

# TECNOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DA PLANTA *Solanum lycocarpum* PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA: VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE LARVAR DE HELMINTOS DE OVINOS

Ana Gabriely Nantes de Oliveira<sup>1</sup>

Ana Beatriz Tavares Capello<sup>2</sup>

Natália da Silva Sunada<sup>3</sup>

Thiago Leite Fraga<sup>3</sup>

## RESUMO

A criação de ovinos possui grande importância sócio-econômica e cultural para o estado de Mato Grosso do Sul e vem sendo amplamente explorada, por meio da criação de raças adaptadas ao clima da região e ao mercado consumidor, sendo a produção impulsionada principalmente por meio da necessidade de diversificação das atividades produtivas no meio rural. Apesar do incremento produtivo para o setor, ainda hoje existem entraves à otimização do desempenho global dos rebanhos ovinos, dentre eles está a helmintose e resistência anti-parasitária à alopáticos. Paralelamente a estas, estudos relacionados a utilização de fitoterápicos para o tratamento parasitário estão sendo desenvolvidos e uma planta em especial, *Solanum lycocarpum*, desponta para o tratamento anti-helmíntico sendo sua eficiência contra parasitas em animais silvestres e disponibilidade fatores favoráveis. Objetivou-se com a execução deste trabalho realizar a fabricação de extrato aquoso das folhas da planta *Solanum lycocarpum* obtido por infusão e testar este frente a eficiência anti-helmíntica por meio da utilização da técnica de inibição da eclodibilidade larvar adaptada às condições de execução. Os resultados obtidos demonstram a viabilidade produtiva do extrato aquoso de folhas da planta *Solanum lycocarpum* e a eficiência da utilização deste por meio da técnica de eclodibilidade larvar modificada, possibilitando redução de 83,33% da eclosão dos ovos de parasitas gastrointestinais de um ovino naturalmente infestado, de propriedade de Dourados – MS.

**Palavras-Chave:** verminose, fitoterapia, ovinocultura

## TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF AQUEOUS EXTRACT OF PLANT LEAVES *Solanum lycocarpum* FOR ANTHELMINTIC EFFICACY EVALUATION: VALIDATION OF THE LARVAL HATCHABILITY INHIBITION TECHNIQUE OF SHEEP HELMINTHS

### SUMMARY

Sheep breeding corresponds to a factor of great socio-economic and cultural importance for the state of Mato Grosso do Sul and has been widely exploited, increasing its production chain of sheep breeding breeds adapted to the climate of the region and the consumer market; being the production driven mainly by the need to diversify productive activities in rural areas. Despite the productive increase for the sector, there are still barriers to optimize the overall performance of sheep flocks, among them is helminthosis and antiparasitic resistance to

<sup>1</sup> Médica Veterinária e Residente do Programa de Residência Agrícola em Gestão de Custos Agropecuários da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). anagabriely\_nantes@hotmail.com

<sup>2</sup> Médica Veterinária graduada pelo Centro Universitário da Grande Dourados – Unigran. anabeatriz.ct@hotmail.com

<sup>3</sup> Professor(a) Doutor(a) do Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias. do Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN, \*Correspondência: natysunada@gmail.com

allopaths. Parallel to these, studies related to the use of phytotherapies for parasite treatment are being developed and one plant in particular, *Solanum lycocarpum*, stands out for anthelmintic treatment being its efficiency in wild animals and availability favorable factors. The purpose of this work was to manufacture aqueous extracts from the leaves of the *Solanum lycocarpum* plant obtained by pressure and to test its anthelmintic efficiency by using the validation of the larval hatchability inhibition technique. The results obtained demonstrate the productive viability of *Solanum lycocarpum* aqueous leaf extract and its efficient use by means of the modified larval hatchability technique, enabling an 83.33% reduction in the hatching of eggs from gastrointestinal parasites in a naturally infested sheep owned by Dourados – MS.

**Keywords:** verminose, herbal medicine, sheep farming

## TECNOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE LA PLANTA DE *Solanum lycocarpum* PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA ANTI HELMÍNTICA: VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE INHIBICIÓN DE LARVAR ECLODIBILIDAD DE HELMINTOS DE OVEJA

### RESUMEN

La cría de ovinos tiene una gran importancia socio-económica y cultural para el estado de Mato Grosso do Sul y ha sido ampliamente explorada a través de la creación de razas adaptadas al clima de la región y al mercado consumidor, siendo la producción impulsada principalmente por la necesidad de diversificación productiva. actividades en las zonas rurales. A pesar del aumento de la producción para el sector, aún existen obstáculos para optimizar el rendimiento general de los rebaños de ovinos, incluidos los helmintos y la resistencia antiparasitaria a los alopatóicos. Paralelamente, se están desarrollando estudios relacionados con el uso de fitoterápicos para el tratamiento parasitario y está emergiendo una planta en particular, *Solanum lycocarpum*, para el tratamiento antihelmíntico, su eficacia frente a parásitos en animales silvestres y factores favorables a la disponibilidad. El objetivo de este trabajo fue realizar la fabricación de un extracto acuoso de las hojas de la planta de *Solanum lycocarpum* obtenido por infusión y contrastarlo frente a la eficacia antihelmíntica mediante el uso de la técnica de inhibición de la incubabilidad larvaria adaptada a las condiciones de ejecución. Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad productiva del extracto acuoso de las hojas de la planta de *Solanum lycocarpum* y la eficiencia de su uso mediante la técnica de incubabilidad larvaria modificada, permitiendo una reducción del 83,33% de la eclosión de huevos de parásitos gastrointestinales de una oveja infestada naturalmente. propiedad de Dourados - MS.

**Palabras clave:** verminosis, fitoterapia, ovinos

### INTRODUÇÃO

O Brasil possui 15,5 milhões de cabeças ovinas distribuídas por todo o país (1), sendo as maiores concentrações verificadas no Nordeste, Sul e Centro-Oeste. Segundo alguns autores (2) o representante do Centro-Oeste que possui o maior rebanho, 464.851 cabeças, corresponde ao Mato Grosso do Sul e este atendendo as necessidades de diversificação das atividades produtivas no meio rural vem aumentando a criação ovina, cuja expressividade de produção é possível graças a criação de raças adaptadas ao clima e ao mercado consumidor.

Um dos principais fatores limitantes para maior expansão da ovinocultura é o parasitismo gastrointestinal que afeta o desempenho global do animal, já que a presença destes parasitas reduz o ganho de peso e a capacidade de reprodução, assim como a produção de leite, lã e couro (3).

Para minimizar as perdas é amplamente empregado o controle das endoparasitoses por meio da utilização de agentes alopáticos, porém o uso indiscriminado e errôneo destes acarreta a resistência antiparasitária em helmintos (2) e diante do exposto, uso inadequado das moléculas de ação anti-helmíntica. Estudos estão sendo desenvolvidos no intuito de obter alternativa de controle parasitário (4).

Uma das vertentes de estudo é o emprego de plantas medicinais (5), que há séculos são utilizadas pelos agricultores, sendo os fitoterápicos uma alternativa viável na atividade anti-helmíntica, e importante frente a resistência aos alopáticos (6-9).

Um exemplo de fitoterápico de fácil acesso é a planta *Solanum lycocarpum*, nativa do Brasil central e cerrado, que possui atividade anti-helmíntica já conhecida no controle de verminoses em animais silvestres (10) e, portanto, promissora para espécies destinadas à produção (3). Entretanto, a evidência científica sobre a eficácia antiparasitária da maioria dos produtos vegetais é limitada, havendo a necessidade de uma padronização destes (5).

Referindo-se ao tocante promissor uso de fitoterápicos no controle da verminose ovina, deve-se buscar meios que facilitem a sua administração, absorção, controle de concentração e eficácia. Desta maneira, objetivou-se com a execução deste trabalho produzir o extrato aquoso das folhas da planta *Solanum lycocarpum* e avaliar a possível eficiência anti-helmíntica por meio da técnica adaptada de inibição da eclodibilidade larvar.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi aprovado pelo comitê de ética para uso animal (CEUA-Unigran) do Centro Universitário da Grande Dourados. O trabalho foi realizado nas dependências das instalações do Centro Universitário da Grande Dourados (Unigran – Dourados). As fezes utilizadas para o teste *in vitro* foram provenientes de um animal naturalmente infestado da fazenda escola Laranja Doce pertencente à referida instituição de ensino em Dourados - MS.

Para a confecção do extrato aquoso (EA), inicialmente foi realizada a secagem das folhas sendo estas picadas e encaminhadas à estufa de circulação forçada de ar por 48 horas a uma temperatura máxima de 55°C. Após essa etapa, o material foi triturado em moinho, tipo Willis, obtendo-se um pó que foi utilizado para a o preparo do extrato (11). O extrato aquoso foi obtido pelo método de extração por infusão, onde os compostos solúveis de uma matéria sólida são extraídos por um solvente líquido em ebulição, mantendo este em um recipiente fechado por aproximadamente 30 minutos (12). Nesta etapa foram colocados em frascos Schott 200 g da folha de *Solanum lycocarpum* moída e acrescentados 2.00 mL de água deionizada. Estes frascos foram tampados e colocados em autoclave a 100 °C, por 30 minutos. Logo após este período, realizou-se a filtração com auxílio de papel filtro obtendo-se assim a parte líquida que constitui o medicamento.

Para testar a eficiência do extrato frente aos helmintos procedeu-se inicialmente ao teste referente ao número de ovos por grama de fezes (OPG) presentes nos animais. Neste, as fezes foram colhidas diretamente da ampola retal e adotou-se a técnica da contagem de OPG por meio do teste de MCMaster modificado (13). Para avaliar a ação do extrato *in vitro* procedeu-se a recuperação de ovos de helmintos, quando em uma amostra de fezes obteve-se número superior a 2000 ovos por grama de fezes (OPG), realizado segundo a metodologia adaptada descrita (14). A referida metodologia utilizada foi adaptada segundo os materiais disponíveis no momento, esta consistiu em homogeneizar as fezes em água morna (41°C) e filtrá-las por

um conjunto de peneiras (150, 75 e 25  $\mu\text{m}$ ), sendo na de menor diâmetro retidos os ovos para então estes serem lavados com água destilada para captação e posterior centrifugação. Na etapa da centrifugação ocorreu a separação de fases sendo a substância sobrenadante descartada e o volume completado com solução supersaturada para a suspensão dos ovos e nova centrifugação. Após esta, o sobrenadante foi depositado novamente em peneira (25  $\mu\text{m}$ ) para a retenção dos ovos, sendo estes lavados com água destilada e a solução resultante depositada em cálice de sedimentação para contagem de 100 ovos/vol.

Estes ovos foram utilizados no teste de inibição da eclodibilidade larvar (Egg Hatch Assay) para avaliar a eficiência do fitoterápico. Neste teste a metodologia que foi utilizada foi também adaptada, onde aproximadamente 100 ovos/vol. foram colocados em cada poço (de placa de 96 poços) e juntamente a estes o fitoterápico a ser testado para posterior homogeneização e acomodação em BOD (27°C) por 24 horas (14). Após este período uma gota de lugol foi adicionada em cada poço e as L1 eclodidas foram quantificadas para o cálculo da porcentagem de inibição da eclodibilidade larvar (14). Sendo assim o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) composto por 2 tratamentos, tratamento controle (sem uso de fitoterápico - uso de água destilada) e teste (utilização de inclusão de concentração de 1g/mL de extrato aquoso de *Solanum lycocarpum*) contendo 96 repetições cada (poços das placas).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como abordado a fitoterapia consiste em um campo promissor a ser estudado para maximização dos índices produtivos, sendo a validação científica dos fitoterápicos uma etapa inicial obrigatória para a utilização correta de plantas medicinais ou de seus compostos ativos (15).

Sendo assim elegeu-se entre as análises que podiam ser realizadas o teste *in vitro* já que este é caracterizado por ser uma forma que permite a avaliação da existência de propriedades anti-helmínticas de extratos vegetais de maneira a criar alternativas para o controle das parasitoses (16).

Para a condução do teste *in vitro* procedeu-se a fabricação do extrato aquoso da planta *Solanum lycocarpum* por meio da remoção por infusão das folhas desta em água destilada. Outras formas de obtenção são descritas em literatura possibilitando a captura de volumes de extratos consideráveis (10,12), porém adotou-se a condução da referida forma de extração por esta possibilitar a obtenção da substância de maneira rápida, segura e não onerosa no que se refere ao material utilizado (12).

Tendo-se obtido o extrato, este passou a ser testado para a verificação da eficiência do método de extração frente a ação anti-helmíntica relacionada ao princípio ativo. Durante esta etapa, a adoção de adaptação da técnica de recuperação de ovos (14) foi necessária já que não existiam todos os equipamentos necessários. Nesta, pôde-se verificar que as alterações realizadas, malha das peneiras e tubos utilizados, não interferiram no processo de recuperação dos ovos de helmintos podendo-se dessa maneira ser recomendada futuramente.

Para a avaliação *in vitro* da eficiência anti-helmíntica adotando-se a técnica da inibição da eclodibilidade larvar (Egg Hatch Assay) (14) foi também realizada adaptação, no que se refere a placa de incubação e observação da eclosão larvar por meio de lâminas escavadas e microscópio óptico, verificando-se que as alterações realizadas não interferiram na confiabilidade do teste. Durante esta visualização pôde-se determinar a eficiência anti-helmíntica do princípio ativo extraído por meio da observação em microscópio óptico das formas de vida do parasita (13,14).

O resultado expressivo de redução, 83,33% da eclodibilidade larvar, traduz a eficiência dos processos realizados bem como a ação do princípio ativo da planta, já que esta é

possuidora de taninos que agem diretamente sobre parasitas internos, aumentando assim a capacidade de resistência dos animais infestados (17).

Reforçando a informação sobre a efetividade do referido fitoterápico, considera-se ainda que uma substância teste é julgada eficaz contra helmintos se acarretar redução de 60% na eclodibilidade dos ovos (18) o que pode gerar um impacto significativo na redução da contaminação das pastagens ao longo dos anos e diminuir o número de tratamentos anti-helmínticos aplicados no rebanho.

Sendo assim a utilização do extrato pode-se mostrar mais interessante do que o uso das folhas ou fruto *in natura* pela facilidade de administração aos animais, visto que não são visualizados indícios de palatabilidade da planta aos pequenos ruminantes, além de ser uma forma mais fácil de controle sobre a dose administrada quando comparada à simples disponibilização em cocho de alimentação visto que alguns animais podem consumir quantidades variadas tornando-se fator de preocupação já que a inclusão de elevadas quantidades de frutos de *Solanum lycocarpum* se mostraram hepatotóxicas em testes com ratos (19).

## CONCLUSÃO

Neste estudo conclui-se que é possível realizar a extração aquosa dos princípios anti-helmínticos das folhas da *Solanum lycocarpum* por meio de infusão e avaliação da efetividade deste mediante adaptações da técnica de eclodibilidade larvar, sem alterar a precisão do método de análise.

## REFERÊNCIAS

1. Gomes FDSCM, Azevedo DB, Alves LGS, Malafaia GCA. Cadeia produtiva da ovinocultura do Estado de Mato Grosso do Sul [Internet]. In: 52o Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural - SOBER; 2014; Goiânia. Goiânia: SOBER; 2014 [citado 21 Jun 2021]. Disponível em: <http://icongresso.itarget.com.br/tra/arquivos/ser.4/1/3114.pdf>
2. Sczesny-Moraes EAS, Bianchin I, Silva KF, Catto JB, Honer MBE, Paiva F. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. *Pesqui Vet Bras* [Internet]. 2010 [citado 21 Jun 2021];30(3):229-336. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/6PLHrDrDLP8Y3j7NJykqNDJ/?lang=pt&format=pdf>
3. Oliveira LDR. Plantas medicinais como alternativa para o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos: testes *in vitro* e *in vivo* [dissertação] [Internet]. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2013 [citado 21 Jun 2021]. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/13868>
4. Oliveira LMB, Bevilaqua CML, Morais SM, Camurça ALF, Macedo ITF. Plantas taniníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Cienc Rural* [Internet]. 2011 [citado 21 Jun 2021];41(11):1967-74. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/RzB4qFqBLLTzH6vfKcpBW6t/?lang=pt>
5. Cunha MPV, Alves Neto AF, Suffredini IB, Abel LJC. Avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos brutos de plantas da Floresta Amazônica e Mata Atlântica brasileira sobre *Haemonchus contortus*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2014 [citado 21 Jun 2021].

- 2021];66(2):374-80. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/MKLwYW54yW57M9vSgK86CC/abstract/?lang=pt>
6. Burke JM, Wells A, Casey P, Miller JE. Garlic and papaya lack control over gastrointestinal nematodes in goats and lambs. *Vet Parasitol* [Internet]. 2009 [citado 21 Jun 2021];159(2):171-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19019552/>
  7. Rodrigues BA, Athayde RCA, Rodrigues GO, Silva WW, Faria BE. Sensibilidade dos nematóides gastrointestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesqui Vet Bras* [Internet]. 2007 [citado 21 Jun 2021];27(4):162-6. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/cPnBckZctCgX39pFnmtb9gk/?format=pdf&lang=pt>
  8. Bianchin I, Catto BJ. Alho desidratado (*Allium sativum* L.) no controle de nematódeos gastrintestinais em bovinos naturalmente infectados. *Cienc Rural* [Internet]. 2004 [citado 21 Jun 2021];34(4):1267-70. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/FYppshjFV6zPjrx5yVFNFDF/?lang=pt>
  9. Sunada NS, Orrico Junior MAP, Orrico ACA, Oliveira ABM, Centurion SR, Lima NSR, et al. Controle parasitário utilizando levamisol, ivermectina e alho desidratado (*Allium sativum*) em ovelhas da raça Santa Inês. *Rev Agrar* [Internet]. 2011 [citado 21 Jun 2021];4(12):140-5. Disponível em: <https://ojs.ufgd.edu.br/index.php/agrarian/article/view/873>
  10. Miranda MA. Avaliação do potencial antiparasitário do extrato alcaloídico e de alcaloides esteroidais dos frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.- Hil [dissertação] [Internet]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2010 [citado 21 Jun 2021]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60138/tde-04112010-161118/publico/Dissertacao.pdf>
  11. Silva DJ, Queiroz AC. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3a ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2002.
  12. Rodrigues FA, Pimenta VSC, Braga KMS, Araújo EG. Obtenção de extratos de plantas do cerrado. *Enciclopedia Biosfera* [Internet]. 2016 [citado 21 Jun 2021];13(23):870. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2016a/agrarias/obtencao%20de%20extatos.pdf>
  13. Sloss MW, Zajac AM, Kemp RL, Diniz R. Parasitologia clínica veterinária. 6a ed. São Paulo: Manole; 1999.
  14. Coles GCC, Bauer FHM, Borgsteede CS, Geerts DTR, Klei MA, Taylor PJ, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol*. 1992;44:35-44. doi: 10.1016/0304-4017(92)90141-u.
  15. Klein T, Longhini R, Bruschi ML, Mello JCP. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Rev Cienc Farm Basica Apl* [Internet]. 2009 [citado 21 Jun 2021];30(3):241-8. Disponível em: <http://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/421/419>

16. Costa CTC, Moraes SM, Bevilaqua CMI, Souza MMC, Leite FKA. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. *Rev Bras Parasitol Vet* [Internet]. 2002 [citado 21 Jun 2021];11(2):57-60. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/284701282\\_Efeito\\_ovicida\\_de\\_extratos\\_de\\_sementes\\_de\\_Mangifera\\_indica\\_L\\_sobre\\_Haemonchus\\_contortus](https://www.researchgate.net/publication/284701282_Efeito_ovicida_de_extratos_de_sementes_de_Mangifera_indica_L_sobre_Haemonchus_contortus)
17. Santana AF, Ribeiro TS, Caetano ALS, Bittencourt CN. Utilização da fitoterapia no controle da eimeriose no rebanho ovino no Município de Entre Rios – Bahia. *PUBVET* [Internet]. 2011 [citado 21 Jun 2021];5(33):1214. Disponível em: <http://pubvet.com.br/uploads/644d2396d2f2f907f063c6f6ecb23832.pdf>
18. Minho AP, Gaspar EB, Yoshihara E. Manual de técnicas laboratoriais e de campo para a realização de ensaios experimentais em parasitologia veterinária: foco em helmintos gastrintestinais de ruminantes [Internet]. Bagé: Embrapa Pecuária Sul; 2015 [citado 21 Jun 2021]. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/136882/1/DT-148-online.pdf>
19. Scarpel R, Cunha WR, Lopes RA, Souza MA, Lope PEVP, Sala MA, et al. Hepatotoxicidade de plantas medicinais. LII. Ação da Infusão de *Solanum lycocarpum* St. Hil. no rato. *Investigacao* [Internet]. 2006 [citado 21 Jun 2021];6:16-20. doi: <https://doi.org/10.26843/investigacao.v6i1.176>. Disponível em: <https://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/176>

**Recebido em: 01/10/2021**

**Aceito em: 21/02/2022**