

Efeito *in vitro* do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos

CORDEIRO, L.N.^{1*}; ATHAYDE, A.C.R.¹; VILELA, V.L.R.¹; COSTA, J.G.M.²; SILVA, W.A.¹; ARAUJO, M.M.¹; RODRIGUES, O.G.¹

¹Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, CEP: 58700-970, Patos-Brasil *Incordeiro@yahoo.com.br ²Universidade Regional do Cariri (URCA), Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, CEP: 63100-000, Crato-Brasil

RESUMO: O experimento *in vitro* foi realizado para avaliar a ação do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre o desenvolvimento de ovos e motilidade de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. As larvas foram obtidas de coproculturas e a recuperação de ovos foi feita pela técnica dos quatro tamises, a partir de fezes de caprinos naturalmente infectados da mesorregião do Sertão Paraibano. O extrato foi utilizado nas diluições de 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12% para ambos os testes e como controle positivo e para controle negativo, utilizou-se água destilada estéril. As placas foram examinadas ao microscópio óptico para contagem dos ovos em desenvolvimento e larvas móveis e imóveis, após 24, 48 e 72 horas de incubação. As concentrações do extrato etanólico de *M. charantia* e os tratamentos controle negativo e positivo diferiram quanto ao número de ovos inviáveis. No teste de motilidade larval as concentrações acima de 12% apresentaram médias significativas quanto ao número de larvas inviáveis. Nas condições ensaiadas a *M. charantia* apresentou atividade ovicida e larvicida.

Palavras-chave: nematóides gastrintestinais, *Momordica charantia*, atividade anti-helmíntica

ABSTRACT: *In vitro* effect of the ethanolic extract of “melão de São Caetano” (*Momordica charantia* L.) leaves on the eggs and larvae of gastrointestinal nematodes from goats.

The experiment *in vitro* was performed to evaluate the action of the ethanolic extract of “melão de São Caetano” (*Momordica charantia* L.) leaves on the development of eggs and motility of larvae of gastrointestinal nematodes from goats. The nematode larvae were obtained from coproculture and the recovery of eggs was done in sieves, from feces of naturally infected goats from the Mesoregion of Paraíba State. The extract was used at the dilutions of 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.12% for both tests and as positive control; for negative control, sterile distilled water was used. The plates were examined under optical microscope to count the eggs in development and mobile larvae after 24, 48 and 72 h of incubation. The concentrations of *M. charantia* ethanolic extract and the negative and positive controls differed as to the number of eggs that were not viable. In the larval motility test, concentrations higher than 12% had significant means as to the number of larvae that were not viable. Under the tested conditions, *M. charantia* showed larvicidal and ovicidal activity.

Key words: gastrointestinal nematodes, *Momordica charantia*, anthelmintic activity

INTRODUÇÃO

As helmintoses são especialmente prevalentes em países em desenvolvimento em associação com práticas de manejo deficientes e inadequadas medidas de controle.

Um dos grandes problemas de saúde, especialmente de pequenos ruminantes, são as infecções por nematóides gastrintestinais. As medidas econômicas mostram que os custos

financeiros do parasitismo interno são consideráveis, devido ao aumento na mortalidade e redução na taxa de crescimento (Louie et al., 2007).

Os riscos da resistência anti-helmíntica, resíduos, disponibilidade e alto custo especialmente para pequenos produtores têm despertado a necessidade de outros métodos alternativos de controle. Opções como, controle biológico, vacinas, seleção de raças geneticamente resistentes e plantas medicinais tem sido estudado em diferentes partes do mundo. O *screening* e avaliação de propriedades de plantas medicinais podem oferecer as possíveis alternativas, sustentáveis e ambientalmente corretas (Artho et al., 2007).

Dentre essas alternativas, medidas biológicas com plantas medicinais estão sendo desenvolvidas, pesquisando novas substâncias com atividade antiparasitária. Entretanto, apesar da medicina popular relatar um número considerável de plantas com ação anti-helmíntica, as investigações científicas, comparando sua eficácia ao dos anti-helmínticos comerciais, ainda são escassos (Diehl et al., 2004; Eguale et al., 2007).

Vários ensaios podem ser usados para testar a atividade biológica, primeiramente *in vitro* e depois, para desenvolver produtos naturais, *in vivo*. Extratos brutos ou fracionados e às vezes compostos isolados são utilizados para realizar *screening* da atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante, anti-helmíntica, bem como propriedades psicotrópicas e neurotrópicas. Nos testes para atividade biológica *in vitro*, uma droga padrão é incluída no esquema de teste para assegurar que o ensaio é efetivo. A atividade do extrato pode ser comparada entre diferentes ensaios, porém não com padrões puros, como extratos brutos que contém uma miríade de compostos que podem agir sinergicamente (Fennell, 2004).

Momordica charantia é uma planta que tem sido utilizada frequentemente como medicinal, pertence à família Curcubitaceae e é conhecida popularmente como melão-de-São-Caetano. Cresce em áreas tropicais da Ásia, Amazônia, oeste Africano e no Caribe, sendo utilizada na medicina popular em países em desenvolvimento como Brasil, China, Colômbia, Cuba, Gana, Haiti, Índia, México, Malásia, Nova Zelândia, Nicarágua, Panamá e Peru. Os frutos, folhas e raízes são utilizadas de forma mais comum para diabetes, cicatrizante, contra parasitas internos e ectoparasitas e no tratamento de cólicas. Os estudos fitoquímicos dos componentes botânicos do melão-de-São-Caetano têm demonstrado o conteúdo de compostos biologicamente ativos como 50 novos glicosídeos cucurbitins e cucurbitane (Chen et al., 2008).

Por estas razões, o interesse em *screening* de plantas medicinais pela sua atividade anti-helmíntica permanece com grande interesse científico independente do uso extensivo de químicos sintéticos

nas modernas práticas clínicas em todo o mundo. Corroborando para o objetivo deste estudo em avaliar *in vitro* a ação do extrato etanólico das folhas de melão-de-São-Caetano sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos da mesorregião do Sertão Paraibano.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido nos Laboratórios de Ciências Química e Biológicas (LCQB) e de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos (LDPAD) da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (UAMV) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Foram utilizadas folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.), as quais foram coletadas na zona rural da cidade de Patos-PB no mês de setembro de 2007. A exsicata da espécie foi depositada no Herbário Caririense Dárdaro de Andrade Lima do Departamento de Biologia da Universidade Regional do Cariri - URCA tendo como registro nº 3272.

O extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano, foi preparado de acordo com a metodologia de Mourechrek (2000), obtendo um extrato líquido com concentração de 98,9 mg mL⁻¹. Os ensaios para verificação e identificação de classes de metabólitos secundários foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997).

Utilizou-se as diluições de 50; 25; 12; 6 e 3% preparadas a partir da concentração matriz do extrato etanólico do material vegetal e a concentração de 0,2 mg de moxidectina (concentração controle positivo) e como controle negativo, água destilada esterilizada.

Como doadora de ovos foram utilizados dois caprinos, naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais (infecção mista). As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal, em quantidade de aproximadamente 50 gramas, acondicionadas em sacos plásticos e encaminhadas diretamente ao Laboratório de Doenças Parasitárias de Animais Domésticos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), sob temperatura ambiente num intervalo de tempo máximo de duas horas.

Foi realizada a contagem de ovos por grama de fezes (OPG), através da técnica de Gordon & Whitlock (1939) e para obtenção dos ovos, utilizou-se a técnica dos quatro tamises metálicos de Girão & Ueno (1982). Os ovos dos nematóides foram recuperados do tamis com menor abertura entre malhas e diluídos com água destilada de modo a comporem uma suspensão, com aproximadamente 4.500 ovos.

O teste de eclosão de ovos foi realizado em triplicata, utilizando 21 placas de Petri como unidades experimentais de acordo com a metodologia de Furtado (2006), adicionando 2 mL da suspensão de ovos, com aproximadamente 500 ovos nematóides gastrintestinais, a 2 mL da diluição do extrato de melão-de-São-Caetano. As placas foram examinadas ao microscópio óptico, para contagem dos ovos em desenvolvimento, às 24, 48 e 72 horas de incubação.

A avaliação ao microscópio óptico das unidades experimentais seguiu a metodologia de Furtado (2006) para quantificação das variáveis como ovo viável (V): ovo blastomero, apresentando massa arredondada formada por grande número de células. Ovo inviável (I): ovo com formação interna mais alongada do que arredondada, dobrada ao meio e de aspecto grosseiro. A importância na diferenciação nas condições dos ovos é necessária para observar se o extrato etanólico está influenciando o desenvolvimento celular dos ovos.

O teste de motilidade foi realizado com larvas de terceiro estágio (L₃), obtidas de coproculturas, realizadas de acordo com a metodologia de Roberts & O'Sullivan (1950). As unidades experimentais constaram de placas de Petri, recebendo 2 mL de suspensão de larvas (400) e 2 mL das concentrações supracitadas. O total de unidades experimentais examinadas foi de 21. A contagem de larvas móveis e imóveis foi realizada às 24, 48 e 72 horas do início do teste.

Os testes de eclosão de ovos e de motilidade larval foram expressos como médias e desvios padrões e as diferenças estatísticas foram mensuradas usando a análise de variância (ANOVA) e confirmado pelo Teste de Tukey a 5% de significância (SAS, 1991).

RESULTADO E DISCUSSÃO

A ação ovicida e larvicida do extrato etanólico das folhas de *M. charantia* podem ser verificados na Tabela 1, observando-se diferença significativa entre as diluições do extrato etanólico e os tratamentos controle negativo e positivo quanto ao número de ovos inviáveis, demonstrando ação ovicida do extrato etanólico. Entretanto, o número de ovos inviáveis foi maior em 12%, talvez devido a uma melhor diluição do extrato, ou seja, nas diluições de 25 e 50% havia muitos resíduos do extrato, retardando a sua ação sobre os ovos. Entretanto, para o teste de motilidade larval isso foi característica favorável, pois as diluições acima de 12% foram significativas quanto ao número de larvas inviáveis, pela aderência dos resíduos do extrato etanólico ao corpo das larvas, impedindo a motilidade e alimentação, resultando em morte.

Na Tabela 2 observa-se que não ocorreu diferença significativa quanto ao tempo de exposição em relação à ação do extrato etanólico de *M. charantia*. Entretanto, durante a leitura de 48 horas, alguns ovos e larvas que inicialmente estavam recobertos pelo extrato, não permitiram a classificação como viável ou inviável, mas na leitura seguinte apresentaram desenvolvimento celular e motilidade, respectivamente. A confirmação da efetiva ação do extrato etanólico de *M. charantia* ocorreu após a leitura de 72 horas.

A análise estatística revelou interação entre os tratamentos e o tempo de exposição, onde na Tabela 3 observa-se que a diluição de 50% do extrato etanólico de *M. charantia* foi efetivo em 72 horas para maior número de ovos e larvas inviáveis. Porém a motilidade larval também foi afetada nas diluições de 12 e 25%.

TABELA 1. Valor médio do desenvolvimento de ovos e larvas de nematóides gastrintestinais submetidos a diferentes diluições de extrato etanólico de *Momordica charantia* ao longo de 72 horas de experimento *in vitro*.

Tratamentos	Estágio de Desenvolvimento*			
	OVV	OVI	LVV	LVI
3%	80.20AB	19.79AB	91.43B	8.56D
6%	72.25AB	27.73AB	96.00AB	4.00DE
12%	55.04B	44.95A	72.13C	27.86C
25%	58.90B	41.10A	51.53D	48.46B
50%	63.46B	36.53A	13.28E	86.71A
Controle negativo	94.77A	5.22B	99.75A	0.24E
Controle positivo	74.06AB	25.93AB	98.13AB	1.86DE

*OVV = ovo viável. OVI = ovo inviável. LVV = larva viável. LVI = larva inviável. Letras maiúsculas comparam médias nas colunas. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

TABELA 3. Interação na ação do extrato etanólico de *Momordica charantia* entre concentrações e o tempo de experimentação quanto ao desenvolvimento

Tratamentos	OVV		OVI		LVV		LVI			
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	
3%	51.87ABa	95.89Aa	92.85Aa	48.13ABa	4.11Aa	7.15Ba	100Aa	0.00Cb	21.76Ba	3.91Cb
6%	38.90Ba	88.10Aa	89.75Aa	61.10Aa	11.90Aa	10.22Ba	100Aa	0.00Ca	9.00BCa	3.00Ca
12%	55.37ABa	63.07Aa	46.70ABa	44.63ABa	36.93Aa	53.30ABa	85.03Ba	14.96Cb	20.60Bb	48.03Ba
25%	42.87ABa	67.17Aa	66.67ABa	57.13ABa	32.83Aa	33.33ABa	24.10Cc	75.90Ba	11.53BCc	57.96Bb
50%	64.97ABa	100Aa	25.43Bb	35.03ABb	0.0Ab	74.57Aa	0.00Db	100.00Aa	79.33Ab	80.80Ab
Controle negativo	95.67Aa	96.33Aa	92.33Aa	4.33Ba	3.67Aa	7.67Ba	100Aa	0.00Ca	0.00Ca	0.73Ca
Controle positivo	93.63Aa	75.73Aa	52.83ABa	6.37Aa	24.27Aa	47.17ABa	100Aa	0.00Ca	1.56Ca	4.03Ca

OVV = ovo viável. OVI = ovo inviável. LVV = larva viável. LVI = larva inviável. Letras maiúsculas comparam médias nas colunas. Letras minúsculas comparam médias na linha. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Na região do Semi-Árido paraibano, vários trabalhos objetivando formas alternativas de controle de verminose caprina e/ou ovina vêm sendo desenvolvidos há vários anos pelo grupo de pesquisa da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, campus de Patos, avaliando administrações *in vivo* de formulações com plantas medicinais.

Os resultados do presente estudo são reforçados pelos trabalhos de Almeida et al. (2007), avaliando a eficácia anti-helmíntica do farelo e do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.), da batata de purga (*Operculina hamiltoni* L.) e da semente de jerimum (*Curcubita pepo* L.), bem como de Brito-Júnior (2006), avaliando *in vivo* a ação anti-helmíntica dos extratos alcoólicos da batata de purga e do melão-de-São-Caetano, cujos resultados indicaram que as plantas estudadas, podem ser utilizadas como alternativa no controle dos nematóides gastrintestinais de caprinos, reduzindo o número de ovos por grama de fezes (OPG).

Devido à insipiência de estudos *in vitro* utilizando *M. charantia* sobre nematóides gastrintestinais, os resultados do presente estudo demonstrando a ação ovicida e larvicida do extrato etanólico de *M. charantia*, só podem ser discutidos com o trabalho de Batista et al. (1999), autores que avaliaram *in vitro* a ação de *M. charantia* e *Spigelia anthelmia* sobre a eclosão de ovos e a motilidade de larvas do nematódeo *Haemonchus contortus*, observando que quanto maior a concentração do extrato maior diminuição no desenvolvimento dos ovos, impedindo a eclosão, ao passo que a motilidade larval foi impedida pela *M. charantia* independente da dose do extrato aplicada, não relatando, porém, qual o perfil fitoquímico dos extratos avaliados.

Este estudo é influenciado por vários trabalhos *in vitro* como os de Costa et al. (2006), que avaliaram inicialmente *in vivo* a ação anti-helmíntica das folhas de *Azadirachta indica* contra nematóides gastrintestinais de ovinos e observaram que não houve atividade da planta como anti-helmíntico. Entretanto em outro delineamento experimental, os mesmos Costa et al. (2008) avaliaram *in vitro* a ação sobre ovos e larvas do nematóide *Haemonchus contortus* e concluíram que o extrato etanólico das folhas de *A. indica* pode ser utilizado no controle de nematóides em pequenos ruminantes, mas alertando para a necessidade de delineamentos *in vivo* e avaliações de toxicidade para desenvolver formulações a serem aplicadas pelos próprios produtores.

Estes trabalhos ressaltam a importância de continuar os estudos com *M. charantia*, buscando o isolamento dos compostos ativos nas folhas e aplicações sobre gêneros específicos de nematóides, permitindo novas formas de controle da verminose caprina.

CONCLUSÃO

O extrato etanólico de *M. charantia* mostrou ser efetivo, impedindo o desenvolvimento celular dos ovos e dificultando a motilidade larval em infecções mistas de nematóides gastrintestinais. Estudos fitoquímicos *in vitro* poderão viabilizar o isolamento dos constituintes químicos do extrato com potencial anti-helmíntico e a realização de testes de toxicidade posteriores.

REFERÊNCIA

- ALMEIDA, W.V.F. et al. Avaliação de plantas medicinais em caprinos da região do semiárido paraibano naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais. **Caatinga**, v.20, n.3, p.1-7, 2007.
- ARTHO, R. et al. Avermectin-resistance in gastrointestinal nematodes of Boer goats and Dorper sheep in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.68-73, 2007.
- BATISTA, L.M. et al. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal**, v.9 n.2, p.67-73, 1999.
- BRITO-JUNIOR, L. **Avaliação Comparada da Ação Anti-Helmíntica da Batata de Purga (*Operculina hamiltoni* (G. Don) D.F Austin & Staples), do Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.) e do Capim Santo (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em Caprinos Naturalmente Infectados**. 2006. 52p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Zootecnia) - Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos.
- CHEN, J. et al. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, v.69, p.1043-8, 2008.
- COSTA, C.T.C. et al. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.137, p.306-10, 2006.
- COSTA, C.T.C. et al. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v.74, p.284-7, 2008.
- DIEHL, M.S. et al. Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.277-84, 2004.
- EGUALE, T. et al. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.428-33, 2007.
- FENNELL, C.W. et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.205-17, 2004.
- FURTADO, S.K. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vivo* e *in vitro***. 2006. 147p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- GIRÃO, E.S.; UENO, H. Nova técnica de contagem de ovos para o diagnóstico de fascioloses crônicas em ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

PARASITOLOGIA, 7., 1982, Porto Alegre. **Resumo...** Porto Alegre, 1982. p.36.
GORDON, H.McL.; WHITLOCK, A.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal Council Scientific Industry Research Austrália**, v.12, p.50-2, 1939.
LOUIE, K.; VLASSOFF, A.; MACKAY, A.D. Gastrointestinal nematode parasites of sheep: A dynamic model for their effect on liveweight gain. **International Journal for Parasitology**, v.37, p.233-41, 2007.
MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**.

2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 300p.
MOURECHREK, V.E. **Introdução a química de óleos essenciais**. São Luís: Universitária - UFMA, 2000. 71p.
ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, J.P. Methods of egg counts and laval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, n.1, p.99-102, 1950.
STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **Guide for Personal Computers Version 6.03**. Cary: Institute Inc., SAS/STAT, 1991.