes (OLIVEIRA et al., 2011). A primeira hipótese se deve a ligação dos taninos condensados às proteínas encontradas na

bainha cuticular das larvas de nematódeos (HOSTE et al., 2006), assim afetando a sua cutícula e impedindo a evolução do estágio infectante para estágio parasitário por alterar suas propriedades químico-físicas (NERY et al., 2010; MACEDO et al., 2012). De forma indireta os taninos condensados ligam-se as proteínas da dieta e protege da degradação ruminal, aumentando o fluxo de proteínas na absorção no intestino delgado o que favorece ao aumento nutricional e numa melhora na resposta imunitária contra os parasitas (HOSTE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011).

Além dos taninos condensados, outros metabólitos secundários como os triterpenoides, saponinas, flavonoides e esteroides tem sido implicados com atividade anti-helmíntica de pequenos ruminantes. (MONTEIRO et al., 2011; FOSTER et al., 2011; EGUALE et al., 2007).

O teste de toxicidade com *Artemia salina* determinou uma concentração letal de 50% de 197µg/ml.

Através dos testes realizados com a CL-50% o *Croton* não obteve uma eficácia esperada, onde, o extrato teve uma eficácia de apenas 22% sobre as larvas analisadas. Pode-se perceber que o gênero *Haemonchus* sp teve predominância com 96,75% em relação aos outros gêneros.

Na análise da CL-100% o *Croton* obteve uma eficácia de 46%, ou seja, o dobro de eficiência sobre a CL-50%, no entanto é possível que concentrações acima da dose estudada no presente trabalho possam obter resultados mais interessantes. Sendo assim, se faz necessária a revisão dos testes, e alterações nas concentrações utilizadas. A fim de que seja encontrada uma dose mais responsiva, e conseqüentemente, mais adequada, no que diz respeito a grau de inibição e percentual de eficácia do produto. Assim sugerindo novas pesquisas com doses mais elevadas do cróton. Outro dado importante é que o gênero *Haemonchus* sp, teve predominância em comparação com os outros parasitas. Em todos os grupos e repetições esse gênero de parasita apareceu com mais de 90%.

Tabela 2.

Tabela 2 - Média de larvas encontradas em coprocultura dos grupos controle e tratamento. Média apresentada por gênero e média geral.

Gênero	Haemonchus	Oesophagostomum	Trichostrongylus	Média Geral	Eficácia
Grupo	sp.	sp.	sp.		Produto %
Tratamento CL 50% (197µg.)	1171(96,75%)	25(3,32%)	3(0,25%)	2212(100%)	22%
Tratamento CL100%(349µg)	792(95,84%)	32(3,96%)	3(0,20%)	827(100%)	46%
Controle	1455(94,50%)	3,6(0,24%)	81(5,25%)	1540(100%)	

CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato de *Croton* sp na concentração 197µg/ml e 394µg/ml apresentaram baixa eficiência sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos, sugerindo que outras concentrações sejam testadas para que se observe uma melhor atividade anti-helmíntica.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A. F. T. Controle da Verminose Ovina, **Revista CFMV Suplemento Técnico**. São Paulo, ano 11, n, janeiro a abril, 2004. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/rev34/tecnic15.htm>. Acesso em: 25 jun. 2019.

ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA W. R.; VENEZIANI R. C. S. Estudo fitoquímico pre liminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. (Solana-ceae). **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 31, p. 205-209, 2010.

ARO, D. T. Verminose ovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano 3, n. 07, 2006.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippiasidoid* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.148, p. 288-294. 2007.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 156-160, 2004.

DEMELER, J.; GILL, J. H.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. The in vitro assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v. 3, p. 109–118, 2013.

EGUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN E. In vitro and in vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 428-433, 2007.

FOSTER, J. G.; CASSIDA, K. A.; TURNER, K. E. In vitro analysis of the anthelmintic activity of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) sesquiterpene lactones against a predominantly *Haemonchus contortus* egg population. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 298-306, 2011.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Sperm-Karber: method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, p. 714-719, 1997.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, p. 253-261, 2006.

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.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAES, S. M.; MACHADO, L. K. A.; RIBEIRO, W. I. C. In vitro activity of *Lantana camara*,

Alpinia zerumbet, *Mentha villosa* and *Targetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 504-509, 2012.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: EDUFC Edições. p. 44-46, 1997.

MONTEIRO, M. V. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACHADO, L. K. A.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; CAMPELO, C. C.; RIBIRO, W. L. C.; MESQUITA, M. A. Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seedson *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 2-4, p. 259-263, 2011.

NERY, P. S.; NOGUEIRA F. A.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 171, p. 361-364. 2010.

OLIVEIRA L. D. R. **Plantas medicinais como alternativa para o controle de Haemonchus contortus em ovinos: testes in vitro e in vivo**. 73 f. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyleinfesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 99-102, 1950.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. PETROVICK, P. R.(org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre., Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS, 2001.

SOTOMAIOR, C. S.; THOMAZ-SOCCOL, V. Estudo do Tipo de Hemoglobina Como Auxiliar na Seleção de Ovinos Resistentes e Suscetíveis aos Helmintos Gastrointestinais, **Archives of Veterinary Science**, v. 1, n. 3, p. 51-55, 1998.

UENO, H.; GUTIERRES, V. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Japan International Cooperation Agency, Tóquio, Japão.1983.

VIEIRA, L.S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v. 2, p. 28-31, 2008.

WOLSTENHOLME, A. J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, M. C. Drug resistance in veterinary helminthes. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 469-476, 2004.