

Ação do extrato de *Punica granatum* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma sp.* de cães.

Punica granatum extract action on dog's infective larvae of *Ancylostoma sp.*

Silas Osório de Rezende¹; Fernanda Mara Fernandes²; Ingrid Ney Kramer Mello²

¹Faculdade de Minas (FAMINAS). Avenida Cristiano Ferreira Varella, 655 - Universitário, Muriaé - MG, Brasil, 36880-000. silas_rezende@yahoo.com.br. ² Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n, Campus universitário, Viçosa – MG, CEP: 36570-900.

ABSTRACT: Some intestinal helminths of dogs, such as *Ancylostoma sp.*, have required great attention for its zoonotic potential. The purpose of this project was to evaluate the anthelmintic activity of *Punica granatum* on motility and larval development of *Ancylostoma sp.* A test was carried in fecal analysis in three groups treated with the *P. granatum* extract at different concentrations and seven replies and other test performed in Petri dishes containing agar medium in 2% water. In three groups was added to the plates extract in different concentrations and in the control group only the suspension of larvae; forming 4 groups with 6 replicates each. The aqueous extract was obtained by cooking. Were used in the experiment fresh feces from mongrel dogs (SRD) naturally infected. According to statistical analysis, the first trial did not achieve significance and showed no significant ovicidal activity, whereas the second test achieved a significant result, especially in the 5% extract concentration. However our findings regarding the activity of the extract are important because than we can continue to work checking its real potential anthelmintic.

Keywords: phytotherapeutic, pomegranate, zoonosis.

RESUMO: Alguns helmintos intestinais de cães, como o *Ancylostoma sp.*, tem requerido grande atenção pelo seu potencial zoonótico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-helmíntica do *Punica granatum* sobre a motilidade e o desenvolvimento larvar de *Ancylostoma sp.* Um ensaio foi conduzido em coproculturas; onde três grupos foram tratados com o extrato de *Punica granatum* em diferentes concentrações com sete repetições e o outro ensaio realizado em placas de Petri contendo o meio Ágar-água 2%; em três grupos foi adicionado às placas o extrato em diferentes concentrações e no grupo controle só a suspensão das larvas; formando quatro grupos com seis repetições cada. O extrato aquoso da planta foi obtido através de

cocção. Foram utilizadas no experimento fezes frescas provenientes de cães sem raça definida (SRD), infectados naturalmente. De acordo a análise estatística o primeiro ensaio não obteve uma significância, ou seja, não apresentou atividade ovicida relevante; já o segundo ensaio obteve um resultado significativo, principalmente na concentração de 5% do extrato. Todavia nossos achados a respeito da atividade do extrato são importantes, pois assim poderemos dar continuidade ao trabalho verificando seu real potencial anti-helmíntico.

Palavras-chave: fitoterápico, romã, zoonose.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento urbano e ambiental provocado pelo homem tem aumentado a ocorrência de zoonoses parasitárias. Cães e gatos podem atuar como carreadores importantes na transmissão dessas parasitoses. Alguns helmintos intestinais de cães, como o *Ancylostoma caninum*, tem requerido grande atenção pelo seu potencial zoonótico (BRAGA *et al.*,2011). Estes helmintos possuem importância na área da saúde pública, pois, além de serem patogênicos aos animais podendo levá-los à morte, nos humanos, *A. caninum* e o *A. braziliense*, podem desencadear a patologia conhecida como *Larva migrans* cutânea (CARVALHO *et al.*,2011). Essa patologia manifesta-se quando larvas infectantes dos nematóides penetram na pele dos humanos e divagam no tecido subcutâneo levando a uma erupção linear e pruriginosa da pele (NUNES *et al.*, 2000).

No Brasil, esta dermatose tem sido referenciada em vários estados e praticamente todas estão relacionadas a pacientes que tiveram contato com areia de praias, depósitos peridomiciliares ou em áreas de recreação. Ou seja, essas infecções são contraídas através de solos/ambientes contaminados. Na população humana, crianças, gestantes, idosos e imunodeprimidos apresentam maior risco de adquirirem essa zoonose (CARVALHO *et al.*,2011;& NUNES *et al.*, 2000).

O grau de contaminação de solos por larvas e ovos de *Ancylostoma sp.* tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores. O intuito destes rodeia sempre na redução e controle da contaminação do ambiente (NUNES *et al.*, 2000).

Nesse contexto, para o controle biológico desses nematódeos, estudos etnomedicinais estão sendo desenvolvidos e inúmeras proposições são feitas sobre as diversas atividades

farmacológicas de plantas medicinais usadas empiricamente. Os fitoterápicos podem ser fonte de anti-helmínticos com novos mecanismos de ação (MICHELIN *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 1999).

Entre o seletivo grupo de plantas medicinais utilizadas pela população, encontra-se a *Punica granatum*, da família Punicaceae, conhecida popularmente como romanzeira e granado, originária da Ásia e amplamente distribuída por todo o Brasil. Dentre os fitoconstituintes presentes na planta, destacam-se os flavonóides, as antocianinas, os taninos, os alcalóides, o ácido ascórbico, os ácidos graxos conjugados e o ácido ursólico. Esta planta é popularmente usada para o tratamento de um considerável número de doenças inflamatórias e infecciosas, como lesões e abscessos de pele e mucosas, amigdalites, faringites, estomatites, diarreias de origem bacteriana e parasitária, hemorroidas, infecções de vias urinárias e genitais, viroses em geral, infecções por fungos, conjuntivites e doenças respiratórias como bronquites (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O uso deste fitoterápico é relatado desde 1550 A.C, onde se descrevia a utilização da casca de romanzeira, para o tratamento do Heltu, uma helmintose comum no antigo Egito. Já nos dias de hoje, ela está sendo utilizada como anti-helmíntico mais especificamente contra tênias (BATAGLIOLI, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-helmíntica do *Punica granatum* sobre o estágio L₃ de *Ancylostoma sp.*

METODOLOGIA

Para o preparo do extrato, foi utilizada a planta *Punica granatum* adquirida da empresa Santos Flora (São Paulo, SP, Brasil). O extrato aquoso foi obtido através de cocção. Foram pesadas 50 gramas de pó da matéria vegetal e diluídos em 500 mL de água destilada. Em seguida realizou-se um banho ultrassônico por 30 minutos e após o resfriamento, a solução obtida foi filtrada e diluída nas concentrações de 1%, 3% e 5% (MICHELIN *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2009).

Foram utilizadas no experimento, fezes frescas provenientes de cães sem raça definida (SRD), infectados naturalmente. Foi realizada a contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com Gordon & Whitlock (1939) para confirmação da infecção. Para a

obtenção das L₃ de *Ancylostoma* sp. foram realizadas coproculturas, onde as fezes foram misturadas com vermiculita industrial fragmentada e autoclavada, umedecidas na proporção de 1:2 e mantidas por 10 dias em câmara incubadora a 26° C. Após este período, as larvas ativas foram recuperadas utilizando-se a técnica de Baerman-Moraes (NEVES, 2000), que é baseada no termo-hidrotropismo positivo das larvas e sedimentação por gravidade. Após 12 horas o sedimento contendo as L₃ foi transferido para tubos de centrifuga e lavado em água estéril 5 vezes por centrifugação a 1000rpm durante 5 minutos. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada, as L₃ contadas em microscópio de luz (40x) e a concentração da suspensão foi ajustada de acordo com o experimento.

Foram realizados dois ensaios experimentais. O primeiro ensaio foi conduzido em coproculturas e formaram-se três grupos tratados com sete repetições cada de acordo com a seguinte descrição:

- (1) 2 gramas de fezes positivas para *Ancylostoma* sp. e 0,25 ml de extrato de *Punica granatum* a 1%);
- (2) 2 gramas de fezes positivas para *Ancylostoma* sp. e 0,25 ml de extrato de *Punica granatum* a 3 %);
- (3) 2 gramas de fezes positivas para *Ancylostoma* sp. e 0,25 ml de extrato de *Punica granatum* a 5 %);
- (4) Controle: coproculturas contendo apenas as fezes positivas sem o extrato.

A seguir, as coproculturas dos quatro grupos foram incubadas durante sete dias, no escuro e a 26°C. Ao final desse intervalo, as larvas presentes em cada grupo estudado foram recuperadas por meio da técnica de Baerman-Moraes (NEVES, 2000), identificadas de acordo com os critérios estabelecidos por Ueno & Gonçalves (1998) e contadas sob microscópio de luz (40X).

O segundo ensaio foi realizado em placas de Petri contendo o meio Ágar-água 2% e foram formados quatro grupos com seis repetições cada:

- (1) 1000 L₃ de *Ancylostoma* sp. e 0,25 mL de extrato a 1%;
- (2) 1000 L₃ de *Ancylostoma* sp. e 0,25 mL de extrato a 3%;
- (3) 1000 L₃ de *Ancylostoma* sp. e 0,25 mL de extrato a 5%;
- (4) Controle com 1000 L₃ de *Ancylostoma* sp. e sem extrato.

As placas foram fechadas e encubadas na câmara incubadora por 10 dias a 25° C. No décimo dia de interação, as L₃ não predadas foram recuperadas do conteúdo das placas de Petri, conforme descrito anteriormente e contadas sob microscópio de luz (40X).

Análise Estatística

Os dados obtidos do ensaio experimental foram tratados por análise de variância (ANOVA) e posteriormente foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Utilizou-se como ferramenta de apoio o software SIGMA PLOT 12.0.

O cálculo do percentual de redução da média de L₃ nos tratamentos foi feito pela seguinte equação:

$$\text{Redução(\%)} = \frac{(\text{Média de L3 recuperadas do controle} - \text{Média L3 recuperadas do tratamento})}{\text{Média de L3 recuperadas do controle}} \times 100$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste preliminar de atividade ovicida e larvicida e de acordo com os dados obtidos através da análise estatística foi possível observar que o primeiro ensaio não apresentou atividade ovicida relevante; em ambas as concentrações dos extratos, os ovos de *Ancylostoma* sp. eclodiram resultando em um número larvar considerável (Fig. 1).

Contudo, vale ressaltar que os testes realizados são apenas uma etapa inicial nessa pesquisa. Estes resultados não são suficientes para validação científica de qualquer atividade pesquisada; resultados positivos e/ou negativos não caracterizam a real atividade do fitoterápico, ou seja, um extrato aquoso de uma planta, a uma dada concentração, pode não apresentar efeito ovicida, porém, outro extrato da mesma planta com concentrações diferentes pode apresentar resultados positivos.

Em um estudo realizado por Vasconcelos *et al.* (2005), foi revisado o potencial de algumas plantas na inibição da eclosão de ovos de nematóides; entre elas, foram avaliadas *in vitro*, *Croton zenhneri* (canela de cunhã), *Ocimum gratissimum* (alfavaca), *Chenopodium ambrosoides* (matruz ou mastruço), *Spigelia anthelmia* (erva lombrigueira), *Dioclea grandiflora*, *Canavalia brasiliensis*, *Uvaria hookei* e *Uvaria narum* apresentaram bons percentuais de atividade nos testes, Destacaram-se os extratos das seguintes plantas; *Dioclea guianensis*, *D.*

grandiflora, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia florinbunda*, que obtiveram um resultado de 78,3 a 99,9% da inibição da eclosão de ovos, na dose de 500mg/mL.

Cordeiro (2008), também avaliou a ação ovicida e larvicida de alguns extratos. Em seu estudo, foram utilizados extratos etanólicos da raiz de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e das folhas de melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de caprinos. Ambos os extratos foram diluídos nas concentrações de 50; 25; 12; 6 e 3%. O extrato etanólico de *M. charantia* na concentração de 12%, apresentou resultados significativos quanto ao número de larvas inviáveis. Enquanto a ação de *S. paniculatum* sobre a eclosão dos ovos foi significativamente diferente nas diluições do extrato acima de 25 % e a motilidade larval foi afetada em 50 %.

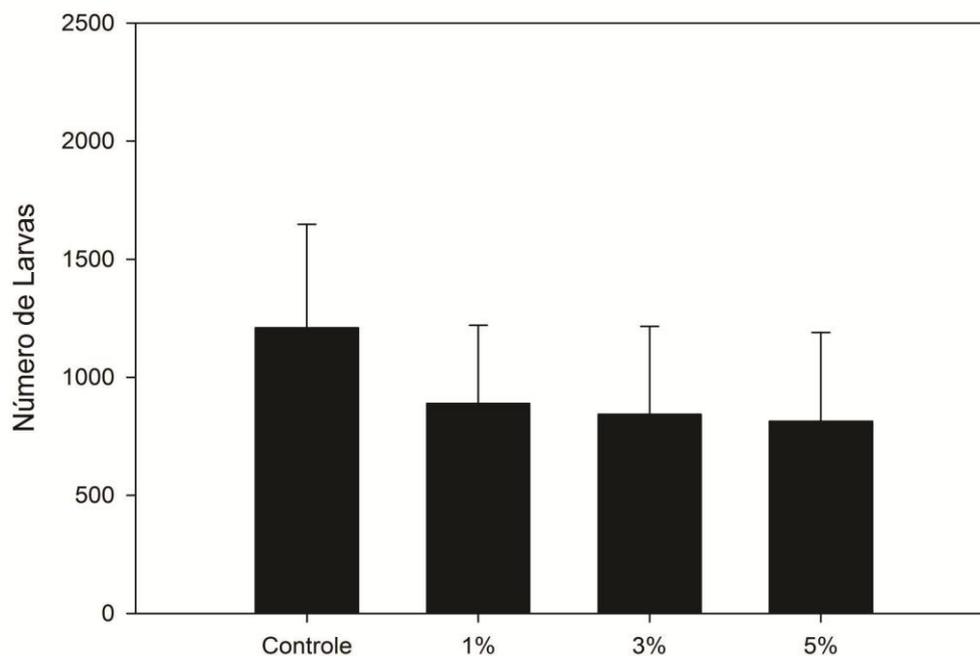


FIGURA1: Valores médios das larvas de *Ancylostoma* sp recuperadas das coproculturas do grupo tratado com o extrato de *Punica granatum* nas concentrações de 1%, 3% e 5%.

No segundo ensaio, obtivemos um resultado mais satisfatório, principalmente na concentração de 5%; o qual apresentou um efeito significativo ($p < 0,01$) na redução de 75,69% de L₃ de *Ancylostoma* sp.(Fig. 2).

Corroborando, Oliveira *et al.* (2011), em seu estudo analisou a atividade de inibição da motilidade ou do desenvolvimento larvar de alguns extratos de plantas, destacando-se o extrato de *Punica granatum* que apresentou um resultado de 86,5% de mortalidade de L₁. Já Souza (2003), cita-se o uso do extrato de *Punica granatum*, sobre as larvas de nematódeos gastrintestinais de bovinos,

obtendo mortalidade de 84% confirmando os estudos de Almeida (1993) que verificou um potente efeito tenífugo da planta.

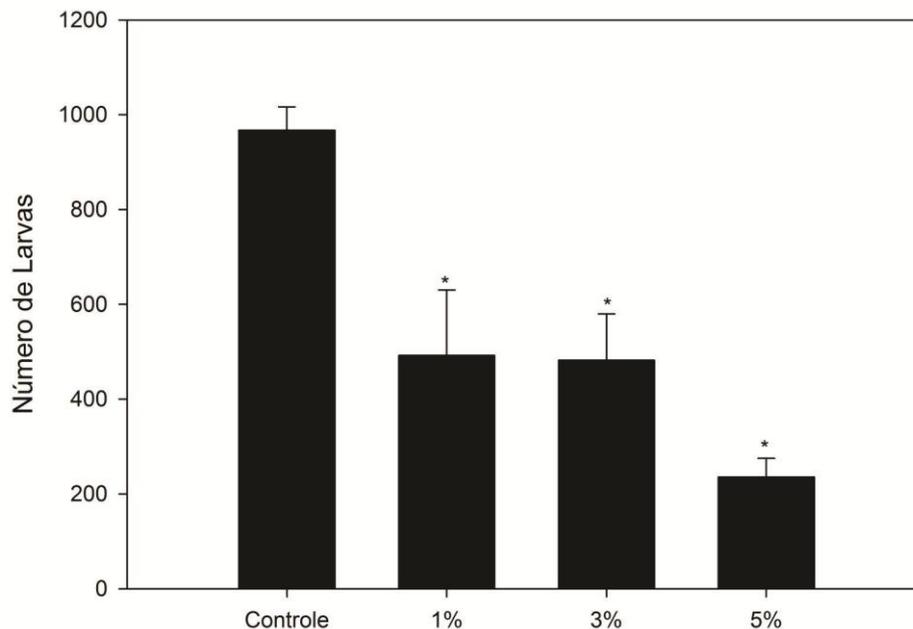


FIGURA 2: Valores médios das larvas de *Ancylostoma sp* recuperadas das placas de Petri do grupo tratado com o extrato de *Punica granatum* em diferentes concentrações.

Os trabalhos que avaliam a atividade anti-helmíntica de plantas são escassos, principalmente frente a espécies da família Ancylostomidae. As pesquisas estão sendo direcionadas para avaliarem a atividade de fungos nematófagos. Fernandes *et al.* (2012) avaliou atividade predatória do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum* após o trânsito gastrointestinal em hamsters. Este fungo apresentou atividade predatória sobre as L₃ de *A. ceylanicum* sendo observada uma diferença significativa nos percentuais obtidos de cada horário em relação ao número de L₃ recuperadas ($P < 0,01$). Outros fungos dentre os quais *Pochonia chlamydosporia* e fungos do gênero *Pleurotus*, são alvos de pesquisas, principalmente por produzirem proteases capazes de destruir ovos de nematódeos.

Essa ação ovicida é um fator desafiador para a eficácia dos extratos de plantas, uma vez que, o envoltório dos ovos é extremamente resistente, sendo necessário o uso de substâncias com propriedade lipolítica ou proteolítica. Diante disso, a busca por substâncias com propriedade larvicida consiste em uma alternativa, uma vez que para as larvas há uma maior susceptibilidade já comprovada a componentes químicos pois não se encontram protegidas pelo envoltório do ovo (SOUZA & SANTOS, 2012).

De acordo com Oliveira *et al.* (2010), atualmente os compostos ativos de vegetais estão sendo estudados para o controle de parasitos intestinais. Neste caso, destacam-se os taninos, que são os metabólitos secundários mais encontrados em plantas. Ressalta também sobre a atividade anti-helmíntica *in vitro* dos taninos que podem ser avaliadas sobre diferentes estágios dos nematódeos, como ovos, larvas de primeiro estágio (L₁), larvas de terceiro estágio (L₃) e adultos.

CONCLUSÃO

Embora o extrato no primeiro ensaio viesse apresentar resultados não tão consideráveis, o segundo apresentou uma atividade anti-helmíntica satisfatória na concentração maior. Estes dados servirão de base para um futuro estudo, onde poderemos isolar os fitoconstituintes da planta; viabilizando seus efeitos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinai s Brasileiras**. Hemus Editora, São Paulo, 1993. 341p.
- BATAGLIOLI, A.S. **Incidência da Fasciolose Bovina em abatedouro da região de Campinas, SP**. 2011. 29f. Trabalho monográfico do curso de Pós-Graduação lato sensu (TCC) – Universidade Castelo Branco, Campinas, 2011.
- BATISTA, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAES, S.M.de.; VIEIRA, L.S. Avaliação ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordic charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal** v. 9(2): 67-73, 1999.
- BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; ARAUJO, J.V.de.; CARVALHO, R. O.; SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J.H.de.; GENIER, H.L.A. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma sp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v.44(1):116-118, 2011.
- BRITO, D.R.B.; FERNANDES, R.M.; FERNANDES, M.Z. de. LIMA.C.M.; FERREIRA, M.D. de. S.; ROLIM, F.R.L; FILHO, M.L.da. SILVA. Atividade anti-helmíntica dos extratos aquoso e
-
- <http://periodicos.pucminas.br/index.php/sinapsemultipla> *Sinapse Múltipla*, 4(2), jun., 103-112, 2015.

etanólico do fruto da *Morinda citrifolia* sobre *Ascaridia galli*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v.18(4): 32-36, 2009.

OLIVEIRA, L.M.B.de.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS,S.M. de.; VASCONCELOS, A.L.F.C.; MACEDO, I.T.F. Plantas taniníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Cienc. Rural** v. 41(11): 1967-1974, 2011.

CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.M.; BRAGA, F.R.; MILAGRES, C.; ARAÚJO, J.V.; CONCEIÇÃO, L.G.; OLIVEIRA, A.C. de. Frequência de helmintoses intestinais nos cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. **Rev. de Ci. Vida. Seropédica** v.31(1): 43-48, 2011.

CORDEIRO, L.N. **Efeito *in vitro* de extratos etanólicos da raiz de Jurebeba (*Solanum paniculatum* L.) e das folhas de Melão- de – São Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos.** 2008. 66f. Dissertação apresentada como parte das exigências do programa de pós- graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Campina Grande, Patos- PB, 2008.

FERNANDES, F.M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F,R.; GUIMARÃES –GAZZINELLI, P.H.; ARAÚJO, J.M.; FERREIRA; S.R.; CARVALHO, R.O.; MELLO, I.N.K. de.; FUJIWARA, R.T. *In vitro* biological controlo f infective larvae of *Ancylostoma ceylanicum*. **Rev. Bras. Parasitol.Vet** v. 21(3): 283-286, 2012.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new tecquinique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific Industrial Research** v.12: 50-52, 1939.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C. de.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da Atividade Anti-Helmíntica de Extratos Vegetais. **Saúde em Revista** v. 7(16): 7-10, 2005.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana.** 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 428 p.

NUNES, C.M.; PENA, F.C.; NEGRELLI, G.B.; ANJO, C.G.S.; NAKANO, M.M.; STOBBE, N.S. Ocorrência de larva migrans na areia de áreas de lazer das escolas municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP, Brasil. **Revista de Saúde Pública** v.34(6): 656-8, 2000.

OLIVEIRA, L.P.; PINHEIRO, R.C.; VIEIRA, M. S.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; VALADARES, M.C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy** v. 20(2): 201-207, 2010.

.SOUZA, M.M.C. de. **Avaliação da Atividade Ovicida de *Annoma squamosa* Linnaeus sobre o nematoide *Haemonchus contotus* Rudolphi e toxicidade em camundongos.** 2003. 95f. Dissertação apresentada como parte das exigências do programa de pós- graduação em Ciências Veterinárias, para obtenção do título de Mestre. – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2003.

SOUZA, F.J.M.A.; SANTOS, I.de. **A avaliação da atividade ovicida e larvicida de dez extratos vegetais frente a *Ancylostoma* sp.** 2012. 21f. Trabalho de conclusão do curso de Farmácia – Faculdade de Pindamonhangaba. Pindamonhangaba, 2012.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes.** UFBA: UFRGS: Japan International Cooperation Agency. 1998.143p.

VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M.; SANTOS, L.F.L.; ROCHA, M.F.G.; BEVILAQUA, C.M.L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Rev. Bras. Pl .Med** v. 7(3): 97-106, 2005.