

Efeito anti-helmíntico dos extratos aquosos e etanólicos da *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde) sobre o nematóide *Ascaridia galli*

FERNANDES, M.Z.L.C.M.¹; FERNANDES, R.M.²; BRITO, D.R.B.³; BORBA, H.R.⁴

¹ Faculdade de Ciências Médicas (FACIME) da Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Rua Olavo Bilac, 2335 Centro - Teresina/PI- Brasil zenaidemoreno@gmail.com ² Departamento de Morfofisiologia Veterinária/ Campus Agrícola da Socopo, S/N, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, zmoreno@ufpi.br. ³ Campus Agrícola da Socopo S/N, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Mestrado em Ciência Animal, Teresina-PI, danilobrito@hotmail.com ⁴ Departamento de Biologia Animal/ Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 47, Seropédica-RJ. borba@ufrj.br

RESUMO: As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos. Dentre as plantas usadas na medicina popular a *Annona squamosa* conhecida como fruta-do-conde é citada como tendo várias ações medicinais, dentre elas a atividade inseticida e anti-helmíntica. Dentro desta perspectiva, objetivou-se determinar a atividade anti-helmíntica dos extratos aquosos (EA) e etanólicos (EE) das folhas da fruta-do-conde sobre o nematóide de aves *Ascaridia galli*, *in vitro* e *in vivo*. No primeiro, os nematóides foram colocados em placa de Petri contendo diferentes concentrações dos extratos e no segundo foram utilizadas seis galinhas poedeiras por grupo, as quais foram administrados 10 mL Kg⁻¹ dos extratos. No teste *in vitro* o EA da *A. squamosa* nas concentrações 2,4 e 9,6 mg mL⁻¹ foi capaz de matar 63,33% e 53,33% dos nematóides, respectivamente. O EE não produziu efeito significativo. No teste *in vivo*, o percentual de eliminação do EA foi de 39% e do EE de 20%. Estes dados sugerem que neste caso a substância responsável pela mortalidade dos parasitos esteja em maior concentração na fração aquosa. Desta maneira, acredita-se que o EA de *A. squamosa* apresenta uma atividade anti-helmíntica potencial sobre o *A. galli*.

Palavras-chave: anti-helmínticos, *Annona squamosa*, *Ascaridia galli*, extratos vegetais

ABSTRACT: Anthelmintic effect of aqueous and ethanolic extracts from *Annona squamosa* L. (sweetsop) on the nematode *Ascaridia galli*. Plants are important sources of biologically active natural products. Among the plants used in popular medicine, *Annona squamosa*, known as sweetsop, is reported to have several medicinal actions such as insecticidal and anthelmintic activity. Therefore, this study aimed to assess the anthelmintic activity of aqueous (AE) and ethanolic (EE) extracts from sweetsop leaves on the chicken roundworm *Ascaridia galli*, both *in vitro* and *in vivo*. In the former, nematodes were placed on a Petri plate containing different concentrations of the extracts; in the *in vivo* test, six egg-laying chickens per group received 10 mL Kg⁻¹ of the extracts. *In vitro* results indicated that *A. squamosa* AE at the concentrations 2.4 and 9.6 mg mL⁻¹ could kill 63.33% and 53.33% nematodes, respectively. However, EE did not have any significant effect. According to the *in vivo* test, the elimination percentage for AE was 39% and for EE, 20%. These data suggest that the substance responsible for parasite mortality was present at a higher concentration in the aqueous fraction. Thus, *A. squamosa* AE is believed to have a potential anthelmintic activity on *A. galli*.

Key words: Anthelmintics, *Annona squamosa*, *Ascaridia galli*, plant extracts

INTRODUÇÃO

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um

grande número de fármacos. Pesquisadores na área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza

revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade, em termos de estrutura, propriedades físico-químicas e biológicas (Wall & Wani, 1996). Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao potencial medicinal (Soerjato, 1996).

Annona squamosa pertence à Família Annonaceae e é conhecida popularmente como frutido-conde. É uma espécie bastante cultivada por possuir frutos bastante apreciados pelo homem (Pontes et al., 2004). Além do potencial frutífero, essa espécie tem grande importância medicinal considerando a utilização na terapêutica popular, onde as folhas são usadas no tratamento de dor de cabeça, diarreia, falta de apetite, reumatismo, anemia e infecções; as sementes são empregadas no combate a caspa e piolhos (Ramos, 1992).

Pio Corrêa (1984) também cita várias propriedades medicinais das folhas como medicação sudorífica, carminativa, estomáquica e anti-helmíntica por via oral e, externamente, em compressas e bochechos, no tratamento de estomatites, nevralgias e cefaléia, bem como, na forma de cataplasma em furúnculos e úlceras para induzir a supuração. Segundo Oliveira et al. (2000), diversas plantas do gênero *Annona* apresentam atividade inseticida, antiparasitária e anti-helmíntica, no entanto não há registro na literatura de pesquisas que tenham determinado estas atividades.

Por outro lado, a infecção parasitária intestinal é considerada como um sério problema causando grandes perdas econômicas no setor da avicultura, principalmente no que diz respeito à mortalidade, retardo do crescimento, redução do índice de conversão alimentar, diminuição da produção de ovos e da fertilidade, e favorecimento à passagem de toxinas através da parede intestinal com aumento da suscetibilidade às doenças infecciosas (Fernandes, 1998).

Um grande número de pesquisas sobre prevalências das helmintíases aviárias tem sido realizado, tanto no Brasil como no exterior. Magwisha et al. (2002), comparando a prevalência de helmintos em criações extensiva na Tanzânia, verificaram a presença de *Ascaridia galli* em 69% das aves jovens e 29% em adultos. Da mesma forma, Eshetu et al. (2001), estudando a prevalência de helmintos de aves na Etiópia, constataram 91% de positividade em 267 aves, sendo que estas apresentavam de um a nove espécies de parasitos, dentre estes 17,28% eram de *Heterakis gallinarum* e 35,58% de *A. galli*. No Brasil, Fernandes (1998) estudando a atividade anti-helmíntica de plantas "in vivo", observou que em 70 frangos de corte criados semi-extensivamente 94,3% eram positivos para *A. galli*.

Dentro desta perspectiva, o presente trabalho

teve como objetivo determinar a atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* das folhas de *Annona squamosa* L. (fruta do conde) sobre o nematóide de aves *Ascaridia galli*.

MATERIAL E MÉTODO

Os ensaios farmacológicos foram conduzidos no período de março de 2004 a janeiro de 2007 no anexo do Biotério Experimental do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. A matéria vegetal da *A. squamosa* foi coletada no município de Teresina-PI em novembro de 2005. Após a identificação botânica, a exsiccata foi depositada no Herbário Graziela Barroso da UFPI sob o nº TEPB-9.482.

Preparo dos Extratos

Imediatamente após a coleta, as folhas foram dessecadas em estufa de circulação forçada de ar durante três dias na temperatura máxima de 45°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e depois trituradas em macromoinho Willye. O extrato aquoso (EA) foi preparado a partir de 10 g da matéria vegetal para 100 mL de água destilada sob cocção por aproximadamente três minutos. Após o resfriamento a solução obtida foi filtrada, acondicionada e mantida sob refrigeração até o momento dos testes. A matéria seca deste extrato foi determinada retirando-se três alíquotas de 1 mL da solução e colocando-as em frascos lavados, secos, desengordurados e previamente pesados. Estes foram colocados em estufa de circulação forçada de ar até a obtenção de massa constante para cada frasco. A massa média obtida referente à 1 mL foi relacionada ao respectivo volume total.

O extrato etanólico (EE) da planta foi obtido colocando-se 500 g da matéria vegetal em etanol PA num processo de maceração a frio. Após quatro extrações sucessivas fez-se a homogeneização, evaporação do etanol, utilizando-se evaporador rotativo a 40°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e em seguida, procedeu-se à liofilização. Para a realização dos testes *in vitro* o extrato etanólico foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) a 12,5% e no teste *in vivo* utilizou-se tween 80, sendo a concentração inicial de 12,5 mg mL⁻¹, para ambos extratos.

Atividade anti-helmíntica *in vitro*

A atividade anti-helmíntica *in vitro* foi determinada sobre o nematóide *A. galli* adultos, machos e fêmeas coletados a partir do intestino delgado das aves necropsiadas. Os parasitos assim obtidos foram lavados minuciosamente com solução salina 0,9% pré-aquecida em banho-maria a 37°C. Os helmintos mais ativos após a lavagem foram imediatamente transferidos para placas de Petri descartáveis (150 x 15 mm) contendo a solução de

Tyrode acrescida do extrato (Kaleysa Raj, 1975).

As concentrações usadas do extrato aquoso foram de 0,60; 1,20; 2,40; 4,80 e 9,60 mg mL⁻¹ e do etanólico foi de 0,42; 0,84; 1,70; 3,40 e 6,80 mg mL⁻¹. Estas foram obtidas colocando-se nas placas alíquotas de 2, 4, 8, 16 e 32 mL dos extratos testes diluídos em 58, 56, 52, 44 e 28 mL da solução de Tyrode, respectivamente, de forma que cada placa ficasse com volume final de 60 mL. Para cada tipo de extrato, fez-se um grupo controle negativo contendo água destilada e DMSO a 12,5%. Como controle positivo usou-se uma solução de piperazina tetrahidratada adaptada aos testes. A piperazina foi diluída em solução de Tyrode numa concentração final de 50 mg mL⁻¹ (Shivakumar et al., 1975).

Foram utilizados nos testes 150 *A. galli* para cada grupo, perfazendo um total de 630 nematóides, exceto no grupo controle positivo onde se usou 30 parasitos. Os parasitos foram distribuídos nas placas em número de dez com três repetições, para cada concentração (cinco). As placas contendo os extratos, os helmintos foram mantidos numa B.O.D. a uma temperatura de 37°C (±1°C) e observadas nos períodos de 6, 24, 48, 72 e 96 horas para o teste de mortalidade. Aqueles com perda de motilidade, mesmo após uma breve pressão com estilete, eram considerados mortos (Shilaskar & Parasar, 1989).

A percentagem de parasitos mortos em cada grupo foi avaliada estatisticamente usando Análise de Variância da variável percentual de mortos. Para comparação das médias aplicou-se o teste de Duncan de acordo com os procedimentos do software SAEG.

Atividade anti-helmíntica *in vivo*

A atividade anti-helmíntica foi determinada em galinhas poedeiras naturalmente infectadas com *A. galli*. Foram usadas 30 aves adultas, com peso médio de 1,5 kg, divididas em grupos de seis animais, sendo constituídos dois grupos para os testes com os extratos, um controle positivo com piperazina e dois grupos controles negativos, com água e tween 80 a 12,5%.

A determinação da infecção do plantel foi realizada logo após a aquisição dos animais por meio de exames coprológicos, utilizando-se a técnica de Willis ligeiramente modificada (Willis, 1927 *apud* Ueno, 1994). Diagnosticada a infecção, os animais foram transferidos para gaiolas galvanizadas com fundo removível para facilitar a coleta das fezes, onde passaram por um período de adaptação de 72 horas, recebendo diariamente 50 g de ração e água *ad libitum*. Antes do início dos testes as aves foram submetidas a um período de jejum de 6 horas, tendo disponível água à vontade. Os extratos aquosos e etanólicos foram administrados através de gavagem no volume de 10 mL Kg⁻¹, durante três dias consecutivos (Fernandes et al., 2005).

As fezes eliminadas em cada período de 24 horas foram recolhidas, efetuando-se um total de quatro coletas. A matéria fecal foi transferida para um tamis USBS-50, abertura 0,297 mm e tyler 48 sob outro tamis de malha USBS-40, abertura 0,42 mm e tyler 35, lavada em água corrente e conservada em solução AFA a quente (Amato et al., 1991) para posterior contagem dos helmintos eliminados. No quinto dia do experimento as aves foram sacrificadas e necropsiadas (Resolução nº 714 de 20/06/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária –CFMV). A mucosa do trato gastrointestinal foi raspada e o conteúdo colocado em frascos contendo AFA quente para posterior contagem e identificação dos helmintos remanescentes com auxílio de microscópio estereoscópio.

A atividade anti-helmíntica das plantas foi avaliada com a aplicação do teste crítico controlado (Steward, 1955), adaptado ao nosso modelo experimental e expressa em termos de percentuais médios de eliminação de *A. galli* nas fezes, em relação ao total de nematóides apurados na contagem fecal e à necropsia. Procedimento idêntico e cálculo semelhante foram aplicados aos grupos controles negativo com o objetivo de avaliar a eliminação espontânea dos helmintos e para verificar se os diluentes não interferiram na atividade dos extratos.

Os resultados foram expressos em termos de percentuais médios de eliminação e analisados estaticamente através da estimativa de proporções dentro do intervalo de confiança de 95% usando-se o software SAS (1986).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a *A. squamosa* e com piperazina são demonstrados nas tabelas e figuras abaixo, onde a eficácia do tratamento corresponde aos percentuais médios de mortalidade do *A. galli*.

Os resultados obtidos nos testes anti-helmínticos *in vivo* e *in vitro* com *A. squamosa* permitem verificar que o extrato aquoso (EAAS) apresentou percentual de mortalidade estatisticamente superior quando comparados com os percentuais obtidos com o extrato etanólico (EEAS). Nas concentrações de 2,4 e 9,6 mg mL⁻¹ foram registrados os maiores percentuais de mortalidade, não sendo demonstrado o efeito dose dependente (Tabela 1).

O EEAS apresentou um perfil inverso em relação ao EAAS, uma vez que foi capaz de causar mortalidade de *A. galli* nas menores concentrações, porém sem significância quando comparados com os valores obtidos no grupo controle (Tabela 1).

As Figuras 1 e 2 mostram o efeito dos extratos aquosos e etanólicos sobre *A. galli* ao longo de 96 horas. O registro de mortalidade dos parasitos

TABELA 1. Percentuais médios de mortalidade de *Ascaridia galli* em diferentes concentrações de extratos aquosos e etanólicos obtidos das folhas de *Annona squamosa*.

Tratamentos	Concentrações (mg mL ⁻¹)	(%) de Mortalidade
Extrato Aquoso	0.60	20,00 ^{bc}
	1.20	10,00 ^c
	2.40	63,33 ^b
	4.80	6,67 ^c
	9.60	53,33 ^b
Extrato Etanólico	0.42	13,33 ^c
	0.84	10,00 ^c
	1.70	3,33 ^c
	3.40	0,00 ^c
	6.80	3,33 ^c
DMSO	-	5,33 ^{c*}
Água destilada	-	13,33 ^{c*}
Piperazina	50	100,0 ^a

Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de significância ($p > 0,05$)

para o EAAS e o EEAS foi observado após 48 horas de exposição, semelhante ao resultado com a piperazina. Uma única concentração do EAAS (2,4 mg mL⁻¹) apresentou mortalidade após 24 horas de exposição ao extrato (Figura 1). Na Figura 2 observa-se claramente que o EEAS não apresentou efeito sobre este nematóide, comportando-se de forma semelhante ao controle negativo.

A mortalidade causada pelo EAAS pode estar relacionada ao efeito hipoglicemiante das folhas da *A. squamosa* estudado por Gupta et al. (2005) em animais de laboratório. Esta relação pode ser possível uma vez que o *A. galli*, segundo Rim et al. (1965), utiliza a glicose mais como reserva energética do que no processo oxidativo do CO₂ na respiração,

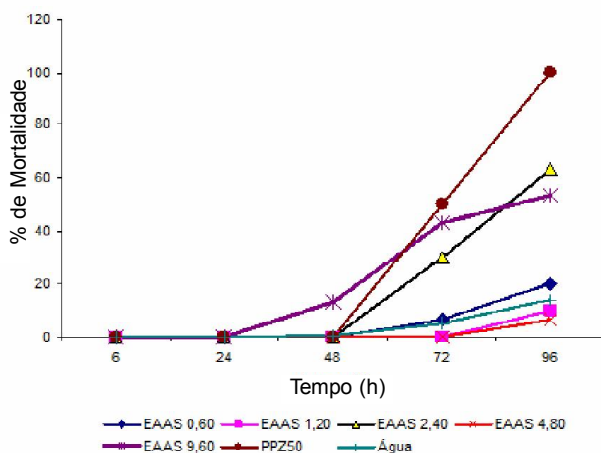


FIGURA 1. Efeito acumulado do extrato aquoso (EAAS) da folha de *Annona squamosa* em diferentes concentrações e da piperazina (PPZ50) sobre *Ascaridia galli*.

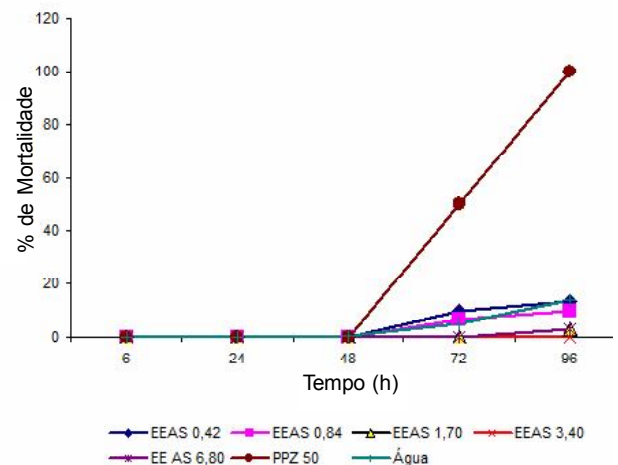


FIGURA 2. Efeito acumulado do extrato etanólico (EEAS) da folha *Annona squamosa* e piperazina (PPZ 50) sobre *Ascaridia galli*.

confirmando o efeito observado nas Figuras 1 e 2, quanto ao início da mortalidade destes parasitos. Os testes anti-helmínticos *in vitro* sugerem que a substância responsável pela mortalidade dos parasitos esteja presente prioritariamente na fração aquosa.

Nos testes *in vivo*, o extrato aquoso apresentou 38,95% de eliminação de *A. galli* quando comparado ao grupo controle, percentual 2,5 vezes maior que a eliminação espontânea (Tabela 2), enquanto o extrato etanólico não ultrapassou os 20%. Esse resultado confirma os efeitos observados nos testes *in vitro* e também que a(s) substância(s) responsável (eis) pelo efeito na eliminação dos helmintos esteja(m) relacionada(s) à fração aquosa, sugerindo que esses metabólitos tenham caráter

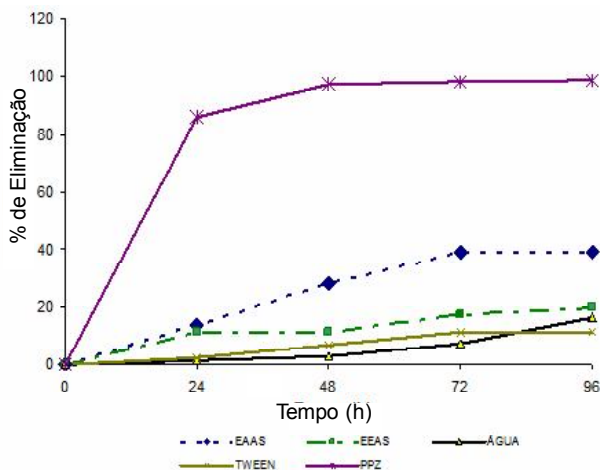
TABELA 2. Influência dos extratos aquosos e etanólicos da *Annona squamosa* e da piperazina sobre *Ascaridia galli*.

Tratamentos	Extratos	Dose mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	Número de Helmintos Eliminados	Contagem de Helmintos na Necropsia (Mín./Máx.)	Total de Helmintos	(%) de Eliminação
<i>A. squamosa</i>	Aquoso	256,20	37	58 (3 ⁻¹ 5)	95	38,95
	Etanólico	187,50	07	28 (0 ⁻¹ 9)	35	20,00
Água destilada	-	-	68	343 (14 ⁻¹ 63)	411	16,55
Tween 80	-	-	05	38 (1-22)	43	11,63
Piperazina	-	100,00	498	07 (0-3)	505	98,61*

* (p < 0,05)

hidrofílico.

A Figura 3 demonstra a atividade anti-helmíntica dos extratos de *A. squamosa*, considerando os percentuais acumulados de eliminação de *A. galli* obtidos ao longo de 96 horas, comparada com a atividade exercida pela piperazina. A eliminação dos helmintos, por influência da piperazina (PPZ) ocorreu nas primeiras 24 horas do teste, enquanto que os percentuais de eliminação produzidos pelo extrato aquoso da planta revelam um efeito gradativo no decorrer do teste atingindo um valor médio próximo de 40%. Estes resultados permitem reafirmar que provavelmente o mecanismo de ação esteja relacionado com a captação de glicose onde os helmintos morrem após esgotarem suas reservas energéticas (RIM et al., 1965).

**FIGURA 3.** Efeito acumulado dos extratos aquosos (EAAS) e etanólicos (EEAS) da folha de *Annona squamosa* e da piperazina (PPZ) na eliminação de *Ascaridia galli*.

CONCLUSÃO

Nas condições em que foi desenvolvida essa pesquisa o extrato aquoso de folha de *Annona squamosa* apresentou uma atividade anti-helmíntica

potencial sobre o nematóide *Ascaridia galli*. Enquanto o extrato etanólico foi incapaz de causar a morte deste nematóide.

AGRADECIMENTO

A Universidade Federal do Piauí pela viabilização financeira e laboratorial para execução deste trabalho.

REFERÊNCIA

- AMATO, J.F.R.; BOEGER, W.A.; AMATO, S.B. **Protocolos para laboratório:** coleta e processamento de parasitos de pescado Rio de Janeiro: Imprensa Universitária, UFRJ, 1991. 77p.
- FERNANDES, R.M. **Avaliação da atividade anti-helmíntica de plantas em frango de corte naturalmente infectados com *Ascaridia galli* (SCHRANK,1788) FREEBORN, 1923 e *Heterakis gallinarum* (SCHRANK,1788) MADSEN, 1949.** 1998. 100p. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- ESHETU, Y. et al. Study of gastro-intestinal helminths of scavenging chicken in four rural districts of Amahara region, Ethiopia. **Revue Scientific et Technique Off Int Epiz**, v.20, n.3, p.791-6, 2001.
- FERNANDES, R.M. et al. A. Atividade anti-helmíntica de plantas em frangos naturalmente infectados com *Ascaridia galli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.264-6, 2005.
- GUPTA, S.; SANYAL, S.N.; DUGGAL, C.L. Study of the acetylcholinesterase activity of *Ascaridia galli*: kinetic properties and the effect of anthelmintics. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.39, n.3-4, p.165-74, 2005.
- KALEYSA RAJ, R. Screening of indigenous plants for anthelmintic action against human *Ascaris lumbricoides*. Part II. **Indian Journal Physiology and Pharmacology**, v.19, n.1, p.47-9, 1975.
- MAGWISHA, H.B. et al. A comparison of the prevalence and burden of helminth infections in grower and adult

- free-range chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v.34, n.3, p.205-14, 2002.
- OLIVEIRA, S.M. et al. Avaliação da eficácia do extrato aquoso de frutos de *Annona squamosa* sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais parasitas de ruminantes. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.67, p.1-45, 2000.
- PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura/IBDF, 1984. v.1, 747p.
- PONTES, A.F.; BARBOSA, M.R.V.; MAAS, P.J.M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botânica Brasileira**, v.18, n.2, p.281-93, 2004.
- RAMOS, P.H. Cultura da gravioleira (*Annona muricata* L.). In: DONÁDIO, L.C. **Fruticultura Tropical**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p.127-57.
- RIM, H.J. et al. Metabolism of C (14) – glucose by *Ascaridia galli*. **Korean Journal of Parasitology**, v.3, n.3, p.107-11, 1965.
- SHILASKAR, D.V.; PARASAR, G.C. Evaluation of indigenous anthelmintics. **Indian Journal of Indigenous Medicines**, v.6, p.49-53, 1989.
- SHIVAKUMAR, A.M.; CHANDRA, S.; SABIR, M. Studies on the anthelmintic actions of mebendazole against *Ascaridia galli*. **Indian Veterinary Journal**, v.2, p.136-42, 1975.
- SOERJATO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspective from field. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p.1-15, 1996.
- STATISCAL ANALYSIS SYSTEM. **System for linear models**. Cary: SAS Institute, 1986. 211p.
- STEWART, J.S. Anthelmintic studies: I. A controlled critical entero-nematicidal test. **Parasitology**, v.45, p.231-41, 1955.
- WALL, M.E.; WANI, M.C. Camphothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p.239-54, 1996.
- WILLIS, H.H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. In: UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3.ed. Tokyo: Japan international Cooperation Agency, 1994. 14p.