

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

*Análise in vitro* do grau de toxicidade do extrato etanólico de *Azadiracta indica* A. Juss em *Artemia salina* e em larvas infectantes de *Haemonchus contortus*

Vicente Oliveira Brito Neto

PATOS-PB

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

*Análise in vitro* do grau de toxicidade do extrato etanólico de *Azadiracta indica* A. juss em *Artemia salina* e em larvas infectantes de *Haemonchus contortus*

Vicente Oliveira Brito Neto

Orientado

Prof. Dr. Wilson Wouflan da Silva

Orientador

PATOS- PB

DEZEMBRO/2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

B862a

Brito Neto, Vicente Oliveira

Análise *in vitro* do grau de toxicologia do extrato etanólico de *Azadiracta indica* A. juss em *Artemia salina* e em larvas infectantes de *Haemonchus contortus* / Vicente Oliveira Brito Neto. – Patos, 2013.

26f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2014.

“Orientação: Prof. Dr. Wilson Wouflan da Silva”

Referências.

1. Parasitologia veterinária. 2. Fitoterapia. 3. Ruminantes. I. Título.

CDU 576.8:619

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

VICENTE OLIVEIRA BRITO NETO  
**Graduando**

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para  
obtenção do grau de Medico Veterinário.

APROVADO EM ...../...../.....

MÉDIA: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

_____ Prof. Dr. Wilson Wouflan da Silva	_____ Nota
_____ Mestranda. Maria do Carmo de Medeiros	_____ Nota
_____ Mestranda. Ana Raquel Carneiro Ribeiro	_____ Nota

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a minha família. Meus pais, Antonia Martins de Oliveira Brito, Antônio Oliveira Brito. Minhas irmãs Aline Oliveira Brito e Alana Maria Oliveira Brito.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer primeiramente a Deus, que me deu força pra que eu conseguisse realizar esse meu sonho, de me tornar Médico Veterinário.

Agradecer aos meus pais, Antonia Martins de Oliveira e Antônio Oliveira Brito, por terem tido paciência e calma comigo, que apesar de tudo ainda me apoiaram em todos os momentos.

As minhas irmãs que me apoiaram bastante nessa jornada, Aline Oliveira Brito e Alana Maria Oliveira Brito, aos seus gritos de alerta que serviram algumas vezes e outras não.

O meu avô Vicente Oliveira Brito, me fez ter mais amor pelos animais, e minha avó Maria Mendes da Costa que sempre torceu por mim.

A minha madrinha, Maria Júlia Oliveira Brito e ao meu Padrinho Assis pelo apoio que eles me deram, e a minha Tia Emília pelos conselhos que ajudaram bastante no meu crescimento. E a todos da família que torceram por mim.

A Bruna Nunes Brito grande amiga que apoiou e deu muitos conselhos para o meu crescimento pessoal e profissional.

A minha amiga irma Polly, a minha grande amiga Gabriela Longo e sua família, pelo apoio nos momentos mais difíceis aqui em Patos, minha segunda família. A minha amiga Eudócia que entramos juntos e saímos juntos na mesma turma.

A meus amigos Cícero Wanderlô (Lolô), Zé Mario(Lobão),Francisco José( Cecé), Francisco Leandro (Peba), Sants Beuve (Bovino), Adriano Baltazar (Botazar), Thiago Gomes (Dr. Thiago), Ênio Cordeiro (Dr. Ênio), Rivaldo Mathias (Rivaldim), Tardelli Araújo(Delim), Leandro Lamartine (Bebim), Renan, Atticcus (Japa), Lyndemarques (Bundinha), Raniere (Ventão), Fellipo Barbosa (Pipo), Luizmar (Titi), Carlos Eduardo (Carlim), Jackson (Frango) e vários outros pelos momentos que jamais esquecerei.

Ao Prof. Dr. Wilson Wouflan por ter aceitado me orientar e ter ajudado a concluir essa etapa, para começar minha vida profissional. A turma do mestrado que me ajudou Fabio, Maria do Carmo e Ana Raquel.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>07</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>08</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>09</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>110</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>2.REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b> <i>Haemonchus contortus</i> .....	<b>12</b>
<b>2.2</b> Plantas medicinais .....	<b>13</b>
<b>2.2.1</b> <i>Azadiracta indica</i> A.juss .....	<b>14</b>
<b>2.3</b> <i>Artemia salina</i> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3. 1</b> Localização do Experimento .....	<b>17</b>
<b>3.2</b> Coleta e confecção do extrato do Nim.....	<b>17</b>
<b>3.3</b> Reprodução em laboratório da <i>Artemia salina</i> .....	<b>17</b>
<b>3.4</b> Teste de evolução da toxicidade em <i>Artemia salina</i> .....	<b>18</b>
<b>3.4.1</b> Análise estatística do teste.....	<b>18</b>
<b>3.5</b> Teste de ovicida e larvicida sobre <i>Haemonchus contortus</i> .....	<b>18</b>
<b>3.5.1</b> Análise estatística .....	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>223</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>234</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** *Azadiracta indica*.....Pág. 15

**Figura 2.** *Artemia salina*.....Pág. 16

## LISTA DE TABELAS

	Pag.
<b>Tabela 1.</b> Valores de CL50 calculados para extrato hidro alcoólico de <i>Azadirachta indica</i> e respectivos intervalos de confiança de 95%	20
<b>Tabela 2.</b> Eficiência do extrato hidroalcoólico no nim ( <i>Azadirachta indica</i> ) em <i>Haemonchus contortus</i>	21

## RESUMO

**NETO, VICENTE OLIVEIRA BRITO.** *Análise in vitro do grau de toxicidade do extrato etanólico de Azadiracta indica A. Juss em Artemia salina e em larvas infectantes de Haemonchus contortus.* Trabalho de Conclusão de Curso – Monografia (Curso de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande. Patos, 2013, 26p.

Parasitas gastrointestinais, principalmente o *Haemonchus contortus*, causam redução na produtividade dos rebanhos de pequenos ruminantes. A falta de conhecimento dos criadores e a aplicação inadequada de vermífugos gera resistência parasitária. Na busca de novos métodos para diminuir o uso de produtos químicos, a fitoterapia é uma nova alternativa. A espécie *Azadiracta indica*, conhecida como Nim, que possui ação repelente e anti – helmíntica. Para estudos toxicológicos de plantas, o microcrustáceo *Artemia salina* é bastante utilizado, por substituir o uso de cobaias na experimentação. Inicialmente, foi preparado o extrato das folhas do Nim, posteriormente o microcrustáceo *Artemia salina* foi reproduzido em laboratório, para avaliar a toxicidade do extrato hidroalcoólico dessa planta. O teste foi realizado em triplicata, com 10 exemplares de *A. salina* em cada placa contendo o extrato nas concentrações de 100, 500, 1000, 10.000 e 20.000 $\mu$ g/mL, após 24 horas foi feita a contagem dos náuplios sobreviventes. Para o teste *in vitro* sobre *H. contortus*, o extrato na concentração de 18.000  $\mu$ g/ml foi adicionado a coproculturas e depois de sete dias procedeu-se a leitura, para contagem das larvas de terceiro estágio (L3). O grau de toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas do nim sobre *A. salina* é baixo, mas quando testado em *Haemonchus contortus* o resultado foi satisfatório. Assim, *A. indica* representa uma alternativa viável para o controle de parasitoses em pequenos ruminantes.

Palavras-chave: Fitoterapia, micro- crustácio, parasitos gastrintestinais.

## ABSTRACT

**NETO, VICENTE OLIVEIRA BRITO. In vitro analysis of the degree of toxicity of the ethanol extract of *A. Azadiracta indicata* Juss in *Artemia salina* and infective larvae of *Haemonchus contortus*.** Trabalho de Conclusão de Curso – Monografia (Curso de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande. Patos, 2013, 26p.

Gastrointestinal parasites, especially *Haemonchus contortus* cause reduction in livestock productivity of small ruminants. The lack of knowledge of creators and inadequate application of anthelmintics generates parasitic resistance. In search of new methods to reduce the use of chemical products, herbal medicine is a new alternative. Among the plants, there is the *Azadiracta* species *indicata*, known as Nim, which has repellent and anti-helminthic properties. For toxicological studies, the microcrustacean *Artemia* is widely used to replace the use of guinea pigs in experiments. Initially, the extract was prepared from the leaves of Neem, subsequently *Artemia salina* was reproduced in the laboratory, to evaluate the toxicity of the hydroalcoholic extract of this plant. The test was conducted in triplicate, with 10 specimens of *A. salina* on each plate containing the extract in concentrations of 100, 500, 1000, 10.000 and 20.000 mg / mL, after 24 hours was done to count the nauplii survivors. For the in vitro test for *H. contortus* extract in concentration of 18.000 mg / ml was added and the stool cultures after seven days proceeded to read, to count of third-stage larvae (L3). The degree of toxicity of the hydroalcoholic extract of the leaves of neem on *A. Salina* is low, but when tested in *Haemonchus contortus* the result was satisfactory. Thus, *A. indicata* represents a viable alternative for the control of parasitic infections in small ruminants.

Keywords: Herbal, micro-crusty, gastrointestinal parasites.

## 1.INTRODUÇÃO

O *haemonchus contortus* é um parasito nematódeo, causador de grandes problemas na região nordeste do Brasil, o seu controle é difícil devido o manejo incorreto dos animais e a má utilização de vermífugos utilizados no seu tratamento, por serem aplicados de forma indiscriminada e constante. Podendo selecionar linhagens resistentes de parasitas.

Nos últimos anos, tem se observado pesquisas na área da fitoterapia, com vista a contribuir no controle parasitário, além de serem de baixo custo retardam a resistência parasitária, pois os produtos químicos fazem com que os próprios parasitas desenvolvam mecanismos de proteção.

O nim (*Azadiracta indica*) tem sido muito pesquisado e está associada ao tratamento de pragas, doenças em humanos, controle de parasitas em animais. Assim, há necessidade de saber qual o grau de toxicidade dessa planta, fazendo a análise *in vitro* do extrato hidroalcoólico das folhas do nim sobre *Artemia salina*.

Atualmente, a utilização de animais na experimentação está cada vez mais rara, pois coloca em risco a vida dos mesmos. Assim têm- se procurado melhores formas de realizar pesquisas sem o uso de animais, e com relação ao grau de toxicidade das plantas, as experiências estão sendo realizadas *in vitro*, em laboratório com o microcústacio *Artemia salina*.

Na busca por uma alternativa fitoterápica mais viável, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito tóxico do extrato etanólico do nim, sobre o microcústacio *Artemia salina*, para determinação da CL50, e determinar a ação ovicida e larvicida em *Haemonchus contortus*.

## 2.REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. *Haemonchus contortus*

As infecções parasitárias são as principais causas de redução na produtividade dos animais, tornado difícil estabelecer um real valor do prejuízo gerado, mais difícil ainda quando se trata das infecções sub-clínicas. Os parasitas podem influenciar na ingestão do alimento, na digestão e em vários outros processos fisiológicos (MCCLEOD, 1995).

Pesquisas demonstram que mais de 80% da carga parasitária de caprinos é composta de *Haemonchus contortus* (COSTA, 2002). Esse parasita é um importante nematódeo para caprinos e ovinos, devido ser o mais prevalente, apresentar elevada intensidade de infecção, e ser responsável por apresentar um quadro clínico severo de anemia (URQUHART et al., 1990).

Os principais sintomas que os helmintos gastrointestinais causam são a debilidade, a anemia severa e hipoproteinemia, ocasionando à diminuição do estado corporal do animal e até morte, causando queda na produtividade. Geralmente o parasitismo acomete animais mais jovens, mas os animais adultos podem ser afetados (KAPLAN, 2004).

O *H. contortus* é um dos parasitas mais patogênicos, pois pode ocasionar morte súbita dos animais acometidos, mesmo sem apresentar sintomas, e pode ocorrer em todo o ano (MATTOS et al., 1999). Por consumir bastante sangue do animal, o *H. contortus*, causa no hospedeiro uma grande incapacidade de recompensar a diminuição de sangue no organismo e se o animal for infectado com um grande número de parasitos ele pode chegar a perder cerca de 0,5ml de sangue por dia, e assim desenvolver um quadro de anemia grave, em um período de tempo muito curto (BOWMAN, 1995).

Os anti-helmínticos são utilizados para o tratamento de parasitoses em todas as espécies de animais, em ruminantes são gastos milhões no controle das helmintoses (URQUHART et al., 1990). Os efeitos benéficos do uso de medicamentos antiparasitários estão ligados de forma direta à contabilidade de uma propriedade. Quando essa tecnologia é aplicada de forma correta, baseada em conceitos epidemiológicos, os envolvidos na cadeia produtiva de uma forma geral ganham em

qualidade, produtividade e lucratividade (ECHEVARRIA et al., 1999; VIEIRA & CAVALCANTE, 1999).

A utilização excessiva de sub, ou sobre-dosagens de anti-helmínticos com o mesmo princípio químico, o momento errado da aplicação do vermífugo e uma falta de manuseio adequado dos animais, têm colaborado para um rápido desenvolvimento da resistência (RODRIGUES, 2005). Cientistas atentam que com o uso de fármacos de forma não criteriosa e demasiada, muito em breve as fontes de controle químico se esgotarão, levando a um grande prejuízo para produtores que dependem desta atividade (VAN WYK et al., 1997; MOLENTO & PRICHARD, 1999). Na tentativa de diminuir o avanço do parasitismo vêm sendo estudadas novas formas de controles integrados, usando fitoterápicos com efeitos anti-helmínticos (HERD, 1996).

Segundo estudos da (FAO, 2003) Food and Agriculture Organization, 55% dos países que fazem parte da Organização Internacional de Epizootias (OIE) concordam que tem resistência de endo e ectoparasitas que acometem os ruminantes; 22% dos países apresentam duas ou mais espécies resistentes.

## **2.2. *Plantas medicinais***

Nos últimos anos tem sido observado um grande interesse pelo potencial terapêutico das espécies vegetais (YUNES et al., 2001), tal fato é comprovado pela evidência de que hoje, cerca de 30% das drogas prescritas no mundo são obtidas direta ou indiretamente dessas plantas. Além disso, cerca de 50% das drogas desenvolvidas entre 1981 e 2002 foram obtidas a partir de produtos naturais, análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais (KOEHN & CARTER, 2005).

A fitoterapia é uma alternativa para aumentar os lucros e diminuir o uso de anti-helmínticos convencionais (VIEIRA, 1999). Na fitoterapia são usadas diversas partes das plantas, como raízes, cascas, folhas, frutos e sementes, de acordo com a espécie trabalhada. Há também várias formas de preparação, mas o chá é a mais utilizada, sendo preparado por decocção ou infusão (LAINETTI R, 1980).

### 2.2.1 *Azadiracta indica* A.juss

Dentre as diversas plantas que são mundialmente estudadas, destaca-se a espécie *Azadiracta indica*, conhecida como nim, que é uma planta natural do sudeste da Ásia e do subcontinente indiano, pertence à família Meliceae, é uma planta resistente à seca, de crescimento rápido, copa densa, chegando a alcançar 15 a 20m de altura, podendo ser cultivada em regiões de clima quente e solos bem drenados (SOGLIA et AL., 2006), cresce bem em áreas de clima tropical e subtropical (VERKEK, 1993). São árvores atrativas, possuem sempre uma grande quantidade de folhas verde-claro intenso, e só caem em casos de seca intensa, o nim é facilmente propagado, tanto sexualmente quanto vegetativamente, podendo ser plantado por meio de sementes, mudas, árvores novas, brotos de raiz ou tecido de cultura (MARTINEZ, 2002; SCHMUTTERER, 1990).

Há alguns anos sua importância econômica vem crescendo bastante pelo uso de seu extrato, obtido das folhas, da casca e das sementes, também é usado para produção de medicamentos e pesticidas. Existem atualmente sistemas agroflorestais e plantações na Austrália, Ilhas Virgens, Porto Rico e no sudeste asiático (PURI & SWAMY, 2001). É uma planta sombreadora, servindo também para a produção de material para construção, combustível, lubrificante, adubo e mais recentemente como praguicida (LOCKE & SCHMUTTERER, 2002).

Já é usada há alguns séculos no Oriente como planta medicinal, no tratamento de inflamações, infecções virais, hipertensão e febre, tem ainda ação repelente. Devido à baixa toxicidade e larga distribuição na natureza, o nim pode ser considerado como uma valiosa fonte para uso na Medicina tradicional e no desenvolvimento de drogas modernas. (MOSSINI, 2005). Essa planta também é capaz de proteger de pragas, por meio de uma grande quantidade de compostos bioativos como: salanina, azadiractina, meliantrol, azadirona, gedunina, nimbolina, entre outros, sendo que a azadiractina é considerada um dos compostos mais potentes (SOGLIA et al., 2006).

Não há registros de toxicidade de nim para humanos. Na África e no Caribe, a população consomem seus frutos maduros (MARTINEZ, 2002). A azadiractina, como principal ingrediente da planta, age sobre os insetos tanto por ingestão como por contato, reduzindo a alimentação e desenvolvimento de insetos. Os extratos do nim tem ação nematicida, bactericida e fungicida, reduz a população de nematódeos fitófagos, inibindo o crescimento de bactérias e atua sobre fungos (SOGLIA et al., 2006).

O nim tem sido divulgado como alternativa fitoterápica no que diz respeito ao controle de nematódeos gastrintestinais em animais, em um estudo feito na Venezuela, o nim é a planta mais usada como medicamento etnoveterinário, usado em várias criações (LANS ., 1998).

Os testes *in vitro* permitem uma análise das propriedades anti-helmínticas dos extratos vegetais, identificando e caracterizando os componentes químicos encontrados nas plantas, possibilitando alternativas para o controle das parasitoses (COSTA et al., 2002).



Figura 1. Folhas do nim.

Fonte: Arquivo pessoal

### 2.3. *Artemia salina*

Para análise de medicamentos, ainda são usados animais, mas buscam-se alternativas que não os exponham a sofrimento, e de menor custo financeiro. Uma melhor forma de avaliação vem sendo utilizada como bioindicador de toxicidade, o uso da *Artemia salina* (Figura 02), um microcrustáceo da ordem Anostraca (SOUTO, 1991). É chamada também de camarão de salmora, é um braquiópoda, pertencente ao filo Anthropoda, esta espécie se encontra nos cinco continentes. (VEIGA et al 2002). Considerada cosmopolita e de fácil adaptação a vários ambientes, pois tem uma resistência a estresse ambiental, como a variação de salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido (NARDO EA, et al 1997)

*A. salina* é um crustáceo filtrador que se alimenta principalmente de bactérias, algas unicelulares, pequenos protozoários e detritos que são dissolvidos no meio. A filtração acontece nos toracópodos, que são responsáveis em conduzir as partículas

alimentícias em até o sistema digestivo. A taxa de filtração diminui de acordo com o aumento da concentração de partículas, ficando essas partículas acumuladas e assim interferindo no processo normal de seus batimentos. Outro efeito quando se têm altas concentrações é que podem passar diretamente pelo tubo digestivo, e dessa forma não sofrer digestão, tornando o indivíduo subnutrido (SOUTO, 1991).

Esse microcústáceo é de baixo custo, fácil manipulação e reprodução em laboratório (CALOW, 1993). Pesquisas fundamentam a ação tóxica de várias substâncias naturais sobre a *Artemia salina* (RIOS, 1995; NASCIMENTO *et al*, 2008).

O método de análise com *Artemia salina* é proposto como um simples bioensaio para pesquisa preliminar de atividade em produtos naturais. Usando esse método, é possível obter a concentração letal (CL50%) dos componentes ativos de extratos em um meio salino. O teste avalia a toxicidade de componentes ativos, frações ou extrato de produtos naturais frente ao organismo marinho *A. salina*, esse simples organismo pode ser usado como um modelo para a citotoxicidade de produtos, além de ser um método rápido, seguro e acessível (MEYER, 1982).



Figura 2: *Artemia salina*

Fonte: Arquivo pessoal

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Localização do Experimento**

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Doenças Parasitárias de Animais Domésticos (LDPAD) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Patos, Paraíba.

#### **3.2 Coleta e confecção do extrato do Nim**

A coleta e herborização do material vegetal foram realizadas baseando-se em metodologias propostas por Cartaxo, Souza e De Albuquerque (2010). As plantas foram coletadas na Fazenda Nupeárido, a exsicata encontra-se armazenada no Herbário da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, sob o número 3851.

Para a aquisição do extrato utilizaram-se as folhas da planta *A. indica*, após a coleta, pesadas em balança eletrônica de precisão e colocadas em sacos de papel de 2 kg. Em seguida levados para estufa para pré-secagem com circulação forçada de ar, por 48 horas a no máximo 45°C. A amostra foi pesada novamente, triturada e colocados em saches feitos de TNT 100% polipropileno, a seguir foi colocada em um recipiente de vidro estéril para alcoolatura durante 72 horas, utilizando o farelo do Nim na proporção de 250g de matéria vegetal para 1L de álcool cereal. O extrato foi filtrado e armazenado em recipiente de vidro para evaporação total do solvente na chapa aquecedora a 50°C.

#### **3.3 Reprodução em laboratório da *Artemia salina***

Esses ensaios foram realizados tendo por base as metodologias propostas por Araújo, Cunha e Veneziani (2010). Inicialmente, foi preparado um litro de água do mar artificial, com o pH ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,08 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH) para incubação dos cistos de *Artemia salina* (1 g/L), que foram expostos à luz artificial (lâmpada incandescente de 60 watts), sob aeração com auxílio de uma bomba para aquário e em temperatura ambiente durante 24 horas. Em

seguida, as larvas foram filtradas (retirando-se os cistos que não eclodiram) e recolocadas no aquário, onde continuaram em incubação por mais 24 horas, nas mesmas condições de luz e de calor. Após essas incubações, quando as larvas atingiram o estágio de metanúplio (cultura pura), essas são as consideradas mais sensíveis ao tratamento.

### **3.4 Teste de evolução da toxicidade em *Artemia salina***

Para o ensaio, foram colocados, em triplicata, dez exemplares de náuplios em poços contendo 5 mL de solução salina, com frações dos extratos vegetais dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%, nas concentrações de 100, 500, 1000, 10.000 e 20.000 µg/mL. Como controle positivo foram colocadas as larvas em hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% e como controle negativo foram feitos dois testes, no primeiro apenas as larvas e a solução salina, sem as concentrações dos extratos e o segundo com as concentrações testadas apenas com o solvente utilizado para preparar os extratos.

Após 24h em contato com a suspensão dos extratos, com o auxílio de um contador de colônias, foi realizada a contagem do número de náuplios sobreviventes dos grupos controle e dos grupos expostos às frações. Foram consideradas mortas aquelas larvas que permanecerem imóveis por mais de 10 segundos após leve toque com a ponta de uma pipeta de Pasteur.

#### **3.4.1 Análise estatística do teste**

A análise estatística deste ensaio foi realizada com os valores obtidos, estimando-se a concentração letal para matar 50% (CL50) das larvas através do método de Análise de Probitos, com 95% de intervalo de confiança, utilizando-se o programa TRIMMED.exe versão 1.5.

### **3.5 Teste de ovicida e larvicida sobre *Haemonchus contortus***

Para testar a ação ovicida e/ou larvicida do extrato, foi adicionado 2,5ml de extrato etanólico de *Azadirachta indica* na concentração de 18.000 µg/ml à culturas

fecais monoespecíficas de *Haemonchus contortus*. Após sete dias procedeu-se a recuperação das larvas de terceiro estágio (L3) para contagem de larvas em microscópio óptico. O teste foi realizado em triplicata e utilizou-se como controle água destilada estéril. Esse experimento baseou-se na metodologia de (CHAGAS & VIEIRA, 2007).

### **3.5.1 Análise estatística**

Para esse ensaio, empregou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC). A eficiência do tratamento foi calculada pela fórmula:  $(L3 \text{ do controle negativo} - L3 \text{ do grupo tratado}) / L3 \text{ do controle negativo}$ , segundo CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse trabalho foi realizado com o objetivo de descobrir uma dose tóxica do nim em *Artemia salina*, para posterior confecção de medicamentos ou outros produtos. Foi também avaliado em ovos e larvas de *Haemonchus contortus*, para assim descobrir se é eficaz ou não ao tratamento como anti-helmíntico. Nas tabelas abaixo estão os dados obtidos do experimento nos dados obtidos nas tabelas 1 e 2.

O extrato do nim mostrou-se letal apenas em altas concentrações (Tabela 01), segundo a classificação de Meyer (1982), esse extrato não é considerado tóxico, pois valores de CL50 acima de 1000 são considerados atóxicos

**Tabela 01.** Valor de CL50 calculado para o extrato hidro alcoólico de *Azadirachta indica* e respectivos intervalos de confiança de 95%.

<i>Azadirachta indica</i>	CL50 (µg/mL)
Extrato hidro alcoólico das folhas	18234,45 (14662,09-22667,19)

Bevilacqua et al.(2008) estudou a toxicidade do nim em *Artemia salina* comparando a preparação comercial do extrato da folha analisando o óleo da semente da *A.indica*. Observou toxicidade aguda, mas diferente, a toxicidade da CL50 do óleo puro foi de 1,59ml/ml, já a preparação comercial do extrato da folha não foi possível calcular pois apresentou morte de 100% de *A.salina*.

Os resultados do experimento *in vitro* em *H. contortus*, apontam que o extrato do Nim na concentração de 18234,45 µg/ml se mostrou eficaz, havendo uma redução na eclodibilidade e no total de L3 recuperadas após 7 dias. De 12.000 ovos por coprocultura, houve 50% de eclodibilidade em água destilada e 14,16% com o extrato da folha do nim. Em larvas de terceiro estágio (L3), teve uma eficiência de 71,77% (Tabela 02).

**Tabela 02.** Eficiência do extrato hidroalcoólico do nim (*Azadirachta indica*) em *Haemonchus contortus*.

Tratamento	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Total de L3	Eclodibilidade (%)	Eficiência (%)
Nim	18.234,45	1700	14,16	71,77
Água destilada	0	6000	50	0

Outros estudos também demonstram o efeito do nim sobre nematódeos de pequenos ruminantes. Ahmed et al. (1994) e Mostofa et al. (1996) avaliaram o efeito do extrato aquoso da semente do nim em nematódeos de pequenos ruminantes obtiveram efeitos positivos para o controle desses parasitas. Pietrosevoli *et al.* (1999) constatou com o fornecimento das folhas desidratadas diminuição do resultado da OPG em bovinos, já em ovinos que foram submetidas a uma alimentação de 3 g/kg de folhas frescas de Nim por 6 semanas tiveram redução significativa na contagem dos parasitas já adultos. (CHANDRAWATHANI *et al.* 2006).

Pessoa (2001) analisou *in vitro* o efeito da azadirachtina retirada da semente do Nim sobre *H. contortus* encontrando 68,3% de inibição na eclodibilidade deste parasito na concentração de 1%.

## 5. CONCLUSÃO

O extrato do Nim (*Azadirachta indica*) foi eficiente no controle de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* sendo observado baixa toxicidade em *Artemia salina*. Assim, *A. indica* representa uma alternativa viável para o controle de *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes.

## 6. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M. G. F.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C. S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 205-209, 2010.
- AHMED, N.U.; MOSTAFA, M.; AWAL, M.A.; ALAM, M.N. Comparative efficacy of modern anthelmintics with that of neem seeds against gastrointestinal nematodiasis in sheep. **Bangladesh Veterinary Journal**, v. 28, n. 1-4, p. 21-23, 1994.
- BEVILACQUA, A .H .V; SUFFREDINI, I. B; BERNARDI, M. M; Toxicidade de neem, *Azadirachta indica* A.Juss( Meliceae), em *Artemias* SP: comparação da preparação comercial e do óleo puro. **Rev. Inst. Cienc. Saúde.** (26)2: 157-60. 2008.
- BOWMAN, D. D. **Georgis Parasitology for Veterinarians**. Philadelphia- EUA: W. B. Saunders Company. 6 ed. P. 430, 1995.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.148, p. 288-294, 2007.
- CARTAXO, S. L .; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** .v.131, p. 326-342, 2010.
- CALOW, P. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In: HOFFMAN, D. et al. Handbook in cytotoxicology. Oxford: **Blackwell Scientific Publication**, v. 1. p. 1-5, 1993.
- COSTA, C. T. C. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, n.2, p. 57- 60, 2002.
- CHAGAS; VIEIRA, L. D. S.; DE SOUZA, A. C. Ação da *Azadirachta indica*( neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Embrapa Caprinos**, Sobral- CE. 2007.
- CHANDRAWATHANI, P.; CHANG, K.W.; NURULAINI, R.; WALLER, P.J.; ADNAN, M.; ZAINI, C.M.; JAMNAH, O.; KHADIJAH, S.; VINCENT, N. Daily feeding of fresh Neem leaves (*Azadirachta indica*) for worm control in sheep.**Tropical Biomedicine**, v.23, p.23-30, 2006.
- ECHEVARRIA, F. A. M., TRINDADE , G. N.P. Anthelmintic resistance by *haemonchus contortus* to ivermectin in brazil. **Veterinary Record**, v.1124, february, p. 147- 148, 1999.

FAO. Resistência a los antiparasitários: Estado atual com ênfases em América Latina. **Salud Animal**. P. 8-43, 2003.

HERD, R. Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. In: Padilha, T. Controle do nematóides gastrintestinais em ruminantes. Coronel Pacheco, MG: **EMBRAPA- CNPGL**, p. 95- 111, 1996.

LANS, C.; BROWN, G. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 35, n. 3, p. 149-163, 1998.

LAINETTI R, Brito ERS. A saúde pelas plantas e ervas do mundo inteiro. Rio de Janeiro: **Ediouro**; 1980.

LOCKE, J.C. “*Fungi*” In: “The Neem Tree”.  
**Edited By H. Schmutterer**, VHC, pp. 118-26, 1995.

KAPLAN, R.M. et al. Validation of the famacha eye color chart de tecning anemia in sheep and goats on farms in the southem united states. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n1/2, p. 105- 120, 2004.

KOEHN FE, CARTER GT . The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov** 3: 206-220, 2005.

MARTINEZ, S. S. O Nim: *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção / **Instituto agrônômico do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2002.

MATTOS, M. J. T. de .; BASTOS, C. D.; SCHIMIDT. V. Relação entre verminoses e presença de sinais clínicos em caprinos naturalmente parasitados. **IX Sem. Brás. Parasitologia Veterinária**. P. 154, 1999.

MEYER BN. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**. 45:31-4, 1982.

MECLEOD, R. S. cost of the majorparasites to the ustralian livestock industries. **International Journal of Parasitology**, v. 25. P. 1363-1367, 1995.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K. Nemathode control and possible developmente of anthelmintic resistance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.8, p. 75-86, 1999.

MOSTAFA, M.; MCKELLAR, Q.A.; ALAM, M.N.; LE JAMBRE, L.F.; KNOW, M.R. Epidemiology of gastrointestinal helminth parasites in small ruminants in Bangladesh and their anthelmintic therapy. **In sustentable parasite controlo m small ruminante na international workshop**. 105- 108, 1996.

NARDO EA, COSTA AS, LOURENÇÃO AL. *Melia azadirach* extract as na antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). **Florida Entomol.** ;80:92-4,1997.

NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA E SILVA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n.2, p. 143-148, 2008.

PESSOA, L.M. Atividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus*. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. p. 68, 2001.

PIETROSEMOLI, S; OLAVEZ, R.; MONTILLA, T.; CAMPOS, Z. Empleo de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en control de nematodos gastrointestinales de bovinos a pastoreo. **Revista de la Facultad de Agronomia**, v.16, n.2, p.220-225, 1999

PURI, S.; SWAMY, S. L. Growth and biomass production in *Azadirachta indica* seedlings in response to nutrients (N and P) and moisture stress. **Agroforestry Systems**. n. 51, p. 57-68. 2001.

RIOS, F. J. B. Digestibilidade in vitro e toxicidade de lectinas vegetais para náuplios de *Artemia* sp. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 1995.

RODRIGUES, A. B. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos e anti-helmínticos na mesorregião do sertão paraibano. 82f. **Dissertação de Mestrado (Zootecnia)** – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos- PB, 2005.

SOGLIA, M. C.; OSÓRIO, A. C. B.; SANTOS NETO, C.; FANCELLI, M.; MACEDO, E. F.; NASCIMENTO, A. S. Usos e aplicações do NIM (*Azadirachta indica*). **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. 4p, 2006.

SOUTO, F. J. B. Influencias de parâmetros ambientais sobre *Artemia* sp (Branchiopoda: Artemiidae) em uma salina artesanal do estado do Rio Grande do Norte. **Curso de Mestrado em Ciências Biológicas** – Zoologia, Universidade Federal da Paraíba, 19 p. 1991.

SCHMUTTERER, H. **Annu. Rev. Entomol.** 35: 271-97, 1990.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 360 p. 1990.

VAN WYK, J. A. O corrence and dissemination of anthelmintic resistance makes It imposible to control some field strains or *Haemonchus contortus* in south Africa With any of the modern anthelmintics? **Veterinary Parasitology**, v. 70, p. 11- 112, 1997..

VERKEC, R.H.J. & D.J. Wright, **Pest. Sci.** 37: 83- 91, 1993.

VEIGA LF, ET AL VITAL NAA. Testes de toxicidade aguda com o microcústáceo *Artemia* sp. In: Nascimento IA, Souza ECPM, Nipper M. Métodos de ecotoxicologia marinha. São Paulo: **Edit. Artes Gráficas**. p.111-22, 2002.

VIEIRA, L, S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti- helmíntica em rebanhos caprinos no estado da paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.19, n.3-4, p.99-103, 1999.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-52, 2001.

[http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/cartilha/cartilha\\_nim\\_2006.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/cartilha/cartilha_nim_2006.pdf), Acesso em 23/11/2013