

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

ATIVIDADE *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM SOBRE LARVAS DE TERCEIRO ESTÁDIO DE NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS (FAMÍLIA TRICHOSTRONGYLIDAE) DE CAPRINOSW.M.A. Souza^{1*}, R.A. Ramos¹, I.C.B. Silva², L.C. Alves¹, M.C.O.C.C. Coelho¹, M.B.S. Maia³¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Av. D. Manoel Medeiros, s/nº, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: isabelwagner@uol.com.br

RESUMO

Avaliou-se *in vitro* a atividade larvicida do extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham) sobre larvas de terceiro estágio de nematoides gastrintestinais de caprinos. Os resultados encontrados demonstraram que a concentração de 500 mg mL⁻¹ apresentou atividade efetiva e com capacidade de ação de 95,89%, demonstrando desta forma a possibilidade do uso terapêutico anti-helmíntico para esse extrato.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoterapia, parasitoses, anti-helmíntico, alecrim pimenta.

ABSTRACT

IN VITRO ACTIVITY OF THE HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *LIPPIA SIDOIDES* CHAM ON BUOYANT LARVAE OF THIRD-STAGE GASTROINTESTINAL NEMATODES (FAMILY TRICHOSTRONGYLIDAE) OF GOATS. The *in vitro* larvicidal activity of the hydroalcoholic extract of rosemary pepper (*Lippia sidoides* Cham) was evaluated on buoyant larvae of third-stage gastrointestinal nematodes of goats. The results demonstrated that the concentration of 500 mg mL⁻¹ presented effective activity, with a capacity of action of 95.89%, thus demonstrating the possibility of anthelmintic therapeutic use for this extract.

KEY WORDS: Phytotherapy, anthelmintic, rosemary pepper.

A prática da medicina popular com o uso de plantas é bastante antiga, não só no Brasil como no mundo, sendo atualmente importante na cura e na prevenção de eventuais enfermidades. Por ser um campo bastante amplo, existindo milhares de espécies distintas com propriedades terapêuticas e diferentes formas de uso para cada grupo, pesquisas estão sendo feitas em todo o país visando contribuir para um melhor aproveitamento dessa flora, em virtude da sua enorme aplicabilidade (ALCANTARA JUNIOR *et al.*, 2005).

Os parasitos gastrintestinais dos ruminantes são responsáveis por constantes perdas econômicas na caprinovinocultura do Nordeste do Brasil (PINHEIRO *et al.*, 2000). Dentre os nematoides, o *Haemonchus contortus* (família Trichostrongylidae) é responsável por elevada mortalidade e diminuição da produtividade dos animais, particularmente nos mais jovens (AROSEMENA *et al.*, 1998).

O controle dos parasitos gastrintestinais tem sido realizado por meio de dosificação anti-helmíntica,

visando reduzir os níveis de infecção dos animais e, conseqüentemente, a descontaminação das pastagens (CHARLES, 1989). Porém, o desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos, associado ao alto custo do tratamento, seus resíduos em alimentos e a poluição ambiental causada por sua utilização, tem incentivado a pesquisa de terapêutica alternativa, como os fitoterápicos (HERD, 1996). Muitas plantas já têm sido descritas como possuidoras de atividade anti-helmíntica (HAMMOND *et al.*, 1997; VIEIRA; CAVALCANTI, 1999).

A *Lippia sidoides* Cham pertence a um gênero bastante vasto, sendo composto por aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores pertencentes à família Verbenaceae (TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996). No óleo essencial de *L. sidoides* encontram-se vários princípios químicos diferentes, destacando-se: monoterpenos (carvacrol, p-cimeno, timol, α -felandreno), sesquiterpene (β -cariofileno, α -copaeno, α -humuleno) (MACAMBIRA *et al.*, 1986; LEMOS *et al.*, 1990; TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996).

²Médica Veterinária, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brasil.

³Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Recife, PE, Brasil.

*Programa de pós-graduação em Ciência Veterinária (Doutorado) - UFRPE.

A associação destes compostos promove ao óleo essencial da *L. sidoides* forte ação antifúngica, antibacteriana, antimicrobiana, moluscida e larvicida, respectivamente, contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Corynebacterium xerosis*, *Candida albicans* ou *Monilia*, *Trichophytum rubrum* e *T. interdigitale*, *Biomphalaria glabra* e *Aedes aegypti* (LEMONS et al., 1990; LACOSTE et al., 1996; MATOS et al., 2000; LORENZI; MATOS, 2002).

Devido ao potencial terapêutico apresentado pela *L. sidoides*, sua alta distribuição pela flora nordestina e a necessidade de se encontrar medidas alternativas eficazes no controle dos parasitos gastrintestinais dos caprinos e ovinos, objetivou-se avaliar a ação larvicida do extrato hidroalcoólico seco (EHA) de *L. sidoides* sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais (família Trichostrongylidae) de Caprinos.

Foram utilizadas folhas de *L. sidoides* Cham provenientes da região do semiárido pernambucano (8° 25'00" Sul e 37° 03'15" Oeste) e transportadas ao laboratório de produtos bioativos de Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco onde o extrato vegetal foi obtido. Inicialmente as folhas foram trituradas e desidratadas em estufa durante 1 hora a 50° C. Em seguida foi adicionado Etanol/H₂O 70° GL (1:1), e procedida a homogeneização e incubação em banho-maria a 70° C por 1h e 30 min. Após este período, foi realizada a filtração em funil com algodão e o extrato obtido foi concentrado em rota evaporador (com pressão reduzida à temperatura de 50° C 90 rpm), A *L. sidoides* Cham foi identificada e tombada no Herbário IPA-PE sob nº 82505 pela botânica Olívia Cano, funcionária da mesma instituição.

Foram coletadas 10 g de fezes diretamente da ampola retal de 20 animais da espécie caprina criados em sistema semi-intensivo no Município de Jaboatão dos Guararapes (8°10'00" Sul e 35°08'00" Oeste), Estado de Pernambuco. As fezes foram acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas sob temperatura refrigerada ao Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Foi realizada cultura para obtenção das larvas infectantes, incubadas em temperatura média de 26° C durante oito dias, reviradas e recolhidas cinco amostras contendo 50 µL do líquido. As larvas obtidas foram coradas com Lugol 1%, realizando-se a classificação quanto ao gênero segundo UENO; GONÇALVES (1998). Foi retirado novamente um número igual de amostras para avaliação de larvas vivas e a sua motilidade.

Microplacas de poliestireno com fundo redondo de 96 poços, em triplicata, contendo 50 µL da solução com aproximadamente 100 larvas L₃ nas concentrações µ controle água, α2 1,0 mg/mL, α3 2,0 mg/mL, α4 5,0 mg/mL, α5 10 mg/mL, α6 20 mg/mL, α7 50 mg/mL, α8 100 mg/mL, α9 150 mg/mL, α10 250

mg/mL e α11 500 mg/mL, do extrato vegetal, α12 controle febendazole a 33 mg/mL foram incubados em temperatura ambiente acompanhada a 26° C por 24, 48 e 72 horas. Sendo o material retirado após cada período de tempo, colocados em lâminas de vidro e analisado em microscopia ótica com objetiva de 100x, sendo as larvas contadas e avaliadas quanto a sua viabilidade. O procedimento foi igualmente repetido com água destilada (controle negativo) e Febendazole a 33 mg/mL (controle positivo) constituindo-se os grupos controles para os testes.

Foram aplicados métodos a fim de mensurar a eficácia do EHA. A fim de alcançar o objetivo desta parte da análise, calculou-se o percentual de larvas mortas após 24, 48 e 72 horas para cada tratamento. Modelo de efeito dada por $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$.

Verificou-se, por meio do teste de Lilliefors (STEPHENS, 1974), se a suposição de normalidade dos resíduos era satisfeita, ou seja, $\epsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$. Calculou-se a análise de variância para verificar se o efeito tratamento, efeito horas e/ou efeito interação (tratamento x horas) eram significativos para determinar o percentual de larvas mortas pelo extrato utilizado. Para os fatores que foram significativos houve comparação entre as médias para verificar onde os efeitos eram maiores ao utilizar extrato nas L₃.

Os dados foram tabulados na planilha eletrônica Microsoft Excel. Para análise estatística foram utilizados os softwares R versão 2.2.1 e EPI6. Todas as decisões foram tiradas no nível de significância de 5%.

A cultura das larvas de nematoides gastrintestinais da família Trichostrongylidae na espécie caprina revelou larvas infectantes do gênero *Haemonchus*, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum*, com uma predominância do gênero *Haemonchus* estando de acordo com ALMEIDA et al. (2003) ao relatarem a predominância do gênero *Haemonchus* em relação aos outros em ovinos no Nordeste do Brasil.

Por meio das estimativas do modelo de efeito, verificou-se que os coeficientes referentes ao tempo (horas) e a interação com as diferentes concentrações não foram significativos. Contudo, por meio da análise de variância do modelo de efeito final, observa-se que o efeito do tratamento é significativo (Tabela 1). Sendo assim, foi realizado o teste de Tukey a fim de verificar onde existe maior ação do extrato.

O grupo α11 apresentou o melhor resultado quando comparado a todos os outros grupos testados, sendo observados 95,89% de eficácia. Como indicativo da eficiência foi considerada o que preconiza o Grupo Mercado Comum para substâncias químicas: Altamente efetivo > 98%; Efetivo 90-98%; Moderadamente efetivo 80-89% e Insuficientemente ativo < 80% (GMC, 1996).

Sendo assim, observa-se, com os resultados expostos, que o efeito do extrato é dose dependente. À medida que aumenta a concentração, aumenta o efeito.

Tabela 1 - Análise de variância para o modelo de efeito final.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p-valor
α	11	41152	3741	54,972	< 0,001 ¹
Resíduo	72	5604	78	-	-

¹P-valor do teste do teste F. Se p-valor < 0,05.

O grupo controle positivo α 12 (febendazole 33 mg/mL) apresentou valores de referência semelhantes aos grupos α 7, α 8 e α 9 com média positiva, porém não significativa. O que nos revela que este grupo também se encontra abaixo do controle efetivo de larvas, o que possivelmente pode demonstrar o desenvolvimento da resistência anti-helmíntica ao produto febendazole. Uma vez que este princípio ativo é indicado com a ação larvicida segundo o fabricante. Quando comparado aos grupos α 10 e α 11, o febendazole se encontra com valores abaixo desses, porém bem próximo ao α 10 e não significativo, ficando desta forma bem inferior ao grupo α 11.

Os resultados aqui encontrados estabelecem uma relação semelhante dos grupos α 10 e α 11 com os dados de BEVILAQUA *et al.* (2005) ao estudarem o efeito larvicida do óleo essencial de *L. sidoides* sobre as larvas L₃ de *H. contortus* nas concentrações 2% e 1% com resultados de 94,58% e 90,25%, respectivamente, de eficiência.

BEVILAQUA *et al.* (2005), ao avaliarem a ação larvicida do óleo essencial de *Ossimum gratissimum*, puderam observar uma alternância de eficiência nos resultados encontrados, mesmo com o aumento de suas concentrações 0,125% obteve 41,18% e 0,25%, 0,50% 1% e 2% obtiveram respectivamente 45,78%, 41,98%, 76,51% e 93,22% de ação. Esse mesmo efeito também foi observado neste estudo entre os grupos

T2 a T6, mas sem diferenças significativas havendo apenas a alternância dos resultados.

Essa situação pode ser explicada quando, durante o desenvolvimento da metodologia, observou-se que quando o volume do extrato era menor, o volume final também diminuía e poderia haver um efeito de aumento da densidade final, interferindo de alguma forma no resultado.

A possibilidade de variação de resultados foi observada por HOUNZANGBE-ADOTE *et al.* (2005) que estudaram a ação de quatro plantas tropicais *Zanthoxylum zanthoxyloides*, *Newbouldia laevis*, *Morinda lúcida* e *Carica papaya* em ovos, larvas infectantes e adultos de *H. contortus* verificando que as plantas testadas apresentavam ação contra todos os estágios dos parasitos, porém, variando grandemente seus resultados entre cada estágio. Desta forma, a discussão de trabalhos referentes a esses estudos é complexa, pois se trata de material, concentrações e solventes diferentes e, portanto, apresentando possivelmente reação para os estágios de desenvolvimento do parasito próprio.

A concentração de 500 mg/mL do EHA de *Lippia sidoides* Cham demonstrou *in vitro* ação larvicida com 95,89% de eficiência sobre as larvas L₃ de nematóides gastrintestinais (família Trichostrongylidae) de caprinos.

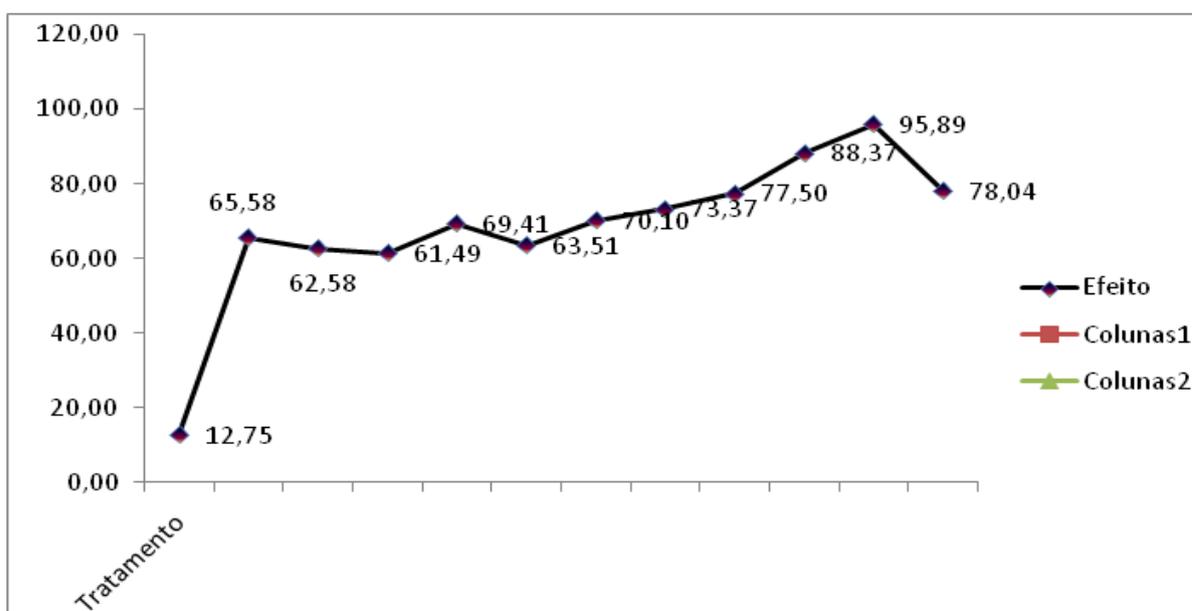


Fig. 1 - Gráfico demonstrativo dos diferentes resultados na evolução das concentrações testadas do EHA de *L. sidoides*.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, JUNIOR, J.P.; AYALA-OSUNA, J.T.; QUEIROZ, S.R.O.D.; RIOS, A.P. Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas medicinais do município de Itaberaba-BA para cultivo e preservação. *Sitientibus. Série Ciências Biológicas*, v.5, n.1, p.39-44, 2005.
- ALMEIDA, M.A. O. BOTURA, M.B.; SANTOS, M.M. dos; ALMEIDA, G.N.; DOMINGUES, L.F.; COSTA, S.L.; BATATINHA, M.J.M. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratos* (DC.) staf (capim-santo) e de *Digitaria insularis* (L) fedde (Capim-açu) sobre cultivo de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.12, n.3, p.125-129, 2003.
- 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 área in Brazil. *Revista Medicina Veterinária*, v.150., p.11-14, 1998.
- BEVILAQUA, C.M.L.; VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M. Ovicidal and larvicidal activity of *Lippia sidoides* and *Ocimum gratissimum* essential oils against *Haemonchus contortus*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 20., 2005, Christchurch, NZ. Session D.
- CHARLES, T.P. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in Pernambuco State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.30, p.335-343, 1989.
- FARIAS, M.P.O. Avaliação "in vitro" da atividade ectoparasiticida e anti-helmíntica da andiroba (*Carapa guianenses Aubli.*). 2007. 134f Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2007.
- MERCOSUL. Grupo Mercado Comum. *Regulamento técnico para registros de produtos antiparasitários de uso veterinário*. Decisão Nº 4/91, Resolução Nº11/93. MERCOSUL, Resolução Nº 76., 1996.
- HAMMOND, J.A.; FIELDING, D.; BISHOP, S.C. Prospects for plant anthelmintics in veterinary medicine. *Veterinary Research Communications*, v.21, p.213-228, 1997
- HERD, R. Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. In: PADILHA, T. (Ed.). *Controle dos nematóides gastrintestinais em ruminantes*. Coronel Pacheco: EMBRAPA - CNPGL, 1996. p.95-111.
- HOUNZANGBE-ADOTE, M.S.; PAOLINI, V.; FOURASTE, I.; MONTAIROU, K.; HOST, H. in vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*, v.78, p.155-160, 2005.
- LACOSTE, E.; CHAUMONT, J.P.; MANDIN, D.; PLUMEL, M.M.; MATOS, F.J.A. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham.; application to the cutaneous microflora. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v.54, p.228-230, 1996.
- LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; CLARK, A.M.; MCCHESENEY, J.D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytotherapy Research*, v.4, n.2, p.82-84, 1990.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MACAMBIRA, L.M.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A. Naphtoquinoids from *Lippia sidoides*. *Journal of Natural Products*, v.49, p.310-312, 1986.
- MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; SILVA, M.G. Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol - *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracillis* H.B.K. (Verbenaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v.11, n.6, p.666-668, 2000.
- 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, p.534-543, 2000.
- POWER, K.G. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) - Guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). *Veterinary Parasitology*, v.10, p.265-268, 1982.
- STEPHENS, M.A. EDF statistics for goodness of fit and some comparisons. *Journal of the American Statistical Association*, v.69, p.730-737, 1974.
- TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) - A literature review. *Journal of Essential Oil Research*, n.8, 471-485, 1996.
- UENO, H.; GONÇALVES, P.C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 3.ed. Tokyo: International Cooperation Agency. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária da UFRGS, 1998. 166p.
- VIEIRA, L. da S.; CAVALCANTE, A.C.R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.19, n.3/4, p.99-103, 1999.

Recebido em 24/4/08

Aceito em 17/1/11