

Universidade Estadual do Ceará
Faculdade de Medicina Veterinária
Programa de Pós - Graduação em Ciências Veterinárias
Michelline do Vale Maciel

Atividade ovicida e larvicida de extratos de *Melia azedarach* L.
sobre *Haemonchus contortus*

Fortaleza – Ceará

2004

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Michelline do Vale Maciel

Atividade ovicida e larvicida de extratos de *Melia azedarach* L.
sobre *Haemonchus contortus*.

Dissertação apresentada ao programa de Pós - Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Reprodução e sanidade animal

Orientadora: Dra. Selene Maia de Moraes

Fortaleza, Ceará
Dezembro de 2004

M152a Maciel, Michelline do Vale

Atividade ovcida e larvicida de extratos de *Melia azedarach* sobre *Haemonchus contortus*/Michelline do Vale Maciel. _____
2004.

74p.; il.;

Orientadora: Profa. Dra. Selene Maia de
Morais.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará,
Faculdade de Veterinária.

1. Parasitologia. 2. *Haemonchus contortus*.
3. *Melia azedarach*. 4. ovcida. 5. larvicida. I.
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de
Veterinária.

CDD: 574

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: Atividade ovicida e larvicida de extratos de *Melia azedarach* sobre *Haemonchus contortus*.

Autor: Michelline do Vale Maciel

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora:

Profa. Dra Selene Maia de Moraes
Orientadora

Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua
Co-orientadora /Examinadora

Prof. Dr Marlon Carneiro Feijó
Examinador

Profa. Dra Lúcia de Fátima Lopes dos Santos
Examinadora

DEDICO,

À minha filha Larissa Emanuelle, razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** e a todos aqueles que tanto me ajudaram, durante todo o curso.

À professora Dra. Selene Maia de Moraes, por sua orientação e dedicação na realização desse trabalho.

À professora Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua, pela oportunidade, dedicação, compreensão e amizade oferecida neste mestrado, e pela co-orientação deste trabalho.

A minha banca examinadora composta pelas Dra(s) Selene Maia de Moraes, Claudia Maria Leal Bevilaqua, Lúcia de Fátima Lopes dos Santos e pelo Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó.

Aos professores do PPGCV, em especial a Dra Fátima por sempre me considerar um de seus alunos.

A Dra. Eneide Girão (EMBRAPA-PI), pela contribuição à realização deste trabalho.

A todos os alunos e mestrados do Laboratório de Química em Produtos Naturais, que contribuíram com trabalho e conhecimentos (Higina, Milena, Jason, Vitor, Márcia, Joana e Eduardo), em especial à minha amiga Cristiane que muito me ajudou em todo o mestrado.

A todos os colegas e estagiários do Laboratório de Doenças Parasitárias do PPGCV, que me ajudaram na realização desse projeto e estiveram ao meu lado durante este período (Lucilene, Iarle, Carol, Iara, Marta e Fernanda Menezes) em especial, ao Cícero por todos os ensinamentos e amizade e Ana Lourdes pela amizade, dedicação e co-orientação deste trabalho.

A todos os colegas do mestrado em Ciências Veterinárias do PPGCV, que fizeram parte da minha vida durante estes dois anos (Maurício, Daniel, Karine, Fabrício, Ney Rômulo, Sthenia, Válber, Joaquim, Michelle e Alex). E àqueles que fazem parte do PPGCV : Alexandre, Ana Kelen, Jean, Ticiano, Kilder e Cláudio.

Às minhas queridas amigas mossoroenses, Suzana e Tânia por todo apoio e amizade durante estes anos.

Aos meus amigos Francisco Marlon Carneiro Feijó e Nilza Dutra Alves, pelo grande apoio e incentivo neste mestrado.

A Alzenira e Adriana Albuquerque, secretárias do PPGCV, que em muito me ajudaram durante todo o tempo de mestrado, e aos funcionários, César e Selmar.

À Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP), pelo financiamento da bolsa durante o período de dois anos.

Agradeço também a toda minha família, em especial aos meus pais, Antônio Pereira Maciel e Maria Suely do Vale Maciel, por toda compreensão, apoio, carinho e dedicação.

À meus irmãos, Myllena e Michel por todo o apoio.

À minhas avós Maria Julieta de Oliveira Vale e Maria Ferreira Maciel, por estarem sempre tão presentes em minha vida.

A meus padrinhos, Aldo (*in memoriam*) e Célia, pelo grande incentivo e força.

Ao Pe. Alfredo pelo carinho e ajuda em tantos momentos da minha vida.

A minha grande amiga, que considero como uma irmã, Dayanne e a Ésio, pela amizade e pelos anos de convivência, sem eles eu não teria conseguido, o MEU MUITO OBRIGADA.

Aos meus amigos Consuelo e Josenilson pelos momentos de descontração.

Ao meu grande amigo-irmão, Raul Santos, por tudo que tem feito por mim todos este anos.

À Marie Fredriksson e Per Gessle, pelo apoio psicológico durante esses dez anos.

Resumo

Haemonchus contortus é um nematóide abomasal, responsável por perdas econômicas em ovinos e caprinos no Nordeste do Brasil. Seu controle está comprometido devido à resistência à diversos anti-helmínticos. Substâncias extraídas de plantas são alternativas no tratamento da verminose, e *Melia azedarach* têm sido descrita como possuidora de propriedades medicinais. Neste trabalho, a atividade dos extratos etanólico e hexânico de folhas e etanólico e clorofórmico de sementes de *M. azedarach* sobre *H. contortus* foi avaliada através dos testes de eclosão de ovos (TEO) e desenvolvimento larvar (TDL). As concentrações dos extratos testadas foram: 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 mg mL⁻¹. Devido à alta eficácia do extrato etanólico de sementes no TEO, avaliou-se doses inferiores, a fim de calcular a CL₅₀. No TEO, os ovos frescos de *H. contortus* foram incubados durante 48h na presença dos extratos. Em seguida, contou-se ovos e larvas ao microscópio. No TDL, larvaculturas com fezes de animal livre de parasitos foram adicionadas a larvas de primeiro estágio e os extratos, durante 5 dias. Ao final do teste as larvas foram recuperadas e contadas, diferenciando larvas de 1º, 2º e 3º estágio. A CL₅₀ foi calculada pelo método de PROBITS pelo programa SPSS 8.0. Os resultados dos testes foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey de 5% de significância. O extrato etanólico de sementes foi mais ativo sobre a inibição de ovos (CL₅₀: 0,36 mg mL⁻¹), enquanto o extrato etanólico de folhas (CL₅₀: 9,18 mg mL⁻¹), foi mais eficaz sobre a inibição do desenvolvimento das larvas. Na análise fitoquímica, verificou-se a presença de taninos em ambos os extratos, triterpenos e alcalóides no extrato etanólico de sementes, e esteróides no extrato etanólico de folhas.

Abstract

Haemonchus contortus is a parasite of the abomasum, of sheep and goats, responsible for economical losses in Northeast of Brazil. Control is compromised due to the resistance to several anthelmintics. Substances extracted from plants are alternative in the treatment of worm, and *Melia azedarach* have been described as possessor of medicinal properties. In this work, the activity of ethanolic and hexanic extracts of leaves and ethanolic and chloroformic extracts of seeds of *M. azedarach* on *H. contortus* was evaluated through the egg hatch (EHT) and larval development test (DLT). The concentrations of the extracts tested were: 50; 25; 12.5; 6.25 and 3.12 mg mL⁻¹. Due to performance of ethanolic extract of seeds, it was evaluated in inferior doses, in order to calculate CL₅₀. In EHT, fresh eggs of *H. contortus* were incubated during 48 hours in the presence of the extracts. Soon after, it was counted eggs and larvae under the microscope. In DLT, larvaculture with animal feces free from nematodes were added to larvae of first stage and the extracts, during 5 days. At the end of the test the larvae were recovered and counted, differentiating 1^o, 2^o and 3^o stage larvae. CL₅₀ was calculated by the method of PROBITS by the program SPSS 8.0. The results of the tests were submitted to the variance analysis and test of Tukey of 5% of significance. The ethanolic extract of seeds was more active in the inhibition eggs test (CL₅₀: 0.36 mg ml⁻¹), while the ethanolic extract of leaves (CL₅₀: 9.18 mg ml⁻¹), was more effective in the inhibition of larvae development. In the phytochemistry analysis, the presence of tannins was verified, triterpenes and alkaloids were present in the ethanolic extract of seeds, and steroids in the ethanolic extract of leaves.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	14
LISTA DE FIGURAS	15
INTRODUÇÃO -----	16
REVISÃO DE LITERATURA -----	18
1) Haemonchose de ovinos e caprinos-----	18
2) Controle do parasitismo gastrintestinal-----	19
3) Plantas com atividade anti-helmíntica-----	19
4) Avaliação da propriedade anti-helmíntica de plantas-----	21
5) <i>Melia azedarach</i> -----	23
5.1) Considerações Gerais-----	23
5.2) Distribuição geográfica-----	24
5.3) Biologia e ecologia-----	24
5.4) Usos na medicina tradicional -----	25
5.5) Constituintes químicos-----	26
5.5.1.) Taninos-----	27
5.5.2.) Triterpenos e esteróides-----	28
5.5.3.) Alcalóides-----	29
JUSTIFICATIVA -----	30
OBJETIVOS -----	31
Objetivo Geral -----	31
Objetivos Específicos -----	31
METODOLOGIA -----	32
1) Obtenção dos extratos-----	32
2) Análise fitoquímica-----	32
3) Teste de inibição da eclosão de ovos -----	33
4) Teste de desenvolvimento larvar-----	34

5) Análise estatística -----	34
RESULTADOS -----	35
DISCUSSÃO -----	41
CONCLUSÕES -----	44
PERSPECTIVAS -----	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	46
ANEXOS -----	57
ANEXO I- ARTIGO: Atividade ovicida e larvicida de extratos de <i>Melia azedarach</i> sobre <i>Haemonchus contortus</i> -----	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão dos extratos hexânico e etanólico de folhas de <i>Melia azedarach</i> sobre a eclosão de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> -----	35
TABELA 2. Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão dos extratos clorofórmico e etanólico de sementes de <i>Melia azedarach</i> sobre a eclosão de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> -----	36
TABELA 3. Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão nas concentrações mais baixas do extrato etanólico de sementes de <i>Melia azedarach</i> sobre a eclosão de ovos de <i>Haemonchus contortus</i> -----	37
TABELA 4: Concentração Letal dos extratos de <i>Melia azedarach</i> sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar de <i>Haemonchus contortus</i> .-----	37
TABELA 5: Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão dos extratos hexânico e etanólico de folhas de <i>Melia azedarach</i> sobre o desenvolvimento larvar de <i>Haemonchus contortus</i> . -----	38
TABELA 6: Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão dos extratos clorofórmico e etanólico de sementes de <i>Melia azedarach</i> sobre o desenvolvimento larvar de <i>Haemonchus contortus</i> -----	39
TABELA 7: Resultados da análise fitoquímica dos extratos etanólicos de folhas e de sementes de <i>Melia azedarach</i> -----	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EEF – Extrato etanólico de folhas

EES – Extrato etanólico de sementes

EHF – Extrato hexânico de folhas

ECS – Extrato clorofórmico de sementes

CL₅₀ – Concentração letal 50

µL – Microlitro

TC – Taninos condensados

HCL – Ácido clorídrico

H₂S – Ácido sulfídrico

KOH – Hidróxido de potássio

TEO – Teste de eclosão de ovos

TDL – Teste de desenvolvimento larvar

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: *Melia azedarach* L.----- 24

INTRODUÇÃO

A ovinocaprinocultura vem desempenhando importante papel sócio-econômico no nordeste brasileiro, onde as populações têm a partir desses animais fonte de proteína e de renda. No Brasil, 90% da população de caprinos está concentrada nas áreas do semi-árido da região nordeste, onde a produtividade destes animais é caracterizada por um longo intervalo pós-parto e alta taxa de mortalidade (Charles, 1989). Dentre os problemas sanitários que acometem os pequenos ruminantes, as nematodioses gastrintestinais ocupam lugar de destaque, sendo estas, uma das maiores causas de redução da produtividade animal nos trópicos (Pinheiro et al., 2000).

A maioria das perdas associadas às infecções por estes parasitos têm mostrado que os custos são enormes devido ao aumento na mortalidade e a redução na taxa de crescimento e produtividade destes animais (Githiori et al., 2000). Dentre os nematóides gastrintestinais, *Haemonchus contortus*, parasito endêmico no Brasil (Arosemena et al., 1999), e o principal responsável pelas perdas de rebanhos causando alta patogenicidade e por ser hematófago promovendo desgaste da mucosa abomasal e severa anemia (Urquhart et al., 1990).

O controle dos nematóides gastrintestinais é feito basicamente pela utilização de anti-helmínticos sintéticos sendo recomendado, no nordeste brasileiro, quatro tratamentos anuais, realizados nos períodos desfavoráveis ao desenvolvimento dos estágios de vida livre (Embrapa, 1994). No entanto, o desenvolvimento de populações resistentes a anti-helmínticos é uma realidade (Melo et al., 2003; Vieira & Cavalcante, 1999) para várias classes de anti-helmínticos (Akhtar et al., 2000), é um dos mais importantes e atuais problemas do controle de parasitoses. Além disso, os anti-helmínticos disponíveis no mercado possuem algumas limitações, tais como, alto custo, resíduos nos alimentos (Herd, 1996; Waller et al., 1997), risco de poluição ambiental e redução na produção de ovinos e caprinos devido à sua baixa eficácia.

A combinação destes fatores tem estimulado à procura de estratégias alternativas de controle. Dentre estas, anti-helmínticos produzidos a partir de plantas

podem oferecer uma alternativa para minimizar alguns destes problemas. Sabe-se que as plantas são uma rica fonte botânica de anti-helmínticos, antibacterianos e inseticidas. Um grande número de plantas medicinais tem sido usado para o tratamento de infecções parasitárias no homem e animais (Akhtar et al., 2000).

Dentro deste contexto, *Melia azedarach* L., comumente conhecida por lírio, lilás da Índia ou cinamomo, tem sido cultivada há muitos anos, com destino em especial à ornamentação, e sua madeira tem sido utilizada na Índia para fabricação de móveis e de papel (Guha & Niji, 1965). No entanto, diversos trabalhos têm descrito esta planta como possuidora de várias propriedades, dentre elas podemos citar: atividade antifúngica (Carpinella et al., 1999), inseticida (Gajmer et al., 2002), anti-viral, anti-malária (Khan et al., 2001) e anti-helmíntica (McGraw et al., 2000; Joshi & Joshi, 2000). Na medicina popular suas raízes, caule, folhas, frutos e flores têm sido amplamente empregadas contra uma variedade de doenças. Suas folhas e flores são usadas para aliviar dores de cabeça, e mais especificamente, suas folhas são utilizadas como anti-helmíntico, antilítico, diurético na Índia (Satyavati et al., 1987) e na China (Oelrichs et al., 1983). *M. azedarach* tem sido avaliada contra *Rhodnius prolixus* (Cabral et al., 1996), *Triatoma infestans* (Valladares et al., 1999) e parasitos gastrintestinais (Hammond et al., 1997). Estes dados demonstram boas possibilidades da utilização de *M. azedarach* no controle de parasitos gastrintestinais de pequenos ruminantes.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Haemonchose na produção de ovinos e caprinos

Existem diversos relatos, em vários países do mundo, demonstrando os prejuízos causados por infecções decorrentes do parasitismo por nematóides gastrintestinais em ruminantes (Githigia et al., 2001). No nordeste do Brasil, as nematodioses são um dos fatores limitantes para a produção de rebanhos caprinos e ovinos (Pinheiro, 2001) sendo caracterizada pela alta mortalidade, baixo peso a desmama e longo intervalo pós-parto. Os parasitos gastrintestinais são a maior causa de problemas relacionados à saúde destes animais na região (Charles, 1989). A maioria das perdas associadas ao parasitismo por nematóides são subclínicas, e mostram que os custos com o parasitismo interno são elevados devido ao aumento da mortalidade e a redução na taxa de crescimento (Githiori et al., 2002).

A Haemonchose é uma gastrite parasitária de grande significado em ovinos e caprinos, causada pelo nematóide abomasal, *Haemonchus contortus*, esta espécie é a mais prevalente encontrada no abomaso destes animais (Charles, 1989). Infecções por este parasito podem resultar em acentuadas perdas na rentabilidade econômica da exploração, visto que, estes nematóides levam a uma depressão do apetite, prejuízos na função gastrintestinal, alterações no metabolismo protéico, energético e mineral, além de mudanças no balanço hídrico, que levam a alterações na composição corpórea e qualidade da carcaça (Fox, 1993). Infecções elevadas resultam em hipoproteinemia com desenvolvimento de “edema de barbela”, fraqueza, diarreia (Carlton, 1998). Entretanto, o principal sintoma da infecção por *H. contortus* é a anemia devido à sua atividade hematófaga. Adultos deste parasito têm sido observados, sugando o hospedeiro por mais de 12 minutos, onde depois de cessada a sucção, a hemorragia local ainda pode durar por até 7 minutos. Estima-se que a perda sanguínea média por parasito por dia seja de 0,05mL (Le Jambre, 1995). O parasitismo é indicado por edema subcutâneo do espaço intermandibular, assim como palidez da conjuntiva e mucosas orais. O sangue é aquoso e

o conteúdo do abomaso é líquido e marrom. As pregas do abomaso podem não apresentar lesões difusas ou focalmente congestas e apresentar edema de submucosa (Carlton, 1998).

2. Controle do parasitismo gastrointestinal

O método mais utilizado para o controle de nematóides gastrintestinais, é basicamente, o uso dos anti-helmínticos sintéticos. Estes compostos são absorvidos pelo parasito através das vias oral e/ou transcuticular. É importante ressaltar que experimentos *in vitro* demonstraram que a passagem transcuticular é a via mais importante para absorção dos anti-helmínticos. No entanto, no caso de parasitos hematófagos a via oral é tida como uma outra forma importante de ação destas drogas (Lanusse, 1996).

Anti-helmínticos têm sido usados durante anos com sucesso no controle de nematóides gastrintestinais. Contudo, atualmente, a eficácia dessas drogas está altamente comprometida em função da evolução de cepas resistentes (Amarante et al. 1999). A resistência anti-helmíntica encontra-se disseminada no mundo inteiro (Waller et al., 1995). O desenvolvimento da resistência é uma consequência inevitável do uso de anti-helmínticos (Waller, 1993). A situação é mais severa em nematóides de ovinos e caprinos onde a resistência tem sido registrada em todas as classes de anti-helmínticos disponíveis (Melo et al., 1998).

O primeiro relato de resistência a anti-helmínticos em ovinos no Brasil foi no Rio Grande do Sul (Dos Santos & Gonçalves, 1967). Estudos posteriores no nordeste brasileiro indicaram resistência anti-helmíntica em Pernambuco e Bahia (Barreto & Silva, 1999). No Ceará, outros relatos de resistência anti-helmíntica em caprinos e em ovinos (Melo et al., 1998) demonstraram que esse problema está se disseminando.

3. Plantas com Atividade anti-helmíntica

As plantas medicinais são matéria prima de origem vegetal utilizadas para elaboração de medicamentos alopáticos fitoterápicos. A grande biodiversidade presente no Brasil, em espécies vegetais constitui uma de suas maiores riquezas e destaca-se como

fonte para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (Dantas et al., 2000). A utilização de plantas no tratamento de diversas enfermidades, infecciosas ou não, é na prática bastante utilizada, sendo esta tão antiga quanto à civilização humana.

Cerca de 25% das drogas prescritas mundialmente, provém de plantas, 121 dos compostos ativos são de uso corrente. Das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais para a Organização Mundial de Saúde, 11% são exclusivamente originárias de plantas, como por exemplo: digoxina de *Digitalis spp*, vincristina de *Catharanthus roseus* entre outras (Rates, 2001).

Em todo mundo, é crescente o número de pesquisas com plantas que apresentam atividade contra vírus, bactérias, fungos e parasitos, não sendo diferente na medicina veterinária onde as pesquisas por plantas medicinais objetiva a redução de problemas sanitários no controle de várias doenças que comprometem a produtividade dos animais (Niezen et al., 1996). No Brasil, plantas medicinais são largamente utilizadas tanto nas áreas rurais como urbanas. A maioria é usada de acordo com a medicina folclórica desenvolvida pelos nativos ou compradas da Europa, Ásia e África. As plantas são utilizadas em formulações de remédios caseiros, como chás, decocto e outras tinturas, xaropes, pós, ou com o desenvolvimento da indústria farmacêutica em cápsulas e pílulas (Matos, 1997).

As principais causas do aumento na procura de produtos alternativos são: a medicina convencional pode ser ineficiente, abusiva e/ou pelo uso incorreto de drogas sintéticas com efeitos secundário, e uma grande parte da população mundial não tem acesso ao tratamento farmacológico convencional (Rates, 2001). Além disso, existe a problemática da resistência apresentada pelos nematóides aos anti-helmínticos atualmente utilizados que tem sido detectada nos rebanhos caprinos e ovinos em diversos países e regiões (Melo et al. 2003). Diante destes riscos, as plantas apresentam-se como uma alternativa natural, visto que estas possuem, contra o ataque de patógenos, mecanismos de defesa baseados na produção de compostos específicos que lhes conferem resistência (Bar-Nun & Mayer, 1990).

Apesar de muitas plantas já terem sido descritas como possuidoras de atividade anti-helmíntica, poucas foram avaliadas cientificamente. Após um levantamento sobre as principais plantas usadas na África, objetivando o controle de parasitoses gastrintestinais, McGraw et al. (2000) avaliaram através de testes *in vitro* 72 extratos obtidos de 24 gêneros de plantas, dentre eles podemos citar: *Acokanthera ablongifolia*, *Aloe marlothii*, *Apodytes diminuta*, *Euclea divinorum*, *Lippia javanica*, *Melia azedarach* e *Trema orientalis*.

No Brasil, Batista et al. (1999) avaliaram a ação de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*, sendo que, no protocolo utilizado, *S. anthelmia* apresentou uma melhor perspectiva para o uso como anti-helmíntico. O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e seu principal constituinte, eugenol revelaram atividade ovicida *in vitro* sobre *Haemonchus contortus* e foi observado que tanto o óleo como seu constituinte, apresentaram eficácia acima de 50 % na concentração de 0,0625% (Pessoa et al., 2002). Vieira e Cavalcante (1991) verificaram redução de 30% na eliminação de ovos nas fezes de caprinos tratados com *Chenopodium ambrosioides*. Os extratos da amêndoa de *Mangifera indica* na concentração de 10 mg ml⁻¹ revelaram 91% de eficácia sobre ovos de *H. contortus* (Costa et al. 2002). Estes resultados demonstram boas possibilidades da utilização de plantas no controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

4. Avaliação da propriedade anti-helmíntica de plantas

A fitoterapia tem sido indicada principalmente para reduzir os custos dos tratamentos e prolongar a vida útil dos produtos anti-helmínticos disponíveis no mercado, os extratos brutos obtidos tem largo uso após a constatação de sua eficácia e testes de segurança, através de ensaios biológicos. A trajetória para a validação farmacológica de plantas medicinais depende do objetivo (Melo, 2001). Quando a natureza química dos compostos envolvidos é conhecida, os métodos de extração são diretos. Quando a composição química não é conhecida o procedimento de extração do material pode ser

baseado no uso da planta na medicina popular ou em extrações com solventes de crescentes polaridades (Rates, 2001).

Para obtenção de compostos ativos isolados, os extratos são inicialmente analisados qualitativamente por cromatografia, e então é feita a triagem para determinação da atividade biológica ou para obtenção dos efeitos biológicos gerais. Para purificação e isolamento, os extratos ativos são seqüencialmente fracionados, e cada fração e/ou componente puro é submetido a ensaios biológicos e a avaliação de toxicidade em animais (Melo, 2001).

Segundo Rates (2001), para validação de plantas medicinais como fitoterápicos, são necessárias várias etapas. Inicialmente, deve-se selecionar a planta a ser testada, e realizar um levantamento dos dados da espécie a ser avaliada, incluindo identificação botânica e dados sobre o uso popular (parte da planta usada, forma de administração, doses, tempo de tratamento, etc). Posteriormente, são necessários testes de validação da planta selecionada, tendo por objetivo confirmar a sua eficácia e determinar a segurança na administração aos animais.

Os primeiros testes para avaliação da propriedade anti-helmíntica de uma planta medicinal são os testes *in vitro*, devido à facilidade de execução, baixo custo e rapidez em relação aos testes *in vivo*. As plantas ou seus compostos são colocados diretamente em contato com os estágios de ovo ou larva do parasito para avaliar seu efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento ou motilidade de larvas. É essencial que os primeiros testes sejam direcionados contra os helmintos de maior importância econômica (Hammond *et al.*, 1997). Dentre os testes *in vitro*, aqueles que podem ser usados para validação de uma planta anti-helmíntica são: inibição da eclosão de ovos, desenvolvimento larvar e mais recentemente, o teste de mortalidade de larvas infectantes sem bainha. O teste de inibição de eclosão de ovos é realizado para verificar o efeito inibitório de um composto sobre a eclosão destes ovos (Coles *et al.*, 1992). O teste de desenvolvimento larvar permite verificar a atividade de quimioterápicos sobre os estágios larvares de nematóides. No teste de mortalidade de larvas infectantes retira-se a bainha das larvas infectantes e em seguida estas são submetidas ao extrato de planta a ser testado,

onde posteriormente serão coradas com um corante vital e identificadas as larvas vivas e mortas ao microscópio.

Após a realização dos testes *in vitro* são necessários os testes farmacológicos que incluem os testes pré-clínicos, realizado com animais de laboratório, toxicológicos e por fim, os testes *in vivo*, utilizando a espécie alvo. Este trabalho está direcionado para a avaliação de propriedade anti-helmíntica *in vitro* de *M. azedarach*.

5. *Melia azedarach*

5.1. Considerações gerais

Melia azedarach (fig. 1) é uma árvore de mais de 10m de altura, cujos galhos rebentam desde a parte inferior do tronco, folhas alternadas, longo-pecioladas, glabras, bipinadas, com folíolos ovais ou lanceoladas, agudos. Flores pequenas, em grandes panículas eretas e multifloras, cheirosas, lilases na cor e de anteras amarelas. Drupa ovóide e pequena, amarela quando madura. Cresce rapidamente, quer por semente, quer por estaca. Em certas regiões da Índia é forragem comum dos bois, carneiros e cabras. Natural do sul da Ásia, hoje subespontânea em quase todos os países tropicais. Jasmim de soldado, flor de viúva, e jasmim de viúva, em Pernambuco; sabonete de soldado, na Bahia; Cinamomo no Rio de Janeiro, São Paulo, Rio Grande do Sul e também viuvinha, inclusive no Ceará (Braga, 1976). Seus frutos são vistosos, globosos e de cor amarelada. É uma planta facilmente diferenciada de outros membros da família Meliaceae pelo aspecto de suas folhas, pendulosas, e com ramos firmes. Uma de suas principais características é a alta produção de folhas e frutos (Burks, 1997).



Figura 1: *Melia azedarach*

5.2. Distribuição Geográfica

Planta nativa do sudeste da Ásia e norte da Austrália. No Novo Mundo, é comumente cultivada com finalidade de sombra e reflorestamento, e tem sido plantada na América tropical em vários países, tais como: México, Argentina e também algumas ilhas do Caribe. Na América do Norte, é encontrada na Virgínia, sul da Flórida e oeste do Texas. Também é encontrada no sudoeste da África (Everitt et al., 1989). No Brasil, possui um cultivo amplo (Nakatani et al., 1995) principalmente no sul (Dantas, 2000) e nordeste do país (Girão, comunicação pessoal).

5.3. Biologia e ecologia

Poucos autores têm descrito sobre a biologia de *M. azedarach*. No entanto, baseado em descrições gerais sobre seu habitat, esta planta requer sol aberto para seu desenvolvimento, não sendo tolerante à sombra, e é adaptada a solo úmido (Henderson, 1991). Apresenta rápido crescimento podendo alcançar de 6 a 8 m de altura,

em 4 a 5 anos. A altura máxima gira em torno de 12-16 m. É uma planta altamente tolerante ao calor e à seca, como também, a condições pobres de solo (Time Life Plant Encyclopedia Virtual Garden, 1999).

5.4. Usos na medicina tradicional

Diversas propriedades terapêuticas tem sido atribuídas a *M. azedarach*. Barquero et al. (1997) relataram que extratos desta planta têm sido usados para várias finalidades médicas, incluindo o tratamento de infecções virais tais como herpes (HSV-1). Extratos do caule são utilizados como anti-helmíntico na ilha de Mauritius e na China. Além disso, na Argélia a planta é utilizada como tônico e antipirético, e no sul da África no tratamento da lepra, eczema e para alívio de ataques asmáticos (Oelrichs et al., 1983). Carpinella et al. (1999) avaliaram a atividade antifúngica desta planta e relataram que o extrato etanólico obtido de frutos maduros apresentou atividade fungistática e fungicida para diversos fungos patogênicos como *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Microsporium canis*. Existem ainda outros empregos para os farmacógenos do cinamomo: na China são usados cascas, folhas e frutos como anti-helmínticos e tratamento de micoses, na África para tratar malária, e na Coreia a casca do caule é usada na forma de decocto para tratar vermes intestinais (Matias et al., 2002). Khan et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana de *M. azedarach* sobre diversos tipos de bactérias, protozoários e fungos como *Bacillus coagulans*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, e *Trichomonas vaginalis*, obtendo ótimos resultados.

No Rio de Janeiro, Cabral et al. (1996) relataram que o extrato metanólico de sementes de *M. azedarach* constitui-se uma ferramenta importante no controle de *Rhodnius prolixus*, vetor da doença de Chagas. Valladares et al. (1999) avaliaram a ação desta planta sobre *T. infestans* e demonstraram que os extratos obtidos dos frutos mostraram atividade repelente contra ninfas deste inseto. De acordo com Dantas et al. (2000), o decocto de folhas de *Melia azedarach* tem sido utilizado como carrapaticida, já

estando comprovada a existência de princípio ativo, presente nesta planta, sobre *Boophilus microplus*.

5.5. Constituintes químicos

Segundo Srivastava et al. (1985) *M. azedarach* apresenta atividades medicinal e inseticida, atribuídas aos limonóides, como azadiractina, um limonóide que possui ação antialimentar em insetos (Huang et al., 1995), classificado como um dos compostos mais promissores sendo extraído de *Azadirachta indica* e *M.azedarach*. Os limonóides são tetranotriterpenóides que tem como precursor um triterpeno, que perde quatro carbonos ao originá-lo. Estes compostos são capazes de inibir o crescimento ou a alimentação de insetos (Matias et al., 2002). Além disso, os extratos de folhas e de sementes de nim e cinamomo, contêm cerca de quatro compostos ativos, dos quais, azadiractina, salanina, meliantriol e nimbim são os principais e que possuem comprovada ação inseticida. As salaninas são triterpenóides que têm sido descritas como composto biologicamente ativo em insetos, encontrados em plantas da família Meliaceae, como *A. indica* e *M. azedarach* (Yamasaki et al., 1988). Segundo Matias et al. (2002) além dos limonóides, outras classes de metabólitos (triterpenóides e esteróides, alcalóides, proteínas, fenóis e fitoesteróis) também estão presentes nos órgãos de *M. azedarach* (Quadro I).

Quadro I: Metabólitos presentes em *Melia azedarach* com atividade biológica descrita.

Metabólitos	Órgão vegetal	Atividade biológica	Tipo de metabólito
Azedarachol	Raiz	Inseticida	Esteróide
Melianol	Fruto	Anti-helmíntico	Triterpeno
Meliantriol	Fruto	Anti-helmíntico	Triterpeno
Cinamol	Sementes	Repelente	Triterpeno
Campesterol	Sementes	Repelente	Fitoesterol

Cabral et al. (2000) avaliaram o extrato metanólico de sementes de *M. azedarach* sobre ninfas de *Rhodnius prolixus* e verificaram que apresentou atividade sobre a muda do inseto, tendo como substâncias responsáveis os fitoesteróis, liganas e triterpenos.

5.5.1. Taninos

Os taninos compreendem um grande grupo de substâncias complexas muito disseminadas no reino vegetal; em quase todas as famílias botânicas há espécies que contêm taninos. Quando ocorrem em grandes quantidades geralmente se localizam em determinados órgãos da planta como as folhas, os frutos, o córtex ou o caule. Costumam ser divididos em duas classes químicas, com base na identidade dos núcleos fenólicos existentes e na maneira como se unem. Como ésteres são facilmente hidrolisados, produzindo ácidos fenólicos e açúcar, são conhecidos como taninos hidrolisáveis. Os taninos condensados compõem a segunda classe. Os taninos precipitam proteínas e podem combinar-se a elas, tornando-as resistentes às enzimas proteolíticas (Robbers, 1997).

Segundo Simões et al. (1999) os taninos condensados são polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan – 3,4-diol. Essa classe de taninos também é denominada como proantocianidina devido ao fato de os taninos condensados produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas. Os taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Taninos condensados em geral estão amplamente distribuídos em plantas lenhosas.

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias. Dentre essas atividades podem-se citar: ação bactericida e fungicida, antiviral, moluscicida, inibição de enzimas e ação anti-tumoral (Simões et al., 1999). Taninos condensados (Athanasiadou et al., 2001) e hidrolisáveis (Costa et al., 2002) também são descritos na literatura como prováveis possuidores de atividade anti-helmíntica.

Aparentemente, os taninos condensados extraídos de plantas (ex: *Vitis vinifera* (uva) e *Camellia sinensis* (chá verde) são isentos de toxicidade, segundo experimentos realizados a curto e longo prazo em animais de laboratório. São necessários outros ensaios clínicos para resolver problemas no que diz respeito à segurança e eficácia dos taninos condensados como agentes terapêuticos (Robbers, 1997)).

5.5.2. Triterpenos e esteróides

Os limonóides são tetranotriterpenóides e talvez os maiores representantes dessa classe como substâncias inseticidas, no entanto, monoterpenos simples, como o limoneno e mirceno desempenham um papel de proteção contra insetos nas plantas que os produzem. Os limonóides são também conhecidos como meliacinas e são assim denominados devido ao seu sabor amargo. Tais substâncias foram isoladas de plantas pertencentes às famílias Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae. Sua rota biossintética em plantas prevê como precursor um triterpeno que no final, dá origem aos tetranotriterpenóides pela perda de 4 átomos de carbono do precursor original. Os limonóides são conhecidos pelo fato de apresentarem atividade contra insetos, seja interferindo no seu crescimento, seja pela inibição de sua alimentação (Simões et al., 2000).

Existe uma grande diversidade de limonóides isolados da família Meliaceae, entre eles azedarachinas, sendaninas e trichilinas, além dos que apresentam o anel C-seco, como a azadiractina que é o principal composto. Estes podem ser encontrados em todos os tecidos das plantas, no entanto, os órgãos podem individualmente produzir diferentes tipos de limonóides (Nakatani et al., 1996). Os limonóides com anel C-seco se restringem aos gêneros *Azadirachta sp* e *Melia sp*. (Champagne et al., 1992). Estas substâncias são comuns naquelas plantas que têm maior atividade inseticida. Estes compostos possuem o anel C do núcleo dos tetranotriterpenóides aberto como pode ser observado na azadiractina, que é o maior representante desta classe. Azadiractina e outros compostos

bioativos do nim podem exercer múltiplas ações afetando a alimentação, crescimento e desenvolvimento de patógenos e seus vetores (Mulla & Tianyun, 1999).

5.5.3. Alcalóides

Os alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, encontrados predominantemente em angiospermas. Alcalóides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo em um ou mais órgãos haverá acúmulo preferencial dessas substâncias. Em geral, alcalóides presentes em plantas da família Meliaceae são quinazolônicos, diterpênicos ou mistos. O amplo espectro das atividades biológicas reportada aos alcalóides pode ser relacionado com sua variedade natural (Simões et al., 2000). A atividade anti-helmíntica dos alcalóides também tem sido descrita. Paraherquamida é um alcalóide, reportado como um potente nematodocida. Este alcalóide inibiu em 50% a motilidade de larvas L3 de *Ostertagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* e *H. contortus* após 72 horas de exposição, nas concentrações de 0,033; 0,058 e 2.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Gill e Lacey, 1993). Shoop et al. (1992), dosificaram bovinos com paraherquamida e observaram que nas doses de 1,0 a 4,0mg kg^{-1} 95% dos parasitos foram removidos, dentre eles, *Haemonchus placei*, *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus axei* e *Oesophagostomum radiatum*.

JUSTIFICATIVA

O nordeste brasileiro concentra a maior criação de caprinos e ovinos deslançados do Brasil. Os parasitos gastrintestinais são comuns às duas espécies animais, e *H. contortus* é o nematóide responsável por severas perdas econômicas de rebanhos. No combate a este parasitismo utilizam-se anti-helmínticos onerosos e algumas vezes pouco eficazes principalmente devido à resistência a estes compostos. Os anti-helmínticos encontrados no mercado atuam sobre ovos dos nematóides impedindo a eclosão ou causando paralisia nas larvas. Os testes *in vitro* são simples, pouco onerosos e rápidos sendo utilizados como teste preliminar de atividade ovicida e larvicida sobre nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. A descoberta de plantas com atividade anti-helmíntica está em consonância com o projeto do governo do Estado do Ceará de desenvolvimento sustentável do semi-árido. Ao utilizar produtos naturais no controle de verminoses gastrintestinais de pequenos ruminantes, pretende-se promover a redução de custos na produção de ovinos e caprinos tornando esta atividade mais produtiva. Desta forma, os testes *in vitro* permitirão avaliar possíveis propriedades anti-helmínticas de plantas encontradas no Brasil.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a eficácia de *Melia azedarach* no controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

Objetivos específicos

Avaliar a atividade ovicida e larvicida do extrato clorofórmico e etanólico de sementes e dos extratos hexânico e etanólico obtidos de folhas de *M. azedarach* contra *H. contortus* parasito abomasal de ovinos e caprinos.

Analisar fitoquimicamente o (os) extrato (os) de maior atividade ovicida e larvicida.

METODOLOGIA

1. Obtenção dos extratos

Foram utilizadas 1 kg de sementes e de 1 kg folhas trituradas da planta *M. azedarach* coletadas em Teresina–Piauí. A exsicata da planta foi realizada no Herbário Prisco Bezerra, Fortaleza, Ceará. Esta planta está registrada sob o número 34590.

Os extratos da planta foram preparados, adicionando-se os solventes orgânicos hexano, clorofórmio e etanol, em aparelho do tipo soxlet durante 6 horas, obtendo-se os respectivos extratos. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório, obtendo-se o extrato hexânico de folhas (EHF), clorofórmico de sementes (ECS) e os extratos etanólicos de folhas e sementes (EEF e EES) de *M. azedarach*.

2. Análise fitoquímica de *M. azedarach*

Os testes fitoquímicos foram realizados com os extratos mais ativos, seguindo a metodologia preconizada por Matos, (1997). Para realização dos testes, tomaram-se alíquotas dos extratos etanólico de sementes (EES) de folhas (EEF) de *M. azedarach* e diluiu-se em água destilada. Estes testes baseiam-se na adição de determinados reagentes e a observação da alteração da cor das soluções com os extratos. No teste para fenóis e taninos foram utilizados tubos de ensaio, contendo 0,5 mL do EES e EEF, em seguida foram colocadas três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3). A solução foi agitada observando-se mudança de coloração ou formação de precipitados abundantes e escuros.

No teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas, foram utilizadas quatro tubos de ensaio, dois contendo EES e dois com EEF, em seguida adicionou-se a um tubo HCl (pH 1-3) e no outro NaOH (pH 11), para cada extrato. Os tubos foram aquecidos com auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2-3 minutos. Foi observado se houve alguma alteração na cor, comparando a tubos contendo apenas o extrato diluído em água. Para confirmação da presença de taninos condensados, utilizou-se um palito

de madeira umedecido no extrato hidroalcolico a ser testado. Após evaporar o solvente, uma face do palito foi re-umedecida com HCl concentrado, com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida o palito foi aquecido por 2-3 minutos ao calor de uma chama de álcool. Observou-se a mudança de coloração na face acidulada do palito.

No teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman - Burchard), extraiu-se o resíduo seco de ambos os extratos, com 1 mL de diclorometano. A solução foi filtrada em um funil com algodão, coberto por 2 decigramas de sulfato de sódio anidro (NaSO_4) para um tubo de ensaio. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de anidrido acético, agitando-se a solução. Em seguida, adicionou-se três gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Observou-se rápido desenvolvimento de cores.

Para o teste de alcalóides, tomou-se uma parte dos extratos dissolvendo-se em água. Em seguida, adicionou-se 3 gotas de HCl. Esta solução foi igualmente dividida em três tubos de ensaio para cada extrato. No primeiro tubo, adicionou-se 3 gotas dos reagentes de Mayer, no segundo 3 gotas de reagente de Dragendorff e no terceiro 3 gotas do reagente de Hager. Observou-se a formação de precipitado característico.

3. Teste *in vitro* de inibição da eclosão de ovos

Dois ovinos portadores de infecção monoespecífica de *H. contortus* foram mantidos em gaiolas metabólicas. Estes animais foram utilizados como fonte de ovos frescos obtidos a partir das fezes para realização dos testes *in vitro*. Aproximadamente 100 ovos frescos de *H. contortus* foram recuperados (Hubert & Kerboeuf, 1984) e distribuídos em 0,5 mL/poço de placa, adicionando-se o mesmo volume dos extratos de *M. azedarach*, nas seguintes concentrações: 50; 25; 12,5; 6,2 e 3,12 mg mL⁻¹. Após 48 horas, contaram-se ovos e larvas eclodidas ao microscópio. Cada concentração dos extratos foi acompanhada de um controle negativo contendo apenas diluente, Tween 80 a 3% e um controle positivo com tiabendazol (TBZ) a 0,025 mg mL⁻¹. Foram realizadas cinco réplicas para cada extrato. No caso do EES foram utilizadas além das concentrações

citadas acima, concentrações mais baixas (1,56; 0,78; 0,39 e 0,19 mg mL⁻¹) para efeito de cálculo da CL₅₀.

4. Teste de desenvolvimento larvar

Após a recuperação e incubação de aproximadamente 100 ovos durante 24 horas em estufa a 30° C para eclosão das larvas, separou-se alíquotas desta suspensão para avaliação do número de larvas eclodidas por µL. Em seguida, foram feitas larvaculturas, adicionando-se larvas e as concentrações (50; 25; 12,5; 6,2 e 3,12 mg mL⁻¹) de cada extrato às fezes de um animal livre de nematóides, e incubadas durante 7 dias a 30° C (Roberts & O'Sullivan, 1950). Após este período as larvas foram recuperadas e contadas ao microscópio observando-se os estágios de desenvolvimento (L₁ ou L₂ e L₃).

5. Análise estatística

Os dados do teste de eclosão de ovos (TEO) e teste de desenvolvimento larvar (TDL) foram transformados pela fórmula: $\log(x + 1)$; submetidos á análise de variância One Way e comparados pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa Prisma 3.0. Os resultados foram expressos em percentual de inibição da eclosão de ovos e de desenvolvimento larvar. O cálculo da CL₅₀ foi realizado pelo método de probito utilizando o programa SPSS 8.0 para Windows, com um intervalo de confiança de 95%. A CL₅₀ é a concentração do extrato que inviabilizou 50% dos ovos e larvas do parasito. Ovo inviável é aquele que não eclodiu após 48 horas, larva inviável é aquela que não atingiu o terceiro estágio larvar após uma semana de contato com o extrato.

RESULTADOS

Os extratos clorofórmico e etanólico de sementes, e hexânico e etanólico de folhas apresentaram um rendimento de 15; 30; 23 e 50g respectivamente.

1. Teste de eclosão de ovos

Os resultados do teste de eclosão de ovos para os extratos de folhas e sementes de *M. azedarach* encontram-se nas Tabelas 1 e 2 respectivamente. Foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) nas médias de eficácia dos extratos de folhas. O EEF mostrou boa atividade ovicida nas cinco concentrações testadas, sendo comparada ao tiabendazol, demonstrando ser dose - dependente. A CL_{50} do EEF foi $2,22 \text{ mg mL}^{-1}$. O EHF não demonstrou atividade ovicida (CL_{50} : $35,8 \text{ mg mL}^{-1}$).

Tabela 1: Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *Melia azedarach* sobre a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*.

Concentração (mg mL^{-1})	% de eficácia	
	Extrato hexânico	Extrato etanólico
50	$16,92 \pm 4,51^{aA}$	$100 \pm 0,0^{aB}$
25	$12,93 \pm 2,82^{aA}$	$100 \pm 0,0^{aB}$
12,5	$15,21 \pm 4,33^{aA}$	$98,24 \pm 1,97^{bB}$
6,2	$15,41 \pm 5,64^{aA}$	$90,42 \pm 1,50^{cB}$
3,12	$14,45 \pm 6,79^{aA}$	$66,64 \pm 3,96^{dB}$
tiabendazol (0,025)	$100 \pm 0,0^b$	$100 \pm 0,0^a$
Tween 80 a 3%	$5,33 \pm 5,61^a$	$5,33 \pm 5,61^e$
água destilada	$1,32 \pm 2,48^a$	$1,32 \pm 2,48^e$

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas. ($p < 0,001$)

Tabela 2: Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão dos extratos clorofórmico e etanólico de sementes de *Melia azedarach* sobre a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*.

Concentração mg mL ⁻¹	% de eficácia	
	Extrato clorofórmico	Extrato etanólico
50	92,39 \pm 1,47 ^{aA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
25	54,98 \pm 3,02 ^{bA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
12,5	62,92 \pm 3,09 ^{bcA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
6,2	40,60 \pm 3,49 ^{bdA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
3,12	32,77 \pm 5,14 ^{dA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
tiabendazol (0,025)	100 \pm 0,0 ^e	100 \pm 0,0 ^a
tween 80 a 3%	1,4 \pm 3,29 ^f	1,4 \pm 3,29 ^b
Água destilada	2,2 \pm 3,67 ^f	2,2 \pm 3,67 ^b

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas. (p < 0,001)

Diferenças estatísticas também foram observadas quando se comparou os dois extratos de sementes (p < 0,05), ambos com atividade ovicida (Tabela 2). O ECS demonstrou atividade ovicida na maior concentração, no entanto o EES mostrou-se superior com eficácia de 100% em todas as concentrações testadas. A CE₅₀ do ECS foi de 7,26 mg mL⁻¹ (Tabela 4).

Tabela 3: Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão em menores concentrações do extrato etanólico de sementes de *Melia azedarach* sobre a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*.

Concentração mg mL ⁻¹	% de eficácia
	Extrato etanólico de sementes
1,56	100 \pm 0,0 ^a
0,78	85,27 \pm 3,65 ^b
0,39	43,75 \pm 4,50 ^c
0,19	31,67 \pm 10,64 ^c
tiabendazol (0,025)	100 \pm 0,0 ^a
tween 80 a 3%	1,4 \pm 3,29 ^d
Água destilada	2,2 \pm 3,67 ^d

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas. (p <0,001)

Tabela 4: Concentração letal dos extratos de *Melia azedarach* sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*.

Extrato de <i>M. azedarach</i>	Concentração letal de 50%	
	Eclosão de ovos	Desenvolvimento larvar
Hexânico de folhas	35,8 mg mL ⁻¹	33,59 mg mL ⁻¹
Etanólico de folhas	2,22 mg mL ⁻¹	9,18 mg mL⁻¹
Clorofórmico de sementes	7,26 mg mL ⁻¹	19,02 mg mL ⁻¹
Etanólico de sementes	0,36 mg mL⁻¹	98 mg mL ⁻¹

Para calculo da CL₅₀ do EES, foi necessário abaixar as concentrações utilizadas. Este extrato apresentou eficácia de 100% mesmo na concentração de 1,56 mg mL⁻¹ (Tabela 3), e a CL₅₀ foi de 0,36 mg mL⁻¹ (Tabela 4), sendo o mais ativo no teste de

eclosão de ovos. Ao comparar os extratos mais eficazes de folhas e sementes, observa-se que o EES foi semelhante ao EEF nas concentrações mais elevadas, sendo mais eficaz nas concentrações subsequentes ($p < 0,05$).

2. Teste de desenvolvimento larvar

Os extratos de folhas da planta demonstraram que o EHF obteve atividade sobre larvas apenas na maior concentração. Entretanto o EEF obteve boa atividade sobre larvas tendo sido 71,7% eficaz até mesmo na concentração de $6,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (Tabela 5) ($p < 0,05$). A CL_{50} deste extrato foi de $9,18 \text{ mg mL}^{-1}$, sendo este portanto, o mais ativo dos quatro extratos testados. Quando foram comparados os extratos de sementes observou-se que o ECS foi eficaz (93,48%) apenas na maior concentração. O EES não demonstrou boa eficácia sobre as larvas de *H. contortus* (Tabela 6).

Tabela 5: Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*.

Concentração (mg mL^{-1})	% de eficácia	
	Extrato hexânico	Extrato etanólico
50	$67,90 \pm 39,55^{aA}$	$91,64 \pm 2,17^{aB}$
25	$32,08 \pm 25,91^{acA}$	$76,73 \pm 35,79^{aB}$
12,5	$22,75 \pm 25,96^{acA}$	$67,57 \pm 12,27^{beA}$
6,2	$13,89 \pm 27,79^{acA}$	$71,7 \pm 8,97^{bceA}$
3,12	$14,25 \pm 18,61^{acA}$	$15,63 \pm 12,23^{dfA}$
Ivermectina ($0,32 \mu\text{L mL}^{-1}$)	$94,29 \pm 4,18^{ba}$	$79,71 \pm 8,90^e$
Tween 80 a 3%	$46,54 \pm 10,02^c$	$0,0 \pm 27,06^f$
Água destilada	$0,0 \pm 37,06^c$	$0,0 \pm 37,42^f$

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas $p < 0,001$.

Ao comparar os extratos de folhas e de sementes, foi observado que o EEF foi o mais eficaz contra larvas do parasito ($p < 0,05$). É importante ressaltar que todas as larvas recuperadas das larvaculturas, para todos os extratos, eram larvas de terceiro estágio.

Tabela 6: Percentual médio de eficácia \pm desvio padrão dos extratos clorofórmico e etanólico de sementes de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*.

Concentração (mg mL ⁻¹)	% de eficácia	
	Extrato clorofórmico	Extrato etanólico
50	93,48 \pm 6,04 ^{acA}	29,03 \pm 33,09 ^{aB}
25	35,13 \pm 21,40 ^{bdA}	32,69 \pm 35,01 ^{aA}
12,5	32,66 \pm 17,63 ^{bdA}	29,41 \pm 9,40 ^{aA}
6,2	26,94 \pm 5,32 ^{bdA}	19,08 \pm 10,90 ^{aA}
3,12	10,44 \pm 23,34 ^{bdA}	22,03 \pm 26,53 ^{aA}
Ivermectina (0,32 μ L mL ⁻¹)	85,15 \pm 11,45 ^c	92,79 \pm 7,97 ^b
Tween 80 a 3%	19,10 \pm 20,68 ^d	14,44 \pm 17,08 ^a
Água destilada	0,0 \pm 14,50 ^d	0,0 \pm 26,93 ^a

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas ($p < 0,001$).

3. Análise fitoquímica de *M. azedarach*

Os testes fitoquímicos foram realizados utilizando-se o extrato de maior atividade no TEO e no TDL. Os resultados desta análise encontram-se na Tabela 7. Nos extratos etanólicos de folhas e sementes, observou-se que ao se adicionar o cloreto férrico, houve mudança de coloração para uma tonalidade verde escura, indicativa de taninos condensados. No teste de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas, observou-se que o EES para o meio ácido houve intensificação da cor parda amarelada, já no meio

alcalino, houve uma coloração vermelho laranja, mostrando positividade para flavononas e taninos condensados. No EEF, observou-se apenas a mudança de coloração no meio ácido, parda amarelada, indicativa de taninos condensados. No teste de confirmação de catequinas foi observado que para ambos extratos, a face do palito de madeira, apresentou uma coloração parda avermelhada, confirmando a presença de catequinas.

Em relação à presença de esteróides e triterpenóides, no EES, houve uma mudança de coloração vermelha indicativa da presença de triterpenóides pentacíclicos livres. No entanto, no EEF esta mudança de coloração passou rapidamente do azul para um verde escuro permanente, indicando que neste extrato há presença de esteróides livres. No teste de alcalóides, foi observada no EES pela a formação de precipitado floculoso nos tubos de ensaio para os três reagentes utilizados. O EEF apresentou formação de precipitado apenas no meio que continha o reagente de Dragendorff.

Tabela 7: Resultados da análise fitoquímica dos extratos etanólicos de folhas e de sementes de *Melia azedarach*.

Teste fitoquímico	<i>M. azedarach</i>	
	Extrato etanólico de sementes	Extrato etanólico de folhas
Fenóis e taninos	+ taninos condensados	+ taninos condensados
Leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	+ taninos condensados e flavonas	+ taninos condensados
Confirmação de taninos	+	+
Esteróides e triterpenóides	+ triterpenóides penta cíclicos livres	+ esteróides
Ácidos fixos fortes	+	-
Alcalóides	+ para 3 reagentes	suspeito

+ = reação positiva

DISCUSSÃO

As plantas são uma rica fonte botânica de substâncias anti-helmínticas, antibacterianas e inseticidas. Um grande número de plantas medicinais têm sido usado para o tratamento de infecções parasitárias em homens e animais (Akhtar et al., 2000). Os testes *in vitro* são usados como estudos preliminares de fitoterápicos. Nestes testes, as plantas são colocadas diretamente em contato com os estágios de ovo ou larva do parasito para avaliar seu efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar (Hammond et al., 1997).

Plantas pertencentes à família Meliaceae têm sido avaliadas com diversas finalidades em várias partes do mundo (Mulla & Tianyun, 1999). No presente estudo, o extrato etanólico de sementes foi o mais ativo, apresentando 100% de eficácia na concentração de 1,56 mg mL⁻¹, ligeiramente ao óleo essencial de *L. sidoides* sobre *H. contortus* na concentração de 1% (Pessoa et al., 2001). Enquanto que eficácias inferiores foram observadas com os extratos acetato de etila e metanólico da planta *Spigelia anthelmia* sobre *H. contortus*, estes extratos apresentaram eficácia de 100 e 97,4% respectivamente na concentração de 50 mg mL⁻¹ (Assis et al., 2003). Os extratos da amêndoa de *Mangifera indica* na concentração de 10 mg mL⁻¹ revelaram 91% de eficácia sobre ovos de *H. contortus* (Costa et al. 2002). Alawa et al. (2003) testaram o extrato aquoso das folhas de *Vernonia amygdalina* e das cascas de *Annona senegalensis* sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*. *A. senegalensis* inibiu a eclosão em apenas 11,5% na concentração de 7,1mg mL⁻¹, diferindo estatisticamente do controle negativo.

A atividade inseticida de plantas desta família têm sido muito estudada, sendo atribuída aos limonóides. Estes compostos são capazes de inibir o desenvolvimento ou a alimentação de insetos (Matias et al., 2002). Resultados semelhantes a este trabalho foram obtidos com o extrato etanólico de *M. azedarach* a 2% sobre ovos do inseto *Earias vitella* (Gajmer et al., 2002). Abdel – Shafy e Zayed (2002) em experimento com óleo de *A. indica* observaram que o “Neem Azal F”, um extrato de sementes desta planta contendo 5% de azadiractina, inibiu a eclosão de ovos do carrapato *Hyalomma*

anatolicum excravatum na dose de 1,6%. Este efeito sobre a eclodibilidade dos ovos foi atribuído a azadiractina. Estes resultados demonstram a possibilidade dos triterpenos serem as possíveis substâncias ativas presentes nos extratos.

Na análise fitoquímica, o EES revelou a presença de TTP em sua composição. Os TTP são substâncias presentes em plantas da família Meliaceae descritas na literatura como possuidoras de atividade inseticida. Segundo Mulla & Tianyun (1999), estas substâncias estão presentes em altas concentrações nas sementes de *A. indica*, já tendo sido relatada sua atividade ovicida sobre insetos. Desta forma, os TTP podem ser uma das substâncias ativas no teste de eclosão de ovos deste estudo. Segundo Velazco (2000), alguns tipos de terpenos como a azadiractina atuam sobre a alimentação, oviposição, fecundidade e desenvolvimento dos insetos.

A eficácia de extratos de plantas sobre larvas de parasitos, também tem sido bem documentada. Devido à atividade antialimentar em insetos (Matias et al., 2002) causada por plantas da família Meliaceae, muitos trabalhos vêm sendo realizados, sobre larvas de insetos. No presente estudo, o EEF foi o mais ativo. Koul et al. (2002) relataram o efeito inibitório de 69,5% sobre o crescimento das larvas do inseto *Helicoverpa armigera* na concentração de 100 ppm, quando se utilizou o extrato metanólico de *Melia dubia* (syn. *M. azedarach*). Resultados inferiores foram obtidos por Alawa et al. (2003), utilizando coproculturas com cascas de *A. senegalensis*. Estes autores encontraram redução significativa do número de larvas recuperadas na concentração de 7,5 mg mL⁻¹. Resultados superiores ao deste trabalho foram obtidos por Ademola et al. (2004) em experimentos realizados com o extrato metanólico da meliacea *Khaya senegalensis* sobre strongilídeos de bovinos, observando-se efeito sobre as larvas de primeiro estágio destes parasitos, apresentando uma DL₅₀ de 0,69 mg ml⁻¹. Salles & Rech (1999) avaliaram a ação de pó de *M. azedarach* sobre o díptero *Anastrepha fraterculus* e observaram redução dose-dependente no número médio de larvas eclodidas e adultos emergidos até a dose de 120g/L.

A presença de taninos condensados foi detectada tanto nos extratos etanólico de folhas como de sementes de *M. azedarach*. Dantas et al. (2000) também detectaram a presença de taninos em frutos maduros de *M. azedarach*, assim como compostos fenólicos não tânicos e esteróides. Os taninos condensados são substâncias descritas na literatura como possuidores de atividade anti-helmíntica, estes podem atuar por dois tipos de mecanismos: ligar-se a proteínas livres reduzindo a disponibilidade dos nutrientes resultando em morte das larvas por inanição, ou ligar-se à cutícula das larvas, rica em glicoproteínas, e causar sua morte (Athanasiadou et al., 2001). Este mecanismo de ação dos TC leva-nos à formular a hipótese de que esta seja uma das substâncias ativas sobre o desenvolvimento das larvas de *H. contortus*.

Em relação aos alcalóides, substâncias encontradas no EES, Gill e Lacey (1993) ao testarem o alcalóide paraherquamida sobre larvas de *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* e *H. contortus* observaram alta taxa de mortalidade das larvas destes parasitos após 72 horas de exposição, nas concentrações de 0,033; 0,058 e 2,7 $\mu\text{g mg}^{-1}$. Apesar da presença de alcalóides não ter sido totalmente comprovada no EEF, outros tipos de alcalóides podem ser os responsáveis pela alta eficácia do EES no teste de eclosão de ovos. É importante ressaltar que tanto para o TEO como para o TDL, as substâncias presentes nos extratos podem ser as responsáveis pela sua respectiva atividade, entretanto, a possível interação entre estas substâncias ativas não deve ser descartada.

Em virtude das diferenças fitoquímicas entre os dois extratos, sugere-se que no teste de eclosão de ovos, os prováveis princípios ativos pertençam à classe dos taninos e triterpenos, como o melianrol e melianol. No teste de desenvolvimento larvar, os taninos provavelmente são as substâncias ativas.

CONCLUSÕES

O extrato etanólico de sementes foi o extrato de maior atividade sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*;

No teste de desenvolvimento larvar o extrato etanólico de folhas revelou ser o mais ativo;

As diferenças de composição química dos extratos deve ser a provável causa das diferenças das atividades dos testes aplicados.

PERSPECTIVAS

Estudar quimicamente os extratos das sementes e folhas de *M. azedarach* através de métodos cromatográficos para isolamento dos constituintes químicos, determinação da sua estrutura molecular através de métodos espectroscópicos e avaliação das suas atividades anti-helmínticas.

Proceder aos testes toxicológicos dos extratos e substâncias com animais de laboratório.

Além disso, verificar a ação de *M. azedarach in vivo*, para avaliação de suas propriedades anti-helmínticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL – SHAFY, S.; ZAYED, A.A. *In vitro* acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.106, p. 89-96, 2002.

ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* e *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v.122, p. 151-164. 2004.

AKHTAR, M. S.; IQBAL, Z.; KHAN, M. N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo – Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research**, v.38, p. 99-107, 2000.

ALAWA, C. B. I.; ADAMU, A. M.; GEFU, J. O.; AJANUSI, O. J.; ABDU, P. A.; CHIEZEY, N. P.; ALAWA, J. N.; BOWMAN, D. D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vermonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v.113, p. 73-81. 2003.

AMARANTE, A. F. T.; CHALESTON, W. E.; LEATHWICK, D. M., TORNERO, M. T. T. Evaluation of larval development assay for the detection of resistance in *Ostertagia circumcincta*. **International Journal for Parasitology**, v.27, p. 305-311, 1997.

AMORIM, A; RODRIGUES, M. L. A; BORBA, H. R. Ação anti-helmíntica de plantas XII – Influência de extratos vegetais *in vitro* na viabilidade de larvas de nematódeos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, p. 47-48, 1996.

AROSEMENA, N. A. E.; BEVILAQUA, C. M. L.; MELO, A. C. F. L.; GIRÃO, M. D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. **Revue Medicine Vétérinaire**, v.150, p. 873-876, 1999.

ASSIS, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S.; COSTA, C. T. C.; SOUZA, J. A. L. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.117, p. 43-49, 2003.

ATHANASADIOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v.99, p. 205-219, 2001.

BAR- NUM, N.; MAYER, A. M. Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinera*, **Phytochemistry**, v. 29, p. 787-791, 1990.

BARQUERO, A. A.; ALCHE, L. E.; COTO, C. E.. Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase-deficient mutant of Herpes simplex virus type 1 alone and in combination with acyclovir. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.9, n.1, p.49-55, 1997.

BARRETO, M. A.; SILVA, J. S. Avaliação da resistência de nematódeos gastrintestinais em rebanhos caprinos do Estado da Bahia – (Resultados Preliminares). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1999. Salvador, BA. **Anais ... Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 1999. p.160.

BATISTA, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal**, v. 9, p. 67-73, 1999.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. v. 11. 3ed. Coleção Mossoroense, 1976.

BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIN, J. D.; Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick), **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 455-459, 2001.

BURKS, K. C. *Melia azedarach*. **Fact sheet prepared by the Bureau of Aquatic Plant Management**. Department of Environmental Protection, State of Florida, Tallahassee, FL. 1997.

CABRAL, M. M. O.; HEINZ REMBOLD, E. S. G., SIMONE, S. G. D.; KALECOM, A. Anti-moulting activity in Brazilian *Melia azedarach*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 117-118, 1996.

CARLTON, W. W. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2ed. Porto Alegre: ArtMed. 1998.

CARPINELLA, M. C.; HERRERO, G. G.; ALONSO, R. A.; PALACIOS, S. M. Antifungal activity of *Melia azedarach* fruti extract. **Fitoterapia**, v. 70, p. 296-298, 1999.

CHARLES, T. P. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in Pernambuco state Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 30, p. 335-343, 1989.

CHAMPAGNE, D. E. Biological activity of limonoids from the rutales. Review article number 65. **Phytochemistry**, v. 31, p. 377-394, 1992.

COLES, G. C.; BAUER, F. H. M.; BORGSTEEDE, S.; GREERTS, S.; KLEI, M. A.; WALLER, P. J. 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. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.

COSTA, C. T. C.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, p. 57-60, 2002.

DANTAS, D.A.; MAGANHA, M.; BERETTA, T. E.; NOZU, P.; PEREIRA, G. da S.; MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.; KOLLER, W. W. ; GOMES, A. Estudo fitoquímico dos frutos de *Melia azedarach* L. (Cinamomo, Meliaceae). In ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIDERP, 2., Campo Grande, 2000. **Anais...**, Campo Grande: UNIDERP, p. 119-120, 2000. *Resumo expandido*.

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao tiabendazol no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, v. 9, p. 201-209, 1967.

EMBRAPA. **Recomendações tecnológicas para a produção de caprinos e ovinos no Estado do Ceará**. Sobral: EMBRAPA/CNPC, 58 p. Circular técnica, 9, 1994.

EVERITT, J. H., ESCOBAR, D.E.; NECK, R.W. Using color-infrared aerial photography to distinguish Chinaberry (*Melia azedarach* L.) infestations in southern and south-central Texas. **The Texas Journal of Science**, v. 41, p. 265-272, 1989.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 46, p. 143-158, 1993.

GAJMER, T.; SINGH, R.; SAINI, R. K.; KALIDHAR, S. B. Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach*) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab)(Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 126, p. 238 – 243, 2002.

GITHIGIA, S. M.; THAMSBORG, S. M.; MUNYA, W. K.; MAINGI, N. Impact of gastrointestinal helminths on production in goats in Kenya. **Small Ruminant Research**, v. 42, p.187-191, 2002.

GITHIORI, J. B.; HÖGLUND, J.; WALLER, P. J.; BAKER, R. L. Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine Africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite, *Haemonchus contortus*, of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p.187-191, 2002.

GUHA, S. R. D.; NEJI, J. S. Writing and printing paper from *Melia azedarach* Linn (Persian lilac) **Indian For**, v. 91, p. 867-869, 1965.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, v. 21, p. 213-228, 1997.

HENDERSON, L. Invasive alien woody plants of the northern Cape. **Bothalia**, v. 21, p. 177-189, 1991.

HERD, R. **Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas**. “Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes” (T. Padilha, Ed. EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco, MG.), p. 95-111, 1996.

HUANG R. C.; OKAMURA H.; IWAGAWA T.; TADERA K.; NAKATANI M. Azedarachin C, a limonoid antifeedant from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 593, 1995.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis: comparison with fecal cultures. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p. 63-71, 1984.

JOSHI, A. R.; JOSHI, K. Indigenous knowledge and uses on medicinal plants by local communities of the kali gandaki watershed area, Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 73, p. 175-183, 2000.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwiigi* and *Melia azedarach*. **Fitoterapia**. v. 72, p.423-427, 2001.

KOUL, O.; MULTANI, J. S.; SINGH, G.; WAHAB, S. Bioefficacy of toosendanin from *Melia dubia* (syn. *M. azedarach*) against gram pod-borer, *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Current science**, v. 83, p. 1387-1390, 2003.

LANUSSE, C. E. Farmacologia dos compostos anti-helmínticos. In PADILHA, T. (ed), EMBRAPA-CNPGL. **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. 1996. 258p. p.1-52.

LE JAMBRE, L. F. Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus* infected sheep. **International Journal for Parasitology**. v. 25, p. 269-273, 1995.

MADLINE, M.; BALLANDONNE, C.; GUYON, R.; MALAS, J. P.; VILAGINES, P.; CABARET, J. ; BARBIER, D. Mise en évidence de la viabilité des oeufs de Taeniides dans les boues résiduaires urbaines. **Journal Européen d'Hydrologie**, v. 31, p. 85-90, 2000.

MARQUEZ, B. P.; CARDENAS, A. O.; MORALES, C. R. STAR, M. J. V. Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* Y *Cinnamomum zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. **Ciencia Uanl**, v.4.n.3. 2003.

MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U. M.; GOMES, A.; KOLLER, W. W. *Melia azedarach*, uso popular x estudos químicos e farmacológicos: breve revisão. **Ensaio e Ciência**: ed. UNIDERP, Campo Grande, v.6, n.1, p. 91-121, 2002.

MATOS, A. F. J. Living pharmacies. *Ciencia e Cultura. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, v. 49, p. 409-412, 1997.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ed. Fortaleza: edições UFC, 141p. 1997.

MCGRAW, L. J.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Antibacterial, anthelmintic and antiamebic activity in South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 247-263, 2000.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; VILLAROEL, A. S., GIRÃO M. D. Resistência a anti-helmínticos em nematódeos gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de Pentecoste, Estado do Ceará. **Ciência Animal**, v. 8, p. 7-11. 1998.

MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L.S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.2, p.339-344, 2003.

MELO, L. M. **Efeitos biológicos gerais da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Spigelia anthelmia***. 2001, f. 44. (Monografia) Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

MENEZES, R. C. A. A.; VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A. Estudos preliminares *in vitro* da atividade ovicida de folhas e sementes de quatro leguminosas sobre *Haemonchus contortus* de caprinos. **Arquivo Universidade Federal Rural Rio de Janeiro**, v.15, p. 121-127, 1992.

MULLA, M.S.; TIANYUN, S. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medicinal and veterinary importance. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 15, p. 133-152, 1999.

NAKATANI, M.; HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K. Salannal, a new limonoid from *Melia azedarach* Linn. **Chemistry Letters**, v. 995, 1995.

NARDO, E. A. B. De; COSTA, A. S.; LOURENÇÃO, A. L. *Melia azedarach* extracts as an antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homóptera: Aleyrodidae). **Florida Entomologist**, v.80, p. 92-94, 1997.

NIEZEN, J. H.; CHARLESTON, W. A. G.; HODGSON, J.; MACKAY, A.D.; LEATHWICK, D.M. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. **International Journal for Parasitology**, v. 26, p. 983-992, 1996.

OELRICHS P. B.; HILL M. W.; VALLELY P. J.; MACLEOD J. K.; MOLINSKY, T. F. et al., Toxicity tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, v. 22, p.531 - 534, 1983.

PESSOA, L. M. **Atividade anti-helmíntica de *Ocimum gratissimum* Linn e eugenol contra *Haemonchus contortus***. 66f. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, 2001.

PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.109, p.59-63, 2002.

PINHEIRO R. R., GOUVEIA, A. M. G., ALVES, F. S. F., HADDAD, J. P. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, 2000.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. 6vols. Ministério da Agricultura, 778p. 1984.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-613, 2001.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. Editorial Premier. São Paulo. 1997.

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

SALLES, L.A.; RECH, N. L.; Efeitos de extratos de nim (*Azadirachta indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: tephritidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, p. 225-227, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 2 ed. Editora UFSC. 2000.

SOUZA, A. P.; VENDRAMIM, J. D. Atividade ovicida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) biótipo B em tomateiro. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 403-406, 2000.

SRIVASTAVA, S. K.; GUPTA, H. O. New limonoids from the roots of *Melia azedarach* Linn. **Indian Journal of Chemistry**, v. 24B, p. 166-170, 1985.

THOMPSON, D. P.; KLEIN, R. D.; GEARY, T. G. Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. **Parasitology**, v.113, p. 217-238, 1996.

Time Life Plant Encyclopedia Virtual Garden [online], acessado em Junho de 2003 <<http://www.vg.com>>.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F.W. **Parasitologia Veterinária**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1990.

VALADARES, G. R.; FERREYRA, D.; DEFAGO, M. T.; CARPINELLA, M. C.; PALACIOS, S. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia**. v.70, p.421-424, 1999.

VELAZCO, M.A.R. Plantas inseticidas [ONLINE] Acessado em 01/11/04.<http://www.Cucba.udg.mx/new/informacionacademica/coaxican/categorias/plant_nsec3.htm >

VERMA, S.; HAMDARD, M. E.; DANDYIA, P. C. A note on neuropsychopharmacological studies of *Melia azedarach* leaves. **Indian Journal Pharmacology**, v. 21, p.46-50, 1989.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 99-103, 1999.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; PEREIRA, M. F., DANTAS, L. B.; XIMENES, L. J. F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North-east Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue Médecine Vétérinaire**. v.150, p. 447-452, 1999.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A C. R. Avaliação de plantas medicinais no controle de *Haemonchus contortus* de caprinos. **Revista Veterinária Brasileira**, v. 19, p. 99-103, 1991.

VILLAMIL, S. M., L. ALCHE,; COTO, C. E. Inhibition of herpes simplex virus type-1 multiplication by meliacine, a peptide of plant origin. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**. v. 6, p. 239-244, 1995.

WALLER, P. J. Control strategies to prevent resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 46, p. 133-142, 1993.

WALLER, P. J., DASH, K. M., BARGER, I. A., et al. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. **Veterinary Record**, v. 136, p. 411-413, 1995.

WALLER, P. J. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 391-412, 1997.

YAMASAKI, B. R.; RITLAND, T. G.; BARNBY, M. A.; KLOCKE, J. A. Isolation and purification of salannin from neem seeds and its quantification in neem and chinaberry seeds and leaves. **Journal of Chromatography**, v. 447, p. 217-283, 1988.

ANEXO I

Artigo: Atividade ovicida e larvicida de *Melia azedarach* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Submetido à revista Ciência Animal.**

ARTIGO I: Atividade ovicida e larvicida de extratos de *Melia azedarach* sobre *Haemonchus contortus*

(Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Melia azedarach* on *Haemonchus contortus*)

Michelline do Vale Maciel¹, Selene Maia de Moraes², Claudia Maria Leal Bevilaqua¹; Ana Lourdes Fernandes Camurça-Vasconcelos¹, Cícero Temístocles Coutinho Costa¹, Cristiane Maria Souza de Castro².

Resumo

Haemonchus contortus é um nematóide abomasal, de ovinos e caprinos, responsável por perdas econômicas no Nordeste do Brasil. Seu controle está comprometido devido à resistência à diversos anti-helmínticos. Substâncias extraídas de plantas são alternativas no tratamento da verminose, e *Melia azedarach* têm sido descrita como possuidora de propriedades medicinais. Neste trabalho, a atividade dos extratos etanólico e hexânico de folhas e etanólico e clorofórmico de sementes de *M. azedarach* sobre *H. contortus* foi avaliada através dos testes de eclosão de ovos (TEO) e desenvolvimento larvar (TDL). As concentrações dos extratos testadas foram: 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 mg mL⁻¹. Devido à alta eficácia do extrato etanólico de sementes no TEO, avaliou-se doses inferiores, a fim de calcular a CL₅₀. No TEO, os ovos frescos de *H. contortus* foram incubados durante 48h na presença dos extratos. Em seguida, contou-se ovos e larvas ao microscópio. No TDL, larvaculturas com fezes de animal livre de parasitos foram adicionadas de larvas de primeiro estágio e os extratos, durante 5 dias. Ao final do teste as larvas foram recuperadas e contadas, diferenciando larvas de 1º, 2º e 3º estágio. A CL₅₀ foi calculada pelo método de PROBITS pelo programa SPSS 8.0. Os resultados dos testes foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey de 5% de significância. O extrato etanólico de sementes foi mais ativo sobre a inibição de ovos (CL₅₀: 0,36mg mL⁻¹), enquanto o extrato etanólico de folhas (CL₅₀: 9,18 mg mL⁻¹), foi mais eficaz sobre a inibição do desenvolvimento das larvas. Na análise fitoquímica, verificou-se a presença de taninos em ambos os extratos, triterpenos e alcalóides no extrato etanólico de sementes, e esteróides no extrato etanólico de folhas.

Abstract

Haemonchus contortus is a parasite of the abomasum, of sheep and goats, responsible for economical losses in Northeast of Brazil. Control is compromised due to the resistance to several anthelmintics. Substances extracted from plants are alternative in the treatment of worm, and *Melia azedarach* have been described as possessor of medicinal properties. In this work, the activity of ethanolic and hexanic extracts of leaves and ethanolic and chloroformic extracts of seeds of *M. azedarach* on *H. contortus* was evaluated through the egg hatch (EHT) and larval development test (DLT). The concentrations of the extracts tested were: 50; 25; 12.5; 6.25 and 3.12 mg mL⁻¹. Due to performance of ethanolic extract of seeds, it was evaluated in inferior doses, in order to calculate CL₅₀. In EHT, fresh eggs of *H. contortus* were incubated during 48 hours in the presence of the extracts. Soon after, it was counted eggs and larvae under the microscope. In DLT, larvaculture with animal feces free from nematodes were added to larvae of first stage and the extracts, during 5 days. At the end of the test the larvae were recovered and counted, differentiating 1^o, 2^o and 3^o stage larvae. CL₅₀ was calculated by the method of PROBITS by the program SPSS 8.0. The results of the tests were submitted to the variance analysis and test of Tukey of 5% of significance. The ethanolic extract of seeds was more active in the inhibition eggs test (CL₅₀: 0.36 mg ml⁻¹), while the ethanolic extract of leaves (CL₅₀: 9.18 mg ml⁻¹), was more effective in the inhibition of larvae development. In the phytochemistry analysis, the presence of tannins was verified, triterpenes and alkaloids were present in the ethanolic extract of seeds, and steroids in the ethanolic extract of leaves.

1. Introdução

O desenvolvimento da ovinocaprinocultura na região Nordeste do Brasil é severamente afetado por diversos fatores, dentre estes, podemos citar as nematodeoses gastrintestinais (Pinheiro et al., 2000). *Haemonchus contortus* é a espécie mais prevalente nesta região do Brasil (Charles, 1989). Infecções por este parasito podem resultar em acentuadas perdas econômicas, visto que, levam a uma depressão do apetite, prejuízos na função gastrintestinal (Fox, 1993).

O controle destas helmintoses é feito basicamente pela utilização de anti-helmínticos, no entanto, o desenvolvimento de populações resistentes é uma realidade (Melo et al., 2003). Além disso, os anti-helmínticos disponíveis no mercado possuem algumas limitações, tais como, alto custo, resíduos nos alimentos (Herd, 1996). Anti-helmínticos produzidos a partir de plantas podem oferecer uma alternativa para minimizar alguns destes problemas, tendo em vista o grande número de plantas usado para o tratamento de infecções parasitárias em homens e animais (Akhtar et al., 2000).

Neste contexto, *Melia azedarach* L., comumente conhecida por lírio ou lilás da Índia tem sido amplamente empregada para combater doenças. Várias partes desta planta são usadas para tratamento de reumatismo, lepra, erupções cutâneas entre outros (Matias et al., 2002). Carpinella et al. (1999) avaliaram a atividade antifúngica desta planta e relataram que o extrato etanólico obtido de frutos maduros apresentou atividade fungistática e fungicida contra fungos patogênicos como *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Microsporium canis*. Khan et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana de *M. azedarach* sobre diversos tipos de bactérias e protozoários. Além disso, a atividade anti-helmíntica em caprinos de *M. azedarach* foi avaliada usando-se frutos secos triturados da plantas, estes apresentaram uma eficácia de 59 e 54% nas concentrações de 2 e 3g/kg. (Girão, comunicação pessoal).

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade ovicida e larvicida dos extratos clorofórmico e etanólico obtidos a partir de sementes, e dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *M. azedarach* contra *H. contortus* parasito abomasal de ovinos e caprinos.

2. Material e Métodos

Foram utilizadas 1 kg de sementes e de 2 kg folhas trituradas da planta *M. azedarach* coletadas em Teresina – PI. Os extratos da planta foram preparados, adicionando-se como solventes orgânicos hexano, clorofórmio e etanol, em aparelho do tipo soxlet durante 6 horas, obtendo-se os respectivos extratos. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório, obtendo-se o extrato hexânico de folhas (EHF), clorofórmico de sementes (ECS) e os extratos etanólicos de folhas e sementes (EEF e EES) de *M. azedarach*.

2.1. Teste *in vitro* de inibição da eclosão de ovos

Dois ovinos portadores de infecção monoespecífica de *H. contortus* foram mantidos em gaiolas metabólicas. Estes animais foram utilizados como fonte de ovos frescos obtidos a partir das fezes para realização dos testes *in vitro*. Aproximadamente 100 ovos frescos de *H. contortus* foram recuperados (Hubert & Kerboeuf, 1984) e distribuídos em 0,5 mL/poço de placa, adicionando-se o mesmo volume dos extratos de *M. azedarach*, nas seguintes concentrações: 50; 25; 12,5; 6,2 e 3,12 mg/mL. Após 48 horas, contaram-se ovos e larvas eclodidas ao microscópio. Cada concentração dos extratos foi acompanhada de um controle negativo contendo apenas diluente, Tween 80 a 3% e um controle positivo com tiabendazol (TBZ) a 0,025mg/mL. Foram realizadas cinco réplicas para cada extrato. No caso do EES foram utilizadas além das concentrações citadas acima, concentrações mais baixas (1,56; 0,78; 0,39 e 0,19mg/mL) para efeito de cálculo da CE₅₀.

2.2. Teste de desenvolvimento larvar

Após a recuperação e incubação de aproximadamente 100 ovos durante 24 horas em estufa a 30° C para eclosão das larvas, separou-se alíquotas desta suspensão para avaliação do número de larvas eclodidas por μ L. Em seguida, foram feitas larvaculturas, adicionando-se larvas e as concentrações (50; 25; 12,5; 6,2 e 3,12 mg/mL) de cada extrato às fezes de um animal livre de nematóides, e incubadas durante 7 dias a 30° C (Roberts & O'Sullivan, 1950). Após este período as larvas foram recuperadas e contadas ao microscópio observando-se os estágios de desenvolvimento (L₁ ou L₂ e L₃).

2.3. Estudo fitoquímico

Os testes fitoquímicos foram realizados seguindo a metodologia preconizada por Matos, (1997). Para realização dos testes, tomou-se uma alíquota do extrato etanólico de sementes (EES) e extrato etanólico de folhas (EEF). Estes testes baseiam-se na adição de determinados reagentes e a observação da alteração da cor das soluções e formação de precipitados com os extratos.

2.4. Análise estatística

Os dados do teste de eclosão de ovos (TEO) e teste de desenvolvimento larvar (TDL) foram transformados pela fórmula ($\log(x + 1)$), submetidos á análise de variância One Way e comparados pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa Prisma 3.0. O cálculo da CE_{50} foi realizado pelo método de PROBITS utilizando o programa SPSS 8.0 para Windows.

3. Resultados

1. Teste de eclosão de ovos

Os resultados do teste de eclosão de ovos para os extratos de folhas e sementes de *M. azedarach* encontram-se nas Tabelas 1 e 2 respectivamente. Foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) nas médias de eficácia dos extratos de folhas. O EEF mostrou boa atividade ovicida nas cinco concentrações testadas, sendo comparada ao tiabendazol[®], demonstrando ser dose - dependente. A CL_{50} do EEF foi de 2,22 mg/mL). O EHF não demonstrou atividade ovicida relevante (CL_{50} : 35,8 mg/mL). Diferenças estatísticas também foram observadas quando se comparou os dois extratos de sementes ($p < 0,05$), ambos com atividade ovicida (Tabela 2). O ECS demonstrou atividade ovicida na maior concentração, no entanto o EES mostrou-se superior com eficácia de 100% em todas as concentrações testadas. A CE_{50} do ECS foi de 7,26mg/mL (Tabela 3).

Para cálculo da CL₅₀ do EES, foi necessário baixar as concentrações utilizadas, devido a sua eficácia, este extrato apresentou uma eficácia de 100% mesmo na concentração de 1,56mg/mL (Tabela 3), e uma CL₅₀ de 0,36mg/mL (Tabela 4), sendo o mais ativo no teste de eclosão de ovos. Ao comparar os extratos mais eficazes de folhas e sementes, pode-se observar que o EES foi igual ao EEF nas concentrações mais elevadas, sendo mais eficaz nas concentrações subseqüentes ($p < 0,05$).

2. Teste de desenvolvimento larvar

Os extratos de folhas da planta demonstraram que o EHF obteve atividade sobre larvas apenas na maior concentração. Entretanto o EEF obteve boa atividade sobre larvas tendo sido 71,7% eficaz até mesmo na concentração de 6,2 mg/mL (Tabela 5) ($p < 0,05$). A CL₅₀ deste extrato foi de 9,18 mg/mL, sendo este portanto, o mais ativo dos quatro extratos testados. Quando foram comparados os extratos de sementes observou-se que o ECS foi eficaz (93,48%) apenas na maior concentração. O EES não demonstrou uma boa eficácia sobre as larvas de *H. contortus* (Tabela 6). Ao comparar os extratos de folhas e de sementes, foi observado que o EEF foi o mais eficaz contra larvas do parasito ($p < 0,05$). É importante ressaltar que todas as larvas recuperadas das larvaculturas, para todos os extratos, eram larvas de terceiro estágio.

3. Análise fitoquímica de *M. azedarach*

Os testes fitoquímicos foram realizados utilizando-se o extrato de maior atividade no TEO e no TDL. Os resultados desta análise encontram-se na Tabela 7. Em ambos extratos, observou-se que ao se adicionar o cloreto férrico houve uma mudança de coloração para uma tonalidade verde escura, indicativa de taninos condensados. No teste de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas, observou-se que no EES para o meio ácido houve uma intensificação da cor parda amarelada, já no meio alcalino, houve uma coloração vermelho laranja, mostrando positividade para flavononas e taninos condensados. No EEF, observou-se apenas a mudança de coloração no meio ácido, parda amarelada, indicativa de taninos catéquicos. No teste de confirmação de catequinas foi observado que para ambos extratos, a face do palito de madeira, apresentou-se uma coloração parda avermelhada, confirmando a presença de catequinas.

Em relação à presença de esteróides e triterpenóides, no EES, houve uma mudança de coloração vermelha indicativa da presença de triterpenóides pentacíclicos livres. No entanto, no EEF esta mudança de coloração passou rapidamente do azul para um verde escuro permanente, indicando que neste extrato há presença de esteróides livres. No teste de alcalóides, foi observada no EES pela a formação de precipitado floculoso nos tubos de ensaio para os três reagentes utilizados. O EEF apresentou formação de precipitado apenas no meio que continha o reagente de Dragendorff.

4. Discussão

As plantas são uma rica fonte botânica de substâncias anti-helmínticas, antibacterianos e inseticidas. Um grande número de plantas medicinais têm sido usado para o tratamento de infecções parasitárias em homens e animais (Akhtar et al., 2000). Os testes *in vitro* são usados como estudos preliminares de fitoterápicos. Nestes testes, as plantas são colocadas diretamente em contato com os estágios de ovo ou larva do parasito para avaliar seu efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar (Hammond et al., 1997).

Plantas pertencentes à família Meliaceae têm sido avaliadas com diversas finalidades em várias partes do mundo (Mulla & Tianyun, 1999). No presente estudo, o extrato etanólico de sementes foi o mais ativo, apresentando 100% de eficácia na concentração de 1,56 mg mL⁻¹, ligeiramente ao óleo essencial de *L. sidoides* sobre *H. contortus* na concentração de 1% (Pessoa et al., 2001). Enquanto que eficácias inferiores foram observadas com os extratos acetato de etila e metanólico da planta *Spigelia anthelmia* sobre *H. contortus*, estes extratos apresentaram eficácia de 100 e 97,4% respectivamente na concentração de 50 mg mL⁻¹ (Assis et al., 2003). Os extratos da amêndoa de *Mangifera indica* na concentração de 10 mg mL⁻¹ revelaram 91% de eficácia sobre ovos de *H. contortus* (Costa et al. 2002). Alawa et al. (2003) testaram o extrato aquoso das folhas de *Vernonia amygdalina* e das cascas de *Annona senegalensis* sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*. *A. senegalensis* inibiu a eclosão em apenas 11,5% na concentração de 7,1mg mL⁻¹, diferindo estatisticamente do controle negativo.

A atividade inseticida de plantas desta família têm sido muito estudada, sendo atribuída aos limonóides. Estes compostos são capazes de inibir o desenvolvimento ou a alimentação de insetos (Matias et al., 2002). Resultados semelhantes a este trabalho foram obtidos com o extrato etanólico de *M. azedarach* a 2% sobre ovos do inseto *Earias vitella*

(Gajmer et al., 2002). Abdel – Shafy e Zayed (2002) em experimento com óleo de *A. indica* observaram que o “Neem Azal F”, um extrato de sementes desta planta contendo 5% de azadiractina, inibiu a eclosão de ovos do carrapato *Hyalomma anatolicum excravatum* na dose de 1,6%. Este efeito sobre a eclodibilidade dos ovos foi atribuído a azadiractina. Estes resultados demonstram a possibilidade dos triterpenos serem as possíveis substâncias ativas presentes nos extratos.

Na análise fitoquímica, o EES revelou a presença de TTP em sua composição. Os TTP são substâncias presentes em plantas da família Meliaceae descritas na literatura como possuidoras de atividade inseticida. Segundo Mulla & Tianyun (1999), estas substâncias estão presentes em altas concentrações nas sementes de *A. indica*, já tendo sido relatada sua atividade ovicida sobre insetos. Desta forma, os TTP podem ser uma das substâncias ativas no teste de eclosão de ovos deste estudo. Segundo Velazco (2000), alguns tipos de terpenos como a azadiractina atuam sobre a alimentação, oviposição, fecundidade e desenvolvimento dos insetos.

A eficácia de extratos de plantas sobre larvas de parasitos, também tem sido bem documentada. Devido à atividade antialimentar em insetos (Matias et al., 2002) causada por plantas da família Meliaceae, muitos trabalhos vêm sendo realizados, sobre larvas de insetos. No presente estudo, o EEF foi o mais ativo. Koul et al. (2002) relataram o efeito inibitório de 69,5% sobre o crescimento das larvas do inseto *Helicoverpa armigera* na concentração de 100 ppm, quando se utilizou o extrato metanólico de *Melia dubia* (syn. *M. azedarach*). Resultados inferiores foram obtidos por Alawa et al. (2003), utilizando coproculturas com cascas de *A. senegalensis*. Estes autores encontraram redução significativa do número de larvas recuperadas na concentração de 7,5 mg mL⁻¹. Resultados superiores ao deste trabalho foram obtidos por Ademola et al. (2004) em experimentos realizados com o extrato metanólico da meliacea *Khaya senegalensis* sobre estrongilídeos de bovinos, observando-se efeito sobre as larvas de primeiro estágio destes parasitos, apresentando uma DL₅₀ de 0,69 mg ml⁻¹. Salles & Rech (1999) avaliaram a ação de pó de *M. azedarach* sobre o díptero *Anastrepha fraterculus* e observaram redução dose-dependente no número médio de larvas eclodidas e adultos emergidos até a dose de 120g/L.

A presença de taninos condensados foi detectada tanto nos extratos etanólico de folhas como de sementes de *M. azedarach*. Dantas et al. (2000) também detectaram a presença de taninos em frutos maduros de *M. azedarach*, assim como compostos fenólicos não tânicos e esteróides. Os taninos condensados são substâncias descritas na literatura como possuidores de atividade anti-helmíntica, estes podem atuar por dois tipos de mecanismos: ligar-se a proteínas livres reduzindo a disponibilidade dos nutrientes resultando em morte das larvas por inanição, ou ligar-se à cutícula das larvas, rica em glicoproteínas, e causar sua morte (Athanasiadou et al., 2001). Este mecanismo de ação dos TC leva-nos à formular a hipótese de que esta seja uma das substâncias ativas sobre o desenvolvimento das larvas de *H. contortus*.

Em relação aos alcalóides, substâncias encontradas no EES, Gill e Lacey (1993) ao testarem o alcalóide paraherquamida sobre larvas de *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* e *H. contortus* observaram alta taxa de mortalidade das larvas destes parasitos após 72 horas de exposição, nas concentrações de 0,033; 0,058 e 2,7 $\mu\text{g mg}^{-1}$. Apesar da presença de alcalóides não ter sido totalmente comprovada no EEF, outros tipos de alcalóides podem ser os responsáveis pela alta eficácia do EES no teste de eclosão de ovos. É importante ressaltar que tanto para o TEO como para o TDL, as substâncias presentes nos extratos podem ser as responsáveis pela sua respectiva atividade, entretanto, a possível interação entre estas substâncias ativas não deve ser descartada.

Em virtude das diferenças fitoquímicas entre os dois extratos, sugere-se que no teste de eclosão de ovos, os prováveis princípios ativos pertençam à classe dos taninos e triterpenos, como o melianol e melianol. No teste de desenvolvimento larvar, os taninos provavelmente são as substâncias ativas.

Tabela 1: Percentual médio de eficácia (média \pm desvio padrão) dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *Melia azedarach* sobre a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*.

Concentração (mg/mL)	% de eficácia	
	Extrato hexânico de folhas	Extrato etanólico de folhas
50	16,92 \pm 4,51 ^{aA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
25	12,93 \pm 2,82 ^{aA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
12,5	15,21 \pm 4,33 ^{aA}	98,24 \pm 1,97 ^{bB}
6,2	15,41 \pm 5,64 ^{aA}	90,42 \pm 1,50 ^{cB}
3,12	14,45 \pm 6,79 ^{aA}	66,64 \pm 3,96 ^{dB}
tiabendazol (0,025)	100 \pm 0,0 ^b	100 \pm 0,0 ^a
Tween 80 a 3%	5,33 \pm 5,61 ^a	5,33 \pm 5,61 ^e
Água destilada	1,32 \pm 2,48 ^a	1,32 \pm 2,48 ^e

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas. (p <0,001)

Tabela 2: Percentual médio de eficácia (média \pm desvio padrão) dos extratos clorofórmico e etanólico de sementes de *Melia azedarach* sobre a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*.

Concentração mg/mL	% de eficácia	
	ECS	EES
50	92,39 \pm 1,47 ^{aA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
25	54,98 \pm 3,02 ^{bA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
12,5	62,92 \pm 3,09 ^{bcA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
6,2	40,60 \pm 3,49 ^{bdA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
3,12	32,77 \pm 5,14 ^{dA}	100 \pm 0,0 ^{aB}
tiabendazol (0,025)	100 \pm 0,0 ^e	100 \pm 0,0 ^a
tween 80 a 3%	1,4 \pm 3,29 ^f	1,4 \pm 3,29 ^b
Água destilada	2,2 \pm 3,67 ^f	2,2 \pm 3,67 ^b

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas. (p <0,001)

Tabela 3: Percentual médio de eficácia (média \pm desvio padrão) em menores concentrações do extrato etanólico de sementes de *Melia azedarach* sobre a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*.

Concentração mg/mL	% de eficácia
	Extrato etanólico de sementes
1,56	100 \pm 0,0 ^a
0,78	85,27 \pm 3,65 ^b
0,39	43,75 \pm 4,50 ^c
0,19	31,67 \pm 10,64 ^c
tiabendazol (0,025)	100 \pm 0,0a
tween 80 a 3%	1,4 \pm 3,29d
Água destilada	2,2 \pm 3,67 ^d

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas. (p <0,001)

Tabela 4: Concentração Letal dos extratos de *Melia azedarach* sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*.

Extrato de <i>M. azedarach</i>	Concentração letal de 50%	
	Eclosão de ovos	Desenvolvimento larvar
Hexânico de folhas	35,8 mg/mL	33,59 mg/mL
Etanólico de folhas	2,22 mg/mL	9,18 mg/mL
Clorofórmico de sementes	7,26 mg/mL	19,02 mg/mL
Etanólico de sementes	0,36 mg/mL	98 mg/mL

Tabela 5: Percentual médio de eficácia (média \pm desvio padrão) dos extratos hexânico e etanólico de folhas de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*.

Concentração (mg/mL)	% de eficácia	
	Extrato hexânico de folhas	Extrato etanólico de folhas
50	67,90 \pm 39,55 ^{aA}	91,64 \pm 2,17 ^{aB}
25	32,08 \pm 25,91 ^{acA}	76,73 \pm 35,79 ^{aB}
12,5	22,75 \pm 25,96 ^{acA}	67,57 \pm 12,27 ^{beA}
6,2	13,89 \pm 27,79 ^{acA}	71,7 \pm 8,97 ^{bceA}
3,12	14,25 \pm 18,61 ^{acA}	15,63 \pm 12,23 ^{dfA}
Ivermectina (0,32 μ L/mL)	94,29 \pm 4,18 ^{ba}	79,71 \pm 8,90 ^c
Tween 80 a 3%	46,54 \pm 10,02 ^c	0,0 \pm 27,06 ^f
Água destilada	0,0 \pm 37,06 ^c	0,0 \pm 37,42 ^f

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas (p <0,001).

Tabela 6: Percentual médio de eficácia (média \pm desvio padrão) dos extratos clorofórmico e etanólico de sementes de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*.

Concentração (mg/mL)	% de eficácia	
	Extrato clorofórmico de sementes	Extrato etanólico de sementes
50	93,48 \pm 6,04 ^{acA}	29,03 \pm 33,09 ^{aB}
25	35,13 \pm 21,40 ^{bdA}	32,69 \pm 35,01 ^{aA}
12,5	32,66 \pm 17,63 ^{bdA}	29,41 \pm 9,40 ^{aA}
6,2	26,94 \pm 5,32 ^{bdA}	19,08 \pm 10,90 ^{aA}
3,12	10,44 \pm 23,34 ^{bdA}	22,03 \pm 26,53 ^{aA}
Ivermectina (0,32 μ L/mL)	85,15 \pm 11,45 ^c	92,79 \pm 7,97 ^b
Tween 80 a 3%	19,10 \pm 20,68 ^d	14,44 \pm 17,08 ^a
Água destilada	0,0 \pm 14,50 ^d	0,0 \pm 26,93 ^a

Letras minúsculas comparam valores entre linhas, letras maiúsculas comparam valores entre colunas (p <0,001).

Tabela 7: Análise fitoquímica dos extratos etanólicos de folhas e de sementes de *Melia azedarach*.

Teste fitoquímico	<i>M. azedarach</i>	
	Extrato etanólico de sementes	Extrato etanólico de folhas
Fenóis e taninos	+ taninos condensados	+ taninos condensados
Leucoanticianidinas, catequinas e flavononas	+ taninos condensados e flavonas	+ taninos condensados
Confirmação de taninos	+	+
Esteróides e triterpenóides	+ triterpenóides penta cíclicos livres	+ esteróides
Ácidos fixos fortes	+	-
Alcalóides	+ para 3 reagentes	suspeito

+ = reação positiva

Referências Bibliográficas

ABDEL – SHAFY, S. & ZAYED, A.A. In vitro acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**. v.106, p. 89-96, 2002.

ADEMOLA, I.O.; FAGBEMI, B.O.; IDOWU, S.O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro e in vivo studies. **Veterinary Parasitology**. v.122, p. 151-164. 2004.

AKHTAR, M. S.; IQBAL, Z.; KHAN, M. N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo – Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research**. v.38, p. 99-107, 2000.

ALAWA, C.B.I.; ADAMU, A.M.; GEFU, J.O.; AJANUSI, O.J.; ABDU, P.A.; CHIEZEY, N.P.; ALAWA, J.N.; BOWMAN, D.D. In vitro screening of two Nigerian medicinal plants (*Vermonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**. v.113, p. 73-81. 2003.

ASSIS, L. M.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, L.S.; COSTA, C.T.C.; SOUZA, J.A.L. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.117, p. 43-49, 2003.

ATHANASADIOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R.L.; Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**. v.99, p. 205-219, 2001.

BRUNHEROTTO, R. & VENDRAMIN, J.D.; Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick), **Neotropical Entomology**, v.30, n.3. p. 455-459, 2001.

CARPINELLA, M. C.; HERRERO, G.G.; ALONSO, R.A.; PALACIOS, S. M. Antifungal activity of *Melia azedarach* fruti extract. **Fitoterapia**. v.70, p.296-298, 1999.

CHARLES, T.P. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in Pernambuco state Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.30, p.335-343, 1989.

DANTAS, D.A.; MAGANHA, M.; BERETTA, T.E.; NOZU, P.; PEREIRA, G. da S.; MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.; KOLLER, W.W. ; GOMES, A. Estudo fitoquímico dos frutos de *Melia azedarach* L. (Cinamomo, Meliaceae). In ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIDERP, 2., Campo Grande, 2000. **Anais...**, Campo Grande: UNIDERP, p. 119-120, 2000. *Resumo expandido*.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Veterinary Parasitology**. v.46, p.143-158, 1993.

GAJMER, T.; SINGH, R.; SAINI, R.K.; KALIDHAR, S. B. Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach*) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab)(Lep., Noctuidae). **Journal Applied Entomology**, v.126, p.238 – 243, 2002.

HAMMOND, J.A.; FIELDING, D.; BISHOP, S.C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**. v.21, p.213-228, 1997.

HERD, R. **Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas**. “Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes” (T. Padilha, Ed. EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco, MG.), p.95-111, 1996.

HUBERT, J., AND KERBOEUF, D. **A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis: comparison with fecal cultures**. Canadian Journal of Comparative Medicine. v. 48, p. 63-71, 1984.

KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwiigi* and *Melia azedarach*. **Fitoterapia**. v.72, p.423-427, 2001.

KOUL,O.; MULTANI, J.S.; SINGH, G.; WAHAB, S. Bioefficacy os toosendanin from *Melia dubia* (syn. *M. azedarach*) against gram pod-borer, *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Current science**, v.83, n.11, p. 1387-1390, 2003.

MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.M.; GOMES,A.;KOLLER,W.W. *Melia azedarach*, uso popular x estudos químicos e farmacológicos: breve revisão. **Ensaio e Ciência**: ed. UNIDERP, Campo Grande, v.6, n.1, p. 91-121, 2002.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2ed. Fortaleza: edições UFC, 141p. 1997.

MELO, A.C.F.L; REIS, I.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; VIEIRA, L.S.; ECHEVARRIA, F.A.M.; MELO, L.M. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.2, p.339-344, 2003.

MULLA, M.S. & TIANYUN, S. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medicinal and veterinary importance. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 15, n.2,p. 133-152, 1999.

OELRICHS P.B.; HILL M.W.; VALLELY P.J.; MACLEOD J.K.; MOLINSKY T.F. et al., Toxicity tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**.v.22, n. 2, p.531 - 534, 1983.

PESSOA, L.M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*.**Veterinary Parasitology**, v.109, p.59-63, 2002.

PINHEIRO R.R., GOUVEIA, A.M.G., ALVES, F.S.F., HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 52, n.5 2000.

ROBERTS, F. H. S. & O’SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for

strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Research**. v.1, p. 99, 1950.

SALLES, L.A.; RECH, N.L.; Efeitos de extratos de nim (*Azadirachta indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (wied.) (Diptera: TEPHRITIDAE). **Revista Brasileira de Agrociência**. v.5, n.3, p. 225-227, 1999.

SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Atividade ovicida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) biótipo B em tomateiro. **Scientia agrícola**, v.57, n.3, p.403-406, 2000.

VELAZCO, M.A.R. Plantas inseticidas. Acessado em 01/11/04
http://www.cucba.udg.mx/new/informacionacademica/coaxican/categorias/plant_nsec3..htm

WALLER, P. J. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.72: p.391-412, 1997.

YAMASAKI, B.R.; RITLAND, T.G.; BARNBY, M.A.; KLOCKE, J.A. Isolation and purification of salannin from neem seeds and its quantification in neem and chinaberry seeds and leaves. **Journal of Chromatography**, v.447, p. 217-283, 1988.