

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUIS EDUARDO FERREIRA

**PROSPECÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ATIVOS VEGETAIS COM AÇÃO ANTI-
HELMÍNTICA EM PARASITAS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS**

RIBEIRÃO PRETO-SP

2011

LUIS EDUARDO FERREIRA

**PROSPECÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ATIVOS VEGETAIS COM AÇÃO ANTI-
HELMÍNTICA EM PARASITAS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Universidade de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. René Oliveira Beleboni

Co-Orientador: Prof. Dra. Suzelei de Castro França

RIBEIRÃO PRETO-SP

2011

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

F383p Ferreira, Luis Eduardo, 1985 -
“Prospecção in vitro e in vivo de ativos vegetais com ação
antihelmíntica em parasitas gastrointestinais de ovinos” / Luis
Eduardo Ferreira. - - Ribeirão Preto, 2011.
61 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. René Oliveira Beleboni.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2011.

1. Biotecnologia. 2. Ovinocultura. 3. Extrato de planta. I. Título.

CDD: 660

LUIS EDUARDO FERREIRA

**PROSPECÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE ATIVOS VEGETAIS COM AÇÃO ANTI-
HELMÍNTICA EM PARASITAS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de
Ribeirão Preto para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Agroindústria

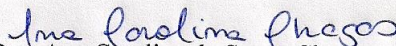
Data da defesa: 15 de dezembro de 2011

Resultado: Aprovado

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. René de Oliveira Beleboni
UNAERP – Universidade de Ribeirão Preto



Prof. Dra. Ana Carolina de Sousa Chagas
Embrapa Pecuária Sudoeste



Prof. Dra. Ana Lucia Fachin Saltoratto
UNAERP – Universidade de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto
2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que acreditaram e contribuíram para a conclusão deste curso. Meus familiares, professores e amigos que me apoiaram ao longo destes dois anos curso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me concedido força, saúde, paz, paciência, esperança e persistência, ao longo destes três últimos anos de muito trabalho.

Durante toda minha vida, nunca perderei oportunidade de agradecer minha família, meu pai Ailton, minha mãe Eni e minha irmã Ana por terem confiado, acreditado e acima de tudo, por ter dado essa grande chance e oportunidade de concluir mais esta etapa da minha vida, e me ajudado a colher todos estes resultados valiosos para minha carreira. Sei o quanto foi difícil e trabalhoso o sacrifício feito por vocês para me apoiar, em todos os detalhes de minha vida. Vocês são base e o alicerce de toda ela, e sem todo esse carinho e atenção que vocês me proporcionaram, eu não seria parte do que sou hoje, adoro e amo vocês, sempre serei grato por tudo.

Agradeço aos meus avós Ari e Adjanira (Vó nina – *in memoriam*), e Adrião (*in memoriam*) e Antônia (vó tona), que são na minha vida os meus segundos pais e mães, me criaram desde bebê, estiveram ao meu lado durante toda minha vida, me dando apoio e incentivo.

Agradeço aos meus tios Humberto e Vera, Enio e Miriam e Marcos, e todos meus primos que também são pessoas que também sempre apoiaram, incentivaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos possíveis da minha vida.

Agradeço ao apoio, carinho e atenção a todos os meus amigos que desde já são muitas turmas a qual pertenço, mas que para mim são como meus irmãos ou minhas segundas famílias: Departamento de Biotecnologia da Unaerp (amigos e professores), Academia Água Viva, Grupo de canto musical do Santuário Nossa Senhora Aparecida, FALP, e companheiros de trabalho na empresa Gold Lab. Vocês são de uma forma geral, foram a base incentivadora de todo este trabalho.

A todos vocês, que pessoas tão valiosas, importantes e especiais em minha vida meu muito obrigado, amo e adoro todos vocês!

Luis Eduardo Ferreira

RESUMO – Um dos mais graves entraves da ovinocultura tem sido o controle de nematóides gastrointestinais no rebanho, sobretudo pelo aparecimento de cepas resistentes aos anti-helmínticos convencionais. Este cenário estimula pesquisas de cunho biotecnológico de modo a avaliar ativos vegetais com atividade anti-helmíntica, seja para o desenvolvimento de fármacos convencionais ou fitoterápicos, se especialmente elencarem vantagens de eficiência, custo e segurança. O presente trabalho teve por objetivo investigar a atividade anti-helmíntica de plantas selecionadas de acordo com critérios etnofarmacológicos e quimiotaxonômicos bem definidos, através de ensaios *in vitro* contra ovos, larvas e adultos de trichostrongilídeos parasitas gastrointestinais de ovinos, e posteriormente em ensaios *in vivo* envolvendo a utilização de animais naturalmente infectados. Considerando a exatidão proporcionada por controles positivo e negativo após padronização dos testes, foram avaliadas as ações ovicidas, larvicidas e contra parasitas adultos de diferentes diluições a partir do extrato aquoso bruto da casca de *Persea gratissima*, das folhas de *Lavandula officinalis*, *Pothomorphe umbelata*, *Alpinia speciosa*, *Annona muricata*, *Achyrocline satureioides*, *Passiflora edulis*, das raízes, haste, folha e flor *Bidens pilosa*. Dos extratos aquosos ensaiados, aquele de *A. muricata* foi o mais efetivo, apresentando efeito inibitório da eclodibilidade de ovos e motilidade larval na ordem de 90-100%, quando comparado ao controle negativo. Ademais, o extrato foi capaz de inibir completamente a motilidade dos parasitas adultos nas primeiras quatro horas de observação do teste, efeito equiparável aquele obtido no controle positivo e diverso do negativo que em 4 horas de experimentação ainda mantinha cerca de 70% da motilidade dos parasitas adultos. Finalmente, o extrato de *A. muricata* foi avaliado para sua ação anti-helmíntica *in vivo*, entretanto, os resultados obtidos não acompanharam o perfil efetivo do extrato como aquele observado para os ensaios *in vitro*.

Palavras Chave: Anti-Helmínticos; Extratos de plantas; Ovinocultura e Trichostrongilídeos.

ABSTRACT – One of the most important problem the sheep farming has been the control of gastrointestinal nematodes in sheep, specially by appearance of strains resistant to anthelmintics conventional. This fact encouraged biotechnology researches for to evaluate anthelmintic activity of plants naturally active, for the developed of drugs conventional or phytotherapy, especially to list the advantage of efficiency, cost and safety. This work aimed to analyze of anthelmintic activity by selected plants according criteria defined as ethnopharmacological and chemotaxonomic, by *in vitro* assay against eggs, larval and adult forms of gastrointestinal parasitic trichostrongylid of sheep, and later *in vivo* to involving naturally infective animals. Considering the accuracy provided by positive and negative controls by standardized test, were evaluated the actions against eggs, larval and adults in different dilutions of the extracts aqueous from the bark of *Persea gratissima*, leaves of *Lavandula officinalis*, *Pothrmorphe umbelata*, *Alpinia speciosa*, *Annona muricata*, *Achyrocline satureioides*, *Passuflora edulis*, roots, stem, leaf, and flowers, *Bidens pilosa*. Among the tested extracts, extract *A. muricata* was the most effective, to showing inhibition of egg hatchability and larval motility in order of 90 – 100%, compared to negative control. Moreover, the extract was able to inhibit completely the motility of parasitic adult in the first four hours of the test observation, effect comparable that obtained in the positive control, and opposite of the negative control in the 4 hours of experiment which had still about 70% of the motility of parasitic adult. Finally, the extract of *A. muricata*, was evaluated for your *in vivo* anthelmintic action, however, the results did not follow the profile of the extract effective as that obtain *in vitro*.

Key words: Anthelmintcs, extract of plants, sheep farm, trichostrongylid.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo natural dos trichostrongilídeos.....	20
2. Fotografias dos exemplares vegetais elencados para os experimentos deste trabalho	29
3. Fazenda experimental Unaerp - Ribeirão Preto-SP.....	32
4. Formas evolutivas de trichostrongilídeos.....	33
5. Larvas L3 de trichostrongilídeos.....	34
6. Coleta dos parasitas adultos de <i>H. contortus</i>	35
7 e 8. Efeito de diferentes tratamentos com extratos aquosos na eclodibilidade de ovos de trichostrongilídeos ($p<0,05$).....	39 e 40
9 e 10. Efeito de diferentes tratamentos com extratos aquosos na motilidade de larvas de trichostrongilídeos ($p<0,05$).....	41 e 42
11. Efeito com tratamento de extrato aquoso de <i>A. muricata</i> na motilidade dos parasitas adultos de <i>H. contortus</i> ($p<0,05$).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Resultados de OPG (ovos/g de fezes) para cada grupo de animais nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 do experimento <i>in vivo</i> com <i>A. muricata</i> ($p < 0,05$).....	44

SUMÁRIO

Assunto	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Panorama sócio econômico genérico da ovinocultura.....	14
2.2. Desafios da ovinocultura: Verminoses gastrintestinais.....	16
2.3. Principais gêneros de helmintos parasitas gastrointestinais de ovinos.....	19
2.3.1. <i>Haemonchus contortus</i>	21
2.3.2. <i>Teladorsagia circumcincta</i>	21
2.3.3. <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	22
2.4. Fármacos anti-helmínticos usuais e o problema da resistência	22
2.4.1. Imidotiazóis	23
2.4.2. Benzimidazóis	23
2.4.3. Lactonas Macrocíticas.....	23
2.5. Fitoterapia e ativos vegetais elencados para teste de atividade anti-helmíntica no presente trabalho.....	24
3. OBJETIVO	30
3.1. Objetivos gerais.....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Preparação dos extratos.....	31
4.2. Manutenção de animais para obtenção de ovos, larvas e parasitas adultos de trichostrongilídeos	31
4.3. Ensaio da inibição da eclodibilidade de ovos para trichostrongilídeos	32
4.4. Ensaio de motilidade larval para trichostrogilídeos.....	33
4.5. Ensaio de motilidade de parasitas adultos <i>H. contortus</i> com <i>A. muricata</i>	34
4.6. Ensaio <i>in vivo</i> com extrato aquoso de <i>A. muricata</i>	36
4.7. Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	51
7. BIBLIOGRAFIA	53

APÊNDICE A

60

APÊNDICE B

61

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a criação de ovinos foi explorada de maneira intensa nas últimas décadas, principalmente pelo interesse na obtenção de derivados como carne, leite e lã. A carne, sobretudo, tem despertado o forte interesse recente da classe média no sul e sudeste do país. No entanto, se por um lado tal atividade se apresenta como uma forte alternativa pecuária, por outro, o despreparo relativo dos criadores, muito antes da cultura se fortalecer, apresentou-se como problema para maior expansão do negócio. Dentre alguns dos entraves, o tratamento desordenado de parasitoses, inclusive gastrointestinais, trouxe ao longo do tempo, resistências de várias espécies parasitárias para muitas das drogas anti-helmínticas até então amplamente utilizadas.

É sabido que a utilização de plantas como fonte medicinal consiste de uma alternativa milenar na cura de muitas doenças, tanto para humanos como para animais de criação. Esta sistemática também se aplicada ao controle de parasitoses, incluindo aquelas gastrintestinais em ovinos, o que norteia as perspectivas para o desenvolvimento de fitoterápicos que venham auxiliar no tratamento e controle das infecções parasitárias.

Tal paradigma impulsiona pesquisas biotecnológicas que tem por objetivo avaliar extratos e ativos isolados de espécies de plantas de caráter medicinal, que contenham atividade anti-helmíntica e possam auxiliar os fármacos atualmente utilizados. Neste trabalho, através de ensaios *in vitro*, extratos naturais de origem vegetal foram avaliados quanto suas eficácias na inibição de eclodibilidade de ovos, diminuição da viabilidade larval e de parasitas na fase adulta, de algumas espécies de nemátodos causadores de parasitoses gastrointestinais em ovinos, nomeadamente da classe dos trichostrongilídeos. Em seguida, o extrato de melhor efetividade foi avaliado *in vivo*, com animais contaminados naturalmente, seguindo as regulamentações experimentais de testes estabelecidas pelo governo federal para validação de ativos de interesse veterinário.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Panorama sócio econômico genérico da ovinocultura

A criação de ovinos e caprinos, caracterizada como uma cultura rústica e adaptável a diversas condições climáticas, solos e vegetações, é praticada em vários continentes. No mundo, apesar de ainda representar 5% do volume total de carnes produzidas, a produção de carne ovina e caprina passou por aumento de 6,5% entre 2003 e 2005, o que resultou no maior avanço relativo comparado aos principais tipos de carnes consumidas para o período (NOGUEIRA e JUNIOR, 2005). Segundo a Associação Paulista de Criadores de Ovinos (ASPACO), o comércio dos produtos derivados da criação de ovinos e caprinos movimentou US\$ 11 bilhões por ano no mundo (ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE CRIADORES DE OVINOS, 2010).

No Brasil, país com ampla diversidade climática, a ovinocultura se consolidou e se fortaleceu no mercado pecuarista nos últimos anos, se tornando uma alternativa promissora de comércio, destacando a carne, lã e pele como os principais derivados desta prática. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO), apesar do superávit, o Brasil detém menos de 1% da produção mundial de carne ovina, e seu consumo ainda é de 400 gramas por habitante. Para dado comparativo, no ano de 2010, o rebanho total de ovinos em todo Brasil foi de cerca de 16,4 milhões de cabeças. O objetivo para os próximos anos é elevar o plantel e proporcionar maior oferta da carne, de modo que seu consumo seja de aproximadamente 2,5 quilos por habitante/ano (JORNAL O ESTADO DE SÃO PAULO, 2010).

As qualidades da carne de cordeiro, que corresponde ao carneiro abatido entre 110 e 120 dias, vão muito além do sabor e da maciez. Este tipo de carne é fonte excelente de proteína, ferro, fósforo, cálcio, vitaminas, inclusas as do complexo B, além de ser de baixo teor calórico e pobre em tipos de gorduras prejudiciais à saúde humana. Considerando a importância nutritiva da carne e, sobretudo, a importância da prática para a economia pecuária nacional nas últimas décadas, as características da atividade e plantel assumem finalidades e contornos particulares em cada região do país (SANTHANNA, 2010).

No nordeste brasileiro, a criação de ovinos é bastante antiga e tradicional, sendo os primeiros animais trazidos ainda pelos colonizadores. Nesta região, a

cultura de maneira subsistencialista, possui grande importância socioeconômica, sendo destinada principalmente a população de baixa renda, por constituir a principal fonte de proteína animal através da carne, e do leite para fabricação de seus derivados. Em regime de pecuária extensiva, a região detém cerca de 56,30% da produção nacional, pois que também é favorecida pelas características geoclimáticas. Deste modo, o manejo de animais é feito ainda de modo rudimentar, sem padronização da produção ou processamento e da destinação logística-comercial de seus derivados bem planejadas (LEITE, 2000).

No estado de São Paulo, onde a prática ganha contornos cada vez mais robustos, o rebanho aumentou de 257.400 mil para 324.700 mil cabeças no período de 1996 a 2005, o que corresponde a um aumento de 26,10%, atingindo nos últimos três anos um salto de produção da ordem de 83% (JORNAL ESTADO DE SÃO PAULO, 2010). Neste estado, a ovinocultura é direcionada para produção comercial de carne, oferecendo cortes especiais com altos valores agregados, destinados principalmente a consumidores de classe média-alta (LONAS NEGRAS, 2010). Dada a exigência maior deste tipo de público consumidor, a produção é mais padronizada e envolve uso de tecnologias sofisticadas, melhoramentos genéticos, uso de inseminação artificial com controle da produção e programação das parições, cruzamento de embriões com alto potencial zootécnico, melhoria da gestão das unidades produtivas, e programa estratégico na prática da vermifugação levando em consideração a dosagem, periodicidades das aplicações, condições climáticas e ambientais da região e do pasto. Estas ações favorecem a manutenção do controle de qualidade do plantel e dificulta o desenvolvimento dos diferentes estágios do parasita gastrointestinal infectante (NOGUEIRA e JUNIOR, 2005).

Este segmento no estado paulista é favorecido pela proximidade dos mercados consumidores, facilidades de escoamento da produção, abatedouros e frigoríficos destinados ao abate e corte de pequenos animais, aproveitando-se da tradição do estado na prática da bovinocultura de corte e leite. Entretanto, a produção paulista ainda não atende completamente a demanda interna de consumo, o que faz o estado negociar carne com o estado do Rio Grande do Sul, ou mesmo importar carne do Uruguai, principal fornecedor e responsável por 10% da carne consumida no Brasil, além de Argentina, Austrália e Nova Zelândia (YONEYA, 2011; EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, 2010; STAUDT e SILVA, 2008).

O estado do Mato Grosso, com perfil de manejo e criação do rebanho semelhante ao do estado de São Paulo, registrou nos últimos três anos um aumento

superior a 27% na participação da criação e produção de carne ovina no Brasil (SANTHANNA, 2010).

A região sul do país, onde a atividade também se consolidou de modo considerável, é a segunda maior criadora de ovinos. Seu manejo do rebanho está direcionado principalmente para a produção de lã destinada para a indústria têxtil, em detrimento da produção da carne. No entanto, pesquisas realizadas entre açougues e redes de supermercados também registraram nos últimos dois anos um aumento de 21% nas vendas de carne ovina (CHOA, 2010; EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, 2010).

Ainda que a exportação brasileira da carne ovina para outros países seja insignificante, o sucesso recente do mercado de criação de ovinos no Brasil tem chamado à atenção de países vizinhos, o que mantém ciclos de negócios e trocas de experiências entre produtores e mesmo pesquisadores do Brasil e Argentina (OJIMA; BEZERRA; OLIVEIRA, 2006).

Dentro da cadeia produtiva a pele ainda é um derivado importante, considerado souvenir de grande valia, apresentado na forma de napa, pelica e camurça, na produção de roupas e calçados. A União Européia é o principal importador de peças do Brasil, tendo comprado por volta de 300 toneladas de pele somente no ano de 2004 (NOGUEIRA e JUNIOR, 2005).

Em suma, o plantel de ovinos, ainda que em recrudescimento no mercado pecuário, tanto no Brasil como no mundo, mostra ser uma cultura vantajosa e em expansão, com enormes perspectivas de sucesso, se arranjada de modo racional e se superar seus grandes desafios.

2.2. Desafios da ovinocultura: Verminoses gastrintestinais

O aquecimento da atividade mostrou mais nitidamente os problemas envolvidos na criação. Estes vão desde a carência de informações técnicas quanto ao manejo, vermifugações realizadas sem auxílio veterinário somado a erros nas dosagens, administrações, aplicações e periodicidades, falta de controle estratégico associado a estação geoclimática do ano, uso freqüente da mesma classe farmacológica anti-helmíntica, clandestinidade de criadouros e abatedouros, baixa adesão a eventuais programas de apoio governamental e até o uso de pouca tecnologia que alternativamente visam baratear o custo de produção (VIEIRA, 2008). O confinamento de um número muito grande de animais por piquetes também é uma

prática comum, especialmente no estado de São Paulo, o que amplia os riscos de doenças (FURTADO, 2006), e resulta em perdas diretas e indiretas em função de entraves sanitários e zootécnicos, como deficiências nutricionais, e proliferação de doenças infecciosas ou parasitárias tal como verminoses ou helmintíases (MELO; NOGUEIRA; RODRIGUES, 2005).

Dentro da cadeia produtiva, as infestações gastrointestinais por helmintos são uma das importantes causas de prejuízos econômicos e déficit na produtividade da ovinocultura, sendo um fator limitante para este setor, o que faz assumir uma posição de destaque dentre as dificuldades e problemas enfrentados no plano de produção (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006).

No rebanho, dependendo da espécie e grau de intensidade de infecção, os danos patológicos causados pelos endoparasitas são manifestados de várias formas. O parasita gastrintestinal na forma adulta, por ser hematófago, espolia a mucosa da parede intestinal por sucção do sangue durante até 12 minutos dependendo da espécie, seguido após, por 7 minutos de plena hemorragia e exsudação protéica provocada pela lesão intestinal chamada de gastrite verminótica. A intensidade de infecção pode fazer o animal perder até 145 mL de sangue por dia, e como consequência, o animal é levado a um quadro clínico de severa anemia e hipoproteinemia (VIEIRA, 2008; MACIEL et al., 2006). Os sintomas diretos são apresentados pela palidez na conjuntiva e mucosa oral, edema subcutâneo e submandibular, fraqueza, anorexia e diarreia. Nos casos agudos, a infecção pode ser letal para o animal, e em casos crônicos a sintomatologia indireta é encontrada na dificuldade de desenvolvimento corporal e retardo no ganho de peso, o que minimizam a produção de carne, leite e outros derivados, além de ampliar as taxas de mortalidade do rebanho (FURTADO, 2006).

Dentro do contexto dos entraves e desafios enfrentados pela pecuária ovina, os mecanismos de resistência animal para com as verminoses citadas, devem ser acompanhados a favor. Dessa forma fatores como faixa etária, raça, integridade imunológica e fisiológica, estado nutricional, e manejo dos animais, exercem grande influência na resistência frente as endoparasitoses. O grau de infecção do ovino, dentre muitas causas, pode também estar associado à idade do animal. Um animal recém nascido e em período de lactação, possui ainda seu sistema imunofisiológico fragilizado, o que amplia a suscetibilidade de infecções parasitárias. A alimentação aliada ao manejo e condição das pastagens, também exerce grande influencia, uma vez que dietas a base de proteína após o desmame favorecem a melhoria do

funcionamento do sistema imunológico e fisiológico, o que auxilia na manutenção da resistência contra infecções.

A genética, sobretudo, tem se mostrado importante na resistência dos ovinos contra os parasitas. As diferenças entre as raças podem ser usadas na seleção de animais como parte de programas de cruzamentos. Amarante (2006) cita algumas raças de ovinos na qual a resistência pode ser constatada, tais como as raças Florida Native e Gulf Coast, ambas presente no Sul dos EUA; St. Croix e Barbados Blackbelly, oriundas do Caribe; Scottish Blackface escocesa; e Red Maasai Africana. No Brasil, a raça Santa Inês obteve maior destaque na resistência contra o parasita da espécie *Haemonchus contortus*, espécie de maior prevalência, comparado com a raça européia Ile de France, (ROCHA; AMARANTE; BRICARELLO, 2005).

A resistência dos nematóides gastrointestinais aos anti-helmínticos usuais se destaca como sendo um dos principais fatores limitantes no controle de verminoses do rebanho. Tal consequência foi a quase inviabilização dos anti-helmínticos para o controle efetivo da doença parasitária, o que reflete em resultados de produção negativos diretos e indiretos (VIEIRA, 2008; MELO; BEVILAQUA; REIS, 2009).

Os primeiros relatos de resistência helmíntica tiveram início nas três últimas décadas, e atingiu gravidade ímpar em todas as regiões do mundo, com destaque para os países tropicais e subtropicais da América de Sul (RODRIGUES et al., 2007). Tanto no Brasil como em outros países, a problemática se iniciou com a tentativa de controle das parasitoses através do uso intensivo e indiscriminado de drogas anti-helmínticas convencionais, com erros de dosagem (sub-dosagem) e periodicidade inadequada de administração dos fármacos e uso contínuo da mesma classe farmacológica anti-helmíntica sem rotatividade (FURTADO, 2006).

Em alguns países tal resistência aos anti-helmínticos disponíveis tornou-se tão evidente que coloca em alto risco toda a produtividade do rebanho (MELO et al., 1998). Nos Estados Unidos (Texas) e na França, cuja criação de caprinos para produção leiteira chega a cerca de 1.200.000 cabeças, a infecção por parasitas, principalmente pela espécie *H. contortus*, aparece como problema de grande relevância (PARAUD e CHARTIER, 2003). Na Índia, pesquisas realizadas em fazendas criadoras de caprinos, além de mostrarem a existência da resistência anti-helmíntica, indicam também a alta prevalência de infecções gastrointestinais por *H. contortus* (TARIQ; CHISHTI; AHMAD, 2010).

A resistência pode ser notificada pelo criador em animais que mantiveram os sinais e sintomas da doença mesmo após a constante administração do fármaco

anti-helmíntico. Apesar do processo de seleção ocorrer de maneira silenciosa e gradativa, são necessários de cinco a oito ciclos parasitários para que a população de parasitas exibam resistência. Tal processo é delineado pela ocorrência de três eventos biológicos bem característicos, cujo conceito é dividido em estabelecimento, desenvolvimento, e dispersão. O estabelecimento está intimamente relacionado ao tamanho e diversidade da população, pois favorece as taxas de mutações entre os genes alelos envolvidos na resistência. O desenvolvimento corresponde à utilização do agente seletivo, que na prática, seria o fármaco anti-helmíntico convencional. A dispersão dos genes é resultado do fluxo e migração gênica que ocorre através dos cruzamentos entre os indivíduos da espécie que parasitam o ovino, influenciado pelo manejo inadequado e equivocado por parte dos criadores (MELO; BEVILAQUA; REIS, 2009).

2.3. Principais gêneros de helmintos parasitas gastrointestinais de ovinos

Os gêneros de helmintos gastrointestinais de maior importância relativa aos prejuízos e impactos econômicos para o plantel pertencem à família Trichostrongylidae, conhecidos coletivamente por trichostrongilídeos. Esta família é representada principalmente pelos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia* (*Teladorsagia*), *Nematodirus* (FURTADO, 2006). Outras espécies de diferentes famílias também são relevantes, tais como dos gêneros *Strongyloides*, *Moniezia*, *Cooperia*, *Oesophagostomum*, *Skrjabinema*, *Trichuris* e *Cysticercus* (RODRIGUES et al., 2007).

Os trichostrongilídeos são parasitas hematófagos com formato capilariforme, e apesar de possuírem ciclos evolutivos semelhantes, cada espécie possui tropismo para um determinado órgão do sistema digestivo do ruminante. No meio ambiente, o grau de precipitação pluviométrica, a umidade relativa do ar e a temperatura interferem no ciclo de vida do parasita. Deste modo, o fator ambiental, associado ao grau de infecção parasitária no rebanho, deve ser levado em consideração, observando-se que o período de chuvas favorece o desenvolvimento e manutenção do ciclo parasitário aliado ao recrudescimento das infecções e prejuízos no campo (VIEIRA, 2008).

O ciclo evolutivo natural, ilustrado na figura 1, se inicia quando fezes de animais contaminados atingem o solo em condições ótimas de desenvolvimento. Os

ovos embrionados se diferenciam em ovos larvados. Destes últimos eclode uma larva rabiditóide de vida livre L1, que se desenvolve para o estágio L2. Tanto as larvas L1 quanto L2 se alimentam de bactérias presentes nas fezes dos animais. Posteriormente, depois de cerca de sete dias, as larvas atingem o estágio L3 infectante que não se alimentam, mas utilizam de suas reservas energéticas. Neste estágio as larvas migram das fezes para a vegetação, na qual a atividade de irrigação e o período anual de chuva favorecem a manutenção e desenvolvimento das mesmas. Estas larvas ditas L3 infectam o animal quando ingeridas durante o pastejo.

Na fase parasitária, a larva L3 sofre duas diferenciações, as quais levam ao desenvolvimento de estruturas anatômicas, tais como a lanceta perfurante, e mecanismos de patogenicidade que permitem auxiliam na efetividade da infecção no hospedeiro. Nele o parasita lesionará e espoliará a mucosa da parede intestinal para obtenção de sangue diretamente dos vasos sanguíneos. Quando adultos, os parasitas apresentam características sexuais dimórficas, ou seja, macho e fêmea, que após acasalamento, liberam para o meio ambiente novos ovos embrionados junto às fezes do animal infectado para que um novo ciclo de contaminação se inicie (URQUHART et al., 1998; MACHADO, 2008).

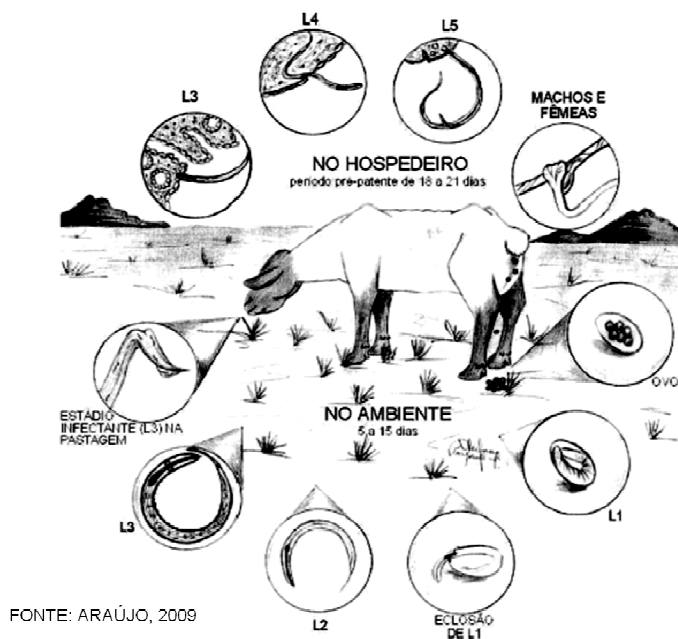


Figura 1: Ciclo natural dos trichostrongilídeos.

Quanto às principais espécies de trichostrongilídeos temos:

2.3.1. *Haemonchus contortus*

A espécie *H. contortus*, cuja classificação taxonômica segundo Urquhart et al. (1998) é apresentada abaixo, é a que apresenta a maior frequência de infecção gastrointestinal nas criações de ovinos e caprinos, se destacando ainda por ser de alta patogenicidade, levando a morte de mais indivíduos do rebanho quando comparada às demais espécies da família. Este parasita é conhecido popularmente como “lombriga da colheita” ou “verme marrom da colheita” (MACHADO, 2008). O parasita, em sua fase adulta, quando presente na mucosa do abomaso, alimenta-se de grandes quantidades de sangue, precipitando muitas vezes um quadro clínico de forte anemia (FURTADO, 2006), perda de apetite, alterações do metabolismo protéico, energético e mineral no animal parasitado (OLIVEIRA et al., 2009).

Filo	Nemathelminthes
Classe	Secernentea
Ordem	Strongylida
Sub Família	Trichostrongyloidea
Família	Trichostrongylidae
Gênero	<i>Haemonchus</i>
Espécie	<i>H. contortus</i>

2.3.2. *Teladorsagia circumcincta*

A espécie *T. circumcincta*, gênero que segundo Halliday e Smith (2011) também o chama de *Ostertagia*, assim como o *H. contortus*, parasita o abomaso de pequenos ruminantes. Muitas vezes confundido com o *H. contortus*, também é chamado de “lombriga da colheita” ou “verme marrom da colheita” (MACHADO, 2008). Segundo Urquhart et al. (1998) a classificação taxonomia da espécie é como a que se segue abaixo:

Filo	Nemathelminthes
Classe	Secernentea
Ordem	Strongylida
Sub Família	Trichostrongyloidea
Família	Trichostrongylidade
Gênero	<i>Ostertagia</i>
Espécie	<i>O. (Teladorsagia) circumcincta</i>

2.3.3. *Trichostrongylus colubriformis*

O nemátodo *T. colubriformis* segundo Urquhart et al. (1998) é o segundo parasita de maior freqüência nas criações de ovinos e caprinos. O intestino delgado é o local onde se aloja no hospedeiro, lesando a mucosa, o que provoca extravasamento exsudativo de proteínas do soro sanguíneo para a luz intestinal, provocando um quadro clínico caracterizado por anorexia, diarreia e edema submandibular. O nematódeo é conhecido popularmente como “verme da diarreia negra” ou “verme vermelho do intestino” (FURTADO, 2006). Os dados taxonômicos são apresentados abaixo:

Filo	Nemathelminthes
Classe	Secernentea
Ordem	Strongylida
Sub Família	Trichostrongyloidea
Família	Trichostrongylidade
Gênero	<i>Trichostrongylus</i>
Espécie	<i>T. colubriformis</i>

2.4 Fármacos anti-helmínticos usuais e o problema da resistência

O mercado dispõe de vários anti-helmínticos, que pressupõem oferecer segurança e eficácia no controle e combate aos nematóides. Em geral, a classificação dos fármacos em classes é baseada nos mecanismos de ação contra as diferentes fases evolutivas dos parasitas e quanto à estrutura química dos diferentes compostos. Neste contexto, o mecanismo de ação de um anti-helmíntico envolve vias ligadas à integridade celular e bloqueio neuromuscular do parasita, os quais de maneira indireta conduzirão ao esgotamento de suas reservas energéticas, paralisia muscular, e sua expulsão do hospedeiro. Desta maneira, as drogas anti-

helmínticas podem ser classificadas em três classes distintas: Imidotiazóis, Benzimidazóis, e Lactonas Macroclílicas (RODRIGUES et al., 2007).

2.4.1. Imidotiazóis

Composta basicamente pelos fármacos tetramisol e o levamisol, sendo amplamente conhecida e utilizada. Estes fármacos atuam como agonistas de receptores nicotínicos em células musculares somáticas, levando à paralisia espasmática de toda musculatura do parasita na fase larval e adulta, podendo levar então à morte do helminto por inanição (KAHN e LINE, 2011; RODRIGUES et al., 2007; ALMEIDA et al., 2010).

2.4.2. Benzimidazóis

Os principais fármacos que compõem esta classe são febendazol, mebendazol, osfendazol e oxbandazol, além dos clássicos tiabendazol e albendazol. Tais fármacos agem por inibir o potencial de polarização dos microtúbulos celulares dispostos no citoplasma celular, levando ao bloqueio da formação do fuso mitótico, envolvido no processo de divisão celular, motilidade e secreção celular de neurotransmissores, organização arquitetônica citoplasmática, absorção e transporte de nutrientes e metabolismo energético, além da excreção de resíduos celulares tóxicos (MELO; BEVILAQUA; REIS, 2009).

2.4.3. Lactonas Macroclílicas

As lactonas macroclílicas consistem em uma classe de fármacos anti-helmínticos cujo advento é proveniente de estudos envolvendo a fermentação de microorganismos pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Dentro desta classe está contido o grupo das avermectinas, composto pelos fármacos abamectina, doramectina e selemectina, sendo as ivermectinas pioneiras no mercado veterinário. Estudos descrevem seu funcionamento com base na atividade agonista para neuroreceptores do ácido gama amínobutírico (GABA), levando a hiperpolarização celular por aumento do influxo de íons cloro (KAHN e LINE, 2011). Tendo em vista que o medicamento desta classe não ultrapassa a barreira hematoencefálica facilmente, estando, pois, impedido de atuar em receptores GABA

de mamíferos, costuma-se dizer que tal classe apresenta toxicidade reduzida, muito embora receptores GABA possam ser encontrados no sistema nervoso periférico destes animais (BORGES, 2007).

Sobre a resistência, Ramos et al. (2002) relata o comportamento das espécies parasitárias de maior prevalência nos rebanhos para cada fármaco, sendo que: *H. contortus*, possui inúmeras cepas resistentes ao tiabendazol e ao levamisol; cepas da espécie *T. colubriformis* são conhecidas por serem resistentes ao levamisol e ao tetramisol; cepas de *O. circumcincta* resistentes também ao levamisol, além de muitas destas cepas serem também resistentes a drogas como oxfendazol e closantel (MELO et al., 1998). No desafio de superar o problema da resistência por estes fármacos, foi desenvolvida a ivermectina, que a princípio mostrou-se bastante eficaz, porém mais tarde, a resistência também se estabeleceu. De fato, na Holanda, segundo Borgsteede et al. (2010), tem sido detectada resistência helmíntica ao fármaco ivermectina principalmente para as espécies *H. contortus* e *T. circumcincta*. Testes recentes para a determinação do grau de resistência o levamisol, albendazole, ivermectina, e triclofrom, indicaram resistência múltipla a dois ou mais fármacos da mesma classe farmacológica, ou cruzada, com resistência simultânea a fármacos de classes farmacológicas distintas. A grande intensidade desta resistência foi demonstrada tanto para espécie *H. contortus* quanto para *T. colubriformis* (ALMEIDA et al., 2010).

2.5. Fitoterapia e ativos vegetais elencados para teste de atividade anti-helmíntica no presente trabalho

O tratamento clássico envolvendo a utilização de drogas anti-parasitárias, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN, 2009), movimentou cerca de 961 milhões de reais no mercado veterinário no ano de 2009. As conseqüências deixadas por este estalão vão muito além da elevação de custos do manejo do plantel veterinário. Além do problema da resistência descrita anteriormente, existe também a possibilidade de contaminações da carne e leite animal, levando a impactos negativos para a saúde humana.

Muitas estratégias de manejo pecuário a fim de coibir e minimizar o grau de infecção parasitária estão sendo utilizadas. Em paralelo, a indústria farmacêutica, que dispõe de inúmeras técnicas baseadas em recursos biotecnológicos, investe em pesquisas em diferentes segmentos visando encontrar formas alternativas de inibir

os abalos econômicos causados pelos nematóides no setor veterinário. Neste sentido, a fitoterapia consiste em uma alternativa no tratamento parasitário, atraindo a comunidade científica. De uma maneira breve, a fitoterapia consiste na pesquisa e estudo de espécies vegetais que podem ser utilizadas em partes ou no todo em tratamentos médicos humanos ou veterinários. Dentro do perfil pecuário atual, esta estratégia pode ser entendida como uma ferramenta a mais no objetivo de se ofertar novas opções terapêuticas que auxiliem no controle do entrave zootécnico vivenciado na ovinocultura.

A escolha de plantas para pesquisa de novos ativos deve se alicerçar quando possível em sólida pesquisa etnofarmacológica e fitoquímica. Cumpre salientar que a escolha das plantas empregadas neste trabalho está de comum acordo com suas potenciais propriedades anti-parasitárias, alicerçada em informações prévias descritas na literatura científica. A seleção compreende também a análise da caracterização fitoquímica, tendo como premissa a presença de classes de compostos fitoquímicos conhecidamente ativos como anti-helmínticos, e análise do potencial vermífugo de outros membros da família e gênero de vegetais, bem como, quanto ao conhecimento etnofarmacológico e uso popular para a atividade fim. Finalmente, é importante destacar que a maioria das plantas escolhidas e listadas abaixo é amplamente distribuída no território nacional, o que facilita em muito a disposição de matéria-prima para o laboratório de pesquisa. Como principal fonte de pesquisa para avaliação das informações etnofarmacológicas foram utilizados os seguintes sites: www.plantamed.com.br; www.plantasquecuram.com.br; www.curaplanta.com.br; www.cantoverde.org, acessados no período entre agosto e outubro de 2010. Neles foi realizado um levantamento criterioso sobre família, gênero, propriedades e informações quanto às ações farmacológicas de acordo com as informações populares, classes fitoquímicas presentes na planta e toxicidade, abalizadas por outros trabalhos científicos citados abaixo.

Tendo como base as premissas supracitadas foram elencadas oito espécies de plantas para teste: *Persea gratissima* Gaertn. (Laureaceae) (Abacateiro - Figura 2A), *Lavandula officinalis* Chaix & Kitt (Lamiaceae) (Alfazema - Figura 2B), *Pothomorphe umbelata* (L.) Miq. (Piperaceae) (Capeba - Figura 2C), *Alpinia speciosa* Schum. (Zingiberaceae) (Colônia - Figura 2D), *Annona muricata* L. (Annonaceae) (Graviola - Figura 2E), *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) (Macela do Campo - Figura 2F), *Passiflora edulis* Sims.

(Passifloraceae) (Maracujá Peroba - Figura 4G), e *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) (Picão - Figura 2H).

Brevemente, dentre os membros da família Zingiberaceae a espécie *Zingiber officinale* é conhecida popularmente como gengibre. Estudos recentes dos compostos [6]-gingerol, [10]-shogaol, [10]-gingerol, [6]-shogaol e hexahidrocurcumina, isolados das raízes desta planta indicaram a presença de atividade anti-helmíntica contra a larva do parasita *Angiostrongylus cantonensis*, causador da doença Angiostrongilíase (LIN et al., 2010). Muitos estudos são realizados com as espécies da família Annonaceae, indicando a presença de numerosos constituintes fitoquímicos tal como fenóis, taninos, catequinos, flavonóides, triterpenos, alcalóides (SOUZA et al., 2008), e, sobretudo, das acetogeninas, classe de compostos reconhecidamente parasiticida, como mostrado no trabalho de Malebo et al. (2009) com acetogeninas isoladas de *Annickia kummeriae*. Neste sentido, pesquisas têm sido efetuadas utilizando várias espécies, principalmente do gênero *Annona*, a fim de classificar e avaliar todas as cerca de 70 tipos e classes diferentes de acetogeninas, extraídas de espécies como *Annona cherimolia*, *Annona squamosa*, *Annona cornifolia*, *Annona montana*, *Annona muricata* e *Annona mutans*.

A espécie *P. gratissima* conhecida popularmente como abacateiro, consiste de uma árvore de grande porte podendo alcançar até 20 metros de altura, sendo encontrada principalmente nos países da América Central e Sul. Para fins medicinais, cujas propriedades são anti-anêmica, anti-diarréica, antiinflamatória, anti-oxidante, é comum o uso de diferentes partes da planta, no entanto, quando se busca pelo seu potencial anti-helmíntico, normalmente apenas a casca do caule é utilizada. A planta é rica em taninos, metil eugenol, dopamina, quecicina, flavonóides e óleos essenciais. Sua importância passa pelo uso culinário, em que a polpa da fruta é comestível (KRUTHIVENTI e KRISHNASWAMY, 2000; JOSEPH e KOUKOURAS, 2002).

A espécie *L. officinalis* conhecida popularmente como alfazema, é de pequeno porte, com tamanho que varia de 30 a 80 cm de altura, possui folhas pequenas, duras e finas, sendo encontrada principalmente em regiões mediterrâneas. De acordo com a informação popular, a planta é indicada pelas propriedades analgésica, anti-anêmica, anticonvulsivante e anti-helmíntica. Seus principais constituintes fitoquímicos são óleos voláteis, flavonóides, taninos e cânfora. Dentre os estudos publicados, baseados na constituição dos óleos voláteis,

estão testes *in vitro* aplicados no combate a fungos, principalmente da espécie *Phytophthora infestans* que atacam plantações de tomate (SOYLU; SOYLU; KURT, 2006) e aqueles que destacam seu efeito diurético pelo uso de infusão das flores (ELHAJILI et al., 2001).

A espécie *P. umbelata* conhecida popularmente como capeba é uma planta de pequeno porte com tamanho que varia entre 1 a 2 metros de altura e folhas largas e grandes. Dentre suas propriedades medicinais estão a anti-relmática, antianêmica, antiinflamatória, diurética, larvicida e anti-helmíntica, antioxidante, citotóxica e fotoprotetora na prevenção do câncer de pele. Na literatura há estudos baseados em suas propriedades antiinflamatórias e analgésicas confirmados pelo uso de extratos aquosos (PERAZZO et al., 2005), bem como nas propriedades citotóxica e antitumoral do extrato bruto obtido de partes aéreas da planta (SACOMAN et al., 2008). Trabalhos também mostraram a atividade antimalarial do 4-Nerolidylcatechol isolado da espécie (PINTO et al., 2009). No contexto farmacêutico, testes estão sendo feitos com manipulações dermocosméticas com a finalidade de prevenção e combate dos danos fotooxidativos causados na pele, envelhecimento cutâneo e câncer de pele (ALMEIDA et al., 2008).

A espécie *A. speciosa* conhecida popularmente como colônia, é uma planta nativa do Brasil, possui pequeno porte, com folhas lanceoladas, compridas e pontiagudas. Apesar de seu caráter abortivo, possui propriedades farmacológicas como a antihipertensiva, antiulcerogênica, diurética, calmante, estimuladora da motilidade intestinal e anti-helmíntica. A análise fitoquímica mostrou a presença de alcalóides, flavonóides, catequina, taninos e óleos essenciais. Na literatura científica, há poucos estudos sobre a espécie, destacando apenas as propriedades diuréticas (MENDONÇA et al., 1991), e aqueles que mostram a presença de dihidrochalcona identificada junto com outros seis compostos fenólicos presentes no rizoma da planta (ITOKAWA; MORITA; MIHASHI, 1981).

A espécie *A. muricata* conhecida popularmente como graviola é uma árvore de clima tropical encontrada principalmente nos países da América Central e Sul. Trata-se de uma planta de grande porte, folhas grandes, casca fina e lisa, e frutos comestíveis. Conforme supracitado são encontradas em sua família plantas ricas em acetogeninas, das quais podemos destacar: squamocina, reconhecida por possuir ação inseticida, mutagênica, fitotóxica e genotóxica (OASA et al., 2010); Annonacina com atividade citotóxica contra células humanas de ovário e mama (LIAW et al., 2004); Montalicina G e H, que possuem atividade contra hepatoma humano HepG2

(LIAW et al., 2005); Annomontacina; Cis-annontacina; Muricina; entre outros. No contexto parasitológico e antimicrobiano, estudos avaliaram a ação antiparasitária, no que podemos citar os testes com extratos metanólicos de *A. muricata* e *A. cherimolia* contra *Entamoeba histolítica* (BORIES et al., 1991), e contra os protozoários *Leishmania braziliensis* e *Leishmania panamensis*, ambos agentes da Leishmaniose (JARAMILLO et al., 2000). Segundo trabalho realizado por Souza et al. (2008), o extrato aquoso de *A. squamosa* mostrou a ação inibitória de 52% na eclodibilidade de ovos contra o parasita *H. contortus* o que confirma a tradição do gênero botânico em pesquisas de âmbito parasitológico e, sobretudo nos testes similares aos que serão realizados neste trabalho.

A espécie *A. saturoioides*, conhecida popularmente como macela do campo, ou camomila nacional, possui porte pequeno e rasteiro em forma de touceira, com tamanho médio de 30 cm de altura. É originária da América do Sul e utilizada como antibactericida, antidiarréica, antiepiléptica, anti-helmíntica, antiinflamatória e antitumoral. Em seu extrato são contidas várias classes fitoquímicas tal como óleos essenciais, flavonóides, ácidos polifenólicos e ésteres. Muitos estudos estão publicados sobre a espécie, e entre eles há aqueles que descrevem testes realizados com plantas coletadas na Argentina, que mostraram a atividade antibacteriana (JORAY et al., 2011), e as propriedades imunomoduladoras sobre leucócitos humanos (TEIXEIRA e BASSANI, 1997), bem como aqueles que descrevem sua ação no trato gastrointestinal e antiinflamatória, ligadas a presença de flavonóides como quercitina, 3-luteolina e O-metilquercitina.

A espécie *P. edulis*, conhecida popularmente como maracujá peroba é uma planta trepadeira de crescimento rápido, encontrada comumente em florestas de países tropicais ou em áreas de cultivo. Rica em flavonóides, pectina e benzoflavonas é indicada popularmente por apresentar efeito calmante, hipnótico, sedativo e anti-helmíntico. Na literatura são encontradas pesquisas que avaliaram a atividade ansiolítica de flavonóides extraídos dos frutos da planta, e teste clínicos realizados em mulheres com hipercolesterolemia, que comprovam ação da pectina na redução do colesterol (LI et al., 2011).

A espécie *B. pilosa* conhecida popularmente como picão, é uma planta rasteira muito comum e amplamente distribuída em todo território brasileiro, de pequeno porte com tamanho que varia de 10 a 15 cm de comprimento. Possui caule fino e reto, com flores peçoladas. A planta é rica em resinas e taninos. Toda a planta pode ser utilizada, no entanto, as resinas são aromáticas e conhecidas por

suas propriedades desobstruente, odontálgica, antidissentérica e vermífuga. Na literatura, são encontrados estudos recentes que avaliaram extratos brutos hidroetanólicos e frações com atividade anti-oxidante e hepatoprotetores (KVIECINSKI et al., 2011). A presença de flavonóides e compostos acetilenos presentes em 41 espécies do gênero *Bidens*, parece ser responsável pela inibição do crescimento *in vitro* do protozoário *Plasmódium falciparum* agente etiológico da malária (BRANDÃO et al., 1997).

Considerando o contexto da discussão acima, se pôde observar que para as plantas elencadas e apesar do uso popular como vermífugo, pouco ou nada é descrito na literatura científica a respeito do tópico de investigação antiparasitária contra helmintos parasitas gastrointestinais de ovinos, o que torna a presente seleção de plantas atraente do ponto de vista da originalidade, sobretudo quanto da pesquisa focada nos critérios etnofarmacológicos e quimiotaxonomicos.



Figura 2: Fotografias dos exemplares vegetais elencados para os experimentos deste trabalho: A – *P. gratissima* (Abacateiro); B – *L. officinalis* (Alfazema); C – *P. umbelata* (Capeba); D – *A. speciosa* (Colônia); E – *A. muricata* (Graviola); F – *A. saturoioides* (Macela do Campo); G – *P. edulis* (Maracujá Peroba); H – *B. pilosa* (Picão).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho envolveu o levantamento bibliográfico para seleção de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. Ademais, o trabalho objetivou padronizar e efetuar ensaios *in vitro* contra ovos, larvas e adultos de parasitas trichostrongilídeos para avaliar os efeitos ovicida, larvicida e contra parasitas adultos das oito espécies vegetais selecionadas. Posteriormente, com o extrato de maior eficácia, realizar os ensaios *in vivo* com animais contaminados naturalmente por trichostrongilídeos.

3.2. Objetivos específicos

- Levantamento bibliográfico e seleção de espécies de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica segundo relatos populares, levando em consideração critérios etnofarmacológicos e quimiotaxinômicos, originalidade científica benefícios estratégicos quanto ao custo, localização e acesso, dando preferência para espécies brasileiras;
- Coleta e identificação botânica das oito espécies vegetais de interesse, e preparo do extrato aquoso em forma de “chá” por infusão simples das partes vegetais de interesse;
- Padronização, para o uso regular nas condições da Unidade de Biotecnologia-UNAERP, dos ensaios *in vitro* contra ovos, larvas e adultos de parasitas trichostrongilídeos gastrointestinais de interesse, utilizando ovinos contaminados naturalmente;
- Avaliação do efeito ovicida, larvicida e contra adultos de trichostrongilídeos parasitas de ovinos de diferentes diluições do extrato aquoso da casca de *P. gratissima*, das folhas de *L. officinalis*, *P. umbelata*, *A. speciosa*, *A. muricata*, *A. saturoioides*, *P. edulis*, e das raízes, haste, folha e flor *B. pilosa*.
- Com base na avaliação dos resultados dos ensaios *in vitro*, efetuar ensaio *in vivo* com carneiros contaminados naturalmente por trichostrongilídeos apenas com a espécie vegetal de maior eficácia nos ensaios *in vitro*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação dos extratos

As cascas frescas de *P. gratissima*, folhas frescas de *L. officinalis*, *P. umbelata*, *A. speciosa*, *A. muricata*, *A. saturoioides*, *P. edulis*, e as raízes, hastes, folhas e flores frescas de *B. pilosa* foram identificadas botanicamente e coletadas no Sítio Terra de Esmael, localizado no Município de Jurucê-SP (Latitude 21°04'12,5"; Longitude 47°04'08,0"; Altitude 545 metros), próximo a cidade de Ribeirão Preto-SP.

O extrato aquoso bruto foi preparado por infusão simples, de acordo com o uso popular em forma de "chá", na proporção de 100 gramas do vegetal fresco triturado para 1 litro de água em ebulição a 100°C. Após 30 minutos de infusão, todo conteúdo foi peneirado e centrifugado a 3000 rpm (Excelsa Baby I, Fanem) por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado em freezer -20°C até uso posterior.

4.2. Manutenção de animais para obtenção de ovos, larvas e parasitas adultos de trichostrongilídeos

Para a realização dos ensaios *in vitro* de eclodibilidade de ovos e viabilidade larval, ovos e larvas de trichostrongilídeos foram obtidos de fezes de carneiros machos, pertencentes à raça Santa Inês, com peso entre 15-40 kg e idade variando entre 4-6 meses, infectados naturalmente e mantidos na Fazenda Experimental da Unaerp (Ribeirão Preto-SP), estando disponíveis água e alimentação *ad libitum*. A confirmação de parasitose para os carneiros foi feita pelo teste parasitológico veterinário de OPG (ovos/g de fezes), conforme técnica padronizada por Gordon e Whitlock (1939) e descrita por Ueno e Gonçalves (1998), sendo as fezes colhidas diretamente da ampola retal dos animais. Posteriormente, para realização dos testes de motilidade dos adultos, os parasitas foram coletados diretamente do abomaso do animal sacrificado com diagnóstico previamente confirmado para alta infestação de parasitas.

Todo o procedimento de manutenção dos carneiros na fazenda experimental e os ensaios *in vivo* foram acompanhados de profissional veterinário responsável e aprovados junto ao Comitê de Ética da Unaerp protocolado sob número 022/09.



Figura 3: Fazenda experimental Unaerp - Ribeirão Preto-SP.

4.3. Ensaio da inibição da eclodibilidade de ovos para trichostrongilídeos

Seguindo a metodologia de Coles et al. (1992), aproximadamente 20 gramas de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal do animal parasitado, conforme confirmação prévia de parasitose (OPG > 2000 ovos/g de fezes). O material colhido foi macerado e filtrado em água corrente por meio de um arranjo de tamises sobrepostos com malhas de 500; 150; 90 e 20 μm . Os ovos retidos no último tamis foram recuperados com solução salina supersaturada, sendo permitida a flutuação do conteúdo de ovos por meio de flotação simples. Os ovos recuperados em suspensão salina foram lavados em água destilada por meio de três centrifugações consecutivas (Excelsa Baby I, Fanem, 3500 rpm, 3 minutos), de modo a gerar uma solução aquosa final de ovos. Suspensões aquosas (100 μL) contendo aproximadamente 100 ovos de trichostrongilídeos foram distribuídas em placas de micro-titulação e adicionadas dos diferentes ativos em teste com diferentes concentrações para formulação das curvas dose-resposta.

O delineamento das faixas de concentração dos extratos aquosos das espécies de plantas *P. gratissima*, *L. officinalis*, *P. umbelata*, *A. speciosa*, *A. muricata*, *A. saturoioides*, *P. edulis*, e *B. pilosa*, foi realizado pelo uso de cinco diluições seriadas de proporções finais v/v (volume solução ovos / volume do extrato) de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%.

Após 48 horas (25°C) de exposição direta dos ovos aos diferentes ativos foi realizada a contagem de ovos e larvas de primeiro estágio (L1) conforme proposto pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (W.A.A.V.P.) e descrito detalhadamente em Powers et al. (1982). O resultado final foi dado pela média ponderada e desvio padrão de três réplicas experimentais independentes,

acompanhadas pelos controles, positivo com Levamisol 2% (2 mg/mL) e negativo com solução salina. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da eclosão de ovos num comparado entre controles negativo, positivo e grupos experimentais.

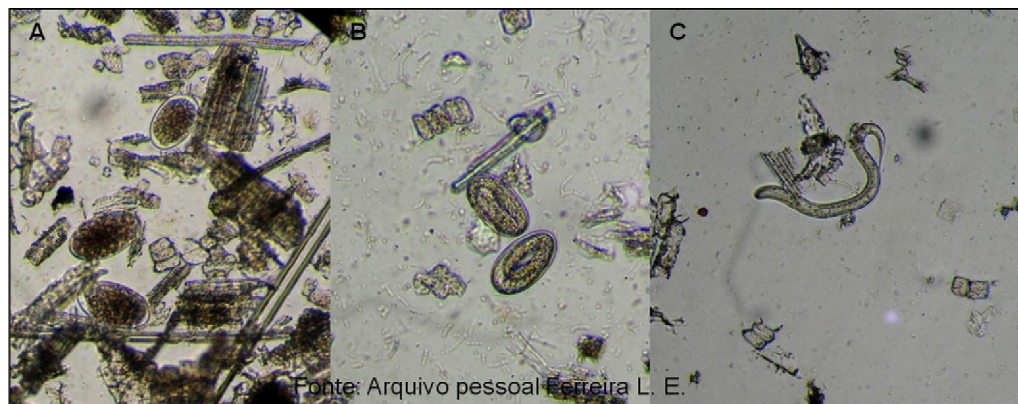


Figura 4: Formas evolutivas de trichostrongilídeos: A - Ovo embrionado; B - Ovo larvado; C – Larva L1.

4.4. Ensaios de motilidade larval para trichostrongilídeos

A coprocultura foi realizada conforme Ueno e Gonçalves (1998). Aproximadamente 20 gramas de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal do animal parasitado, conforme confirmação prévia de parasitose (OPG > 2000 ovos/g de fezes). O material foi macerado e adicionado na proporção de 1:2 (v/v) em maravalha estéril até completa homogeneização de modo que a mistura permanecesse umedecida através da adição de quantidade suficiente de água destilada. Após o período de 07 dias em condições ótimas de incubação em temperatura ambiente, o material em béquer foi invertido em placa de petri com quantidade suficiente de água morna (37°C), para a qual migram as larvas de terceiro estágio (L3). Suspensões aquosas (50 µL) contendo cerca de 50 larvas de terceiro estágio foram distribuídas em placas de micro-titulação e adicionadas dos diferentes ativos em teste e em diferentes concentrações para formulação das curvas dose-resposta.

O delineamento das faixas de concentração dos extratos aquosos das espécies de plantas *P. gratissima*, *L. officinalis*, *P. umbelata*, *A. speciosa*, *A. muricata*, *A. saturoioides*, *P. edulis*, e *B. pilosa*, foi realizado pelo uso de cinco

diluições seriadas de proporções finais v/v (volume solução ovos / volume do extrato) de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%.

Após 24 horas de exposição direta (25°C) das larvas aos diferentes ativos, foram feitas contagens do contingente de larvas móveis e imóveis em microscopia comum. O resultado final foi dado pela média ponderada e desvio padrão de três réplicas experimentais independentes, acompanhadas pelos controles, positivo com Levamisol 2% (2 mg/mL) e negativo com o diluente dos ativos em questão. Os dados foram expressos como percentagem de larvas mortas num comparado entre controle negativo, positivo e grupos experimentais.



Figura 5: Larvas L3 de trichostrongilídeos.

4.5. Ensaio de motilidade de parasitas adultos *H. contortus* com *A. muricata*

O teste foi desenvolvido segundo a metodologia proposta por Hounzangbe-Adote et al. (2005). Os parasitas adultos de trichostrongilídeos, visíveis a olho nu, foram coletados manualmente diretamente do abomaso de animais infectados naturalmente e sacrificados de acordo com o protocolo aprovado no Comitê de Ética. Para tanto, carneiros adultos segundo as mesmas descrições apresentadas acima e apresentando valores de OPG elevados (> 3000 ovos/g de fezes), foram mantidos em jejum durante 24 horas antes do sacrifício pelo método de sensibilização mecânica seguido de sangria. Imediatamente após a morte do animal, foi removido todo o sistema digestivo de modo a facilitar a localização do abomaso, que uma vez isolado e pinçado fora removido pelo uso de tesoura cirúrgica. O órgão, devidamente mantido para transporte, foi aberto e a coleta dos parasitas adultos realizada através de lavagem da mucosa da parede intestinal com solução salina a 37°C em um funil de vidro acoplado a uma mangueira de abertura e fechamento

controlados por prendedor de metal. Após decantação dos parasitas durante o período de 1 hora, os mesmos foram removidos e incubados por no máximo 1 hora em uma solução PBS com penicilina e estreptomicina 4% a 37°C.

Em placas de 12 poços contendo cerca de 5 a 7 parasitas adultos, foram adicionados 1 mL das diluições do extrato de *A. muricata* avaliado nas concentrações de 1,7 mg/mL; 8,5 mg/mL e 42,5 mg/mL. Essa espécie mostrou os melhores efeitos quando comparada as demais plantas estudadas contra ovos e larvas de trichostrongilídeos. Durante o experimento, as placas foram mantidas em estufa sob temperatura de 37°C, e a leitura de motilidade dos parasitas realizada em intervalos de 2 horas até que o controle negativo perdesse sua eficiência, o que em geral acontecia em torno de 10 horas após o início dos testes em nossas condições de experimentação.

O resultado final foi dado pela média ponderada e desvio padrão de três réplicas experimentais independentes, acompanhadas pelos controles, positivo com Levamisol 2% (2 mg/mL) e negativo composto de solução PBS com penicilina e estreptomicina 4%. Os dados foram expressos como percentagem de parasitas móveis num comparado entre controle negativo, positivo e grupos experimentais. As análises estatísticas dos resultados foram feitas usando o teste de ANOVA seguido do pós-teste de Skott-Knott ($p < 0.05$).

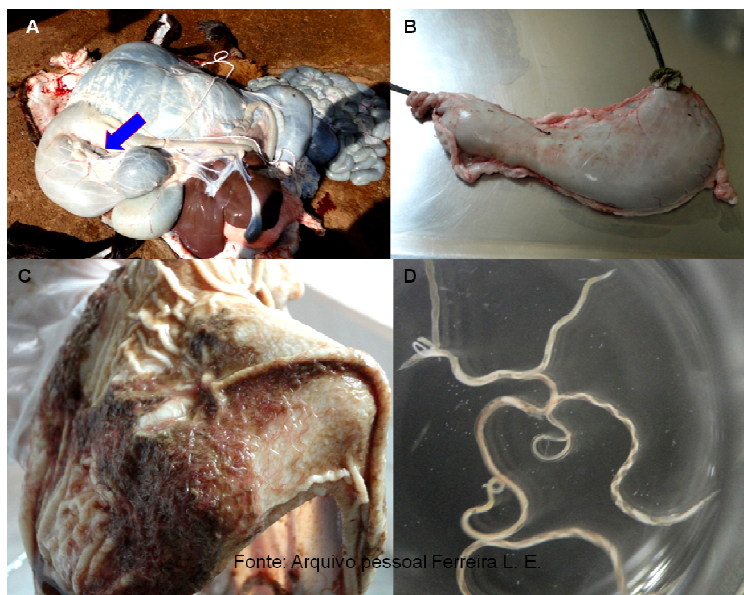


Figura 6: Coleta dos parasitas adultos de *H. contortus*:

A - Aparelho digestivo do ovino; B - Órgão abomaso; C - Parasitas adultos na mucosa intestinal; D - Parasita adulto.

4.6. Ensaio *in vivo* com extrato aquoso de *A. muricata*

Para realização dos ensaios *in vivo*, abalizados segundo metodologias de manejo realizadas corriqueiramente em centros de pesquisas agropecuárias, foram utilizados 30 carneiros machos, numerados, da raça Santa Inês, com peso entre 15-25 Kg e idade entre 4-6 meses, contaminados naturalmente por trichostrongilídeos e mantidos na Fazenda Experimental da Unaerp (Ribeirão Preto-SP) estando disponíveis alimentação composta por ração comercial e feno durante dois períodos diários, e água “*ad libitum*”. Os animais, adquiridos de propriedades rurais localizadas na macrorregião da cidade de Ribeirão Preto – SP, tiveram a confirmação de parasitose feita pelo teste OPG, durante os três dias consecutivos anteriores ao início do experimento, cuja carga parasitária constatada variou entre 1500 a 20.000 ovos/g de fezes (Média geral dos animais de 5500 ovos/g fezes), sendo o valor de parasitose mínima de 1500 ovos/g de fezes para seleção do animal.

De maneira randômica, os 5 grupos de animais (n=6) foram distribuídos em três grupos testes, tratados com diluições seriadas do extrato bruto de *A. muricata*, em concentrações (peso folha / peso animal) de 1g/kg; 0,33 g/kg; 0,11g/kg, e em dois grupos controles. No grupo controle positivo foi administrado o vermífugo Trimix[®], cuja dosagem de 1ml/4kg de animal, fornece 200mcg/kg de ivermectina, 7,5mg/kg de levamisol, 5,0 mg/kg de albendazol, e para o controle negativo administrado solução salina (1ml/kg de animal). Em todos os grupos a administração dos tratamentos foi feita por via oral. Assim como para os testes de mobilidade de parasitas adultos, a eleição de *A. muricata* para os testes *in vivo* baseou-se em sua maior eficácia nos testes *in vitro* (testes ovicidas e larvicidas) quando comparada com os demais extratos em teste.

O experimento perdurou por sete dias consecutivos. Exames de OPG foram feitos em triplicata para cada amostra de fezes nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 sendo expressos através das médias ponderada das triplicatas de cada animal, seguido das médias ponderadas de cada grupo e desvio padrão. Exames clínicos veterinários, com parâmetros avaliáveis de peso, condições gerais da mucosa conjuntiva, qualidade da pelagem, escore corporal positivo ou negativo, análise de comportamento e checagem da temperatura. Também nestes mesmos dias foram coletadas amostras de sangue de cada animal para exames laboratoriais completos de hemograma (contagem de hemácias, hematócrito, dosagem de hemoglobina e

contagem de leucócitos) e série bioquímica composta de dosagens de glicose, uréia, creatinina, colesterol total, colesterol VLDL, triglicérides, ácido úrico, proteínas totais, albumina, bilirrubina direta e total, bilirrubina indireta, enzimas AST / TGO (transaminase glutâmico oxalacética), ALT / TGP (transaminase glutâmico pirúvica), gama GT (gama glutamiltransferase), globulina, e relação albumina / globulina.

O resultado final foi dado pelas médias ponderadas das triplicatas dos resultados dos exames parasitológicos (OPG) de cada animal nos dias 0, 1, 3, 5, 7, seguido das médias ponderadas dos animais de cada grupo e desvio padrão.

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas das médias ponderadas das triplicatas dos resultados obtidos nos testes de eclodibilidade de ovos, motilidade larval, motilidade de parasitas adultos, e ensaio *in vivo*, foram realizadas utilizando o teste de ANOVA seguido do pós-teste de Skott-Knott ($p < 0.05$), no programa SISVAR 5.3 desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras (UFLA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os resultados dos ensaios *in vitro* são representações gráficas das médias ponderadas e desvio padrão das três réplicas experimentais independentes, realizadas em quintuplicata, e expressas como porcentagem de inibição da eclodibilidade de ovos ou porcentagem de motilidade larval ou de parasitas adultos, na comparação entre grupos controles e experimentais.

As figuras 7 - 8 e 9 - 10 mostram, respectivamente, os diferentes resultados obtidos na avaliação dos efeitos ovicidas e larvicidas dos extratos aquosos das oito espécies vegetais, num comparado com grupos controles negativos (Solução salina) e positivo (Levamisol 2%). Enquanto a figura 11 mostra o resultado obtido na avaliação da motilidade dos parasitas adultos em um período de total de 10 horas expostos ao extrato de *A. muricata* comparado com aos grupos controles negativo (solução PBS com penicilina e estreptomicina 4%) e positivo (Levamisol 2%).

Os resultados do ensaio *in vivo* com o extrato bruto de *A. muricata* são expressos na tabela 1. Nela estão contidos os resultados dos exames parasitológicos de fezes obtidos nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 do experimento, através das médias ponderada das triplicatas de cada animal, seguido das médias ponderadas dos animais de cada grupo e desvio padrão.

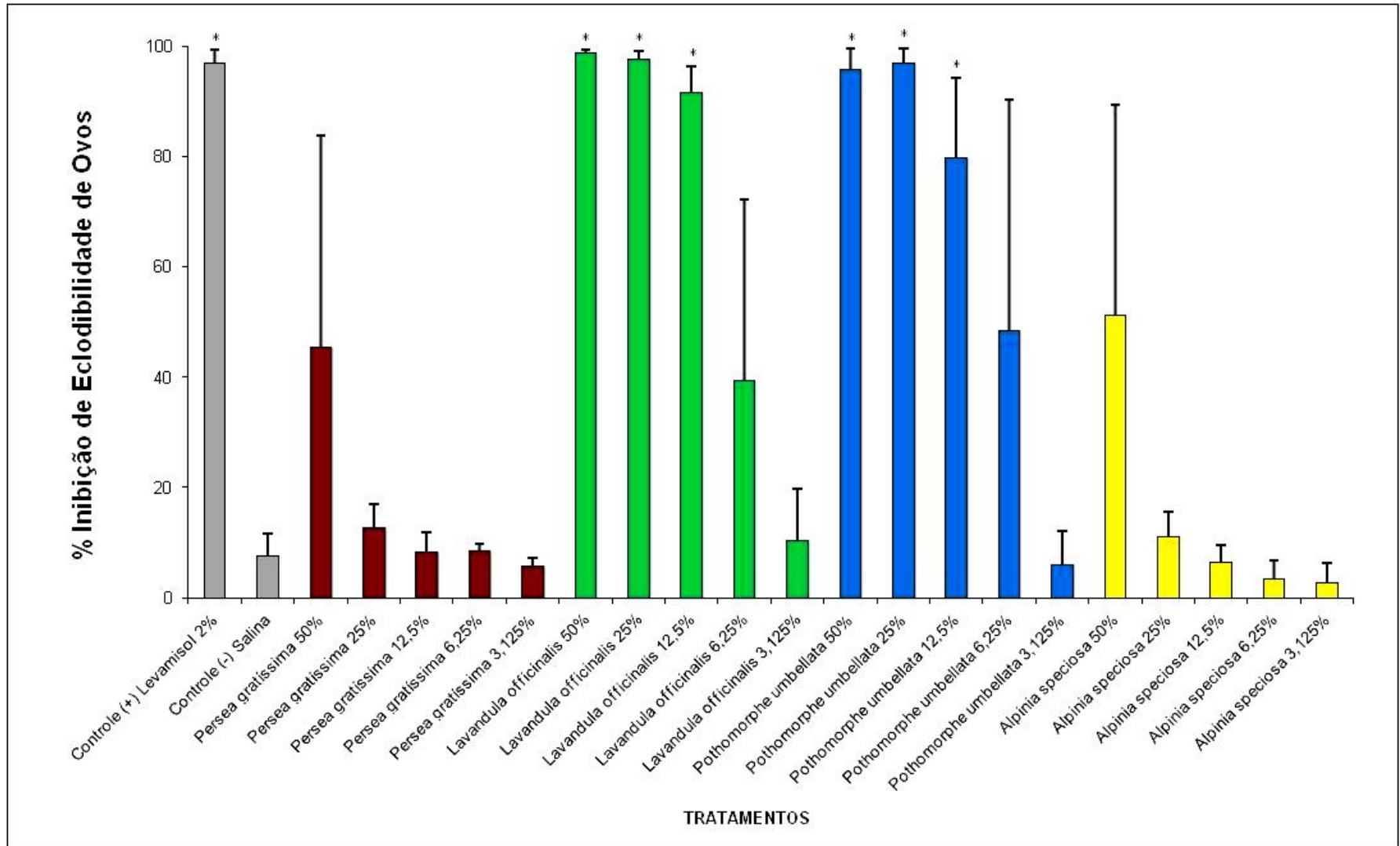


Figura 7: Efeito de diferentes tratamentos com extratos aquosos na eclodibilidade de ovos de trichostrongilídeos ($p < 0,05$).

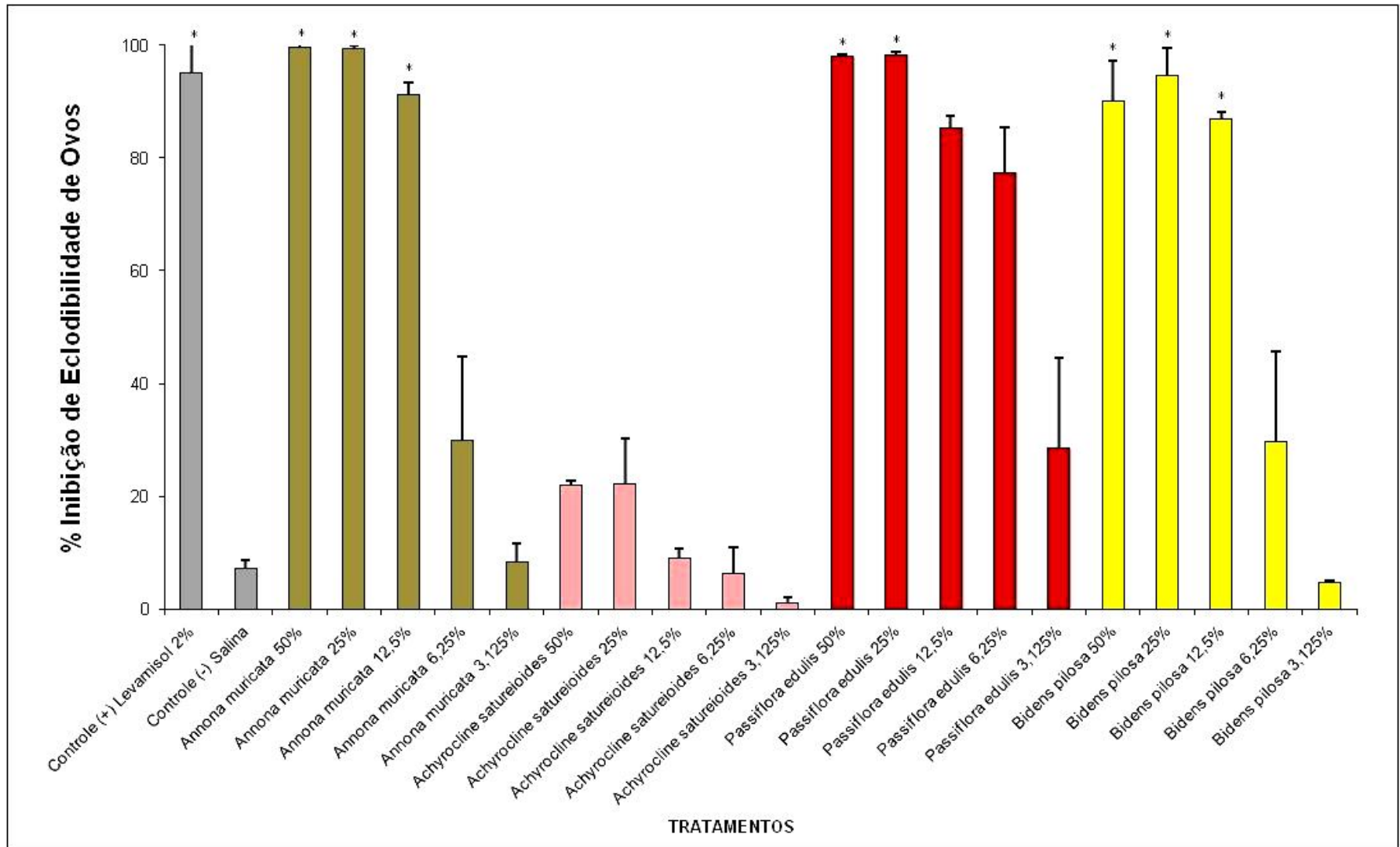


Figura 8: Efeito de diferentes tratamentos com extratos aquosos na eclodibilidade de ovos de trichostrongídeos ($p < 0,05$).

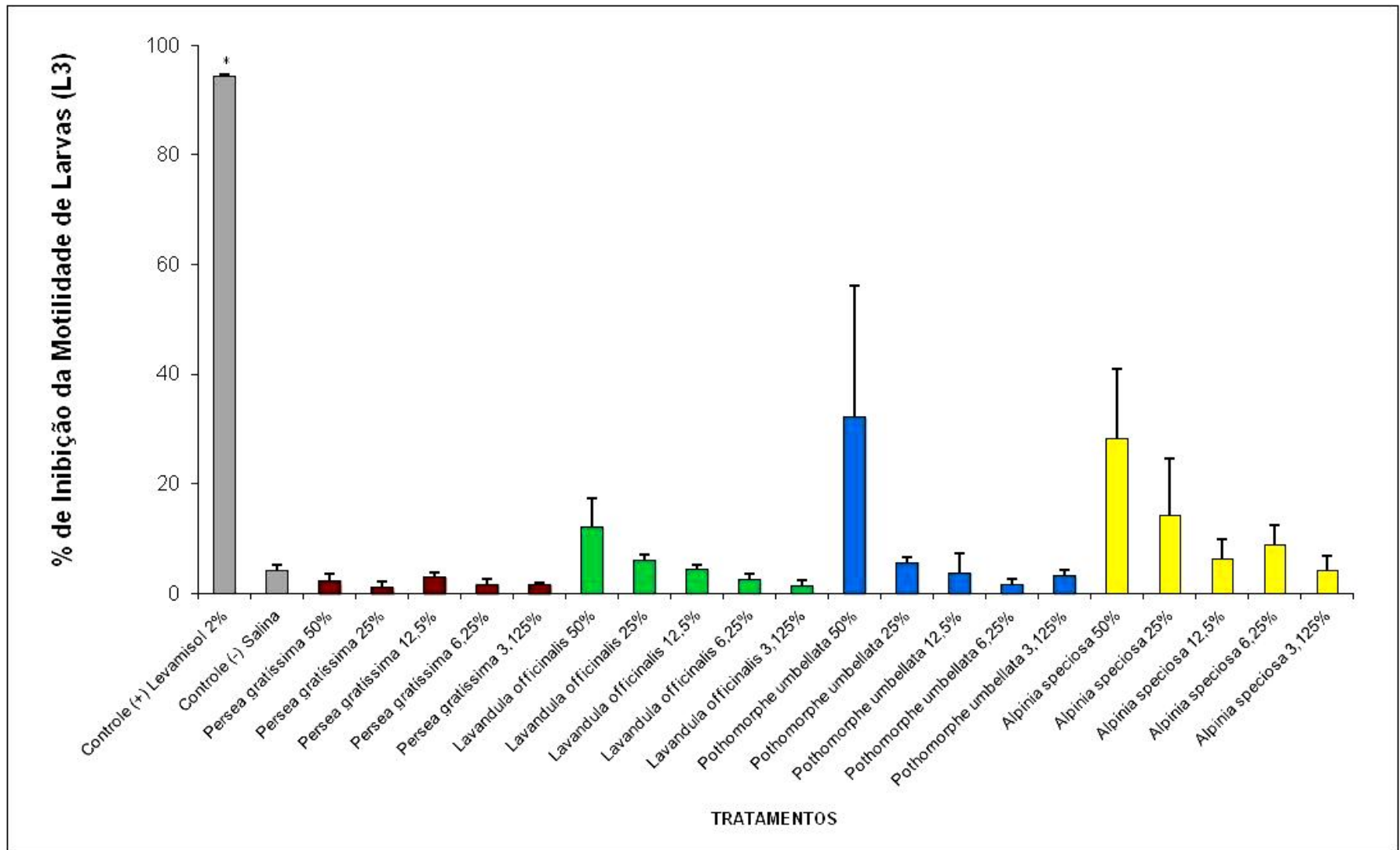


Figura 9: Efeito de diferentes tratamentos com extratos aquosos na motilidade de larvas de trichostrongilídeos ($p < 0,05$).

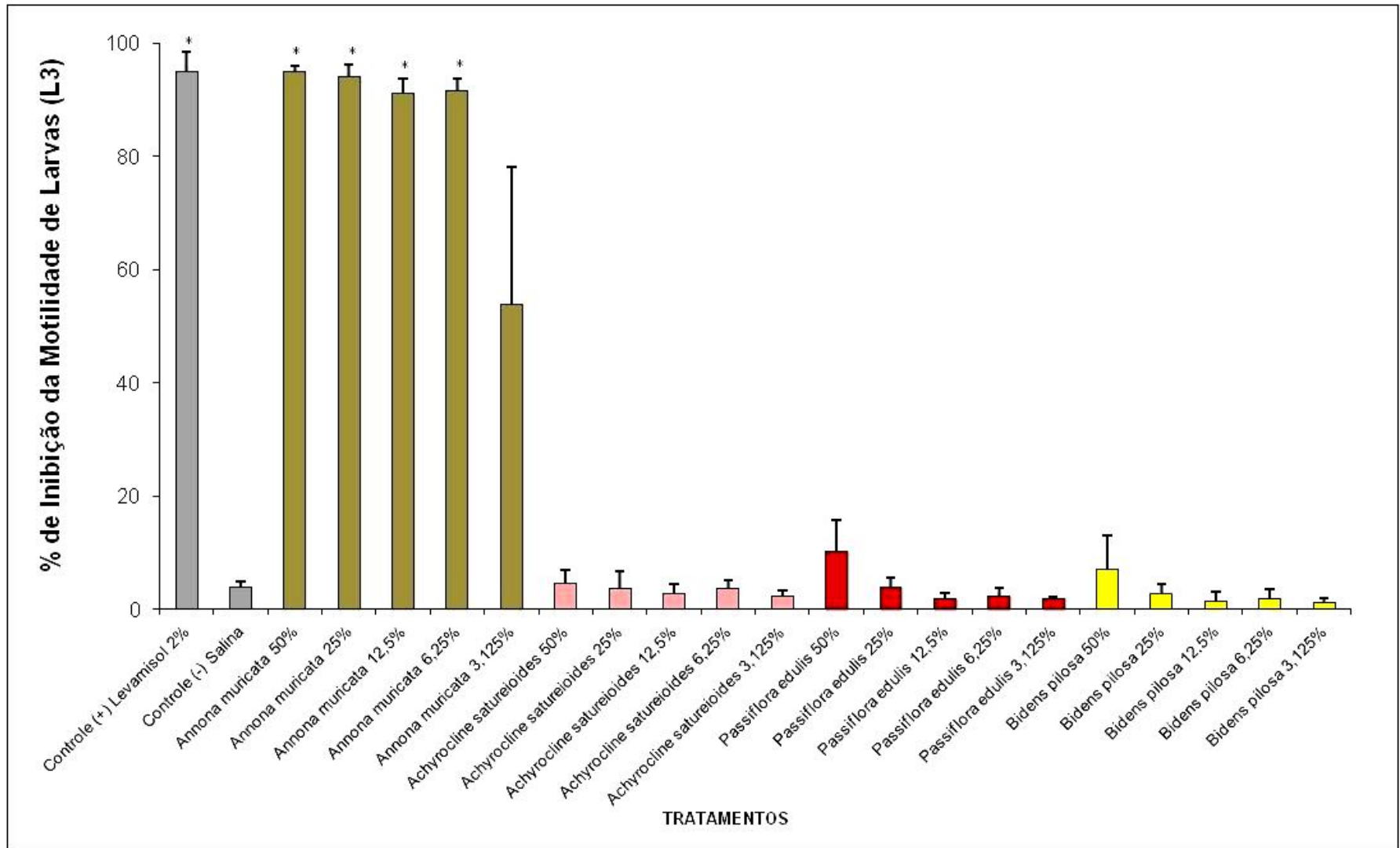


Figura 10: Efeito de diferentes tratamentos com extratos aquosos na motilidade de larvas de trichostrongilídeos ($p < 0,05$).

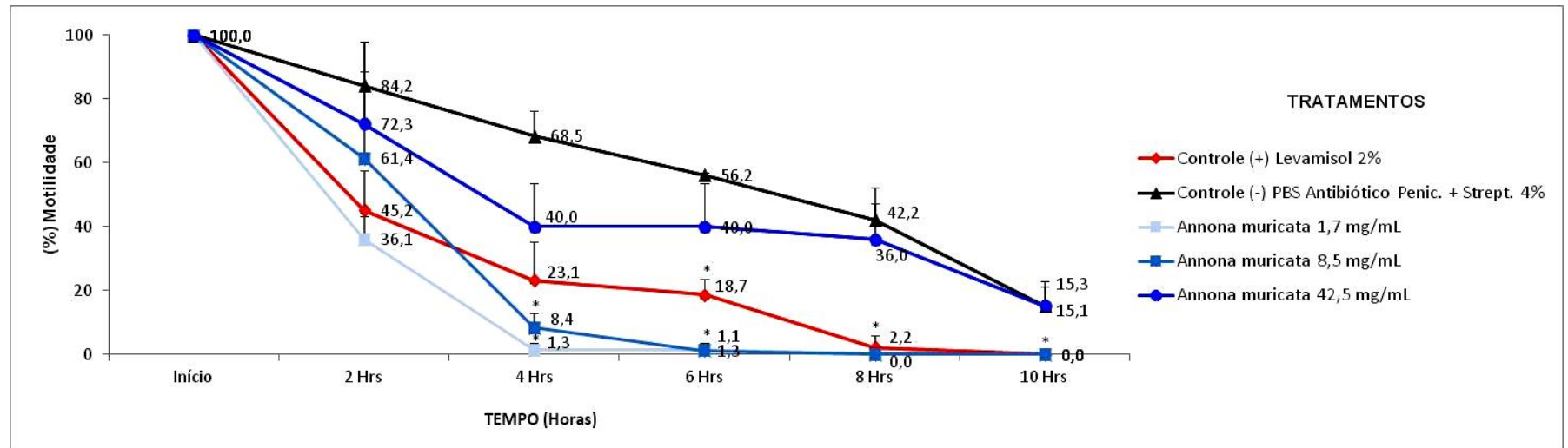


Figura 11: Efeito com tratamento de extrato aquoso de *A. muricata* na motilidade dos parasitas adultos de *H. contortus* ($p < 0,05$).

Tabela 1: Resultados de OPG (ovos/g de fezes) para cada grupo de animais nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 do experimento *in vivo* com *A. muricata* ($p < 0,05$).

Tratamentos	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7
Controle (+) Trimix [®] 1ml/4kg	3917 ± 2076 *	1475 ± 1076 *	139 ± 114 *	200 ± 162 *	164 ± 147 *
Controle (-) Salina 1ml/kg	7164 ± 3827	7433 ± 3638	4767 ± 2469 *	7572 ± 2967	8489 ± 3181
<i>A. muricata</i> 1g/kg	6000 ± 5007	5878 ± 4056	4089 ± 4046 *	2828 ± 1792 *	3806 ± 3049 *
<i>A. muricata</i> 0,33g/kg	9083 ± 6824	8056 ± 4030	4000 ± 2788 *	7613 ± 4697	9787 ± 11338
<i>A. muricata</i> 0,11g/kg	6439 ± 4830	6844 ± 7376	3200 ± 3125 *	4283 ± 2299 *	2830 ± 1944 *

A análise dos resultados obtidos com os testes ovicidas (Figs. 7 e 8) nas cinco diluições seriadas dos extratos da casca de *P. gratissima*, das folhas de *A. speciosa* e *A. saturoioides*, não mostraram resultados expressivos na inibição do desenvolvimento dos ovos quando comparada ao controle positivo (Levamisol 2%). Para estas espécies de plantas ensaiadas, a inibição da eclodibilidade de ovos variou em média entre 25 a 45% na diluição de maior concentração (50% v/v), patamar que representa uma percentagem inferior comparado com as demais espécies testadas na mesma proporção de diluição. Por outro lado, os testes com folhas de *L. officinalis*, *P. umbelata*, *A. muricata*, *P. edulis*, e a planta inteira de *B. pilosa*, demonstraram resultados bastante promissores, onde a inibição da eclodibilidade de ovos variou entre 95 e 100%, principalmente para as três diluições de maior concentração (50%; 25%; 12,5% v/v). Tais resultados foram equiparáveis aqueles obtidos para o controle positivo.

A análise dos resultados obtidos com os testes larvicidas (Figs. 9 e 10) nas cinco diluições seriadas dos extratos de *P. gratissima*, folhas de *L. officinalis*, *A. saturoioides*, *P. edulis*, e planta inteira de *B. pilosa*, mostrou resultados insignificantes em termos de eficiência, pois, os números percentuais das mortalidades de larvas causadas pelas cinco concentrações seriadas variaram entre 1 a 10%, valores próximos daqueles exibidos pelo controle negativo utilizado. Já os testes com os extratos das folhas de *P. umbelata* e *A. speciosa* mostraram resultados percentuais de mortalidade mais efetivos, atingindo a ordem de aproximadamente 40% para diluição de maior concentração utilizada (50% v/v). Entretanto, os resultados obtidos com o extrato de folhas de *A. muricata* se mostraram essencialmente satisfatórios, com taxas de mortalidade atingindo a faixa de 90-95% para as quatro diluições de maior concentração (50%, 25%, 12,5% e 6,25% v/v), resultados equiparáveis aqueles obtidos quando do uso de controle positivo.

Considerando que a *A. muricata* apresentou resultados promissores em ambos os testes, eclodibilidade de ovos e motilidade de larvas, foi natural supor sua maior eficiência também para os testes contra parasitas adultos de *H. contortus*, apresentados na figura 11 completando a investigação do ativo no ciclo de vida inteiro do parasita. Deve ser lembrado que os testes *in vitro* envolvendo os parasitas adultos são mais trabalhosos e envolvem o sacrifício de animais, o que implica em maior contingência de ações, inclusive no aspecto ético, explicando assim a seleção apenas de *A. muricata* para estes testes. Para os testes contra parasitas adultos, as

diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. muricata* apresentou resultados bastante significativos ao inibir a motilidade dos parasitas em comparação com o grupo controle negativo ao longo de 10 horas de exposição, muito embora sem que este efeito fosse dependente de dose. Aliás, doses menores do extrato inibiram motilidade dos parasitas do que suas doses mais altas. De acordo com a metodologia original proposta por Hounzangbe-Adote et al. (2005), a técnica envolvia a leitura dos resultados apenas nos horários de 6, 24 e 48 horas, parâmetro modificado em nossas condições de experimento considerando a viabilidade dos parasitas utilizados e condições de ambiente próprias, abalizadas funcionalmente nos experimentos pelos controles positivo e negativo. Nos nossos experimentos as menores doses do extrato aquoso *A. muricata* foram capazes de inibir completamente a motilidade de parasitas adultos nas primeiras quatro horas de observação, efeito equiparável aquele obtido para o controle positivo, e diverso do negativo, no qual em 4 horas de experimento ainda podia se observar cerca de 70% da motilidade dos parasitas preservada.

Uma grande vantagem observada para os efeitos da *A. muricata* é que a mesma apresenta ação significativa em todas as fases do ciclo de vida do parasita, ou seja, ovos, larvas e adultos, o que diminui as chances de aparecimento de resistências por parte do parasita, pelo menos do ponto de vista teórico. Este desiderio, sobretudo, se aliado ao uso da planta na forma de fitomedicamento faz reforçar a idéia de diminuição das chances de resistência, problema acentuado no controle de parasitoses gastrointestinais de ovinos com o uso do arsenal terapêutico ora empregado. Isto porque se forem observadas atividades sinérgicas de diferentes moléculas em diferentes alvos farmacológicos para o extrato, o uso da planta como fitoterápico seria feito de forma mais vantajosa, onde poucas chances seriam dadas para o aparecimento de parasitas resistentes, se somada a idéia de cobertura ampla do ciclo de vida do parasita. Com efeito, a fitoterapia consiste em uma forma de tratamento ou terapia que cresceu e se destacou nas últimas décadas, pois algumas espécies de plantas são facilmente encontradas e são de fácil acesso econômico à população carente, desde que devidamente orientada. Este corolário, aliado a fatores tais como uso de medicamentos de alto custo, indisponibilidade dos fármacos em algumas áreas rurais carentes ou distantes, e desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos pelos nematóides, impulsionam a ampliação de pesquisas e estudos de plantas voltadas para o uso humano e veterinário, incluindo a busca por novos vermífugos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Além

disso, e no cenário agropecuário, a carne e o leite do animal tratado pelo uso da fitoterapia tendem a apresentar baixos teores de resíduos químicos em contraposição aos tratamentos convencionais, o que permite uma alimentação mais saudável ao consumidor (FURTADO, 2006).

Para efeito comparativo e segundo Souza et al. (2008), testes *in vitro* para avaliação do extrato aquoso de *A. squamosa* (Fruta de conde), espécie de mesmo gênero da graviola, resultou na mortalidade de 19,4% de larvas de primeiro estágio em nematóides gastrintestinais de bovinos. Em carneiros, testes *in vivo*, também foram realizados, nos quais os resultados mostraram a redução de 40% na contagem de ovos de *H. contortus*, dados que corroboram indiretamente aos resultados aqui obtidos para *A. muricata*. A literatura aponta que não são recentes as pesquisas com acetogeninas, um dos constituintes fitoquímicos extraídos de espécies da família de plantas da *A. muricata* (Annonaceas), sobre o contexto farmacológico como sendo este composto fortemente bioativo, incluso como anti-helmíntico. Dentre os vários tipos de acetogeninas, a squamocina tem sido apresentada como possuindo atividade inseticida, mutagênica e genotóxica (ALVAREZ et al., 2010). A acetogenina annonacina, também mostrou atividade citotóxica em células de câncer ovariano (LIAW et al., 2004), câncer de mama, e carcinoma renal (KIM; SON; WOO, 2001). Na parasitologia, estudos também mostram sua avaliação citotóxica contra agentes causadores da leishmaniose (JARAMILLO et al., 2000), sendo a atividade citotóxica possível responsável pelos efeitos observados neste trabalho para graviola, rica em acetogeninas. Apesar da incompleta elucidação dos mecanismos de ação do extrato da família Annonácea, estudos biomoleculares apontam que sua ação na inibição da eclodibilidade dos ovos e evolução até larva de diferentes parasitos, está ligada na inibição da divisão celular (mitose), e dessa forma na formação e desenvolvimento das estruturas vitais do parasito, além do bloqueio do funcionamento da cadeia respiratória para liberação de energia, ação semelhante a classe dos fármacos benzimidazóis (SOUZA et al., 2008).

A reprodutibilidade, confiança e robustez dos experimentos para ovos, larvas e adultos dos parasitas podem ser certificadas por desvios padrões relativamente baixos observados para maioria dos grupos e pela correta funcionalidade do controle positivo e negativo, com variabilidades experimentais bastante adequadas quando comparadas com a literatura científica (MACIEL et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009). Até o presente momento, os trabalhos de prospecção de ativos em ensaios *in vitro*

como predecessores dos ensaios *in vivo* tem se apresentado como uma estratégia experimental racional e elegante, na medida em que permitem economia de tempo e de custos, ao mesmo tempo em que diminuem o número de animais necessários para o desenvolvimento de um novo ativo de interesse biotecnológico, o que implica obviamente em vantagens no que tange ao regulatório ético no uso de animais de experimentação. Além disso, e por serem simples e rápidos, os testes *in vitro* permitem com segurança e eficiência o acompanhamento da purificação cromatográfica de ativos de interesse, muito embora, não obrigatoriamente, ativos eficazes *in vitro* também o sejam *in vivo*, sendo o mesmo verdadeiro quando da obtenção de um ativo isolado em comparação ao efeito sinérgico entre ativos no extrato total em ensaios *in vitro* e *in vivo* (AKHTAR et al., 2000), uma vez que os resultados usualmente variam de acordo com o nematóide usado no teste e quanto ao estado imunológico de diferentes raças e tipos de ovinos (DIMRI e SHARMA, 2004; TZAMALOUKAS et al., 2006).

Somado a este tópico e considerando a efetividade do extrato de *A. muricata*, segundo Powers et al. (1982) os resultados dos testes *in vitro* devem ser abalizados pelo índice de classificação adotado pela *World Association For The Advancement Of Veterinary Parasitology* (W.A.A.V.P.). Nela o patamar percentual de efetividade para produto em teste ser lançado para tratamento anti-helmíntico, deve ultrapassar 90% de ação contra o parasita tratado, além da comprovação de que o ativo impediu a evolução normal dos ovos (FURTADO et al., 2005). Os testes *in vitro* de eclosão de ovos (COLES et al., 1992) e de desenvolvimento larvar, por colocar a substância diretamente em contato com as diferentes formas parasitárias dentro do ciclo evolutivo, são amplamente utilizados, tanto para avaliar resistência aos anti-helmínticos (COSTA et al., 2002), como também para testes com extrato ou ativos de origem vegetal selecionados com possível atividade anti-helmíntica (RODRIGUES et al., 2007).

Uma vez definido o extrato de *A. muricata* como sendo o mais efetivo nos ensaios *in vitro*, inclusive em conformidade com os critérios da W.A.A.V.P., o extrato foi administrado por via oral para animais infectados naturalmente com trichostrongilídeos. O fato de os animais serem contaminados naturalmente e serem oriundos de uma macrorregião de extensão territorial considerável, como aquela de Ribeirão Preto-SP, faz com que os experimentos sejam mais realísticos em relação às condições de campo que acompanham o produtor, onde co-infecções por parasitas de diferentes espécies, em diferentes estágios de evolução dentro do ciclo

parasitológico e apresentando diferentes níveis de resistência a tratamentos com anti-helmínticos são bastante comuns.

A tabela 1 mostra os resultados de OPG de grupos controles e experimentais nos testes *in vivo*. Muito embora os grupos experimentais possam ter sofrido deflexões de valores de OPG em dias específicos, o perfil de resposta geral dos grupos (1g/kg; 0,11g/kg; 0,33 g/kg) durante os 7 dias de experimento se assemelhou de maneira quase fidedigna aqueles do grupo controle negativo, e de maneira bastante diversa do grupo positivo que quase promoveu total eliminação de ovos ao fim do experimento.

Estes dados nos levam a concluir que, muito embora bastante promissor nos testes *in vitro*, o extrato de *A. muricata*, ao menos nas doses ensaiadas, falhou na apresentação de qualquer atividade *in vivo*. Tal divergência dos resultados *in vitro* e *in vivo*, também relatada por Peneluc et al. (2009) e Molento e Prichard (2001), pode ser atribuída à interação organismo – bioativo – parasita, a biodisponibilidade, ou seja, eficiência do extrato da planta dentro do animal, proteção do parasita na intimidade das vilosidades intestinais, virulência da espécie do parasita e sensibilidade do hospedeiro frente a infecção. Outros efeitos também são justificados pela baixa concentração do extrato utilizado nos experimentos *in vivo* quando comparado as doses efetivas para os ensaios *in vitro*, nos quais o bioativo em contato íntimo com as formas evolutivas dos parasitas possui ação direta. A ação de microorganismos no rumem, também justifica a disparidade dos resultados, pois a microbiota ruminal pode alterar o metabolismo e o mecanismo de ação de alguns nutrientes, medicamentos ou extratos bioativos administrados via oral Peneluc et al. (2009). Divergências entre resultados *in vitro* e *in vivo*, parecem até certo ponto comuns experimentalmente, como reportado em testes envolvendo alho (*Allium sativum*), neem (*Azadirachta indica*), melão de são Caetano (*Momordica charantia*), e fruta do conde (*A. squamosa*), realizados em condições similares as deste trabalho, onde a ação *in vitro* dos ativos fora comprovada em detrimento de sua ação *in vivo* (CHAGAS, 2007).

Finalmente, os valores de desvios padrões altos encontrados em nossos experimentos *in vivo* em comparação com aqueles *in vitro*, refletem e se devem a características próprias da metodologia, que prevê a distribuição randômica de animais vivos cujos valores de OPG iniciais para teste variaram em ordens de grande monta (1500 – 20.000 ovos/g de fezes). Este tipo de observação parece ser comum em experimentos de mesmo tipo (OLIVEIRA et al., 2009). Durante o ensaio,

houve a morte de 2 animais dos grupos experimentais, entretanto as morte não podem ser atribuídas a um efeito tóxico do extrato de *A. muricata*, uma vez que estas mortes foram atribuídas ao acentuado grau de fraqueza no qual os animais se encontravam já no início dos testes, associado à elevada carga parasitária constatada nos OPGs, não combatidas pelo tratamento. Ademais, conforme mencionado na metodologia, e a fim de acompanhar o estado clínico fisiopatológico dos animais, os resultados de OPGs foram associados com exames clínicos e laboratoriais bioquímicos e hematológicos de cada animal (Material Suplementar – Anexos) não foram observadas fortes variações quando comparando os animais ao controle positivo e experimentais com aqueles do controle negativo. Isto significa dizer, que o extrato aquoso de graviola fora bem tolerado pelos animais do ponto de vista toxicológico.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se do conjunto de dados obtidos neste trabalho que:

- Os trabalhos de prospecção de ativos em ensaios *in vitro* como precursores dos ensaios *in vivo* tem se apresentado como uma estratégia experimental vantajosa por permitirem economia de tempo/custeio e redução da necessidade do uso de animais de experimentação, ao mesmo tempo em que permitem o acompanhamento da purificação cromatográfica de ativos de interesse de maneira rápida e eficiente, quando devidamente padronizados. Neste íterim, quando avaliadas as eficiências de funcionalidade de controles positivo e negativo nos testes de eclodibilidade de ovos, e viabilidade de larvas e adultos de trichostrongilídeos parasitas gastrointestinais de ovinos, pode-se afirmar que a padronização dos testes ocorreu com sucesso em nosso laboratório;

- Pesquisas teóricas baseadas na literatura popular e científica a fim de selecionar espécies de plantas com caráter anti-helmíntico, baseadas em relatos populares, efeitos farmacológicos, e acesso facilitado, ocorreu com sucesso. Assim foi possível montar um grupo de oito espécies de plantas, das quais foi possível apresentar a *A. muricata* como bastante efetiva na em sua atividade anti-helmíntica;

- Dos extratos aquosos ensaiados, o de *A. muricata* foi o mais efetivo, apresentando efeito inibitório da eclodibilidade de ovos e inibitório da viabilidade larval na ordem de 90-100%, quando comparado ao controle negativo. Ademais, o extrato foi capaz de inibir completamente a motilidade dos parasitas adultos nas primeiras quatro horas de observação do teste, efeito equiparável aquele obtido para o controle positivo e diverso do negativo que em 4 horas ainda mantinha cerca de 70% da motilidade dos parasitas, mostrando que a *A. muricata* pode ser uma fonte efetiva de ativos com interesse biotecnológico ou para o desenvolvimento de fitoterápicos úteis para uso veterinário no ramo da ovinocaprinocultura.

Em que pese a forte ação *in vitro*, o extrato aquoso de *A. muricata* falhou em reduzir o nível de OPG em animais contaminados quando comparado ao efeito do vermífugo comercial, composto da associação de ivermectina, levamisol e albendazol. Tal divergência dos resultados *in vitro* e *in vivo*, pode ser explicada, ao menos em partes, por fatores como a biodisponibilidade dos compostos ativos nos diferentes compartimentos do trato gastrintestinal, pela dose e concentração avaliada, alta variação do OPG, e dentre outros fatores. Ademais, pelos exames clínicos e laboratoriais empregados nos experimentos *in vivo*, pode-se dizer que o

extrato aquoso de graviola é bem tolerado pelos animais do ponto de vista toxicológico.

7. BIBLIOGRAFIA

AKHTAR, M. S.; IGBAL, Z.; KHAN, M. N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo-Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research**. v. 38, 99–107, 2000.

ALMEIDA, F. A. et al. Multiple Resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**. v.59, n.4, p.622-625, 2010.

ALMEIDA, R. L. et al. Padronização e determinação da fotoestabilidade do extrato de folhas de *Photomorphe umbellata* L. Miq. (pariparoba) e avaliação da inibição *in vitro* de metaloproteases 2 e 9 na pele. v.44, n.1, 2008.

ALVAREZ, C. O. et al. Inseticidal, mutagenic and genotoxic evaluations of annonaceous acetogenins. **Natural Products Communications**. v.5, n.3, p.391-394, 2010.

AMARANTE, A. F. T. Resistência genética de ovinos à verminoses. **FarmPoint**, jun. 2006, Disponível em: <http://www.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/resistencia-genetica-de-ovinos-a-verminoses-138n.aspx>. Acesso em: 15 set. 2011.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE CRIADORES DE OVINOS. **Carne ovina**: produção e consumo no Brasil e nas Américas. mai 2010. Disponível em: <<http://www.aspaco.org.br/ovinoicias.php?id=848>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

BORGES, A. F., **Ação Reversora *in vitro* e *in vivo* do verapamil sobre a resistência de *Haemonchus contortus* à ivermectina**. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

BORGSTEEDE, F. et al. How widespread is resistance to ivermectin among gastrointestinal nematodes in sheep in the Netherlands. **Tijdschr Diergeneeskd**, v.135, n.21, p. 782-785, 2010.

BORIES, C. et al. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta Med**. v.57, n.5, p.434-436, 1991.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens species* (asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. **Journal of Ethnopharmacology**. v.57, n.2, p.131-138, 1997.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

CHAGAS, A. C. S. Pesquisas com Fitoterápicos para Controle da Verminose. **FarmPoint**, mai 2007. Disponível em: <http://www.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/sanidade/pesquisas-com-fitoterapicos-para-o-controle-da-verminose-36098n.aspx>. Acesso em: 14 set. 2011.

CHOA, D. **Consumo de carne ovina em crescimento**. jan 2010. Disponível em: <http://jcrs.uol.com.br/site/noticia.php?codn=18216>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

COLES, G. C. et al. World Association for Advancement in Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. v.44, p.35-44, 1992.

COSTA, C. T. C. et al. 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.

DIMRI, U.; SHARMA, M. C. Effects of sarcoptic mange and its control with iol of *Cedrus deodara*, *Pongamia glabra*, *Jatropha curcas* and benzyl benzoate, both with and without ascorbic acid on growing sheep: epidemiology; assessment of clinical, haematological, cell-mediated humoral immune responses and pathology. **Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medic**, v.51, p.71-78, 2004.

ELHAJILI, M. et al. Diuretic activity of the infusion of flowers from *Lavandula officinalis*. **Reproduction Nutrition Development**. v.41, n.5, p.393-399, 2001.

EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. **Demanda por carne ovina cresce 25%, mas oferta é baixa**, jan. 2010. Disponível em: <http://www.cnpc.embrapa.br/>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

FURTADO, S. K. et al. Efeito de *Carica papaya* L. (Caricaceae) e *Musa paradisiaca* Linn. (Musaceae) Sobre o Desenvolvimento de Ovos de Nematóides Gastrointestinais de Ovinos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.72, n.2, p.191-197, 2005.

FURTADO, S. K. **Alternativas Fitoterápicas Para o Controle da Verminose Ovina no Estado do Paraná: Testes *in vitro* e *in vivo***. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminthes in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v.139, n.4, p.308-320, 2006.

HALLIDAY, A. M.; SMITH, H. D. Attempts to immunize sheep against *Teladorsagia circumcincta* using fourth-stage larval extract. **Parasite Immunology**. n.33, v.10, p.554-560, 2011.

HOUNZANGBE-ADOTE, M. S. et al. In vitro effects of four tropical plantas on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**. v.78, p.155-160, 2005.

ITOKAWA H.; MORITA, M.; MIHASHI, S. Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**. v.20, n.11, p.2503-2506, 1981.

JARAMILLO, M. C. et al. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v.71, p.183-186, 2000.

JORAY, M. B. et al. Antibacterial activity of extracts from plants of central Argentina- isolation of an active principle from *Achyrocline satureioides*. **Planta Med**. v.77, n.1, p.95-100, 2011.

JORNAL O ESTADO DE SÃO PAULO. **Ovinos: Plantel cresce no Brasil, mas ainda é insuficiente**. 19 jan. 2010. Disponível em:
<[HTTP://WWW.estadao.com.br/estadaodehoje/20110119/not_imp66803.0.php](http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20110119/not_imp66803.0.php)>.
Acessado em: 30 jan.2011.

JOSEPH, L. B; KOUKOURAS, K. *Persea gratissima* (Avocado) sterols decrease UVB induced proinflammatory mediators. **Journal of Cosmetic Science**. v.53, n.5, p.309-311, 2002.

KAHN, C. M; LINE, S. **The Merck Veterinary Manual**. 10 ed. Whitehouse Station (New Jersey-USA). Merck Sharp & Dohme Coporation, 2011.

KIM, D. H.; SON, J. K.; WOO, M. H. Annomocherin, annonacin and annomontacin: a novel and two known bioactive mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona cherimolia* seeds. **Archives of Pharmacol Research**. v.24, n.4, p.300-306, 2001.

KRUTHIVENTI, A. K.; KRISHNASWAMY, N. R. Constituents of the flowers of *Persea gratissima*. **Fitoterapia**. v.71, n.1, p.94-96, 2000.

KVIECINSKI, M. R. et al. Brazilian *Bidens pilosa* Linné yields fraction containing quercetin-derived flavonoid with free radical scavenger activity and hepatoprotective effects. **Libyan Journal of Medicine**. v.18, n.6, 2011.

LEITE, E. Ovinocaprinocultura no nordeste: organização e crescimento. **Embrapa Sobral**, Agosto. 2000. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>Acessado em 03 fev 2010.

LI, H. et al. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. **Journal of Ethnopharmacology**. v.133, n.3, p.1085-1090, 2011.

LIAW, C. C. et al. Montacin and cis-Montacin, two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Journal of Natural Products**, v.67, n.11, p.1804-1808, 2004.

LIAW, C. C. et al. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.13, n.15, p.4767-4776, 2005.

LIN, R. J. et al. Larvicidal activities of ginger (*Zingiber officinale*) against *Angiostrongylus Cantonensis*. **Acta Tropica**, v.115, n.1-2, p.69-76, 2010.

LONAS NEGRAS. **Consumo de carne de cordeiro nas festas de fim de ano**. fev. 2010. Disponível em: <<http://www.lomasnegras.com/noticias.php?id=23>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

MACIEL, M. V. et al. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.140, p. 98-104, 2006.

MACHADO, A. A. **Endoparasitoses ovina**. In: Seminários Acadêmicos, abr. 2008. Disponível em <http://www.uniovinos.unipampa.edu.br>>Acessado em 03 fev 2010.

MALEBO, H. M. et al. Antiplasmodial, anti-trypanosomal, anti-leishmanial and cytotoxicity activity of selected Tanzanian medicinal plants. **International Journal of Health Research**. v.11, n.4, p.226-234, 2009.

MELO, A. C. F. L. et al. Resistência a anti-helmínticos a nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de pentecoste, estado do ceará. **Revista Ciência Animal**, v.8, n.1, p. 7-11, 1998.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; REIS, I. F. Resistência aos anti-helmínticos benzimidazóis em nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestinos brasileiros. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p.294-300, 2009.

MELO, T. C.; NOGUEIRA, E. A.; RODRIGUES, C.F.C. Entraves e desafios a caprinocultura no sudoeste paulista. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>Acessado em 03 fev 2010.

MENDONÇA, V. L. et. al. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.2, p.93-97, 1991.

MOLENTO, M. B.; PRICHARD, R. K., Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.21, n.3, p.117-121, 2001.

NOGUEIRA, E. A.; JUNIOR, S. N. Ovinos e caprinos avançam em São Paulo. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>Acessado em 03 fev 2010.

OASA, M. et al. A total synthesis of annonacin (1) was accomplished by using versatile chiral building block 2 for synthesizing the mono-tetrahydrofuran (THF) annonaceous acetogenins. **Bioscience Biotechnology**. v.74, n.6, p.1274-1275, 2010.

OJIMA, A. L. R. O.; BEZERRA, L. M. C.; OLIVEIRA, A. L. R. Caprinos e ovinos em São Paulo atraem argentinos. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, v.1, n.1, 2006. Disponível em:<<http://www.iea.sp.gov.br>>Acessado em 03 fev 2010.

OLIVEIRA L. M. B. et al. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**. v. 159, p. 55-59, 2009.

PARAUD, C.; CHARTIER, C. Biological control of infective larvae of a gastrointestinal nematode (*Teladorsagia circumcincta*) and a small lungworm (*Muellerius capillaris*) by *Duddingtonia flagrans* in goat faeces. **Parasitology Research**, v.89, p.102-106, 2003.

PENELUC, T. et al. Atividade anti-helmíntica de extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* lam. (rutaceae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.1, p.43-48, 2009.

PERAZZO, F. F. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, n.2, p.215-220, 2005.

PINTO, A. C. et al. New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.44, n.6, p.2731-2735, 2009.

POWERS, K. G. et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) – Guidelines for Evaluating the Efficacy of Anthelmintics in Ruminants (Bovine And Ovine). **Veterinary Parasitology**, v.10, p.265-284, 1982.

RAMOS, C. I. et al. Resistência de Parasitos Gastrintestinais de Ovinos a Alguns Anti-Helmínticos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.32, n.3, p.473-477, 2002.

ROCHA, R. A.; AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.. Resistance of Santa Ines and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Botucatu, v. 14, n. 1, p.17-20, 2005.

RODRIGUES, A. B. et al. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do sertão paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.4, p.162-166, 2007.

SACOMAN, J. L. et al. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.41, n.5, p.411-415, 2008.

SANTHANNA, S. **Mato Grosso registra crescimento de consumo de carne ovina no Estado**. 30 out. 2010 Disponível em: <<http://www.aguaboanews.com.br/>>. Acesso em: 30 jan. 2011.

SINDAN. **Mercado veterinário: Classes terapêuticas e espécies de animais**. 2009. Disponível em: <http://www.sindan.org.br/sd/sindan/index.html>. Acesso em: 11 jan. 2012.

SOUZA, M. M. C. et al. Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. seeds. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**. v.80, n.2, p.271-277, 2008.

SOYLU, E. M.; SOYLU, S.; KURT, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. **Mycopathologia**. v.161, n.2, p.119-128, 2006.

STAUDT, N. P.; SILVA, R. O. P. Perspectiva da produção de ovinos no estado de São Paulo. **Análise e Indicadores do Agronegócio**, v.3, n.5, 2008. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>Acessado em 03 fev 2010.

TARIQ, K. A.; CHISHTI, M. Z.; AHMAD, F. Gastro-intestinal nematode infections in goats relative to season, host sex and age from the Valley, India. **Journal of Helminthology**, v.84, n.1, p.93-97, 2010.

TEIXEIRA, H. F.; BASSANI, V. L. Avaliação da influência de adjuvantes de farmacêuticos sobre características físicas, químicas de extratos secos de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. **Caderno de Farmácia**. v.13, n.2, p.151-152, 1997.

TZAMALOUKAS, O. et al. The effect of chicory (*Cichorium intybus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on larval development and mucosal cell responses of growing lambs challenged with *Teladorsagia circumcincta*. **Parasitology Research**, v.132, p.419-426, 2006.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4 ed. Tóquio (Japan). Japan Internacional Cooperation Agency, p.25, 1998.

URQUHART, G. M. et al. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p.9-23, 1998.

VIEIRA, L. S. Métodos Alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v.2, n.2, p.49-56, 2008.

YONEYA, F. Criadores de ovinos festejam bons preços. **Jornal O Estado de São Paulo**, 19 jan. 2011. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20110119/not_imp668041,0.php>. Acesso em: 30 jan. 2011.

APENDICE A

RELAÇÃO DE CARNEIROS: EXAME LABORATORIAL																							
Dia do Experimento: 1			Data da Coleta: 15/06/2011																				
Grupo	Nº do Carneiro	HEMOGRAMA				BIOQUÍMICO																	
		Hemác. 106 mm ³	Hemat. (%)	Hemog. g/dL	Leuc. mm ³	Glicose mg/dL	Uréia mg/dL	Creat. mg/dL	Colest. mg/dL	Triglic. mg/dL	Ac. Úrico mg/dL	Prot. Tot. g/dL	Album. g/dL	Bilirru. D mg/dL	Bilirru. T mg/dL	AST/TG O U/L	ALT/TG P U/L	Fosf. Al c U/L	GamaG T U/L	Bilirru. I mg/dL	Col. VL DL mg/dL	Globul. mg/dL	ReI. A/G g/dL
Negativo Salina 1 ml/4kg	28	8.96	25	8,5	7.600	70	56	0,8	77	22	0,1	4,8	3,0	0,04	0,06	122	30	208	27	0,0	4,4	1,8	1,7
	14	7.9	24	7,8	11.200	75	56	0,8	48	21	0,2	5,0	2,8	0,08	0,15	82	9	241	33	0,1	4,2	2,2	1,3
	32	13.0	35	12,9	7.900	72	46	0,7	93	20	0,4	5,4	3,4	0,01	0,05	100	21	242	49	0,1	4,0	2,0	1,7
	8	14.9	30	10,8	9.300	58	66	0,8	71	20	0,3	6,2	2,8	0,02	0,04	262	20	250	46	0,0	4,0	3,4	0,8
	19	10.8	30	10,4	8.600	76	59	0,9	82	25	0,1	6,2	3,3	0,03	0,04	379	24	309	69	0,0	5,0	2,9	1,1
	30	10.8	30	10,5	9.000	78	43	0,8	80	14	0,3	5,1	2,8	0,03	0,06	114	25	252	37	0,0	2,8	2,3	1,2
Positivo Trimix 1 ml/kg	2	14.9	38	13,7	6.800	66	56	0,8	59	27	0,7	6,2	3,8	0,01	0,05	129	19	423	52	0,0	5,4	2,4	1,6
	22	13.1	36	13,2	10.500	67	45	1,0	72	21	0,4	5,8	3,7	0,01	0,05	79	26	187	23	0,0	4,2	2,1	1,8
	6	12.5	34	11,9	9.300	67	39	0,5	50	11	0,6	6,7	2,3	0,04	0,08	67	8	68	35	0,1	2,2	4,4	0,5
	35	11.0	30	10,9	15.200	72	53	0,9	78	23	0,3	5,0	3,5	0,01	0,11	89	8	189	40	0,1	4,6	1,5	2,3
	3	9.1	25	8,7	7.100	44	60	0,6	28	16	0,7	6,7	2,8	0,02	0,06	135	13	7	41	0,0	3,2	3,9	0,7
	9	13.3	35	13,6	8.300	64	36	0,5	51	10	0,2	6,3	2,4	0,03	0,06	69	2	107	29	0,0	2,0	3,9	0,6
	29	10.6	30	10,8	9.300	75	47	0,8	79	14	0,4	5,6	3,4	0,01	0,05	142	25	210	25	0,1	2,8	2,2	1,5
Teste G1 1 ml/kg Conc. 1 g/ml	5	11.8	33	11,8	9.100	64	74	0,5	47	52	0,2	5,7	2,6	0,04	0,07	147	16	111	46	0,1	10,4	3,1	0,8
	20	13.3	35	12,7	8.100	69	54	0,9	70	18	0,2	5,9	3,7	0,02	0,03	133	26	187	38	0,0	3,6	2,2	1,7
	21	13.8	37	13,1	8.600	68	47	0,9	83	3	0,3	6,1	3,9	0,02	0,05	78	6	433	52	0,0	0,6	2,2	1,8
	37	8.98	25	9,1	8.900	73	46	0,9	65	17	0,2	5,9	4,2	0,05	0,21	83	12	188	46	0,2	3,4	1,7	2,5
	34	7.6	22	7,8	10,6	74	61	0,9	52	14	0,2	4,7	2,7	0,01	0,10	106	13	66	38	0,1	2,8	2,0	1,4
	36	8.3	24	8,7	10.800	69	64	0,7	59	17	0,0	4,3	2,5	0,05	0,09	153	23	87	36	0,1	3,4	1,8	1,4
Teste G2 1 ml/kg Conc. 0,33g/ml	31	8.9	25	8,6	9.000	67	62	0,5	53	34	0,2	4,0	2,1	0,01	0,05	127	26	141	29	0,1	6,8	1,9	1,1
	33	9.78	28	8,9	8.600	66	51	0,9	81	15	0,1	5,8	3,0	0,02	0,05	128	30	174	36	0,1	3,0	2,8	1,1
	27	11.6	33	11,7	9.100	62	50	0,9	70	12	0,2	5,7	3,4	0,03	0,06	130	6	211	27	0,1	2,4	2,3	1,5
	4	9.0	25	8,6	8.600	60	76	0,7	50	22	0,3	7,4	3,1	0,03	0,07	126	18	541	46	0,0	4,4	4,3	0,7
	17	8.9	25	9,3	10.100	60	61	0,7	35	26	0,1	4,6	2,1	0,01	0,05	88	13	153	35	0,0	5,2	2,5	0,8
	12	9.18	26	8,6	12.900	63	75	0,5	22	16	0,0	5,9	2,3	0,03	0,08	142	18	58	52	0,1	3,2	3,6	0,6
Teste G3 1 ml/kg Conc. 0,11 g/ml	16	3.6	10	4,2	3.200	76	86	0,8	42	29	0,2	3,8	1,7	0,01	0,10	46	10	104	61	0,0	5,8	2,1	0,8
	26	14.0	35	14,2	7.600	66	53	0,9	63	24	0,4	6,4	3,2	0,04	0,08	87	5	295	38	0,1	4,8	3,2	1,0
	18	12.6	34	12,6	10.600	60	68	0,9	37	19	0,1	6,7	2,7	0,02	0,07	83	7	209	50	0,1	3,8	4,0	0,7
	23	13.6	37	13,2	9.000	63	55	0,8	89	15	0,1	5,9	3,9	0,03	0,04	114	11	422	28	0,0	3,0	2,0	2,0
	15	9.5	25	8,6	10.200	66	70	0,8	59	25	0,2	5,1	2,7	0,02	0,03	72	19	231	24	0,0	5,0	2,4	1,1
	25	10.6	30	10,5	8.300	69	51	1,0	78	26	0,2	5,9	3,4	0,00	0,05	92	5	302	32	0,1	5,2	2,5	1,4

APENDICE B

RELAÇÃO DE CARNEIROS: EXAME LABORATORIAL																								
Dia do Experimento: 1					Data da Coleta: 22/06/2011																			
Grupo	Nº do Carneiro	HEMOGRAMA				BIOQUÍMICO																		
		Hemác.	Hemat.	Hemog.	Leuc.	Glicose	Uréia	Creat.	Colest.	Triglic.	Ac. Úrico	Prot. Tot.	Album.	Bilirru. D	Bilirru. T	AST/TGO	ALT/TGP	Fosf. Alc	GamaGT	Bilirru. I	Col. VL DL	Globul.	Rel. A/G	
		106 mm ³	(%)	g/dL	mm ³	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	mg/dL	mg/dL	U/L	U/L	U/L	U/L	mg/dL	mg/dL	mg/dL	g/dL
Negativo Salina 1 ml/4kg	28	8.9	25	8,0	8.100	83	77	0,9	44	43	0,8	5,3	3,1	0,01	0,06	20	30	249	34	0,1	8,6	2,2	1,4	
	14	6.3	17	6,9	12.800	66	47	0,7	31	36	0,3	4,6	2,3	0,02	0,09	50	12	216	40	0,1	7,2	2,3	1,0	
	32	7.6	22	7,8	12.900	67	52	0,7	39	23	0,4	4,5	2,9	0,01	0,04	97	18	335	67	0,0	4,6	1,6	1,8	
	8	14.9	30	10,6	5.100	73	64	0,7	40	37	0,6	6,3	2,7	0,01	0,03	103	22	371	34	0,0	7,4	3,6	0,8	
	19	10.8	30	10,9	7.500	58	43	0,7	38	41	0,2	4,4	2,3	0,01	0,05	63	18	270	46	0,0	8,2	2,1	1,1	
	30	8.6	25	7,9	3.900	79	58	0,7	34	22	0,0	4,6	2,7	0,02	0,08	46	15	290	63	0,1	4,4	1,9	1,4	
Positivo Trimix 1 ml/kg	2	14.1	38	13,7	12.100	68	48	0,8	55	22	0,3	5,7	3,5	0,02	0,05	102	25	348	46	0,0	4,4	2,2	1,6	
	22	11.2	33	11,8	6.000	75	52	0,8	40	25	0,4	5,1	3,1	0,02	0,10	67	18	229	45	0,1	5,0	2,0	1,6	
	6	10.5	30	10,4	12.700	65	39	0,5	29	24	0,2	6,1	2,1	0,02	0,08	50	13	140	39	0,1	4,8	4,0	0,5	
	35	11.0	30	10,9	16.300	72	60	1,0	43	28	0,2	4,6	3,2	0,03	0,13	75	10	140	62	0,1	5,6	1,4	2,3	
	3	9.18	25	8,9	7.600	71	46	0,6	33	26	0,4	6,2	2,5	0,02	0,08	86	13	183	52	0,1	5,2	3,7	0,7	
	9	10.6	30	10,6	12.300	74	60	0,7	38	27	0,2	6,1	2,8	0,02	0,05	67	20	294	61	0,0	5,4	3,3	0,8	
Teste G1 1 ml/kg Conc. 1 g/ml	29	10.6	30	10,8	6.100	68	55	0,8	47	19	0,3	4,9	2,9	0,02	0,04	115	17	201	39	0,0	3,8	2,0	1,5	
	5	10.6	30	10,6	11.000	50	49	0,5	27	22	0,1	4,6	2,0	0,02	0,10	115	20	131	49	0,1	4,4	2,6	0,8	
	20	9.7	28	9,3	12.300	68	56	0,8	38	14	0,4	5,7	3,4	0,02	0,07	102	23	238	49	0,1	2,8	2,3	1,5	
	21	13.3	37	13,0	5.100	70	51	0,8	35	22	0,4	5,2	3,3	0,02	0,07	66	8	379	67	0,1	4,4	1,9	1,7	
	37	8.9	25	8,9	6.300	73	51	0,8	31	41	0,3	5,3	3,8	0,01	0,23	69	16	188	40	0,2	8,2	1,5	2,5	
	34	7.6	22	7,2	12.800	66	62	0,8	35	28	0,2	4,4	2,5	0,03	0,10	80	16	65	67	0,1	5,6	1,9	1,3	
Teste G2 1 ml/kg Conc. 0,33g/ml	36	8.3	24	8,7	13.300	69	44	0,6	40	31	0,2	3,3	1,8	0,02	0,09	308	17	81	195	0,1	6,2	1,5	1,2	
	31	3.6	10	3,6	12.800	78	56	0,5	27	15	0,3	3,9	2,0	0,02	0,11	60	15	126	43	0,1	3,0	1,9	1,1	
	33	7.9	23	7,7	3.800	71	51	0,8	26	20	0,3	5,5	3,0	0,02	0,06	474	33	301	73	0,0	4,0	2,5	1,2	
	27	9.10	26	8,6	12.300	101	37	0,7	28	18	0,1	4,8	3,0	0,02	0,08	567	45	192	60	0,1	3,6	1,8	1,7	
	4	6.98	20	6,9	12.200	71	63	0,6	25	22	0,4	5,5	2,5	0,02	0,10	95	17	863	50	0,1	4,4	3,0	0,8	
	17	8.9	25	9,3	12.300	62	58	0,7	51	26	0,3	3,5	1,7	0,03	0,05	114	12	94	16	0,0	5,2	1,8	0,9	
Teste G3 1 ml/kg Conc. 0,11 g/ml	12	MORREU																						
	16	MORREU																						
	26	14.0	35	14,0	5.600	69	45	0,8	31	28	0,4	5,5	2,8	0,01	0,07	59	11	365	44	0,1	5,6	2,7	1,0	
	18	12.6	34	12,3	11.800	72	60	0,8	35	23	0,4	6,1	2,5	0,02	0,04	66	14	227	50	0,0	4,6	3,6	0,7	
	23	10.6	30	10,9	6.500	75	49	0,7	38	25	0,4	5,3	3,4	0,09	0,11	112	12	6,25	28	0,1	5,0	1,9	1,8	
	15	5.6	15	5,2	13.100	52	51	0,6	39	35	0,3	3,9	2,0	0,01	0,04	43	14	184	24	0,0	7,0	1,9	1,1	
25	10.6	30	10,5	5.100	29	52	0,8	30	24	0,4	5,5	3,0	0,01	0,08	472	27	303	86	0,1	4,8	2,5	1,2		