

EFEITO OVICIDA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE *Mangifera indica* L. SOBRE *Haemonchus contortus*

OVICIDAL EFFECT OF *Mangifera indica* L. SEEDS EXTRACTS ON *Haemonchus contortus*

COSTA¹, C.T.C.; MORAIS², S.M. DE; BEVILAQUA^{*3}, C.M.L.; SOUZA¹, M.M.C. DE & LEITE⁴, F.K.A.

(1) Bolsista FUNCAP/ Mestrando PPGCV/FAVET/UECE; (2) Prof. Titular CCT/UECE; (3) Prof Adjunto PPGCV/FAVET/UECE.

* Autor para correspondência, E-mail: claudiam@fortalnet.com.br; (4) Bolsista IC/FUNCAP CCT/UECE

SUMMARY: The rapid development of anthelmintic resistance, associated with the high cost of the available anthelmintic drugs, has limited the success of gastrointestinal helminthosis control of small ruminant, and thus awakened the interest to study medicinal plants as alternative source of anthelmintics. Hexane extract and ethanolic fraction from hexane extract (EFHE) obtained from *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) seeds were tested on *Haemonchus contortus* eggs via egg hatch test. Phytochemical tests were performed with the most efficient extract to detect some of micromolecule constituents. The extracts were evaluated at the final concentrations: 0.08; 0.4; 2.0; 10.0 and 50.0 mg ml⁻¹. EFHE inhibited 95.66% of the egg hatching at 50.0 mg ml⁻¹, and this effect was dose dependent. However hexane extract at similar concentration had insignificant effect. The constituents detected in EFHE were mainly proanthocyanidins and in lesser extent hydrolyzable tannins, triterpenes, including saponins. These results indicate that utilization of EFHE from *M. indica* may be useful in the control of gastrointestinal nematodes of sheep and goats.

KEY WORDS: *Mangifera indica*, seeds, hexane extract, ethanolic fraction, *in vitro*, *H. contortus*.

INTRODUÇÃO

O parasitismo por nematóides gastrintestinais provoca elevadas perdas econômicas em pequenos ruminantes do nordeste brasileiro (PINHEIRO et al., 2000). Dentre os nematóides, *Haemonchus contortus* é responsável por diminuição da produtividade e elevada mortalidade dos animais, particularmente dos jovens (AROSEMENA et al., 1998). O controle destes parasitos é usualmente realizado com anti-helmínticos, visando reduzir os níveis de infecção dos animais e promover a descontaminação das pastagens (CHARLES, 1989). Porém o rápido aparecimento de nematóides resistentes aos anti-helmínticos associado ao alto custo do tratamento, seus resíduos em alimentos e a poluição ambiental causada por sua utilização incentivaram a pesquisa de alternativas, como os fitoterápicos (JACKSON et al., 1993; WALLER et al., 1995; HERD, 1996). Muitas plantas já tem sido descritas como possuidoras de atividade anti-helmíntica (HAMMOND et al. 1997; VIEIRA et al., 1999).

O extrato aquoso *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* foram testados sobre a eclosão de ovos de *H. contortus* obtendo inibição de 50% dos ovos com as doses de 0,17 e 0,10 mg ml⁻¹, respectivamente (BATISTA et al., 1999).

Mangifera indica L. (Anacardiaceae) é uma planta originária da Índia, conhecida popularmente como manga. Atualmente encontra-se difundida em várias regiões tropicais e subtropicais, sendo possuidora de um dos frutos mais populares no mundo. (LAKSHMINARAYANA, et al., 1983). Existe aproximadamente cinco centenas de variedades de mangas. No Ceará são frequentes as seguintes variedades: itamaracá, coité, massa, espada, carlota, rosa, manguita e bourbon (BRAGA, 2001).

A planta é recomendada no tratamento das bronquites crônicas e outras afecções do peito, contra a disenteria, hemorragias intestinais. Ainda é diurética e estimulante da função láctea. Com os frutos prestes a amadurecer faz-se doce estomáquico, útil na cura da debilidade ou atonia dos órgãos gastrintestinais. As folhas são adstringentes. As sementes possuem propriedades anti-

helmínticas (BRAGA, 2001). É ainda uma das plantas ricas em vitamina C, o que permite combater e/ou prevenir o escorbuto (MATOS, 2000).

A validação científica dos fitoterápicos é uma etapa inicial obrigatória para a utilização correta de plantas medicinais ou de seus compostos ativos com fins comerciais. Desse modo, o teste *in vitro* com extratos de sementes de *M. indica* permitirá uma avaliação preliminar da existência de propriedades anti-helmínticas nestes extratos, determinando assim, o primeiro passo para a caracterização dos possíveis compostos ativos presentes em *M. indica*, abrindo portanto, novas possibilidades para o controle das endoparasitoses.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de extratos e prospecção fitoquímica preliminar

Aproximadamente 200g de sementes de *M. indica* foram trituradas e misturadas a 1l de hexano e aquecidas em banho-maria até o início da fervura. Em seguida filtrou-se a mistura obtendo-se o extrato hexânico. Após filtração foi adicionado 1l de álcool etílico ao restante das sementes trituradas, repetindo-se o mesmo procedimento para obter a fração etanólica do extrato hexânico (FEEH). O extrato mais ativo foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel sendo eluído com os solventes hexano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridade crescente. Várias frações foram coletadas sendo realizados testes fitoquímicos com a solução alcoólica de cloreto férrico, testes de formação de espuma e de Lieberman-Burchard (MATOS, 1999).

Obtenção de ovos de *H. contortus*

Foram coletadas diretamente do reto, aproximadamente 10g de fezes de ovino portador de infecção monoespecífica de *H. contortus*. As fezes foram misturadas com água e filtradas através de tamises com abertura entre malhas de 590; 150; 101 e 30 mm. Os ovos foram retidos e coletados no último tamis.

Teste de redução da eclosão de ovos

Para o teste de eclosão de ovos, uma suspensão contendo aproximadamente 100 ovos de *H. contortus* foi distribuída em placas de titulação e adicionada do extrato. Após 48 horas, colocou-se algumas gotas de Lugol e os ovos e larvas de primeiro estágio foram contados (COLES et al. 1992). Para melhorar a solubilidade, o extrato etanólico foi diluído em Tween 20 a 0,5% e o extrato hexânico em Tween 80 a 3% na proporção de 1:1. As concentrações finais dos extratos foram de 0,08; 0,4; 2,0; 10,0 e 50,0 mg ml⁻¹. Cada teste teve três réplicas que foram acompanhadas pelos controles,

positivo com 0,2 mg ml⁻¹ de tiabendazol e negativo com o diluente.

Correção dos resultados e Análise estatística

Os dados obtidos com os extratos foram corrigidos em função da resposta natural obtida pelos controles negativos, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de larvas no X total de nematóides} - N^{\circ} \text{ total de larvas no controle}}{\text{controle negativo no extrato}^*}$$

Total de nematóides no controle negativo*

*total de nematóides = ovos e larvas de 1º estágio

Os resultados foram submetidos à análise de variância sendo o teste Duncan utilizado para comparar as percentagens médias de eclosão entre as concentrações do extrato ou fração e o controle negativo, e o teste T de Student entre extrato e fração (SAS, 2000). Uma probabilidade estatística de 5% foi o critério de significância. Os dados apresentados expressam a percentagem de inibição da eclosão de ovos.

RESULTADOS

O FEEH de *M. indica* apresentou excelente atividade ovicida enquanto o extrato hexânico não apresentou atividade (Tabela 1). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as concentrações de 50 e 10 mg ml⁻¹ no FEEH, no entanto o

Tabela 1. Percentual médio (\pm desvio padrão) de inibição da eclosão de ovos de *H. contortus* pelo extrato hexânico e fração etanólica do extrato hexânico (FEEH) de sementes de *Mangifera indica*.

Concentração (mg ml ⁻¹)	Extratos	
	Hexânico	FEEH
50	3 \pm 2,00 ^{CBa}	95,66 \pm 12,80 ^{Ab}
10	1 \pm 1,00 ^{CDa}	91,00 \pm 17,05 ^{Ab}
2	0,33 \pm 0,58 ^{Da}	14,33 \pm 3,51 ^{Bb}
0,4	6 \pm 2,64 ^{ABa}	5,66 \pm 4,51 ^{CBa}
0,08	0,66 \pm 0,58 ^D	2,66 \pm 2,31 ^C
Controle negativo	9,66 \pm 0,58 ^{Aa}	5,00 \pm 2,00 ^{Cbb}

Letras maiúsculas comparam médias nas linhas e letras minúsculas nas colunas; letras diferentes indicam diferença significativa ($P > 0,05$)

efeito ovicida só foi obtido a partir desta última concentração. O efeito ovicida do FEEH de *M. indica* foi dose dependente. No controle positivo não houve eclosão de ovos e no controle negativo, a eclodibilidade média foi de 90,34%.

Os metabólitos detectados no FEEH foram proantocianidinas, taninos hidrolisáveis, triterpenos, incluindo saponinas.

DISCUSSÃO

O teste *in vitro* de eclosão de ovos é utilizado para detectar resistência a anti-helmínticos benzimidazóis que inibem a polimerização da tubulina impedindo o desenvolvimento do embrião. Este ensaio coloca a substância a ser testada diretamente em contato com a forma parasitária e por isso pode ser utilizado para triagem de extratos com possível atividade anti-helmíntica.

As frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica do extrato etílico de *S. anthelmia* foram testados quanto à inibição de ovos de *H. contortus*, concluindo-se que as frações acetato de etila e metanólica foram as mais eficientes, pois na concentração de 50 mg ml⁻¹ inibiram 100 e 97,4% da eclosão dos ovos de *H. contortus*, respectivamente (ASSIS, 2000). Os óleos essenciais de *Ocimum gratissimum* e eugenol foram 100% eficazes na inibição da eclosão de ovos de *H. contortus* na concentração de 0,5% (PESSOA et al. 2002). Estes resultados assemelham-se aos obtidos no presente trabalho. No entanto, se compararmos o efeito destes extratos e frações com o tiabendazol, primeiro anti-helmíntico da família benzimidazol, comercialmente utilizado para pequenos ruminantes, observaremos que a concentração necessária para obter 100% do efeito ovicida foi de 0,2 mg ml⁻¹. É evidente que este último é o princípio ativo isolado enquanto que no FEEH provavelmente existe uma substância com propriedade anti-helmíntica mas em pequenas proporções. Em geral, o extrato de uma planta possui pequenas concentrações de princípio ativo e um grande número de propriedades promissoras (RATES, 2001).

Geralmente, a busca de plantas com finalidades medicinais inicia-se por testes com o extrato aquoso da planta. No entanto, os taninos já são conhecidos, pois na natureza estão associados à defesa natural das plantas. Estas substâncias são divididas em taninos hidrolisáveis e condensados ou proantocianidinas (ATHANASIADOU et al., 2001). Dentre os dois grupos, já foi relatado que os taninos condensados têm efeito indireto contra o parasitismo já que melhora o estado geral do animal devido ao aumento no aproveitamento protéico da dieta (BARRY & MCNABB, 1999).

O quebracho, planta rica em proantocianidinas foi utilizada em teste de desenvolvimento larvar sobre *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* e *Nematodirus battus*. O quebracho não teve qualquer efeito, pois 98% das larvas atingiram o estágio infectante, porém observou-se efeito sobre a viabilidade (motilidade) das larvas de 3º estágio de todas as espécies testadas, sendo este dose dependente. O extrato de quebracho utilizado *in vivo* sobre os mesmos nematóides não mostrou resultados satisfatórios contra os parasitos do abomaso, porém foi eficiente contra *T. colubriformis* e *N. battus* (ATHANASIADOU et al., 2001). Estes resultados contraditórios podem ser ex-

plicados pela complexa natureza dos taninos. Diferentes tipos de taninos condensados provavelmente apresentam diferentes efeitos sobre os parasitos.

Os resultados deste trabalho indicam que a fração etanólica do extrato hexânico obtido a partir de sementes de *M. indica* possui atividade contra ovos de *H. contortus*. Não se tem qualquer registro em termos de toxicidez, haja vista o amplo uso deste material como conservante de alimentos devido às propriedades antioxidantes (KABUKI, 2000). Espera-se após confirmação por testes *in vivo*, obter um anti-helmíntico natural, de fácil aquisição e baixo custo.

SUMÁRIO

O rápido desenvolvimento da resistência a anti-helmínticos, associada ao alto custo das drogas disponíveis, tem limitado o sucesso do controle das helmintoses gastrintestinais de pequenos ruminantes, e despertado o interesse do estudo de plantas medicinais como fontes alternativas de anti-helmínticos. O extrato hexânico e a fração etanólica do extrato hexânico (FEEH) obtido a partir de sementes de *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) foram testados sobre ovos de *Haemonchus contortus* através do teste de eclosão de ovos. Testes fitoquímicos foram realizados com o extrato mais ativo para detectar alguns de seus constituintes micromoleculares. Os extratos foram avaliados nas seguintes concentrações finais : 0,08; 0,4; 2,0; 10,0 e 50,0 mg ml⁻¹. O extrato etanólico inibiu 95,66% da eclosão de ovos na concentração de 50,0 mg ml⁻¹, sendo que este efeito foi dose dependente. No entanto, o extrato hexânico apresentou atividade insignificante na mesma concentração. Os constituintes detectados no FEEH foram principalmente proantocianidinas, e em menor quantidade taninos hidrolisáveis, triterpenos, inclusive saponinas. Estes resultados indicam que o FEEH de *M. indica* é um potencial agente no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos.

PALAVRAS-CHAVE: *Mangifera indica*, sementes, extrato hexânico, fração etanólica, *in vitro*, *H. contortus*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq (proc. 464390/01) e FUNCAP (proc.147/00).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AROSEMENA, N. A. E., BEVILAQUA, C. M. L., MELO, A. C. F. L. & GIRÃO, M. D. (1999). Seasonal variations

- of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. *Rev. Med. Vet.* 150:11-14.
- ASSIS, L. M. (2002). Atividade anti-helmíntica *in vitro* de extratos de *Spigelia anthelmia* sobre *Haemonchus contortus*. (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará. 54p.
- ATHANASIADOU, S., KYRIAZAKIS, I., JACKSON, F. & COOP, R. L. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* 99:205-219.
- BRAGA, R. (2001). Plantas do nordeste - Especialmente do Ceará. Coleção Mossoroense, 5ª edição, volume I, p. 204.
- BATISTA, L. M., BEVILAQUA, C. M. L., MORAIS, S. M. & VIEIRA, L. S. (1999). Atividade ovicida e larvicida *in vitro* de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. *Ci. Anim.* 9:67-73.
- BARRY, T. N. & MCNABB, W.C. (1999). The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Brit. J. Nut.* 81: 263-272.
- CHARLES, T. P. (1989). Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in Pernambuco State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 30:335-343.
- COLES, G. C., BAUER, F. H. M., BORGSTEEDE, S., GREERTS, S., KLEI, M. A. TAYLOR, T. & WALLER, P. J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 44:35-44.
- HAMMOND, J. A., FIELDING, D., & BISHOP, S. C. (1997). Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res. Comm.* 21:213-228.
- HERD, R. (1996). Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. "Controle dos nematóides gastrintestinais em ruminantes" (T. Padilha, Ed.), pp. 95-111. EMBRAPA-CNPGL, Coronel Pacheco, MG.
- JACKSON, E. (1993). Anthelmintic resistance - the state of play. *Br. Vet. J.* 149: 123-127.
- KABUKI, T., NAKAJIMA, H., ARAI, M., UEDA, F., KUWABARA, Y. & TOSAKO, F. S. (2000). Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica* L.) kernel seeds. *Food Chem.* 71:61-66
- LAKSHMINARAYANA, G., CHANDRASEKHARA, R.T & RAMALINGASWAMY, P.A. (1983). A Variations in content, characteristic and composition of mango seeds and fat. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60:88-89.
- MATOS, F. J. A. (2000). Introdução à fitoquímica experimental. Edições UFC, Fortaleza, 141 p.
- PESSOA, L. M., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L., LUCIANO, J. H. S. (2002). Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 109:59-63.
- PINHEIRO, R. R., GOUVEIA, A. M. G., ALVES, F. S. F. & HADDAD, J. P. A. (2000). Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med Vet. Zootec.* 52:534-543.
- Statistical Analyses Systems (SAS) Institute Inc. (2000). SAS/STAT Users Guide.
- RATES, S. M. K. (2001). Plants as sources of drugs. *Toxicon*, 39: 603-613.
- VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R., PEREIRA, M. E., DANTAS, L. B. & XIMENES, L. J. F. (1999). Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará state, north-east Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. *Rev. Med. Vet.* 150:447-452.
- WALLER, P. J., DASH, K. M., BARGER, I. A., LEJAMBRE, L. F. & PLANT, J. (1995). Anthelmintic resistance in nematodes parasites of sheep: learning from the Australian experience. *Vet. Rec.* 136:411-413.