

**Ação *in vitro* do extrato do botão floral da bananeira (*Musa spp.*) sobre nematódeos
gastrointestinais de ovinos**

***In vitro* action of the banana tree (*Musa spp.*) floral button extract on sheep
gastrointestinal nematodes**

**Acción *in vitro* del extracto de brote de flor de banano (*Musa spp.*) en nematodos
gastrointestinales de ovejas**

Recebido: 10/07/2020 | Revisado: 17/07/2020 | Aceito: 21/07/2020 | Publicado: 03/08/2020

Matheus Eduardo Leme

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5817-4076>

Universidade Estadual do Norte do Paraná, Brasil

E-mail: matheustchubiru@gmail.com

Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9608-4282>

Universidade Estadual do Norte do Paraná, Brasil

E-mail: emellopeixoto@uenp.edu.br

Eidi Yoshihara

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-0418>

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Brasil

E-mail: ehidi@apta.sp.gov.br

Monica Tiemi Aline Kakimori

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6051-4722>

Universidade Estadual de Londrina, Brasil

E-mail: monicakakimori@gmail.com

Erislaine Augusta Portes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2056-4140>

Universidade Estadual de Londrina, Brasil

E-mail: erislaineportes@hotmail.com

Melissa Monteiro Paiva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2327-8948>

Universidade Estadual do Norte do Paraná, Brasil

E-mail: melissapaivaa@hotmail.com

Marcos Augusto Alves da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5570-8677>

Universidade Estadual do Norte do Paraná, Brasil

E-mail: marcoasilva@uenp.edu.br

Resumo

Uma alternativa para o controle de verminose na ovinocultura é a utilização de plantas bioativas. Diversos estudos têm relacionado plantas taniníferas com propriedades anti-helmínticas, com destaque para a bananeira (*Musa* spp.). Assim, o objetivo do trabalho foi qualificar e quantificar o potencial anti-helmíntico do extrato hidroalcoólico do botão floral da bananeira a 10% (EHB), nas concentrações de 20, 40, 80, 160 e 320mg mL⁻¹, sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos. O presente estudo laboratorial, de natureza quantitativa, justifica-se principalmente pelo fato de que estudos *in vitro*, são exigidos preliminarmente aos ensaios pré-clínicos e clínicos. Dessa forma, foram utilizadas fezes de ovinos naturalmente infectados, selecionados pela contagem mínima de 2.000 ovos por grama de fezes e em quadruplicada, foram avaliados também, os tratamentos controle negativo e positivo. Além disso, foram determinados os teores de polifenóis totais, taninos condensados, flavonoides, e atividade antioxidante. Utilizando os testes de inibição da eclodibilidade de ovos (TEO) e da migração larval (TIML), foi possível verificar 100% de inibição, para ambos os testes, na concentração de 320mg mL⁻¹. O EHB (10mg mL⁻¹) apresentou 0,38mg EAG g⁻¹ de polifenóis totais, 372,70mg EAT g⁻¹ de taninos, 0,42mg RE g⁻¹ de flavonoides, e atividade antioxidante de 43,03% com IC₅₀ correspondendo à 0,2765mg mL⁻¹. Dessa forma, foi possível verificar atividade anti-helmíntica e antioxidante do EHB, demonstrando importante potencial no controle de verminose em ovinos.

Palavras-chave: Agroecologia; Banana; Verminose; Ovinocultura; Taninos.

Abstract

An alternative for the control verminosis in sheep is the use of bioactive plants. Several studies have related tanniferous plants with anthelmintic properties, especially banana (*Musa* spp.). Therefore, the objective of this work was to qualify and quantify the anthelmintic potential of the hydroalcoholic extract of the 10% banana floral bud (HEB), in the concentrations of 20, 40, 80, 160 and 320mg mL⁻¹, on eggs and larvae of gastrointestinal nematodes of sheep. The present laboratory study, quantitative in nature, is justified mainly by the fact that *in vitro* studies are required preliminarily to pre-clinical and clinical trials.

Thus, feces from naturally infected sheep were used, selected by the minimum count of 2,000 eggs per gram of feces and in quadruplicate, negative and positive control treatments were also evaluated. In addition, the contents of total polyphenols, condensed tannins, flavonoids, and antioxidant activity were determined. Using the eggs hatchability inhibition tests (EHT) and larval migration (LMIT), it was possible to verify 100% inhibition, for both tests, in the concentration of 320mg mL⁻¹. HEB (10mg mL⁻¹) showed 0.38mg EAG g⁻¹ of total polyphenols, 372.70mg EAT g⁻¹ of tannins, 0.42mg RE g⁻¹ of flavonoids, and antioxidant activity of 43, 03% with IC50 corresponding to 0.2765mg mL⁻¹. In this way, it was possible to verify the anthelmintic and antioxidant activity of HEB, demonstrating an important potential in controlling worms in sheep.

Keywords: Agroecology; Banana; Verminose; Sheep; Tannins.

Resumen

Una alternativa para controlar los gusanos en las ovejas es el uso de plantas bioactivas. Varios estudios han relacionado plantas tanníferas con propiedades antihelmínticas, especialmente plátano (*Musa* spp.). Por lo tanto, el objetivo era calificar y cuantificar el potencial antihelmíntico del extracto hidroalcohólico del brote floral de plátano al 10% (EHP), en las concentraciones de 20, 40, 80, 160 y 320mg mL⁻¹, en huevos y larvas de nematodos gastrointestinales de ovejas. El presente estudio de laboratorio, de naturaleza cuantitativa, se justifica principalmente por el hecho de que se requieren estudios *in vitro* de forma preliminar a los ensayos preclínicos y clínicos. Por lo tanto, se usaron heces de ovejas infectadas naturalmente, seleccionadas por el recuento mínimo de 2,000 huevos por gramo de heces. Además de EHP, los tratamientos de control negativo y positivo se evaluaron por cuadruplicado. Además, se determinaron los contenidos de polifenoles totales, taninos condensados, flavonoides y actividad antioxidante. Utilizando las pruebas de inhibición de incubabilidad de huevos (PIH) y la migración larval (PIML), fue posible verificar el 100% de inhibición, para ambas pruebas, en la concentración de 320mg mL⁻¹. EHP (10mg mL⁻¹) mostró 0.38mg EAG g⁻¹ de polifenoles totales, 372.70mg EAT g⁻¹ de taninos, 0.42mg RE g⁻¹ de flavonoides y actividad antioxidante de 43, 03% con IC50 correspondiente a 0.2765mg mL⁻¹. De esta manera, fue posible verificar la actividad antihelmíntica y antioxidante de EHP, demostrando un potencial importante en el control de gusanos en ovejas.

Palabras clave: Agroecología; Plátano; Gusanos; Ovejas; Taninos.

1. Introdução

O principal entrave da ovinocultura mundial, especificamente em regiões tropicais, é a presença de nematódeos gastrintestinais. Estima-se que cerca de 60% das perdas de produção são decorrentes da ação de parasitos (Costa et al., 2011).

A verminose provoca queda na produção dos animais infectados, incluindo menor ganho de peso, menor rendimento de carcaça, menor produção de leite, má qualidade da lã, baixa fertilidade e maior mortalidade (Vieira, 2008). Segundo Amarante et al. (1997), o combate aos nematódeos gastrintestinais é baseado em tratamentos repetitivos com drogas anti-helmínticas e esse processo favorece o desenvolvimento de populações resistentes à essas drogas, aumentando os gastos com medicamentos.

Uma alternativa para o controle de verminose e redução da resistência medicamentosa é a utilização de plantas medicinais. O uso terapêutico das plantas tem despertado grande interesse da população, da comunidade científica e dos serviços de saúde nos últimos anos (Souza et al., 2013).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi criada em 2006, pelo Decreto nº 5.813, e as diretrizes da política foram detalhadas como ações no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – Portaria Interministerial nº 2.960/2008. Um dos objetivos da Política e do Programa é garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (Brasil, 2006).

Estudos realizados com o objetivo de controlar parasitos e reduzir os impactos da resistência, têm relacionado diversas plantas taniníferas com propriedades anti-helmínticas, destacando-se a bananeira (*Musa* spp.) (Neuwirt et al., 2015; Nogueira et al., 2012). De acordo com Niezen et al. (1995) a utilização de plantas ricas em taninos condensados pode ser indicada como alternativa no controle de verminose em ovinos, reduzindo o uso de produtos sintéticos, bem como os custos de produção. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a ação anti-helmíntica e atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico do botão floral da bananeira (EHB) em nematódeos gastrintestinais de ovinos.

2. Material e Métodos

O presente estudo se refere à pesquisa laboratorial de natureza quantitativa (Pereira et al., 2018), trata-se de teste *in vitro* que normalmente são exigidos (comitês de Ética em

experimentação Animal) obrigatoriamente antes de se realizar os subsequentes testes in vivo, também conhecidos como testes pré-clínicos e clínicos.

2.1 Coleta e processamento do material vegetal

O botão floral da *Musa paradisiaca* foi coletado na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), situada no Câmpus Luiz Meneghel (CLM) no município de Bandeirantes, Paraná, Brasil (Latitude 23° 06' 28.6" Sul e Longitude 50° 21' 31.9" Oeste). A seleção foi realizada pela ausência de alterações macroscópicas como coloração, presença de insetos, aparência seca, entre outras alterações macroscopicamente visíveis. Em seguida essas amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno e encaminhadas ao laboratório de Plantas Medicinais do Núcleo de Ensino, Extensão e Pesquisa em Agroecologia, Sustentabilidade e Produção Orgânica NEPASPLAB - CLM / UENP. Este material foi higienizado em água corrente, seco em estufa com ventilação forçada de ar à 40 °C por 96 horas, moído em moinho de facas, mensurada sua massa seca em balança semi-analítica. A planta está registrada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob o número HUEM: 31695.

Para a confecção do extrato hidroalcoólico a 10%, foi utilizada metodologia semelhante à realizada por Rutherford & Powrie (1993), Hajhashemi, Ghannadi & Sharif (2003) e Boligon et al. (2009). Foi adicionado 30g do material vegetal, a 189mL de álcool etílico absoluto 99,5% e 81mL de água destilada. A extração foi realizada por agitação mecânica, com auxílio de agitador magnético, à temperatura ambiente por 24 horas, com subsequente filtração à vácuo, utilizando papel filtro (Whatman nº 3, 9.0cm. Gramatura média (g/m²): 187). O material vegetal resultante deste processo foi submetido à extração por mais duas vezes, acrescentando-se a solução hidroalcoólica nas mesmas proporções acima descrita.

O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador (modelo: TE-211, Tecnal, Brasil) à temperatura de 60°C e pressão de -400 a -500mmHg durante 60 minutos e posteriormente liofilizado (modelo: LJJ06, Científica, Brasil) à -50°C e pressão de -150mmHg.

2.2 Obtenção de ovos e larvas de nematódeos

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa no uso de Animais da Universidade Estadual do Norte do Paraná (CEUA-UENP), sob protocolo

14/2016, de 22 de novembro de 2016, e estão de acordo com os princípios éticos em experimentação animal vigentes na legislação Brasileira.

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de ovinos das raças White Dorper, 3/4 White Dorper e 7/8 White Dorper, com idade entre 2 a 5 anos, fêmeas, naturalmente infectadas e ausentes de tratamento anti-helmínticos por pelo menos 60 dias. Esses animais foram provenientes do rebanho da Fazenda Escola da Universidade Estadual do Norte do Paraná.

Realizou-se contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) conforme Gordon & Whitlock (1939), para seleção das amostras a serem utilizadas nos testes *in vitro*. Foram selecionados cinco animais que apresentaram valores iguais ou superiores a 2.000 OPG. As larvas foram obtidas por meio de cultura de larvas conforme Roberts & O'Sullivan, (1950), a partir de pull de fezes dos 5 animais. Os gêneros identificados conforme Keith (1953), foram identificadas larvas de *Haemonchus* spp. (78%), *Trichostrongylus* spp. (10%) e *Cooperia* spp. (7%) e *Strongyloides* spp. (5%).

Para isolamento de ovos para o teste de eclodibilidade foi utilizada a metodologia descrita por Coles et al. (1992) adaptada por Bizimenyera et al. (2006). As amostras fecais foram homogeneizadas em 250ml de água morna de torneira (40°C) e filtradas em tamises de diferentes aberturas (250; 150; 75 e 25µm), em ordem decrescente, permanecendo os ovos retidos ao final na tamis de 25µm. Após lavagem com água morna, o material obtido foi transferido para um tubo cônico de centrífuga, completado com água destilada e centrifugado a 3000 giros durante 5 minutos. Após, foi descartado o sobrenadante e os tubos foram preenchidos com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) com densidade de 1,20g mL, para suspensão dos ovos, novamente centrifugado a 3000 giros durante 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado no tamis de 25µm e para a retirada dos resíduos de NaCl, o sobrenadante foi novamente lavado e filtrado em água morna, em seguida armazenado em refrigeração à 6°C por 24 horas.

2.3 Teste de eclodibilidade de ovos (TEO)

O teste de eclodibilidade de ovos foi realizado segundo metodologia descrita por Von Samson-Himmelstjerna, et al. (2009). Utilizando placa para cultura de células, contendo 24 poços, foram alocados em média de 110 a 120 ovos em cada poço, e submetidos ao EHB nas concentrações de 20, 40, 80, 160, 320mg mL⁻¹. A água destilada foi utilizada como controle

negativo (CN) e sulfóxido de albendazol ($200\mu\text{g mL}^{-1}$) como controle positivo (CP), avaliados em quadruplicada.

Para avaliação de cada tratamento, foi acrescentado nas placas de cultura $100\mu\text{L}$ da suspensão água e ovos, e $400\mu\text{L}$ dos respectivos tratamentos. As placas foram mantidas em incubadora de demanda biológica de oxigênio (B.O.D.) (modelo: TE-371, Tecnal, Brasil) à 27°C , por 48 horas. Após esse período, os ovos e larvas eclodidas de primeiro estágio (L1) foram quantificadas.

Os resultados foram avaliados de acordo com o percentual de redução larval (%LR) usando a fórmula: $\text{Eficácia}(\%) = [\text{Mo} / (\text{ML} + \text{MO}) \times 100]$, onde MO representa a contagem de ovos no tratamento e ML contagem de larvas no tratamento. Foi empregada uma regressão não linear para determinar as concentrações do extrato suficiente para inibir 50% (CL_{50}) e 90% (CL_{90}) de incubação de ovos.

2.4 Teste de inibição da migração larval (TIML)

O teste de inibição da migração larval foi realizado segundo metodologia descrita por Rabel, Mcgregor & Douch (1994). Foram utilizadas larvas de terceiro estágio (L₃) recém obtidas das culturas de larvas de ovinos da Fazenda Escola da Universidade Estadual do Norte do Paraná, que não recebiam tratamento antiparasitário há no mínimo 60 dias.

Para o desembainhamento das larvas foi realizado segundo metodologia descrita por Bahuaud et al. (2006). As larvas foram mantidas em tubo cônico de centrífuga com $50\mu\text{L mL}^{-1}$ de hipoclorito de sódio à 12%, homogeneizando lentamente por 5 minutos. Para a retirada dos resíduos de hipoclorito, foi preenchido o tubo cônico de centrífuga com água destilada e centrifugado a 3.000 giros por 3 minutos, foi retirado o sobrenadante e acrescentado água destilada novamente. Esse processo foi realizado por mais três vezes e as larvas foram quantificadas para que houvesse aproximadamente 200 larvas em $50\mu\text{L}$ de solução de larvas.

A quantificação foi realizada analisando 20 amostras de $10\mu\text{L}$ contendo solução de larvas, depois foram acondicionadas em placas de cultura de 24 poços. Em seguida, adicionou-se $950\mu\text{L}$ dos respectivos tratamentos: EHB 20, 40, 80, 160 e 320mg mL^{-1} , CN com água destilada e CP com $100\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfóxido de albendazol, avaliados em quadruplicada.

Após o acondicionamento em incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) durante 16 horas a 27°C , os respectivos tratamentos foram colocados sobre malha de abertura de $25\mu\text{m}$ para avaliação da migração das larvas. Após nova incubação, nas condições

descritas anteriormente, porém por 24 horas, procedeu-se contagem das larvas por microscopia óptica com aumento de 100 vezes. A porcentagem de migração foi calculada por meio da fórmula migração(%) = $[NM / (NM + NR)] \times 100$, onde NM é o número de larvas L3 migradas através da malha e NR é o número de larvas L3 retidas na malha.

Para análises estatísticas, os dados para se obter a curva dose-resposta foram ajustados ao modelo de regressão não linear proposto por Streibig (1988). Para o Teste de Eclodibilidade de Ovos e Teste da Inibição da Migração Larval:

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{b}\right)^c}$$

Em que:

y = porcentagem de inibição da eclodibilidade de ovos e inibição da migração larval;

x = concentração do EHB, e;

a, b e c = parâmetros estimados da equação, de tal forma que:

a = amplitude existente entre o ponto máximo e o ponto mínimo da variável;

b = dose que proporciona 50% de resposta da variável;

c = declividade da curva ao redor de b.

De acordo com a fórmula proposta por Streibig (1988), valores de b correspondem à concentração necessária para inibir 50% da eclodibilidade de ovos e inibição da migração larval. Desta maneira, valores muito baixos b demonstram tendência a susceptibilidade dos ovos e larvas avaliados ao extrato testado, e quanto maior o valor de b, menor a susceptibilidade dos ovos e larvas ao extrato.

2.5 Análises do extrato

Os teores de taninos condensados, polifenóis totais, flavonoides e atividade antioxidante foram determinados por espectrofotômetro ultravioleta visível (UV-Vis) (modelo: UV-M51, BEL Engineering, Itália). As análises foram realizadas em triplicada nas concentrações de 2.5, 4, 5.5, 7, 8.5 e 10mg mL⁻¹. O teor de taninos condensados foi expresso em mg de equivalente em ácido tânico por grama do extrato (mg EAT g⁻¹), conforme Fagbemi, Oshodi & Ipinmoroti (2005).

Para determinação de polifenóis totais, utilizou-se o método de *Folin-Ciocalteu*, utilizando ácido gálico como padrão de comparação (Stagos et al., 2012). Os resultados foram expressos em mg de equivalente em ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG g⁻¹). O

ácido gálico possui estrutura simples e é precursor de vários compostos fenólicos, sendo assim considerado substância de escolha como padrão.

A determinação dos teores de flavonoides totais foi baseada na complexação dos flavonoides com o cloreto de alumínio (Zhishen & Mengcheng, 1999), e os resultados foram expressos em mg de rutina por grama de extrato seco (mg RE g⁻¹).

A atividade antioxidante foi determinada pelo método da inibição da oxidação do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), conforme Blois (1958). Adicionalmente, a capacidade do extrato para inibir a oxidação do radical DPPH em 50% (IC₅₀).

3. Resultados e Discussão

Por meio do teste de inibição da eclodibilidade, foi possível observar que o EHB inibiu 82,57% na concentração de 160mg mL⁻¹, atingindo 100% na concentração de 320mg mL⁻¹, igualando aos 100% apresentados pelo tratamento controle positivo, que correspondeu ao medicamento químico sintético. Como era de se esperar, os tratamentos correspondentes ao controle negativo apresentaram 96,60% de eclodibilidade (Tabela 1).

Tabela 1. Valores referentes à média da porcentagem de inibição da eclodibilidade de ovos e desvio padrão, para as diferentes concentrações em mg mL⁻¹ do extrato hidroalcoólico do botão floral da bananeira a 10%.

Concentração do extrato (EHB) (mg mL ⁻¹)	Média da % de inibição	Desvio Padrão
CN*	3,4	0,94
CP*	100	0
20	17,91	12,02
40	7,825	2,87
80	12,37	2,54
160	82,57	8,12
320	100	0

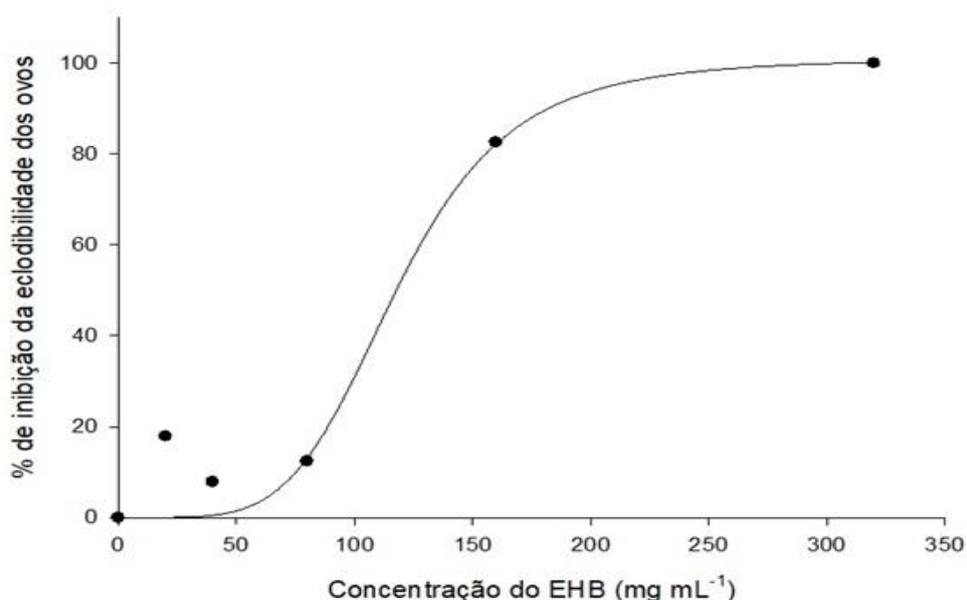
*CN: controle negativo; *CP: controle positivo
Fonte: Autores.

Em relação aos resultados apresentados na Tabela 1, cabe considerar que assim como o tratamento controle positivo, o EHB na dosagem de 320mg mL⁻¹ foi capaz de inibir completamente a eclodibilidade das larvas de nematódeos gastrointestinais. Esse resultado, é

capaz de demonstrar seu potencial uso como anti-helmíntico para o controle parasitário de ovinos. Entretanto, é de extrema importância se considerar a adicional vantagem do EHB, no que se refere à inocuidade para o consumidor, produtor e meio ambiente. Pois, o fato de tratar-se de um medicamento natural, ou seja, ausente de substâncias sintéticas, seu uso previne a presença desses contaminantes tanto dos alimentos oriundos da produção animal (carne, leite, etc.) como do meio ambiente. Diferentemente, animais de produção tratados por meio de parasiticidas sintéticos, excretam resíduos dessas substâncias no solo, águas e vegetação, que muitas vezes determinam significantes prejuízos para a biodiversidade da natureza. Além disso, o uso de produtos naturais não exige período de carência para o consumo dos alimentos, nem tão pouco compromete a certificação dos produtos provenientes de sistemas orgânicos, biodinâmicos ou agroecológicos de produção animal, cujo uso de pesticidas sintéticos determina a suspensão temporária dos produtos assim classificados.

Apesar do EHB nas concentrações 20, 40 e 80mg mL⁻¹ não ter apresentado diferença significativa no que se refere à concentração letal (CL), pois as CL₅₀ e CL₉₀ do EHB corresponderam à 117 e 182mg mL⁻¹, respectivamente, foi possível observar a tendência de comportamento dose dependente, ou seja a medida que se aumenta a dose do produto avaliado, verifica-se maior efetividade de ação do mesmo; conforme ilustrado no Gráfico 1.

Gráfico 1. Inibição da eclodibilidade de ovos proporcionado pelo extrato hidroalcoólico do botão floral da bananeira.



*Estimativas dos parâmetros a, b e c e do coeficiente de determinação (R²) do modelo log-logístico, ajustados para o controle de inibição da eclodibilidade de ovos. R²: 0,95.

Fonte: Autores.

Resultados semelhantes foram descritos por Neuwirt et al., (2015), que, utilizando extrato hidroalcolico de folhas frescas de *Musa* spp., verificaram inibição da eclodibilidade de ovos de nematódeos de ovinos em 98,55% na dosagem de 160mg mL⁻¹ e 100% na concentração de 180mg mL⁻¹.

Ainda avaliando o potencial anti-helmíntico de *Musa* spp., Nogueira et al. (2012) observaram eficácia de 100% na inibição da eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus*, utilizando extrato aquoso da folha, pseudocaule e botão floral da bananeira na concentração de 10mg mL⁻¹, entretanto, obtiveram inibições acima de 95% nas concentrações 2,5mg mL⁻¹; 5,0mg mL⁻¹ e 10,0mg mL⁻¹. Segundo esses autores, os metabolitos da banana inibem a embriogênese desses nematódeos e, portanto, reduzem as taxas de eclodibilidade. Os valores das concentrações foram mais baixos do que as encontradas nesse estudo. Essa diferença pode estar relacionada com o local de produção da bananeira como topografia, clima, altitude, época do ano, diferenças entre espécies, composição bromatológica do botão floral, composição do extrato e método de extração (Morais, 2009).

O CN apresentou 94,8% de migração larval e o CP atingiu 91% da inibição, o que nos permite observar a adequabilidade das condições experimentais do presente estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Valores referentes à média da porcentagem de inibição da migração larval e desvio padrão, para as diferentes concentrações em mg mL⁻¹ do extrato hidroalcolico do botão floral da bananeira a 10%.

Concentração do extrato (EHB) (mg mL ⁻¹)	Média da % de inibição	Desvio padrão
CN*	5,2	0,98
CP*	91	1,85
20	37,95	2,47
40	45,19	2,26
80	90,3	1,22
160	94,8	1,15
320	100	0

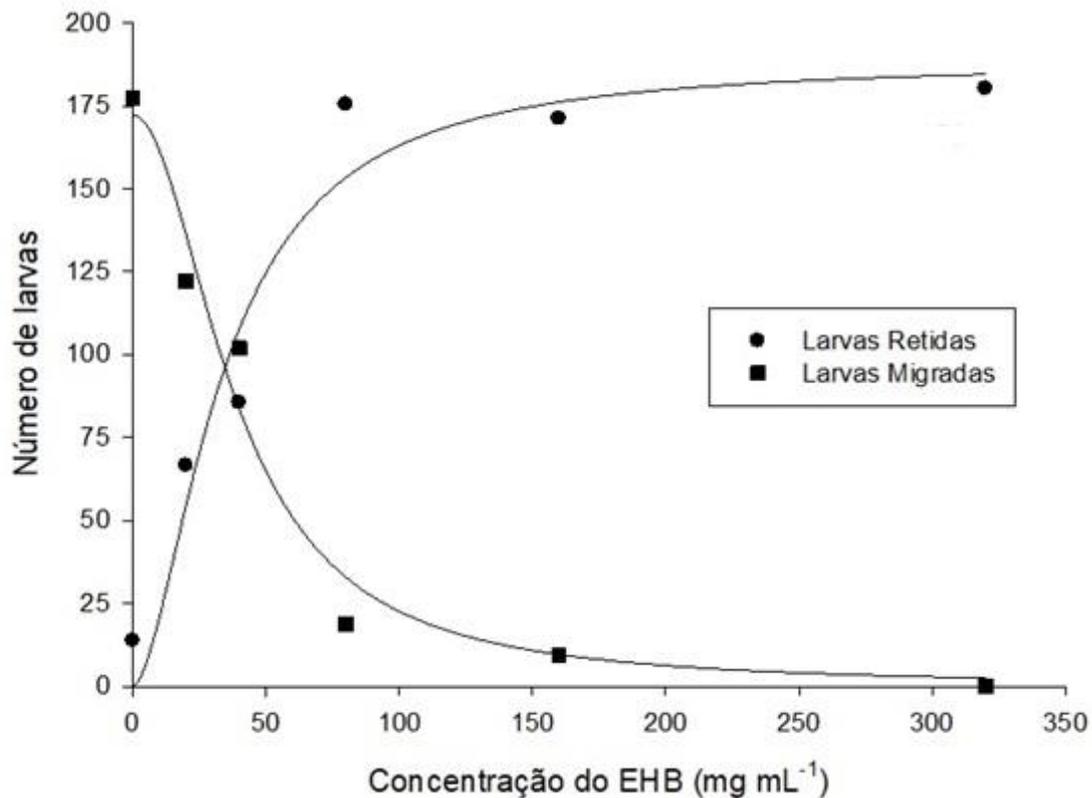
*CN: controle negativo; *CP: controle positivo
Fonte: Autores.

Semelhantemente ao que foi descrito em relação ao efeito deletério provocado pelo EHB sobre a inibição da eclodibilidade, apresentados na Tabela 1, a inibição da migração larval foi determinada por todas as concentrações do EHB avaliadas pelo presente estudo. Entretanto, é preciso ressaltar que neste caso, o EHB a partir das concentrações superiores à 160mg mL^{-1} , apresentou efetividade maior que aquela determinada pelo tratamento controle positivo.

Esses resultados corroboraram com outros pesquisadores que também registraram ação inibitória de plantas taniníferas sobre migração de larvas de nematódeos de ovinos (Bizimenyera et al., 2006; Yoshihara et al., 2014). Porém, o presente estudo priorizou avaliar o resíduo proveniente de uma planta amplamente produzida no território nacional, sendo seu consumo popularmente apreciado pelos brasileiros, o que conseqüentemente favorece a sustentabilidade econômica do sistema de produção agropecuário. Esse aspecto é particularmente importante quando se leva em consideração os anseios e necessidades da sociedade atual, no que se refere à busca por inovações eficientes à saúde, educação e desenvolvimento sustentável, sem deixar de levar em consideração o equilíbrio entre a prosperidade humana com a proteção do meio ambiente (ODS, 2015).

No teste de inibição da migração larval o EHB inibiu 90,30% na concentração 80mg mL^{-1} , 94,80% na concentração de 160mg mL^{-1} , atingindo 100% na concentração de 320mg mL^{-1} (Gráfico 2).

Gráfico 2. Número de larvas migradas e larvas retidas nas concentrações do extrato hidroalcoólico do botão floral da bananeira.



*Estimativas dos parâmetros a, b e c e do coeficiente de determinação (R²) do modelo log-logístico, ajustados para o número de larvas migradas e retidas, R²: 0,96 e 0,93, respectivamente.
Fonte: Autores.

As concentrações de 20 e 40mg mL⁻¹ não tiveram diferença significativa e suas CL (concentração letal) não apresentaram 50% de inibição, o que não é relevante para o presente estudo. As CL₅₀ e CL₉₀ do EHB foram 45 e 79mg mL⁻¹, respectivamente.

Neuwirt et al. (2015) utilizando extrato hidroalcoólico de folhas frescas de *Musa* spp. constataram valores de 100% de inibição nas concentrações de 800mg mL⁻¹ e 1.000mg mL⁻¹, doses muito superiores as usadas nesse estudo. Deve-se levar em consideração que os extratos foram produzidos a partir de partes diferentes da planta.

Nery et al. (2012) utilizando extrato aquoso de frutos imaturos de *Musa indica* var. constataram eficácia superior a 90% na inibição do desenvolvimento larval de nematódeos de ovinos.

Resultados opostos ao encontrados neste estudo foram observados por Marie-Magdeleine et al. (2014), testando três diferentes extratos (água, álcool metílico e

diclorometano), produzidos a partir das folhas e o caule de *M. paradisiaca*, relataram alta taxa de migração, no qual não diferiram do controle negativo.

Yoshihara et al. (2014) utilizaram 100mg mL⁻¹ de extrato comercial de *Acacia mearnsii* e verificaram 97,1% de inibição da migração larval, valores semelhantes aos encontrados nesse estudo quando comparados a porcentagem de inibição da migração larval. Yoshihara et al. (2014), trabalhando com adultos de *Haemonchus* sp. constataram o efeito dos taninos condensados utilizando microscopia eletrônica de varredura. Foi observada a presença de rugas transversais na cutícula em toda a extensão corporal e presença de rupturas da cutícula, com aparente extravasamento de material interno.

Em relação às análises do extrato, o EHB apresentou maiores teores de polifenóis totais na dosagem de 10mg mL⁻¹, que correspondeu a 0,38mg equivalente de ácido gálico por grama de extrato (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios referentes à polifenóis totais, taninos condensados, flavonoides e atividade antioxidante para as diferentes concentrações em mg mL⁻¹ do extrato hidroalcoólico do botão floral da bananeira a 10%.

Concentração do extrato (EHB) (mg mL ⁻¹)	Polifenóis totais*	Taninos* condensados	Flavonoides*	Atividade antioxidante
2,5	0,11	54,25	0,04	10,13
4	0,15	116,04	0,07	16,20
5,5	0,20	195,08	0,13	22,35
7	0,27	272,94	0,22	28,73
8,5	0,30	332,70	0,34	35,05
10	0,38	372,70	0,42	43,03

*Valores expressos por mg de extrato seco.

Fonte: Autores.

Os teores de taninos condensados foram de 54,25mg equivalente de ácido tânico por grama de extrato a partir da dosagem de 2.5mg mL⁻¹, atingindo 372,70mg equivalente de ácido tânico por grama de extrato a partir da dosagem de 10mg mL⁻¹. A atividade do extrato pode estar relacionada aos teores de taninos condensados. O tanino condensado pode interagir com as proteínas na cutícula do nematódeo, evitando a degradação das proteínas de maior

valor biológico não sejam degradadas e utilizadas pela microbiota ruminal, sendo estes complexos dissociados no intestino delgado, local de absorção dos aminoácidos (Waghorn, 2008).

Son-de Fernex et al. (2012) avaliaram a atividade anti-helmíntica de cinco plantas contendo taninos condensados, demonstrando que houve efeito inibitório sobre a motilidade e desembainhamento de larvas de *Haemonchus contortus*. Hoste et al. (2012) avaliaram o efeito anti-helmíntico de *Onobrychis viciifolia* e *Lysiloma latisiliquum* a partir dos taninos condensados, observaram *in vitro*, efeitos como redução de eclodibilidade, inibição do desenvolvimento e motilidade de larvas e adultos.

Quanto aos teores de flavonoides, na concentração de 10mg mL^{-1} , observou-se $0,42\text{mg}$ equivalente de rutina por grama de extrato. Flavonoides podem apresentar ação antimicrobiana, devido formação de complexos da parede bacteriana com proteínas solúveis e também ao rompimento e destruição das membranas microbianas (Soldera, Zanella & Frasson, 2010). Este fato pode ser de grande importância considerando a possibilidade da ocorrência de infecções bacterianas secundárias devido às parasitoses gastrintestinais. A atividade antioxidante dos flavonoides atua no controle da produção de radicais livres (Sousa et al., 2007).

Vijayakumar, Presannakumar & Vijayalakshmi (2008) avaliaram os teores de flavonoides encontrados na polpa de banana e utilizaram em ratos machos *Sprague-Dawley*, os autores concluíram que o consumo de bananas em uma dieta equilibrada pode colaborar na proteção do organismo contra o estresse oxidativo.

A atividade antioxidante correspondeu a $43,03\%$ na concentração de 10mg mL^{-1} , com IC_{50} correspondendo a $0,2765\text{mg mL}^{-1}$. Sobre a atividade antioxidante do EHB, foi possível verificar $\text{IC}_{50} = 276,5\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses resultados foram 17 vezes superiores ao encontrado no ácido ascórbico ($\text{IC}_{50} = 4,900\mu\text{g mL}^{-1}$) sendo esta uma vitamina reconhecida como potente antioxidante utilizada como referência por vários autores (Ilha et al., 2008).

Pereira (2010) relatou atividade antioxidante em extratos hidroalcoólicos, tanto para polpa da banana quanto para casca da banana, sendo o IC_{50} de $690,97\mu\text{g mL}^{-1}$ e $393,44\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, para inibir o radical DPPH esses autores utilizaram concentrações maiores que as apresentadas nesse estudo. Assim, sugere-se que o botão floral da bananeira tenha um maior poder antioxidante do que outras partes da planta.

4. Considerações Finais

O EHB apresenta atividade anti-helmíntica *in vitro*, demonstrando potencial no controle parasitológico de nematódeos gastrintestinais. O efeito anti-helmíntico pode ser devido a presença dos taninos condensados presentes na *Musa paradisiaca*.

Dessa forma, a partir desses resultados obtidos pelos testes *in vitro* realizados pelo presente estudo, será possível justificar a continuidade do mesmo, pela execução dos ensaios *in vivo* pré-clínicos e clínicos, que são essenciais para segurança e validação dos registros de plantas medicinais e fitoterápicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001, pela bolsa concedida para a realização deste projeto e à Universidade Estadual do Norte do Paraná

Referências

Amarante, A. F. T., Junior, J. B., Amarante, M. R. V., & Barbosa, M. A. (1997). Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 73(1-2),89-104.

Bahuaud, D., Martinez-Ortiz-de-Montellano, C., Chauveau, S.; Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., & Hoste, H. (2006). Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology*, 132(4),545-554.

Bizimenyera, E. S., Githiori, J. B., Eloff, J. N., & Swan, G. E. (2006). *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, 142(3-4):336-343.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*, 181(4617):1199-1200.

Boligon, A. A., Pereira, R. P., Feltrin, A. C., Machado, M. M., Janovik, V., Rocha, J. B. T., & Athayde, M. L. (2009). Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*, 100(24),6592-6598.

Brasil, Ministério da Saúde. (2006). *Portaria no 971, de 3 de maio de 2006*. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, 3 de maio 2006. Seção 1,20-25.

Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., & Waller, P. J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44(1-2),35-44.

Costa, K. M. F. M., Ahid, S. M. M., Vieira, L. S., Vale, A. M., & Soto-Blanco, B. (2011). Efeitos do tratamento com closantel e ivermectina na carga parasitária, no perfil hematológico e bioquímico sérico e no grau de ovinos infectados com nematódeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(12),1075-1082.

Fagbemi, T. N., Oshodi, A. A., & Ipinmoroti, K. O. (2005). Processing effects on some antinutritional factors and in vitro multienzyme protein digestibility (IVPD) of three tropical seeds: breadnut (*Artocarpus altilis*), cashewnut (*Anacardium occidentale*) and fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*). *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(4),250-256.

Gordon, H. M., & Whitlock, H. V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the council for Scientific and Industrial Research*, 12(1),50-52.

Hajhashemi, V., Ghannadi, A., & Sharif, B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1):67-71.

Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J. F. J., & Sandoval-Castro, C. A. (2012). Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*, 186(1-2),18-27.

Ilha, S. M., et al. (2008). Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Brasilian Journal of Pharmacognosy*, 18(3),387-393.

Keith, R. K. (1953). The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. *Australian Journal of Zoology*, 1(2),223-235.

Marie-magdeleine, C.; Udino, L.; Philibert, L.; Bocage, B. & Archimede, H. (2014). *In vitro* effects of Musa x paradisiaca extracts on four developmental stages of *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*, 96(1):127-132.

Morais, L. A. S. (2009). Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, 27(2),4050-4063.

Nery, P. S., Nogueira, F. A., Oliveira, N. J. F., Martins, E. R., & Duarte, E. R. (2012). Efficacy of extracts of immature mango on ovine gastrointestinal nematodes. *Parasitology Research*, 111(6),2467-2471.

Neuwirt, N., Gregory, L., Yhoshihara, E., & Gorniak, S. L. (2015). Effect of *Musa* spp. Extract on eggs and larvae of gastrointestinal nematodes from infected sheep. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(6),3751-3757.

Niezen, J. H., Waghorn, T. S., Charleston, W. A. G., & Waghorn, G. C. (1995). Growth and gastrointestinal parasitism in lambs grazing either lucerne (*Mendicato sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *Journal of Agricultural Science*, 125(2),281-289.

Nogueira, F. A., Oliveira, L. N., Silva, R. B., Nery, P. S., Junior, G. F. V., Geraseev, L. C., & Duarte, E. R. (2012). Anthelmintic efficacy of banana crop residues on gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo tests. *Parasitology Research*, 111(1),317-323.

ODS - Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. (2015). *Protocolo Internacional da Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU)*. Recuperado de <https://nacoesunidas.org/pos2015>.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Pereira, G. A. (2015). *Estudo dos parâmetros de extração de compostos fenólicos e avaliação da atividade antioxidante in vitro da banana (Musa sp.)*. 2015. 149 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos: Área de concentração em Engenharia de Alimentos.

Rabel, B., Mcgregor, R., & Douch, P. G. (1994). Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *International Journal for Parasitology*, 24(5),671-676.

Roberts, F. H. S., & O'sullivan, P. J. (1950). Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1(1):99-102.

Rutherford, M. C., & Powrie, L. W. (1993). Allelochemic control of biomass allocation in interacting shrub species. *Journal of Chemical Ecology*, 19(5),893-906.

Soldera, C. C., Zanella, G. N., & Frasson, A. P. Z. (2010). Avaliação da atividade antibacteriana de *Croton urucurana*. *Revista Contexto Saúde*, 10(19),25-31.

Son-De Fernex, E. V., Alonso-Díaz, M. A., Mora, B. V., & Capetillo-Leal, C. M. (2012). *In vitro* anthelmintic of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*, 131(4),413-418.

Sousa, C. M. M., et al. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30(2),351-355.

Souza, C. M. P., Brandão, D. O., Silva, M. S. P., Palmeira, A. C., Simões, M. O. S., & Medeiros, A. C. D. (2013). Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande-Paraíba. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(2),188-193.

Stagos, D., et al. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic *Lamiaceae* species. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11),4115-4124.

Streibig, J. (1988). Herbicide bioassay. *Weed Research*, 28(6),479-484.

Vieira, L. S. (2008). Métodos alternativos de controle de nematoides gastrointestinais em caprinos e ovinos. *Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária*, 2(2),49-56.

Vijayakumar, S., Presannakumar, G., & Vijayalakshmi, N. R. (2008). Antioxidant activity of banana flavonoids. *Fitoterapia*, 79(4),279–282.

Von Samson-Himmelstjerna, G., et al. (2009). Standardization of egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology Research*, 105(3),825-834.

Waghorn, G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - Progress and Challenges. *Animal Feed Science and technology*, 147(1-3),116-139.

Yoshihara, E., Minho, A. P., Cardim, S. T., Tabacow, V. B. D., & Yamamura, M. H. (2014). *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of condensed tannins on gastrointestinal nematode infestations in sheep (*Ovis aries*). *Semina: Ciências Agrárias*, 35(6),3173-3180.

Zhishen, J., & Mengcheng, T. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4),555-559.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Matheus Eduardo Leme – 30%

Erika Cosendey Toledo de Mello Peixoto – 15%

Eidi Yoshihara– 10%

Monica Tiemi Aline Kakimori – 10%

Eriislaine Augusta Portes – 10%

Melissa Monteiro Paiva– 10%

Marcos Augusto Alves da Silva – 15%