UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ÉRIKA BREDA CANOVA

Eficiência de plantas taniníferas no controle de helmintos gastrintestinais de ovinos

Piracicaba
2016

ÉRIKA BREDA CANOVA

Eficiência de plantas taniníferas no controle de helmintos gastrintestinais de ovinos

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Helder Louvandini

Coorientadora: Dra. Luciana Morita Katiki

Piracicaba

2016

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Canova, Érika Breda

Eficiência de plantas taniníferas no controle de helmintos gastrintestinais de ovinos / Érika Breda Canova; orientador Helder Louvandini; coorientadora Luciana Morita Katiki. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

100 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Leguminosas forrageiras 2. Metabólitos secundários 3. Nematoides 4. Ovinocultura 5. Pau-Brasil 6. Sustentabilidade I. Título

CDU (633.875 : 595.1) 636.3

Dedico,

Aos meus pais Jurandir José Canova e Ilce Breda Canova,

Ao meu marido Heverton Luís Moreira, as minhas três bolotinhas e

À minha vózinha Verônica (em memória), pela qual sinto imensa gratidão, carinho, amor, respeito, orgulho, e principalmente, muitas saudades...

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por tudo de maravilhoso que tem feito em minha vida e por ter me amparado nos momentos difíceis

Aos melhores pais do mundo

Jurandir José Canova e Ilce Breda Canova pelo amor incondicional, apoio, compreensão, dedicação, paciência...

Minhas Marías

Amazona Maria (em memória), Fany Maria e Preta Maria que me proporcionam as melhores alegrias do mundo, melhor companhia na hora de escrever, pela dedicação exclusiva e pelo amor incondicional. AMOR VERDADEIRO, AMOR ETERNO...

Ao meu Marido Heverton Luís Moreira

Pela paciência, dedicação, amor, respeito, carinho, força, compreensão, ajuda e alegrias

A minha co-orientadora

Dra Luciana Morita Katiki, por ter sido muito presente, paciente, e principalmente, por ter acreditado em mim na realização desse trabalho.

Agradeço imensamente pela amizade, pelas boas conversas, pelas viagens, pelos desabafos e pelas ótimas gargalhadas!

Ao meu orientador

Professor Dr Helder Louvandini pela paciência na orientação deste trabalho

A FAPESP

Pelo auxílio de reserva e pela bolsa de estudos durante o doutorado (2012/18379-3)

Ao CNPq

Pelo financiamento deste projeto (476880/2012- 2)

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP

Por conceder-me a oportunidade da realização do Doutorado

A Embrapa

Plataforma Nacional de Recursos Genéticos (Cenargen – Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia) por ter fornecido *C. elegans*.

Ao Instituto de Zootecnia - IZ

Por conceder-me a oportunidade da realização de todo meu projeto de Doutorado

Aos meus colegas do CENA

Andressa Santanna Natel, Rafael Meneghini, Ana Claudia Koki S. Issakowicz, Juliano Issakowicz, Paulo Tavares, Adibe Luiz Abdalla Filho, Ronaldo Lucas, Patrícia Pimentel, Alessandra Romero, Tairon Pannunzio, Jade Soares, Taís Cavallaro, Tali Aspis, Egon Hion Ieda, Carina Nazato, Fernanda Campos, Dinesh Dhanasekaran e Alinne Schumann

Aos colegas do IZ

Carol, Leandro, Gunta, Regis, Jefferson, Andiara e Márcia, meu muito obrigada pelo auxílio, compreensão, dedicação, amizade e paciência

Aos meus amigos e amigas

Que nos momentos de lazer se fizeram prestativos, dando força e coragem para seguir tocando em frente

A todas as pessoas que convivo de maneira direta ou indiretamente que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho, um muito obrigada e que Deus ilumine a todos nós!

RESUMO

CANOVA, E. B. **Eficiência de plantas taniníferas no controle de helmintos gastrintestinais de ovinos**. 2016. 100 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Os endoparasitas têm demonstrado resistência aos principais anti-helmínticos. Por isso é necessário investigar estratégias sustentáveis, sendo uma das alternativas a utilização de plantas leguminosas (*Fabaceae*). Objetivou-se avaliar a atividade anti-helmíntica de 17 extratos de plantas no teste de inibição da eclodibilidade dos ovos (TIEO), teste de inibição de desembainhamento de larvas (TIDL) de *Haemonchus contortus* e o teste de motilidade do *Caenorhabditis elegans* (TMCL), *in vitro*. As duas melhores plantas foram levadas para teste *in vivo* (*Arachis pintoi* cv Amarillo e *Caesalpinia echinata*). Os extratos foram feitos a partir das folhas de *Arachis pintoi* cv Amarillo, *Caesalpinia echinata, Cajanus cajan, Calopogonium velutinum, Canavalia ensiformis, Centrosema pubencens* cv Cardillo, *Cratylia mollis, Dipteryx alata, Gliricidia sepium, Leucaena leucocephala* cv Cunningham, *Leucaena pulverulenta, Mimosa caesalpiniaefolia, Neonotonia wighiti* cv Cianova, *Noenotonia wighiti* cv Tinaroo, *Piptadenia colubrina, Stylosanthes guianensis* e *Styzolobium aterrimun*, as quais foram coletadas no campo agrostológico do Instituto de Zootecnia em Nova Odessa/SP. Seus princípios ativos foram extraídos em solução de acetona:água 70:30, solvente retirado por rotaevaporação, seguido por lavagem com diclorometano e liofilizado. Os resultados obtidos para o TIEO, TIDL e para o TMCE foram baseados na concentração inibitória de 50% (CI_{50}), maior concentração testada 50 mg/mL e a menor 0,0975 mg/mL nos TIEO e TIDL, e TMCE a maior foi 50 mg/mL e a menor 0,039 mg/mL. Em ordem da maior para menor eficácia no TIEO foram para o extrato de *P. colubrina* (0,10 mg/mL), extrato de *C. echinata* (0,17 mg/mL) e extrato *M. caesalpiniaefolia* (0,53 mg/mL). Os resultados do TIDL em ordem da maior para menor eficácia foram para o extrato de *S. guianensis* (0,51 mg/mL), extrato de *A. pintoi* cv Amarillo (1,04 mg/mL) e extrato de *C. echinata* (1,25 mg/mL). O resultado obtido com maior eficiência na CI_{50} do TMCE foi o extrato de *C. echinata* (0,49 mg/mL), o extrato de *M. caesalpiniaefolia* (1,03 mg/mL), extrato de *Dipteryx alata* (1,50 mg/mL) e extrato de *P. colubrina* (1,56 mg/mL). Para o experimento *in vivo* utilizou-se 30 ovinos, PV médio de 32 kg (+/- 0,59), mestiços Dorper/Santa Inês, machos, não castrados. Animais foram divididos em três tratamentos: *A. pintoi* (A), *C. echinata* (B) e controle (C) infectados sem tratamento, cada tratamento continha 10 animais. Animais dos tratamentos A e B foram tratados com 10 g da planta moída juntamente no concentrado. Foram colhidos sangue e fezes para análises. Final do experimento os animais foram abatidos e abomaso lavado para a recuperação dos *H. contortus*. O tratamento A obteve OPG (1015) quando comparado com OPG dos tratamentos B (1244) e C (1537). O comprimento dos nematoides machos (A = 1,24 cm; B = 1,31 e C = 1,35) e fêmeas (A = 1,83 cm; B = 1,91 e C = 1,97) encontrados em cada tratamento teve diferença significativa, sendo a quantidade de nematoides do tratamento A menores. Conclui-se que a planta *A. pintoi* propiciou redução no OPG e comprimento dos nematoides sugerindo ação anti-helmíntica com potencial de uso no controle sustentável desta verminose.

Palavras-chave: Amendoim forrageiro, Compostos fitoquimícos, Ovinocultura, Pau Brasil Sustentabilidade

ABSTRACT

CANOVA, E. B. **Tanniferous plants (leguminous) efficiency for controlling gastrointestinal parasitism of sheep**. 2016. 100 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

Endoparasites have demonstrated resistance to the main anthelmintics found in the market and new sustainable strategies are needed to control them. This work aimed to evaluate the anthelmintic activity of 17 extracts of taniniferous plants that belongs to the *Fabaceae* family by *in vitro* egg hatch test (EHT), larval exsheathment test (LET) with *Haemonchus contortus* and larval motility test (LMT) with *Caenorhabditis elegans*. *Arachis pintoi* cv Amarillo and *Caesalpinia echinata*. *Arachis pintoi* cv Amarillo, *Caesalpinia echinata, Cajanus cajan, Calopogonium velutinum, Canavalia ensiformis, Centrosema pubencens* cv Cardillo, *Cratylia mollis, Dipteryx alata, Gliricidia sepium, Leucaena leucocephala* cv Cunningham, *Leucaena pulverulenta, Mimosa caesalpiniaefolia, Neonotonia wighiti* cv Cianova, *Noenotonia wighiti* cv Tinaroo, *Piptadenia colubrina, Stylosanthes guianensis* and *Styzolobium aterrimun* were collected from Agrostological field from Instituto de Zootecnia (Nova Odessa/SP). The phytochemicals were extracted by maceration in acetone:water (70:30). The acetone was rotoevaporated and the aqueous extract was cleared with dicloromethane. The remaining extract was liofilized and kept frozen until the use in vitro tests. EHT, LET were performed with doses ranging from 50 mg/mL to 0.0975 mg/mL and LMT with doses ranging from 50 mg/mL to 0.039 mg/mL. LC_{50} were calculated to compare efficacies. The extracts *P. colubrina* (0.1 mg/mL), *C. echinata* (0.17 mg/mL) and *M. caesalpiniaefolia* (0.53 mg/mL) presented the best results in EHT. *L. pulverulenta, C. cajan, C. mollis* and *S. aterrimun* were not effective at the higher dose in EHT (50 mg/mL). In the LET the extracts of *S. guianensis* (0.51mg/mL), *A. pintoi* cv Amarillo (1.04 mg/mL) and *C. echinata* (1.25 mg/mL) had the best results. In LMT, the extracts of *C. echinata* (0.49 mg/mL), *M. caesalpiniaefolia* (1.03 mg/mL), *D. alata* (1.5 mg/mL) and *P. colubrina* (1.56 mg/mL) had the best results. *A. pintoi* and *C. echinata* were chosen to be tested *in vivo.* In order to evaluate the plants over lambs infected with parasites, 30 lambs with average body weight of 32 kg (+/- 0,59 kg), Dorper x Santa Ines, male and not castrated were divided equaly in 3 treatments: (A) *A. pintoi* 10 g/day, (B*) C. echinata* 10 g/day and (C) control. The plants were grinded and mixed with concentrate and offered during all experiment. Blood and feces were collected for analysis. At the end of experimental period, animals were slaughtered and *H. contortus* were recovered from abomasum for counts, measurements and evaluation of female fertility (count of eggs). Treatment (A) with *A. pintoi* had lower FEC (1015) when compared with (B) *C. echinata* with FEC of 1244 and (C) Control with FEC of 1537 (*P<0.05).* The length of male worms (A = 1,24 cm; B = 1,31 cm e C = 1,35 cm) and female (A = 1,83 cm; B = 1,91 cm e C = 1,97 cm) presented differences (*P<0.05),* as the (A) group present smaller length. It was concluded that *A. pintoi* cv Amarillo reduced FEC and the size of the worms suggesting potencial anthelmintic effect in the sustainable control of parasites.

Keywords: Brazilwood, Peanut forage, Phytochemical compounds, Sheep, Sustainability

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Ovo e a casca do ovo de *Haemonchus contortus*..... 22

Figura 2.2 - Larva infectante (L_3) de *H. contortus*/Liberação da bainha..... 23

Figura 2.3 - Passo a passo da extração dos compostos fitoquímicos das plantas com diclorometano..... 32

Figura 2.4 - TIEO – Placa de poço de polietileno com os ovos de *H. contortus* e as concentrações dos extratos..... 33

Figura 2.5 - TIDL..... 33

Figura 2.6 - Ovos dentro do nematoide *C. elegans*..... 35

Figura 2.7 - Vulva do *C. elegans*..... 35

Figura 2.8 - TMCE – *C. elegans* na placa de poço de polietileno com as concentrações dos extratos..... 36

Figura 2.9 - Ciclo de vida do *C. elegans*..... 37

Figura 5.1 - Protocolo experimental utilizado..... 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Valores de Fenóis Totais (FT), Taninos Totais (TT) e Taninos Condensados (TC) das plantas dos respectivos extratos..... 55

Tabela 3.2 - Valores encontrados em ordem decrescente para a Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) dos extratos das plantas e a porcentagem da eclodibilidade do ovos com os extratos mais PVPP (E+PVPP) que foram avaliados para o Teste de Inibição da Eclodibilidade dos Ovos (TIEO) de *H. contortus*..... 56

Tabela 3.3 - Correlação entre os valores encontrados de Fenóis Totais (FT), Taninos Totais (TT), Taninos Condensados (TC) das plantas (p) e dos extratos (e) com a Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) dos extratos avaliados..... 58

Tabela 3.4 - Valores encontrados em ordem decrescente para a Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) dos extratos das plantas e a porcentagem do desembainhamento das larvas com os extratos mais PVPP que foram avaliados para o Teste de Inibição de Desembainhamento das Larvas (TIDL) de *H. contortus*..... 59

Tabela 4.1 - Valores encontrados em ordem decrescente para a Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) dos extratos das plantas avaliados no Teste de Motilidade do *C. elegans* (TMCE) e a porcentagem do desembainhamento das larvas com os extratos mais PVPP (E+PVPP)..... 75

Tabela 5.1 - Análise bromatológica dos componentes da dieta e os valores de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados das plantas utilizadas no experimento..... 89

Tabela 5.2 - Número de ovos por gramas de fezes (OPG) dos ovinos nos tratamentos e ao longo do período experimental..... 92

Tabela 5.3 - Quantidade e comprimento dos machos e fêmeas de *H. contortus* e fecundidade das fêmeas nos tratamentos utilizados..... 93

Tabela 5.4 - Parâmetros sanguíneos (hemograma e bioquímico) dos ovinos de cada tratamento experimental..... 93

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 17

2. REVISÃO DA LITERATURA..... 20

2.1. Panorama da ovinocultura..... 20

2.2. Nematoide gastrintestinal – *Haemonchus contortus*..... 21

2.3. Resistência anti-helmíntica..... 26

2.4. Fitoquímicos..... 27

2.5. Validação do uso de compostos fitoquímicos..... 30

2.5.1 Métodos de extração..... 31

2.5.2 Teste de inibição de eclodibilidade dos ovos (TIEO)..... 32

2.5.3 Teste de inibição do desembainhamento da larva (TIDL)..... 33

2.5.4 Triagem com *Caenorhabditis elegans*..... 34

2.5.5 Teste *in vivo*..... 38

Referências..... 40

3 – Eficiência dos extratos de plantas leguminosas em testes *in vitro* com *Haemonchus contortus*

3.1. Introdução..... 50

3.2. Materiais e Métodos..... 51

3.2.1. Colheita e processamento das plantas..... 51

3.2.2. Extração dos princípios ativos..... 51

3.2.3. Quantificação dos taninos das folhas e extratos..... 52

3.2.4. Teste de inibição de eclodibilidade dos ovos (TIEO)..... 52

3.2.5. Teste de inibição do desembainhamento da larva (TIDL)..... 53

3.2.6. Estatística..... 54

3.3. Resultado..... 54

3.4. Discussão..... 60

3.5. Conclusão..... 64

Referências..... 65

4 – Teste de motilidade com *Caenorhabditis elegans* para triagem de plantas leguminosas

4.1. Introdução..... 70

4.2. Materiais e Métodos..... 72

4.2.1. Colheita e processamento das plantas..... 72

4.2.2. Extração dos princípios ativos..... 72

4.2.3. Quantificação dos taninos das folhas e extratos..... 72

4.2.4. Cultivo do *Caenorhabditis elegans*..... 72
4.2.5. Teste de motilidade do *Caenorhabditis elegans* (TMCE)..... 73
4.2.6. Estatística..... 74
4.3. Resultado..... 74
4.4. Discussão..... 76
4.5. Conclusão..... 80
Referências..... 80

5 – Utilização de *Arachis pintoi* cv Amarillo e *Caesalpinia echinata* em testes *in vivo* no controle de *Haemonchus contortus*

5.1. Introdução..... 86
5.2. Materiais e Métodos..... 88
5.2.1. Local do experimento, colheita e processamento das plantas..... 88
5.2.2. Animais e manejo..... 89
5.2.3. Teste *in vivo*..... 90
5.2.4. Abate dos animais..... 91
5.2.5. Estatística..... 92
5.3. Resultado..... 92
5.4. Discussão..... 94
5.5. Conclusão..... 97
Referências..... 97

1. INTRODUÇÃO

O ovino foi a primeira espécie a ser domesticada pelo homem, a qual foi utilizada como fonte de alimento (carne e leite) e também como proteção, pelo uso da lã e couro servindo de abrigo para se proteger das intempéries ambientais da época. A criação ovina se expandiu por todos os territórios e a ampla propagação da espécie foi, principalmente, pelo poder de adaptação à diferentes climas, relevos e vegetações. Aqui no Brasil a criação de ovinos teve influência, principalmente, dos portugueses durante o período de colonização. A princípio a criação de ovinos era voltada somente para a produção de lã e aos poucos, dependendo das necessidades de cada região, os animais foram sendo adaptados para a produção de lã e de carne (VIANA, 2008).

Os ovinos antes da domesticação apresentavam hábitos migratórios e eram mantidos livres das altas infecções por nematoides gastrintestinais. Por estarem sempre dispersos não apresentavam as chances de reinfecção. Contudo, a capacidade de ter forragens com alto valor nutritivo possibilitou o aumento de número de animais por hectare, isso fez com que quebrasse o equilíbrio entre hospedeiro-parasita, e desde então, os produtores de ovinos vêm enfrentando graves problemas com os nematoides gastrintestinais (SANTIAGO et al., 1976).

Juntamente com a expansão da ovinocultura brasileira surgiram também os problemas sanitários que são os nematoides gastrintestinais, os quais acometem os rebanhos mundialmente. Esses nematoides gastrintestinais são responsáveis, na maioria das vezes, por grande parte da perda econômica na produção de pequenos ruminantes, pois causa baixo desenvolvimento em todas as fases na criação da ovinocultura, e com o agravo de que esta enfermidade pode levar a óbito, principalmente os animais jovens e em fêmeas no periparto (BORGES et al., 2013).

O Brasil por ser um país de clima tropical e por possuir condições ambientais favoráveis (umidade alta e temperaturas elevadas acima de 20 ºC) há aumento na proliferação dessas espécies parasitárias, sendo que, a espécie que mais causa prejuízo no rebanho de ovinos é o nematoide gastrintestinal *Haemonchus contortus*. Entretanto, as infecções de um rebanho geralmente são mistas (ALMEIDA et al., 2010) e o controle destas infecções parasitárias é imprescindível para que haja sucesso na produção de pequenos ruminantes.

Os endoparasitas, atualmente, têm demonstrado ser resistentes aos principais anti-helmínticos existentes no mercado e um dos motivos disto foi pelo uso errôneo e indiscriminado dessas substâncias químicas (MOLENTO, 2004; HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011; VERISSÍMO et al., 2012). Nesse contexto é necessário investigar

estratégias sustentáveis para o controle desses nematoides. Uma das alternativas sustentáveis são os estudos com plantas leguminosas, as quais possuem compostos fitoquímicos como, por exemplo, as saponinas, a nicotina, piretrinas, terpenos, xantonas, rotenona, morfina, os taninos condensados (TC), entre outros, sendo que, os TC apresentam ação anti-helmíntica, exercendo ação direta ou indireta nos endoparasitas. Além disso, o controle alternativo pode diminuir o resíduo na carne e no leite e, também, no meio ambiente. É sabido que os compostos das plantas tem origem a partir de uma relação alelopática entre a planta (espécie e estágio de desenvolvimento) e o ambiente (intemperes e geografia) onde se encontra (WINK, 2008; TORRES-ACOSTA et al., 2012).

Pesquisas em torno dos produtos naturais estão expandindo cada vez mais, isso está ocorrendo devido ao aumento dos relatos existentes a resistência dos anti-helmínticos existentes no mercado. Esse processo de resistência se deu pelo uso errôneo desses produtos, pela má aplicação do produto, pelo curto intervalo entre os tratamentos, pela utilização de uma mesma classe de anti-helmínticos por longos períodos, pelo uso de medicamentos vencidos, pela super dosagem devido ao equivoco na estimativa do peso do animal, utilização de produtos de origem duvidosa, a rápida alternância de diferentes grupos, os tratamentos não seletivos, o uso de medicamentos de longa persistência e a compra de animais infectados com cepas resistências (SILVESTRE et al., 2002; MOLENTO, 2004; BESIER, 2006; TORRES-ACOSTA et al., 2012; FALZON et al., 2013; MCMAHON et al., 2013; MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013).

Vários testes *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar o potencial de plantas com ação anti-helmíntica, dentre eles pode-se destacar: teste de inibição de eclodibilidade dos ovos (TIEO), o teste de inibição do desembainhamento larval (TIDL) de *H. contortus* e o teste de motilidade do *Caenorhabditis elegans* (TMCE), cada um identificando ação sobre determinada fase de vida do endoparasita. Além disto, avaliações *in vitro* são mais rápidas e menos onerosas que testes *in vivo*.

Dentre a riqueza da flora brasileira foram selecionadas dezessete plantas para verificar sua ação no combate ao nematoide *H. contortus.* Para a validação do uso dos extratos feitos a partir das plantas leguminosas com atuação anti-helmíntica, foram realizados testes *in vitro* para confirmar a sua eficiência e determinar a segurança de sua utilização em organismos vivos e, a partir da obtenção dos dois melhores resultados *in vitro* é que foi realizado o teste *in vivo*.

Os extratos avaliados foram obtidos das seguintes plantas: *Arachis pintoi* cv Amarillo, *Caesalpinea echinata, Cajanus cajan, Calopogonium velutinum, Canavalia ensiformis, Centrosema pubencens* cv Cardillo, *Cratylia mollis, Dipteryx alata, Gliricidia sepium, Leucaena leucocephala* cv Cunningham, *Leucaena pulverulenta, Mimosa caesalpiniaefolia, Neonotonia wighiti* cv Cianova, *Noenotonia wighiti* cv Tinaroo, *Piptadenia colubrina, Stylosanthes guianensis* e *Styzolobium aterrimun.*

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Panorama da ovinocultura

O Brasil se destaca por possuir clima favorável e uma grande extensão territorial, fatores estes que auxiliam na produção ovina. O número do rebanho de ovinos no Brasil no ano de 2004, segundo a ANUALPEC, era de a 14.731.982 milhões de cabeças, em 2005 o efetivo desse rebanho passou para 16.063.135 milhões e em 2006 atingiu 17.105.572 milhões de animais. Entre os anos de 2009 e 2010, houve uma oscilação no número efetivo de ovinos no Brasil, e segundo o IBGE, o tamanho do rebanho foi de 16.812.105 e 17,3 milhões de cabeça, respectivamente. Em 2011, o número efetivo de ovinos em território brasileiro era de 17.668.063 de cabeças, e em 2012, esse número teve uma queda de 5 %, atingindo 16.789.492 milhões de cabeças de animais. Já no ano de 2013 houve um aumento de 3 % no efetivo do rebanho de ovinos aqui no Brasil. Quando comparado com o ano de 2012, a quantidade total de ovinos em 2013 foi de 17.291 milhões de cabeça (IBGE, 2011; 2012; 2013). Segundo o IBGE o rebanho efetivo de ovinos no ano de 2014 passou para quase 17.615 milhões de cabeça.

Em se tratando de rebanhos ovinos, destaca-se a presença de nematoides gastrintestinais, os quais podem acometer toda a criação de um único produtor, gerando grandes perdas na criação. Neste contexto, um dos nematoides que mais causa perda na economia e na criação de ovinos é *Haemonchus contortus* (família dos tricostrongilídeos), por ser um parasita hematófago, causa anemia aos animais e acarreta a morte dos mesmos. Todavia, a infecção geralmente é acompanhada por uma infecção mista, podendo ter a presença de *Trichostrongylus colubriformis* (que causa enterite e diarreia), a presença de *Cooperia* spp. (perda de apetite e baixo ganho de peso), de *Oesophagostomum* spp (responsáveis por enterite, que em infecções agudas, provoca grave diarreia) e *Strongyloides papillosus* (ALMEIDA et al., 2010).

A infeção mista prejudica ainda mais o desenvolvimento da ovinocultura, pois limita a criação destes animais ao redor do mundo, sendo responsável por elevada perda econômica, devido ao crescimento tardio, perda em peso, redução no consumo, queda na produção de leite, baixa fertilidade e alta taxa de mortalidade. Esses fatos ocorrem devido as lesões causadas pelos nematoides na mucosa do abomaso e intestinal. Essas lesões provocam distúrbios na absorção dos nutrientes, espoliação hematófaga, infecções subclínicas, em alguns casos vêm associadas à diarreia com presença de sangue, anemia, baixa condições corporal e baixo rendimento de carcaça (SOULSBY, 1992).

Diante do exposto, uma das táticas para ajudar na profilaxia da verminose dos rebanhos de ovinos é o uso de plantas que apresentam potencial no controle dos nematoides gastrintestinais. Existem vários estudos frente à linha de pesquisa com fitoterápicos, os quais, vêm apresentando resultados promissores com elevado potencial no controle estratégicos sustentável contra esses nematoides gastrintestinais (MOLENTO, 2004; ALONSO-DÍAZ, 2008; MAX, 2009; MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO et al., 2010; ALONSO-DÍAZ et al., 2011; ÁLVAREZ et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; HERNANDEZ et al., 2014), sendo que, um dos pontos altos do uso de fitoterápicos é não apresentar resíduo na carne e no leite para o consumo humano e para o meio ambiente também melhorando a sustentabilidade do sistema de produção.

2.2. Nematoide gastrintestinal – *Haemonchus contortus*

H. contortus é um nematoide endoparasita, hematófago, que acomete os pequenos ruminantes, possuem alta patogenicidade e de prevalência, possui característica monóxeno (não necessita de hospedeiro intermediário), possui o ciclo de vida direto. A distribuição geográfica do *H. contortus* é mundial, sendo mais encontrado em regiões que possui em clima tropical e subtropical (HOUNZANGBE-ADOTE et al., 2005).

As fêmeas de *H. contortus* são altamente prolíferas, com ovipostura de cerca de 5.000 ovos/fêmea/dia (LE JAMBRE, 1995). Os animais infectados eliminam os ovos pelas fezes e em condições entre 18 °C a 26 °C, umidade entre 80% a 100% e o oxigênio, são fatores que propiciam o desenvolvimento dos ovos para larvas infectantes. Caso os cíbalos fecais sequem antes de atingir estágio mais avançado, esses ovos se tornam inviáveis, porém se a perda de umidade for mais tardia os ovos permanecerão viáveis, mas em estágio de dormência. Em condições normais de temperatura e umidade, após seis horas, o embrião apresenta as extremidades mais espessas que o resto do corpo. Em 10 horas, já é possível ver a larva dentro do ovo enrolada em formato de oito. A casca do ovo ainda é bem rígida. Após, aproximadamente 22 horas, todos os ovos já eclodiram (VEGLIA, 1915).

Os ovos de *H. contortus* (Figura 2.1) apresentam em sua estrutura três camadas, as quais são: a vitelínica (camada externa), a camada quitinosa (intermediaria) e a camada basal que é constituída por lipídios e por proteínas (MANSFIELD et al., 1992). Na camada basal, o principal ingrediente é o colesterol, que está relacionada com a fluidez e a permeabilidade do ovo. Já a proteína desempenha as funções de respiração, comunicação entre as células, o crescimento, o transporte e o reconhecimento celular (ROTHNIE et al., 2001). Quando os ovos estão para eclodir ocorre a embriogênese, que ocorre a formação do fluído da eclosão

que provoca a mudança bioquímica na superfície do ovo. Esse fluído altera as ligações entre lipídios com lipídios e lipídios com proteínas, que resulta na instabilidade e na resistência dos ovos aos anti-helmínticos (RIOU et al., 2003). Pesquisa feita por Hillrichs et al. (2012) relataram a presença de uma proteína não imunológica presente nos ovos de *H. contortus*, chamada de lectina, os autores relataram que essa proteína possui uma alta afinidade em se ligar com TC e quando isso acontece ocorre a inibição dos ovos de *H. contortus.*

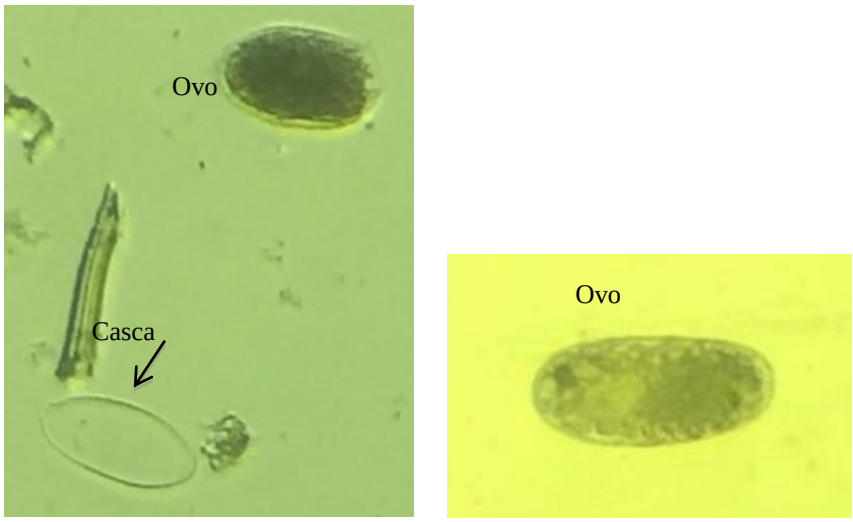

Figura 2.1 – Ovos e casca de ovo de *Haemonchus contortus*
Fonte: arquivo pessoal da autora

Da eclosão dos ovos até a larva de estágio um (L1) levam aproximadamente 21 horas. A L1 apresenta tamanho de 340 a 350 µm de comprimento e 15 a 20 µm de espessura, após uma hora de L1 as larvas começam a se alimentar e apresentam contrações em seu intestino. Por volta de 24 a 27 horas após a liberação dos ovos nas fezes do hospedeiro, as larvas apresentam os movimentos mais lentos e típicos, esses sinais ajudam a distinguir entre o 1º e o 2º estágio, é nessa fase que as larvas apresentam grânulos (lipídios) nas células dos intestinos e param de se alimentar, é nessa fase que se inicia o primeiro período letárgico, nessa fase as larvas ficam rígidas em formato de vírgula, aparentemente mortas, porem estão apenas no período de transição. Após 8 a 10 horas as larvas saem do estágio (VEGLIA, 1915).

Na fase larval de segundo estágio (L2), as larvas apresentam um crescimento marcante, possuindo larvas que alcançam 500 µm de comprimento. A L2 apresenta movimentos nadatórios, voltam a se alimentar e as células do intestino ficam maiores. Após determinado período onde a L2 tenha obtido alimento suficiente, ela passa para o segundo período letárgico, esse período pode ser desencadeado por fatores externos ou individuais. Nesse período as larvas permanecem esticadas e as mudanças são notadas pela abertura bucal

tornando-se mais estreita e o esôfago se torna menos marcante, adquirindo a larva um formato de lança. Ao final de todo esse processo a larva terá um corpo medindo 715 µm, 27 µm de diâmetro e uma cauda com 130 µm de comprimento e a larva apresentará uma bainha (cutícula) que a envolve. Entre 8 a 12 horas após todo esse processo, o período letárgico é finalizado e as larvas tornam-se ativas novamente, contudo se as condições ambientais não forem favoráveis, haverá um retardo nesse processo, sendo que em ambientes onde a temperatura é baixa (4 °C) pode ocorrer a inibição por completo do desenvolvimento do *H. contortus*, porem se o ambiente tiver uma temperatura média acima de 25 °C, o período de desenvolvimento larval da L2 até a L3 é de três dias após a eclosão do ovo (VEGLIA, 1915).

Da eclodibilidade dos ovos até o desenvolvimento para larva de terceiro estágio infectante (Figura 2.2), todo esse processo é desenvolvido na pastagem, fora do hospedeiro, considerado o período de vida livre do ciclo, que leva aproximadamente sete dias. No entanto, se as condições não estiverem favoráveis o desenvolvimento das larvas podem ser adiado por semanas, até meses (ONYIAH; ARSLAN, 2005).

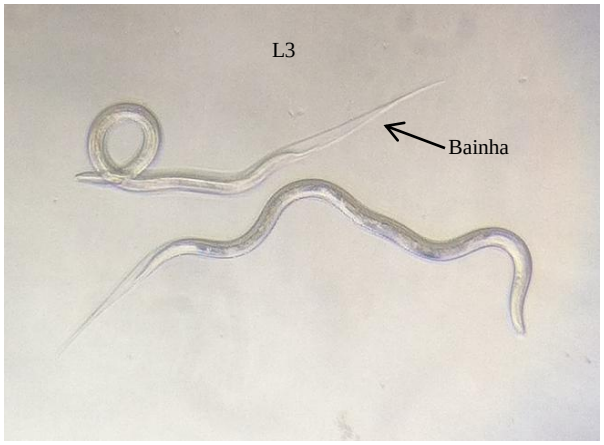

Figura 2.2 – Larva infectante (L3) *H. contortus* /Liberação da bainha
Fonte: arquivo pessoal

O período que compreende do terceiro (L3) até o quinto estágio (L5) ocorre dentro do hospedeiro, chamada de fase parasitária. A L3 apresenta movimentos mais rápidos e em espirais. Esses movimentos possibilitam a movimentação da larva nas pastagens, aumentando a chance da L3 ser ingerida pelo hospedeiro, e em seguida, a liberação da bainha (Figura 2.2). As características da L3 é semelhante com a L2, sendo que a maior diferença entre esses dois estágios é, principalmente, pelo tamanho das larvas e a presença da bainha envolta da larva (VEGLIA, 1915).

A bainha envolta do *H. contortus* é composta principalmente por proteína e uma pequena porção de lipídios e carboidratos. Essa composição está organizada estruturalmente em três camadas, sendo elas: a camada que é composta principalmente por colágeno (camada basal e intermediaria), a função do colágeno é o crescimento e a diferenciação celular, manutenção tecidual e a regulação do fluxo dentro dos tecidos (COX, 1992). Outra função do colágeno da bainha é que sua composição contém uma mistura de proteína que varia de tamanho, dependendo de cada espécie e a fase de desenvolvimento.

A segunda camada possui proteína, composta pela proteína ditirosina, e não possui colágeno, e está presente nas regiões epicuticular e cortical externa (denominada de cuticlin), é essa a camada que atua na proteção dos nematoides, por ser extremamente resistentes (FETTERER; RHOADS, 1990). E, por fim, a camada formada por proteína não-estrutural (está localizado na superfície externa da bainha). A bainha desse nematoide está associada por três cadeias de polipeptídios que se entrelaçam formado uma tripla-hélice, para que isso ocorra é preciso que todo terceiro aminoácido (glicina, prolina e hidroxiprolina) da cadeia polipeptídica seja uma glicina (FETTERER; RHOADS, 1993).

A L3 possui duas bainhas, uma que foi sintetizada antes da segunda muda, e que fica aderida ao corpo da larva, e a outra que é retida e que envolve a larva. Entre as bainhas há um espaço que é preenchido por um líquido rico em glicoproteína, o qual possui a função de lubrificar e impedir a aderência entre as bainhas (BIRD, 1990). A perda da bainha da L3 (desembainhamento) ocorre quando existe uma combinação de estímulos físicos-químicos vindo do hospedeiro, tais como a presença de metano, CO_2, temperatura e pH que estão presentes no rúmen do animal originando a fase L4 (ROGERS e SOMMERVILLE, 1962).

O nematoide antes de chegar na muda final desenvolve as lancetas perfurantes, que auxiliam sua fixação na parede do abomaso e na alimentação (sangue). O nematoide já adulto se move livremente pela superfície da mucosa. O tempo que leva da infecção até a eliminação dos ovos pelas fezes é de aproximadamente 21 a 28 dias (SOULSBY, 1992).

O monitoramento da infecção por *H. contortus* nos ovinos pode ser feito por exames através da contagem de células vermelhas no sangue, pela hemoglobina, pela concentração de albumina, pela taxa de consumo alimentar, pelo crescimento tardio do animal e pela contagem de ovos por grama (OPG) nas fezes. Quando o animal vem a óbito devido a infecção por *H. contortus* é possível fazer a recuperação do abomaso do animal, e a partir daí fazer todo o procedimento de lavagem desse abomaso para obter o numero de larvas de quarto e quinto estágio, o número de fêmeas e machos presente nesse abomaso, e também, o comprimento

desse nematoide adulto (MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

Os animais infectados com *H. contortus* geralmente apresentam anemia hemorrágica aguda, esse sintoma se dá devido ao hospedeiro ser hematófago, sugando em torno de 0,05 mL de sangue diariamente. Um ovino infectado com aproximadamente 5.000 *H. contortus* perderá cerca de 250 mL de sangue diariamente (TAYLOR; COOP; WALL, 2010), e para agravar ainda mais a situação, a infecção geralmente é mista, que pode acarretar mais danos aos ovinos.

A hemoncose aguda se torna visível em torno de duas semanas após a infecção. Essa infecção causa alguns sinais que são visíveis, como o edema mandibular (que é o extravasamento da proteína – hipoproteinemia) (FOX, 1993), inchaço no abdômen, as fezes ficam mais escuras e causa queda na lã, e também, a diminuição progressiva no hematócrito. Durante semanas subsequentes o hematócrito se estabiliza, no entanto, a perda constante de ferro e proteína dentro do trato gastrintestinal faz com que a medula fique exaurida, tendo como consequência a queda abrupta do hematócrito antes de ocorrer a morte do animal. Quando a infecção é ainda mais severa, animais infectados com 30.000 nematoides, os ovinos aparentemente são saudáveis e podem morrer de repente por causa de gastrite hemorrágica grave, esse fato é conhecido como hemoncose hiperaguda. O ovino que apresenta morte causada pela hemoncose possui o abomaso com líquido de cor marrom escuro, devido a presença de sangue em seu interior, e ainda, a presença de edemas na mucosa, submucosa e na serosa do abomaso. Os animais que chegaram ao óbito devido a hemoncose, em sua necropsia, puderam ser encontrados de 2.000 a 20.000 nematoides no abomaso, os quais causam várias e pequenas lesões em seu interior (TAYLOR; COOP; WALL, 2010). Já na hemoncose crônica, os animais adquirem os nematoides durante uma estação do ano, onde ocorre a reinfecção, nesse período os animais infectados com algumas centenas de *H. contortus* produzem sinais clínicos da hemoncose, com perda em peso, fraqueza e anemia marcante (TAYLOR, COOP e WALL, 2010).

É conhecido que os nematoides gastrintestinais, principalmente o *H. contortus*, pode infectar os ovinos em todas as suas etapas de vida. No entanto, tem algumas fases onde essa prevalência é mais evidente: em fêmeas gestantes, no pré e pós parto e animais jovens, independentemente da raça. Existem outros fatores como o estado nutricional do animal e o estado fisiológico que também irão interferir na infecção dos animais (VIEIRA, 2003). Devido o *H. contortus* ser um dos nematoides mais patogênicos e que apresenta resistência

frente aos principais químicos existentes, a fitoterapia vem mostrando resultados expressivos na prevenção e no tratamento desse nematoide (KATIKI et al. 2011).

2.3. Resistência anti-helmíntica

Mundialmente é conhecida a resistência dos nematoides pelos principais fármacos existentes no mercado (TORRES-ACOSTA et al., 2012; FALZON et al., 2013; MCMAHON et al., 2013; MARTÍNEZ-VALLADARES et al., 2013), esse fato ocorreu devido ao uso intensivo e inadequado dos mesmos, erros estes que foram atribuídos pela má aplicação do produto, o curto intervalo entre os tratamentos, a utilização de uma mesma classe de anti-helmínticos por longos períodos, uso de medicamentos vencidos, a super dosagem devido ao equivoco na estimativa do peso do animal, utilização de produtos de origem duvidosa, a rápida alternância de diferentes grupos, os tratamentos não seletivos, o uso de medicamentos de longa persistência e a compra de animais infectados com cepas resistências (SILVESTRE et al., 2002; MOLENTO, 2004; BESIER, 2006). Todo esse processo errôneo levou o nematoide apresentarem características de resistências, uma delas seria de apresentarem maior patogenicidade e capacidade de transmitir essa caraterística aos seus descendentes (HOUNZANGBE-ADOTE et al., 2005; MOLENTO, 2004). Outro fator seria possuir maior sobrevivência no período de vida livre. A resistência faz com que as fêmeas de *H. contortus* liberem uma quantidade maior de ovos, com a finalidade de melhorar o seu poder de infecção (PRICHARD et al., 1980).

O primeiro caso de resistência de nematoides gastrintestinais de ovinos ao fármaco tiabendazol relatado foi com descrito por Drudge et al. (1964). Já no Brasil, Santos e Franco (1967) foram os primeiros a referirem a resistência de anti-helmíntico no Estado do Rio Grande do Sul com diferentes bases químicas utilizadas em tratamentos de pequenos ruminantes. Cezar et al. (2010) conduziram na região Sul do país experimento que foram testados nove diferentes tipos de fármacos contra *H. contortus*, em 5.000 animais, e os autores descreveram que não houve eficácia em nenhum deles. Estudos conduzidos nos estados da região Nordeste do Brasil também não encontraram respostas favoráveis aos anti-helmíticos testados (levamisol, albendazol, parbendazol, oxfendazol, ivermectina e moxidectina) (CHARLES et al., 1989; MELO et al., 2003; BARRETO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007).

Trabalhos feitos no estado do Mato Grosso do Sul, em 16 fazendas, também não foram encontrados eficácia em nenhum fármaco testado (albendazol, levamisol, ivermictina, triclorfom, moxidectina e closantel) (SCZESNY-MORAES et al., 2010; EURICO et al.,

2010). Na região Sudeste (Estado de São Paulo) foram feitos estudos em 35 propriedades com animais infectados naturalmente e nenhuma propriedade teve eficácia de 100% com os anti-helmínticos avaliados (albendazol, ivermectina, moxidectina, closantel e levamisol) (VERÍSSIMO et al., 2012). Em outro trabalho conduzido no estado do Rio de Janeiro, com 10 rebanhos diferentes, foram encontraram resistência de 100% com os anti-helmínticos avaliados (albendazol, closantel, doramectina, fenbendazol, levamisol, ivermectina, moxidectina e nitroxynil) (CRUZ et al., 2010). Os autores Kaplan e Vidyashankar (2012) descreveram que o problema da resistência anti-helmíntica na ovinocultura é muito mais grave aqui no Brasil do que em qualquer outro país.

Existem recentemente estudos publicados que relatam a resistência da mais nova fórmula disponível no mercado, o monepantel [Zolvix®, Novartis Animal Health]. Brom et al. (2015) publicaram um estudo, feito na Holanda em fazendas particulares, que os ovinos que foram tratados com monepantel demonstraram resistência em testes de OPG com *H. contortus*. Em estudo feito no Uruguai por Mederos et al. (2014) com ovinos infectados com *H. contortus*, os quais foram tratados com monepantel, relataram que após o teste de OPG os autores notaram que não houve redução significativa dos ovos nas fezes dos animais. Scott et al. (2013) também mencionaram a resistência do monepantel na Nova Zelândia com ovinos e caprinos infectados com *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* em testes feitos com OPG descreveram que a eficiência desse composto foi zero.

Conder e Campbell (1995) relataram que a resistência dos nematoides contra os anti-helmíticos ocorre quando a droga que apresentava redução da carga parasitária acima de 95% decresce a nível inferior a este valor. Além da resistência o uso de anti-helmínticos comerciais geram impacto ecotóxico e presença de resíduos químicos na carne e no leite (MOTA et al., 2003), por isso é necessário controle e estratégia sustentável, a fim de reduzir a ocorrência dos endoparasitas que pode acometer 95% do rebanho, principalmente animais jovens, fêmeas no periparto e em lactação, tendo como resultado a perda em peso entre 6 a 12 kg/animal/ano e a mortalidade acima de 40%. Em alguns criadores esse percentual de perda pode ser ainda maior (KNOX et al., 2006).

2.4. Fitoquímicos

Os fitoquímicos das plantas medicinais são aqueles que apresentam compostos que conferem atividade terapêutica. O uso dessas plantas é bastante antigo pela população mundial e tem como princípio o controle e/ou o tratamento de diversas enfermidades

(WHO, 1998). Esse fato se dá devido a presença de metabolitos secundários das plantas, que também são denominadas de princípios ativos e que são responsáveis por possuir o efeito curativo. Cerca de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente são provenientes de plantas, sendo que 121 dos compostos ativos são de uso contínuo (RIGUEIRO, 2007).

A Organização Mundial de Saúde considera que 252 drogas são básicas e essenciais, destas 11% são exclusivamente originais de plantas. Aqui no Brasil uma investigação no total de 483 espécies, entre 79 famílias, poderiam ser medicinal e/ou tóxica. Destas 466 espécies correspondem cerca de 96,5% foram registradas para uso medicinal, oito plantas foram consideradas medicinais e tóxicas e 27 plantas foram consideradas somente tóxica (AGRA, FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2007).

O uso de plantas medicinais além de ser considerada para tratamento de seres humanos, também tem sido utilizada em criações de animais, principalmente na produção de produtos orgânicos, por serem biodegradáveis, não causar poluição e diminuir os resíduos nos alimentos que são destinados aos humanos. O uso de plantas medicinais na criação de animais tem o intuito de se tornar uma aliada no controle e na redução dos nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes (MOLENTO, 2004). A utilização dos fitoterápicos no controle desses nematoides gastrintestinais apresenta efeito no controle parasitário de pequenos ruminantes, e além da eficácia, o uso de plantas com efeito anti-helmíntico possui menor custo, prolonga a vida útil dos anti-helmínticos já existentes, causa menor efeito colateral nos animais e possui baixo impacto ambiental (CHAGAS et al., 2008), já que na maioria das vezes essas plantas são destinadas para a própria alimentação de ruminantes.

Os compostos que são extraídos das plantas são classificados como metabólicos primários e secundários. Os compostos primários são substâncias, tais como óleos vegetais, ácidos graxos (sabão e detergente) e os carboidratos (amido, pectina e celulose) (BALANDRIN et al., 1985).

Os metabolitos secundários são compostos fitoquímicos que tem distribuição limitada e sua concentração vai depender dos grupos taxonômicos do reino vegetal e sua origem se dá a partir de uma relação alelopática entre a planta (espécie e estágio de desenvolvimento) e o ambiente (intemperes e geografia) onde se encontra. Esses compostos secundários não são indispensáveis para o desenvolvimento da planta, porem é sintetizado por vias alternativas do metabolismo celular e são produzidos em diversas partes da planta, como as folhas, caules, raízes, flores e sementes, e são armazenados em vacúolos celulares ou em seus tricomas (WINK, 2008; TORRES-ACOSTA et al., 2012).

Observa-se também que os metabólicos secundários são armazenados em pequenas quantidades na planta, no entanto, possui um papel importante no auxílio da planta na defesa contra microrganismos, insetos e predadores, são atrativos para a polinização e ajuda a planta na adaptação no ambiente. Esses compostos ativos são utilizados em produtos farmacêuticos para dar sabor e aroma e para pesticidas, os exemplos desses compostos fitoquímicos são os taninos, as saponinas, a nicotina, piretrinas, rotenona, morfina, entre outros. Esses fitoquímicos são obtidos das plantas através de processos simples, como a destilação a vapor ou extração utilizando solventes orgânicos ou aquosos (BALANDRIN et al., 1985).

Os fitoqumícos como os taninos são conhecido como compostos polifenólicos solúveis em água, os quais possuem a capacidade de se ligar através de ligações hidrofóbicas e pelas pontes de hidrogênio a algumas proteínas, em especial à prolina (BAXTER et al., 1997). É sabido que os taninos apresentam ação anti-helmíntica e essa ação atua de duas maneiras, por ação direta ou por ação indireta. A atividade anti-helmíntica direta interfere diretamente sobre o nematoide e/ou em seu ciclo natural e a atividade indireta ocorre pela proteção da proteína do alimento ingerida pelo animal, devido à característica quelante da proteína, juntamente com os taninos (HOSTE et al., 2012), disponibilizando incremento protéico no trato gastrintestinal inferior, resultando melhores condição de resposta inume frente aos parasitas (BRICARELLO et al., 2005). Além disso, o uso de controle alternativo contra os parasitas gastrintestinais de ovinos auxilia na diminuição do resíduo na carne e no leite e, também, no meio ambiente.

Os taninos se classificam de acordo com suas estruturas químicas, dentre elas ressaltam-se os taninos condensados (TC) ou proantocianidinas e os taninos hidrolisáveis (TH), sendo o primeiro resistente a hidrolise e subdivididos em diversas outras classes, como as prodelfinidinas que possui uma ação mais potente contra os nematoides, as procianidinas que têm uma ação menos potente contra os nematoides e, também, as prorobetinidinas e profisetinidinas (SALUNKHE et al., 1990; BRUNET; HOSTE, 2006; HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011; HOSTE et al., 2012). Os TC são oligômeros dos grupos flavan-3-ols ou flavan 3,4-diols, sendo que, esses oligômeros e polímeros de flavonóides estão ligados por uma ponte de carbono-carbono que é a forma mais comum de tanino. Já os TH sofrem hidrolise em condição ácida ou básica produzindo carboidratos e ácidos fenólicos (SALUNKHE et al., 1990; HAGERMAN; BUTLER, 1991).

Estudos realizados por Nogueira et al., (2009) sobre a avaliação com extratos de *L. operculata* e *M. charantia*, em teste *in vivo* contra nematoides gastrintestinais de cordeiros, relataram redução média de 45,5% no OPG dos animais tratados com *L. operculata* e uma

redução de 75,9% nos animais tratados com *M. charantia.* SIMON et al. (2012) avaliaram o efeito *in vivo* do extrato de aquoso matanólico da casca do caule de *Combretum molle* (2 g/kg de PV) e observaram a redução de ovos de *H. contortus* no OPG em 96%. Estudos realizados por Waterman et al. (2010) com ação anti-helmíntica de extratos aquosos e orgânicos de 17 plantas utilizadas na medicina tradicional do Sahara sub-africana, 12 plantas demonstraram eficiência na atividade anti-helmíntica contra uma cepa resistente de *C. elegans* ao levamisol. Os autores relataram que a atividade anti-helmíntica pode ter sido devido à presença de substâncias secundárias presentes nas plantas avaliadas, tais como o tanino, os compostos fenólicos simples como o ácido gálico, gentísico e elágico, substâncias como as saponinas e os flavonóides como os quercentinas e as quininas.

2.5. Validação do uso de compostos fitoquímicos

Para a validação da eficiência e do uso das plantas, como os extratos brutos, são necessários estudos que envolvem os ensaios biológicos e os testes de segurança. Para o início dessa trajetória é necessário saber a composição química das plantas. Quando há conhecimento desses compostos a extração é direta, mas caso a composição química da planta não seja conhecida o procedimento da extração pode ser baseado no uso da planta pela medicina popular ou em extrações com solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água) (RATES, 2001).

Para que haja a validação é preciso a realização de algumas etapas, dentre elas a escolha e a identificação da espécie vegetal, a parte da planta testada, a forma de administração, as doses fornecidas, o tempo de tratamento, entre outros, para a realização de testes *in vitro*, realização de testes *in vivo* e a avaliação da toxicidade da planta escolhida. Muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos com os princípios ativos de plantas, por meio de testes *in vitro*, contra nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes, tais testes são os de inibição de eclodibilidade dos ovos (TIEO), os testes de inibição de desembainhamento da larva (TIDL) e os testes de motilidade com *Caenorhabditis elegans* (TMCE), estes testes têm sido bastantes utilizados e obtidos resultados eficazes. A realização dos testes *in vitro* é recomendável por possuir custos mais baixos, apresentar respostas mais rápida e a diminuição do uso indiscriminado de animais.

O TIEO, TIDL e o TMCE *in vitro* são conduzidos de forma que as plantas ou seus fitoquímicos fiquem em contato diretamente com os ovos, com as larvas e com *C. elegans* para avaliar o efeito sobre a eclosão dos ovos, sobre o efeito na larva e sobre o efeito no *C. elegans* (HAMMOND et al., 1997; BORGES, 2003). McGraw et al. (2000) estudaram

72 extratos obtidos de 24 gêneros de plantas, em testes *in vitro* com contra *C. elegans*, e constataram que apenas uma planta não apresentou o efeito desejado.

2.5.1. Método de extração

A metodologia aplicada para a realização da extração tem como intuito a retirada dos fitoquímicos que estão localizados em alguma parte da planta, como as folhas, caules, frutos e raízes. A teoria da extração é fundamentada no fato que uma substância presente na planta seja solúvel em algum tipo de solvente. Para que tenha sucesso na extração é necessário que esses compostos fitoquímicos sejam extraídos, com o auxílio de um solvente. O processo de extração se dá em função do tempo em que a planta ficará em contato com o solvente, a espessura que a planta foi moída, a temperatura, a polaridade do solvente, a reatividade desse frente aos fitoquímicos a serem extraídos, da quantidade de solvente e da quantidade de planta que foram utilizados, para garantir o sucesso da extração é necessário encharcar as células da planta com o solvente para extrair delas os fitoquímicos nela existente (BALANSARD et al., 1991).

A escolha do solvente é de extrema importância. Esses solventes na maioria são um líquido orgânico volátil, que pode ser removido com auxílio de um rotaevaporizador após a extração fornecendo assim o material desejado. Existem alguns solventes orgânicos que são mais utilizados no processo de extração, sendo, o pentano, hexano, éter de petróleo, éter etílico, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol e o etanol. A escolha por utilizar acetona e diclorometano (Figura 3) como solvente é devido a sua potencial eliminação de substâncias como as gorduras, os óleos e as resinas. O diclorometano é um líquido incolor, muito volátil, apresenta odor etéreo e muito pouco solúvel em água (BALANSARD et al., 1991). Antes de iníciar o processo de extração com o diclorometano, a planta moída permanece em contato com uma solução de acetona e agua. Após um determinado período essa solução é rotaevaporada e, em seguida, lavada com diclorometano, outro fator que deu pela escolha do diclorometano como extrator foi devido à solubilidade do extrato, o extrato feito a partir do diclorometano facilita o extrato ser dissolvido em água (BARRAU et al., 2005).

Estudos feitos por Sobral et al. (2009) relataram que o extrato feito a partir da lavagem com solvente diclorometano, utilizando a planta *Kielmeyera cuspidata* Saddi, isolou e identificou, por cromatografia de coluna de gel sílica, cinco tipos de xontanas, dentre elas, a 1,6-diidroxi- 3,5-dimetoxixantona [**1**], 2-hidroxi-1-metoxixantona [2], 2,3-metilenodioxixantona [3], 4-hidroxi-2,3- metilenodioxixantona [4] e

3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona [5], e também identificaram compostos como os triterpenos α-amirina e β-amirina. Em estudo feito por Marie-Magdeleine et al. (2009) relataram que o extrato lavado com diclorometano, com folhas da planta de *Cucurbita moschata*, continham compostos fitoqumímicos, tais como os aminoácidos (cucurbitina e cucurmosina), terpenóides e as saponinas.

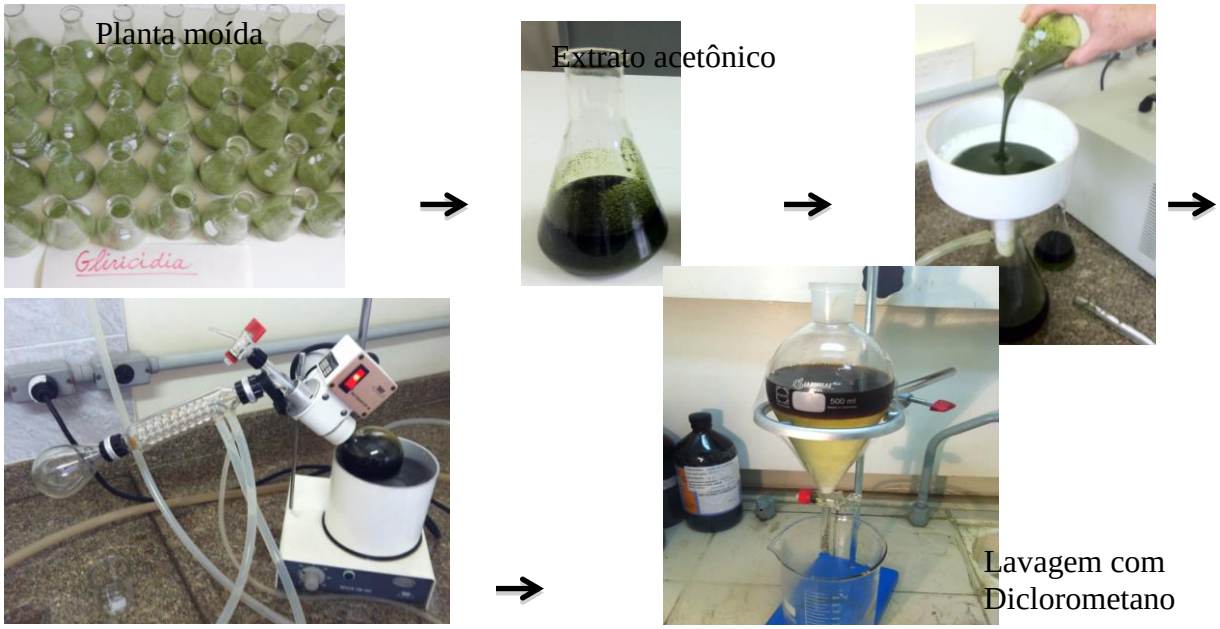

Figura 2.3 – Passo a passo da extração dos compostos fitoquímico planta com acetona e diclorometano
Fonte: Arquivo pessoal

2.5.2. Teste de inibição de eclodibilidade dos ovos (TIEO)

O teste realizado *in vitro* da inibição da eclodibilidade dos ovos (Figura 4) se dá a partir da coleta das fezes diretamente do reto do animal, o qual está infectado com *H. contortus*. Essas fezes são levadas ao laboratório e por meio de lavagem e uso de peneiras com diferentes malhas (1 mm, 0,75 mm, 0,55 mm e 0,25 mm), os ovos foram separados para o teste. Os ovos recuperados são incubados em placas de polietileno com 24 ou 48 poços em diferentes concentrações dos extratos que serão avaliados, em seis repetições por 24 horas a 27 ºC, após esse período as placas são levadas ao microscópio invertido. A concentração do extrato é necessária para inibibação da eclosão dos ovos que será calculada posteriormente (BIZIMENYERA et al., 2006).

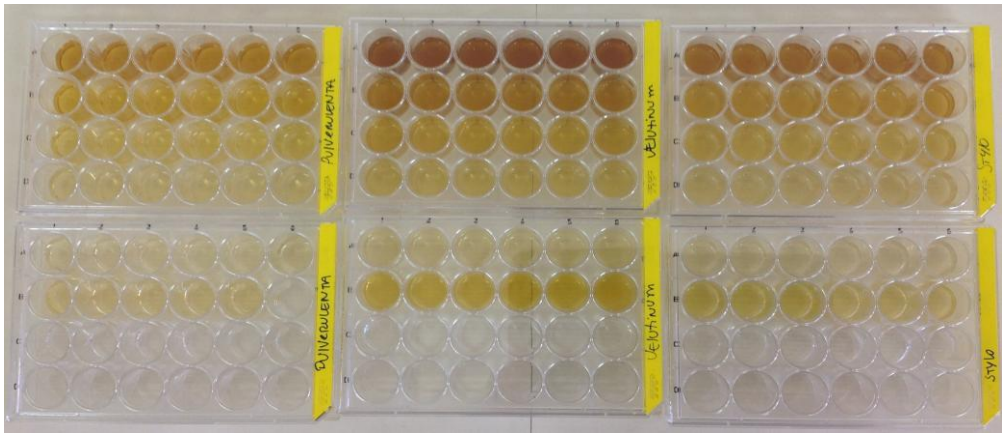

Figura 2.4 – Teste de Inibição da Eclosão dos Ovos (TIEO) – Placa de poço de polietileno com os ovos e as concentrações dos extratos
Fonte: Arquivo pessoal

2.5.3. Teste de inibição do desembainhamento da larva (TIDL)

O TIDL tem como objetivo analisar o efeito dos extratos das plantas sobre a perda da membrana que está localizada envolta da L3, chamada de cutícula (bainha), as quais ficam em contato com os extratos em diferentes concentrações juntamente com um meio tampão fosfato-salino (PBS – pH de 7,2) no período de 3 horas, após esse período as larvas são expostas ao hipoclorito de sódio para verificar se houve ou não o efeito dos extratos. As larvas devem apresentar a perda da bainha progressivamente no período de 60 minutos (BAHUAUD et al., 2006). A concentração de extrato é necessária para verificar qual extrato atinge a concentração Inibitória de 50% (CI_{50}) (BIZIMENYERA et al., 2006).

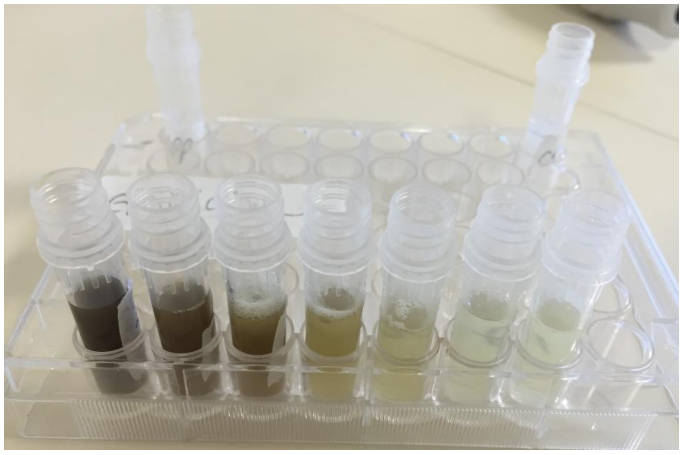

Figura 2.5 – Teste de Inibição do Desembainhamento da Larva (TIDL)
Fonte: arquivo pessoal

2.5.4. Triagem com *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

Vários estudos em várias linhas de pesquisas têm descritos o uso de um nematoide de vida livre de solo chamado de *Caenorhabditis elegans* (KUMARAN et al., 2003; OKPEKON et al., 2004; SCHACHTER, 2004; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; THOMPSON; POMERAI, 2005; DHAKAL et al., 2006; VENTURA et al., 2006; KAMPKÖTTER et al., 2007; SOCHOVÁ et al., 2007; KATIKI et al., 2012; KATIKI et al., 2013), sendo que, os pioneiros no Brasil a estudar *C. elegans* juntamente com compostos secundários e extratos de plantas no auxílio ao controle de nematoides gastrintestinais de ovinos está localizado no Instituto de Zootecnia aos cuidados da Dra Luciana Morita Katiki.

C. elegans é um nematoide encontrado em solos de países com regiões de clima temperado, se alimentam de bactérias e fungos e são facilmente isolados de frutas que estão em decomposição. Esses nematoides são usados para apontar o quanto o solo está sendo preservado ou agredido e/ou qual concentração de contaminante está presente no solo. *C. elegans* tem sido muito utilizado como modelo em testes, pois possui a fisiologia e a genética conhecida, o mesmo tipo de ribossomo, os mesmos níveis celulares e os mesmos níveis moleculares existente nos mamíferos (BRENNER, 1974, KALETTA; HENGARTER, 2006).

O cultivo e os experimentos com esse nematoide são muito mais baratos quando comparados com estudos feitos com camundongos ou outros modelos de mamíferos. *C. elegans* se encontra na ordem Rhabditida que está associada a ordem Strongylida, onde se encontra os parasitas mais importantes, que incide nos rebanhos de ruminantes, os trichostrongilídeos (GEARY; THOMPSON, 2001).

C. elegans se tornou um modelo a ser pesquisado a partir da década de 60 com o pesquisador Sydney Brenner da Universidade de Cambridge na Inglaterra. Esse nematoide apresenta anatomia simples com pequenos tecidos e órgãos internos. Possui o corpo cilíndrico, com camadas de células epiteliais e protegido por uma cutícula, semelhante a cutícula do *H. contortus*. Seu corpo apresenta musculatura arranjadas em quatro fileiras, sendo duas dorsais e duas ventrais. Possui um cordão ventral, o qual percorre todo comprimento de seu corpo, tem uma cabeça protuberante, onde possui o órgão de alimentação, a faringe. Seu corpo é todo preenchido com o intestino e mais de 90% dos nematoides adultos são hermafrodita, sendo o restante macho. Os embriões começam a se desenvolver no interior do nematoide na forma de ovos (Figura 6) e são depositados pela vulva (Figura 7) (BRENNER, 1974). O desenvolvimento desses nematoides depende de umidade, pois possui pouca proteção contra o dessecamento (HOLDEN-DYE, 2007).

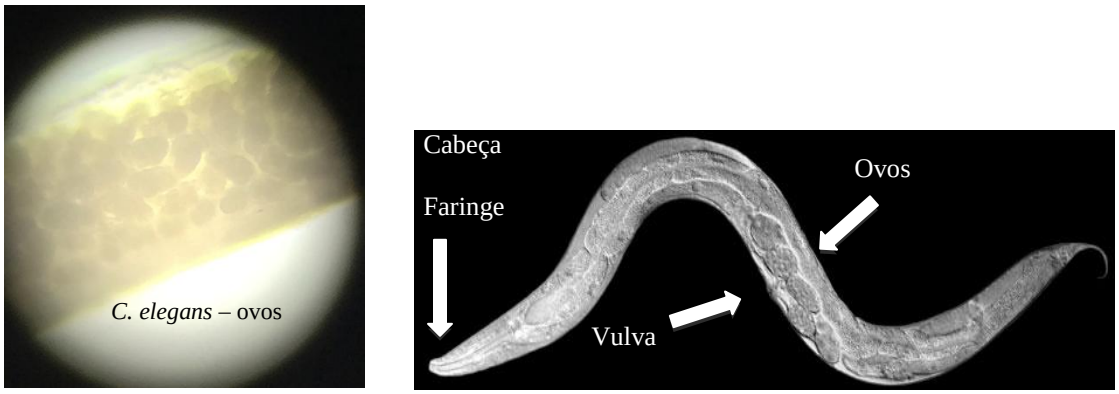

Figura 2.6 – Ovos dentro do nematoide *C. elegans*
Fonte: arquivo pessoal / http://worms.zoology.wisc.edu/worms.html

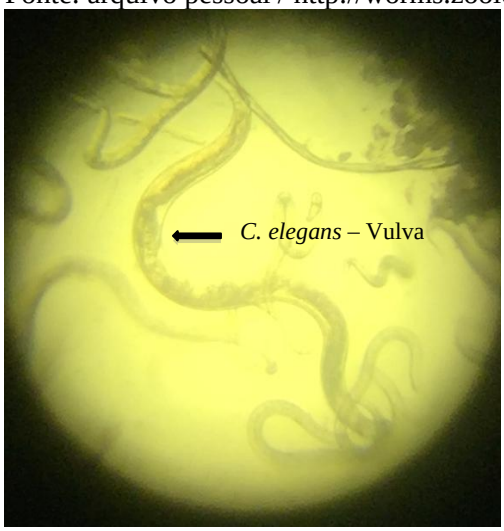

Figura 2.7 – Vulva *C. elegans*
Fonte: arquivo pessoal

O teste *in vitro* com *C. elegans* (TMCL) pode ser feito nas várias fases de vida do nematoide. Escolhe-se o nematoide *C. elegans* adulto em substituição ao nematoide *H. contortus* adulto, que ao invés de abater um ovino adulto, coletar seu abomaso e recuperar os *H. contortus* adulto, pode-se substitui-lo pelo nematoide *C. elegans* adulto. Esse teste é realizado com os extratos em várias concentrações para verificar qual extrato atinge a concentração Inibitória de 50% (CI_{50}) (BIZIMENYERA et al., 2006). *C. elegans* fica em contato com o extrato (Figura 2.8) durante 24 horas em placas de poços de polietileno e após esse período essas placas são levadas ao microscópio invertido para verificar a quantidade de nematoides mortos e/ou vivos.

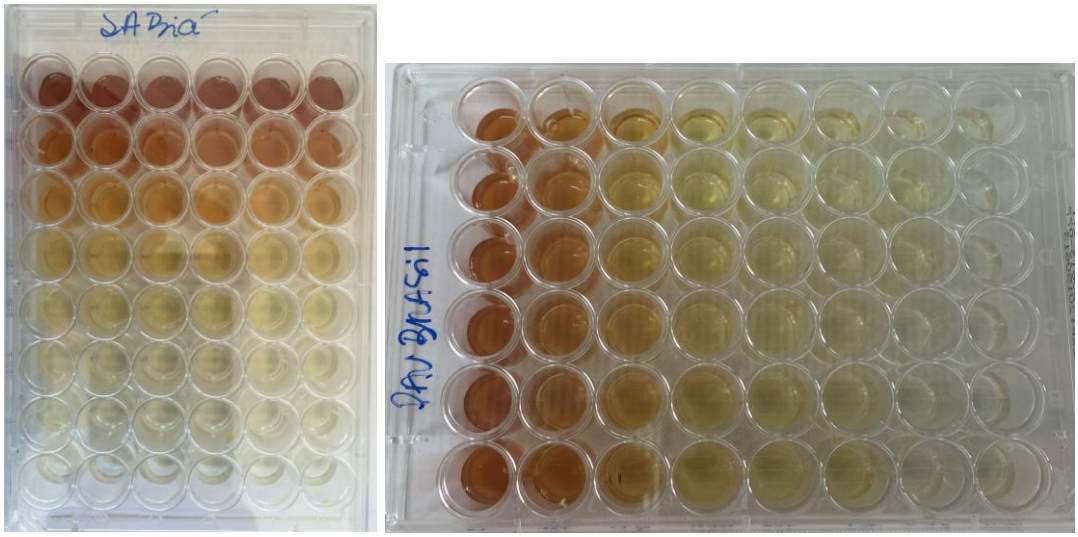

Figura 2.8 – Teste de Motilidade de *Caenorhabditis elegans* (TMCE), *C. elegans* na placa de poço de polietileno com as concentrações dos extratos
Fonte: Arquivo pessoal

O ciclo de vida do *C. elegans* é bem rápido. O embrião se desenvolve e eclodem dos ovos em algumas horas, sendo o primeiro estagio larval completado após 12 horas, passando ainda por mais quatro estágios antes da fase adulta. A temperatura influência o desenvolvimento completo do ciclo de vida desse nematoide. Ambientes com temperaturas de 15 °C o ciclo se completa em 5,5 dias, ambientes com temperaturas de 20 °C completa o ciclo em 3,5 dias e ambientes com temperaturas de 25 °C completa todo o ciclo em 2,5 dias e o nematoide adulto vive em torno de 20 dias (BRENNER, 1974).

Outros fatores também podem afetar o desenvolvimento do ciclo do *C. elegans*, tais como, o excesso de população ou a falta de alimento, esses fatores auxiliam o nematoide a escolher o melhor caminho para se desenvolver. Um dos caminhos é através da rota de desenvolvimento normal, onde a larva se encontra no estágio latente, denominado de *dauer*, as larvas permanecem sem se alimentar e sobrevivem em condições desfavoráveis (hipometabólicos) por alguns meses e altamente resistentes ao estresse. Outra rota de desenvolvimento é quando a larva *dauer* se depara com condições ideais, essa larva sai do estágio latente, e se desenvolve numa larva de quatro estágio antes de se tornar adulta, e o tempo desse nematoide na fase adulta é de duas a três semanas (BRENNER, 1974) (Figura 2.9).

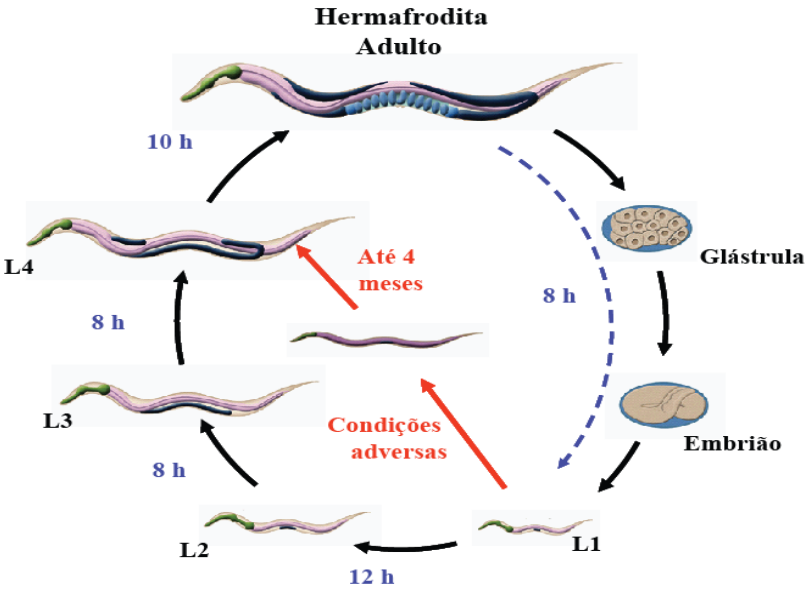

Figura 2.9 – Ciclo de vida do *C. elegans*.
Fonte: Worm atlas

O primeiro estudo feito utilizando *C. elegans* como modelo em estudos com anti-helmíntico foi em 1981 pelos pesquisadores Simpkin e Coles. Os autores concluíram que o *C. elegans* satisfez a necessidade dos testes *in vitro* e relataram a facilidade do manejo e o baixo custo dos testes. A partir daí os pesquisadores optaram em avaliar produtos com ações anti-helmíticas utilizando *C. elegans* como modelo em testes *in vitro* (FONSECA-SALAMANCA; MARTINEZ-GRUEIRO, 2003; MCGAW et al., 2007; BULL et al., 2007; KATIKI et al., 2012). Produtos testados com a finalidade anti-helmínticas são muito fáceis de serem analisados em culturas de nematoides apenas monitorando o oviposição, sobrevivência, comportamento, locomoção, desenvolvimento ou reprodução da espécie em questão (BULL et al., 2007). Esse nematoide possui a facilidade de manejo em pesquisas, pois serve como um modelo para testes de anti-helmínticos, reduzindo as necessidades de espaço físico, uso de animais maiores, custos e a quantidade do produto a ser testado (BRENNER, 1974).

Estudos feitos por Fasiuddin e Campbell (2000) e por Bull et al. (2007) relataram a baixa eficiência nos testes *in vitro* utilizando as drogas anti-helmínticas, o tiabendazol e o emodepside, com os ovos de *C. elegans.* A concentração Inibitória de 90% (CI_{90}) para o ovo de *C. elegans* foi muito maior quando comparado com a CI_{90} para os ovos de *H. contortus.* Nos dois trabalhos, os autores relataram a existência de estruturas diferentes entre os dois ovos avaliados. Fasiuddin e Campbell (2000) relataram ainda que a casca do ovo do *C. elegans* possui uma resistência ainda maior contra compostos químicos como o hipoclorito de sódio, que é utilizado no procedimento de sincronização de vida desse nematoide. Ambos

estudos relataram que a droga avaliada atingiu efeito apenas após a eclosão dos ovos. E que os estudos *in vitro* utilizando *C. elegans* como screenings é viável devido ao baixo custo e sua facilidade de manejo.

2.5.5. Teste *in vivo*

O teste *in vivo*, com os animais, é realizado apenas após a obtenção dos resultados realizados com os testes *in vitro*. O teste *in vivo* é o último teste a ser realizados para poder estimar a eficiência anti-helmíntica de um produto que está sendo avaliado e testado (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Os testes realizados *in vitro* oferecem respostas rápidas para verificar se o produto que está sendo pesquisado apresenta ou não atividade anti-helmíntica, no entanto, devido as respostas encontradas em ambos os testes é necessário confirmar a atividade em questão com a realização de testes *in vivo*, para somente depois confirmar se há ou não atividade anti-helmíntica (HOUZANGBE-ADOTE et al., 2005).

A dificuldade encontrada na realização de testes *in vitro* é a concentração que será testada, sendo que, fica viável exceder essa concetração em testes *in vitro*, pois no momento que for para a realização do teste *in vivo* essa concentração terá que ser convertida para um animal adulto. Se os valores avaliados no teste *in vitro* forem extrapolados, o valor que será fornecido para o animal tem que ser na mesma proporção, o qual fica inviável devido ao elevado volume a ser administrado para o animal via oral (HOUGHTON et al., 2007). Estudos feitos com a planta *Arachis pintoi* pelos pesquisadores Rojas et al. (2006) descreveram que a obteveram sucesso na ação anti-helmíntica nos testes realizados *in vivo* com ovinos contra o *H. contortus.*

Diante do exposto, com o presente trabalho objetivou-se avaliar em testes *in vitro* (TIEO, TIDL e TMCE) 17 espécies vegetais contra o nematoide *H. contortus*. Dessas 17 espécies, as duas plantas com os resultados promissores (*Piptadenia colubrina* e *Arachis pintoi* cv Amarillo) foram avaliados em testes *in vivo*.

- ✓ *Arachis pintoi* cv Amarillo (Amendoim forrageiro),
- ✓ *Caesalpinia echinata* (Pau Brasil),
- ✓ *Cajanus cajan* (Guandu),
- ✓ *Calopogonium velutinum,*
- ✓ *Canavalia ensiformis* (Feijão de Porco),
- ✓ *Centrosema pubencens* cv Cardillo,
- ✓ *Cratylia mollis,*
- ✓ *Dipteryx alata* (Baru),

- ✓ *Gliricidia sepium*,
- ✓ *Leucaena leicocephala* cv Cunningham,
- ✓ *Leucaena pulverulenta*,
- ✓ *Mimosa caesalpiniaefolia* (Sabiá sem espinhos),
- ✓ *Neonotonia wighiti* cv Cianova,
- ✓ *Noenotonia wighiti* cv Tinaroo,
- ✓ *Piptadenia colubrina* (Angico),
- ✓ *Stylosanthes guianensis*,
- ✓ *Styzolobium aterrimun* (Mucuna Preta).

Referências

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** Curitiba, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TOGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistances to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, Amsterdam**,** v. 59, p. 622-625, 2010.

ÁLVAREZ, L. R.; JACKSON, F.; GREER, A.; BARTLEY, Y.; BARTLEY, D. J.; GRANT, G.; HUNTLEY, J. F. *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 186, p. 390–398, 2012.

ALONSO-DÍAZ, M. A. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniniferous plants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 153, p. 313-319, 2008.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; HOSTE, H. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus.* **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181 p. 360–364, 2011.

ANUALPEC. **Anuário da pecuária Brasileira:** suinocultura e outras criações. São Paulo: FNP, 2004. p. 267–318.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials. **Science**, Washington, DC, v. 228, p. 1154-1160, 1985.

BALANSARD, G.; MAILLARD, C.; VIDAL-OLLIVIER, E. Méthodes d'extraction en vue d'obtenir des extraits ou produits purs à partir des plantes médicinales. **Encyclopédie Médicinales Phytothérapie, Aromathérapie.** Paris: Editions Techniques, 1991. v. B-8-3, 9, p. 18.

BARRAU, E.; FABRE, N.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Efect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, London, v. 131, p. 531-538. 2005.

BARRETO, M. A.; ALMEIDA, M. A. O.; SILVA, A.; SILVA, L. E. B.; BITENCUR, C. P. Eficácia anti-helmíntica do levamisole, albendazole e ivermectina em ovinos na região semi-árida da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14. 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 266.

BAXTER, N. J.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E.; WILLIAMSON, M. P. Multiple interactions between polyphenols and salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precitation. **Biochemistry**, New York, v. 36, p. 5566-5577, 1997.

BESIER, B. New anthelmintics for livestock: the time is right. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 21-24, 2006.

BIRD, A. F. Vital staining of glycoprotein secreted by infective third stage larvae of *Haemonchus contortus* prior to exsheathment. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 5, p. 619-623, 1990.

BIZIMENYERA, E. S.; GITHIORI, J. B.; ELOFF, J. N.; SWAN, G. E. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Tricostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, p. 336-343, 2006.

BORGES, C. C. L. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 58, n. 1, p. 42-47, 2003.

BORGES, F. A.; ALMEIDA, G. D.; HECKLER, R. P.; LEMES, R. T.; ONIZUKA, M. K. V.; BORGES, D. G. L. Impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 45, p. 723-727, 2013.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, Bethesda, v. 77, p. 71-94, 1974.

BRICARELLO, P. A.; AMARANTE, A. F. T.; ROCHA, R. A.; CABRAL FILHO, S. L.; HUNTLEY, J. F.; HOUDIJK, J. G. M.; ABDALLA, A. L.; GENNARI, S. M. Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 134, p. 99-109, 2005.

BROM, V. D.; MOLL, L. R.; KAPPERT, C.; VELLEMA, P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 209, n. 3, p. 278-280. 2015.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, n. 20, p. 7481-7487, 2006.

BULL, K.; COOK, A.; HOPPER, N. A.; HARDER, A.; HOLDEN-DYE, L.; WALKER, R. J. Effect of the novel anthelmintic emodepside on the locomotion, egg-laying behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 37, p. 627-636, 2007.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Paulínia, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.

CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L. A.; RIBAS, H. O.; VOGEL, F. S. F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, p. 157-160, 2010.

CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S.; FREITAS, A. R.; ARAÚJO, M. R. A.; ARAÚJO-FILHO, J. A. Anthelmintic efficacy of neem (Azadirachta indica A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 151, p. 68-73, 2008.

CHARLES, T. P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D. B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 34, p. 71-75, 1989.

CONDER, R. G. E.; CAMPBELL, W. C. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistence. **Advances in Parasitology**, London, v. 35, n. 4, p. 1-83, 1995.

COX, G. N. Molecular and biochemical aspects of nematode collagens. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 78, n. 1, p. 1-15, 1992.

CRUZ, D. G.; ROCHA, L. O.; ARRUDA, S. S.; PALIERAQUI, J. G. B.; CORDEIRO, R. C.; JUNIOR, E. S.; MOLENTO, M. B.; SANTOS, C. P. Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 170, p. 340-343, 2010.

DHAKAL, B. K.; LEE, W.; KIM. Y. R.; CHOY, H. E.; AHNN, J.; RHEE, J. H. *Caenorhabditis elegan*s as a simple model host for Vibrio vulnificus infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 346, n. 3, p. 751-757, 2006.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYATT, Z. N. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research,** Chicago, v. 25, p.1512-1518, 1964.

EURICO, A. S. M.; BIANCHIN, I.; SILVA, K. F.; CATTO, B. C.; HONER, M. R.; PAIVA, F. Resistência anti-helmíntica de nematoides gastrintestinal em ovinos, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 229-236, 2010.

FALZON, L C.; MENZIES, P. I.; SHAKYA, K. P.; JONES-BITTON, A.; VANLEEUWEN, J.; AVULA, J.; STEWART, H.; JANSEN, J. T.; TAYLOR, M. A.; LEARMOUNT, J.; PEREGRINE, A. S. Anthelmintic resistence in sheep flocks in Ontario, Canada. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 193, p. 150-162, 2013.

FASIUDDIN, A.; CAMPBELL, W.C. *Haemonchus contortus* (Nematoda:Trichostrongylidae) is much more sensitive than *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae) to the ovicidal action of thiabendazole. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 86, n. 3, p. 628-630, 2000.

FETTERER, R. H.; RHOADS, M. L. Tyrosine-derived cross-linking amino acids in the sheath of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 76, n. 5, p. 619–624. 1990.

FETTERER, R. H.; RHOADS, M. L. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 46, n. 1-4, p. 103-111, 1993.

FONSECA-SALAMANCA, F.; MARTÍNEZ-GRUEIRO, M. M. Nematocidal activity of nitazoxanide in laboratory models. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 91, p. 321-324, 2003.

FOX, M. T. Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 46, p. 143–158. 1993.

GEARY, T. G.; THOMPSON, D. P. *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 101, p. 371-386, 2001.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 21, p. 213-228, 1997.

HAGERMAN A. E.; BUTLER L. G. Tannins and lignins. In: ROSENTHAL, G. A.; BERENBAUM, M. R. (Ed.). **Herbivores**: their interactions with secondary plant metabolites. New York: Academic Press, 1991. p. 355-388.

HERNANDEZ, P. M.; SALEM, A. Z. M.; ELGHANDOUR, M. M. M. Y.; SALAZAR, M. C.; LAGUNAS, B. C.; CAMACHO, L. M. Anthelmintic effects of *Salix babylonica* L. and *Leucaena leucocephala* Lam. extracts in growing lambs. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 46. p. 173-178, 2014.

HILLRICHS, K.; SCHNIEDER, T.; FORBES, A. B.; SIMCOCK, D. C.; PEDLEY, K. C.; SIMPSON, H. V. Use of fluorescent lectin binding to distinguish *Teladorsagia circuncincta* and *Haemonchus contortus* eggs, third-stage larval and adult worms. **Parasitology Research,** Heidelberg, v. 110, p. 449-458, 2012.

HOUNZANGBE-ADOTE, M. S.; PAOLINI, V.; FOURASTE, I.; MOUTAIROU, K.; HOSTE, H. In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, London, v. 78, p. 155-160, 2005.

HOLDEN DYE, L.; WALKER, R. J. **Anthelmintic drugs**. London: WormBook, 2007. DOI 10.1895/wormbook.1.143.1

HOSTE, H.; MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; MANOLARAKI, F.; BRUNET, S.; OJEDA-ROBERTOS, N.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A. Direct and indirect effects of bioactive tannin rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 186, p. 18-27. 2012.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solution for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 144-154, 2011.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* testis in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 110, p. 391-400, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal:** 2011, 2012 e 2013. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 6 jun. 2015.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews. Drug Discovery**, London, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 186, p. 70-78, 2012.

KAMPKÖTTER, A. The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans.* **Pharmacological Research**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 139-147, 2007

KATIKI, L. M.; CHAGAS, A. C.; BIZZO, H. R.; FERREIRA, J. F.; AMARANTE, A. F. Anthelmintic activity of Cymbopogon martinii, Cymbopogon schoenanthus and Mentha piperita essential oils evaluated in four different in vitro tests. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 183, p. 103-108, 2011.

KATIKI, L. M.; FERREIRA, J. F. S.; GONZALEZ JAVIER, M.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S.; CHAGAS, A. C. S.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, p. 218–227, 2013.

KNOX, M. R.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AGUILAR-CABALLERO, A. J. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, p. 385-393, 2006.

KUMARAN, A. M.; D'SOUZA, P.; AGARWAL, A.; BOKKOLLA, R. M.; BALASUBRANANIAM, M. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. **Phytotherapy Research**, London, v. 17, p. 957-957, 2003.

LE JAMBRE, L. F. Relationship of blood loss to worm numbers, biomass and egg production in *Haemonchus contortus* infected sheep. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 25, p. 269-273, 1995.

MANSFIELD, L. S.; GAMBLE, H.R.; FETTERER, R.H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*. I. Structural components. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 103, p. 681-686, 1992.

MARTÍNEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO, C. Effect of a tropical tannin-rich plant Lysiloma latisiliquum on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 172, p. 283-290, 2010.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; MARTÍNEZ-PÉREZ, J. M.; ROBLES-PÉREZ, D.; CORDERO-PÉREZ, C.; FAMULARO, M. R.; FERNANDEZ-PATO, N. CASTAÑÓN-ORDÓÑZ, L.; ROJO-VAZQUEZ, F. A. The present status of anthelmintic resistence in gastrointestinal nematode infection of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 191, p. 177-181, 2013.

MCMAHON, C.; BETLEY, D. J.; EDGAR, H. W. J.; ELLISON, S. E.; BARLEY, J. P.; MALONE, F. E.; HANNA, R. E. B.; BRENNAN, G. P.; FAIRWEATHER, I. Anthelmintic resistence in northern Ireland. I. Prevalence of resistence in ovine fastrointestinal nematodes. as determined through faecal egg count reduction testing. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v. 195, p. 122-130, 2013.

MCGRAW, L. J.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Antibacterial, anthelmintic and antiamoebic activity in South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 72, p. 247-263, 2000.

MCGAW, L. J.; VAN der MERWE, D.; ELOFF, J. N. In vitro anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. **Veterinary Journal**, London, v. 173, p. 366-372, 2007.

MAX, R. A. The effect of wattle tannin drenches on gastrointestinal nematodes of tropical sheep and goats during experimental and natural infections. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 147, p. 211-218, 2009.

MEDEROS, A. E.; BANCHERO, G. E.; RAMOS, Z. First report of *monepantel Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. **Parasites & Vectors,** London, v. 7, p. 598, 2014.

MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do Estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, n. 1, p. 72-79, 2004.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.

NOGUEIRA, D. M.; MOURA, E. J.; NASCIMENTO, T. V. C. Avaliação de extratos de plantas medicinais no controle de nematódeos gastrintestinais de cordeiros criados em sistemas de produção de frutas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 19., 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia:SBZ, 2009.

OLIVEIRA, L. M. B.; MACEDO, I. T. F.; VIEIRA, L. S.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; TOMÉ, A. R.; SAMPAIO, R. A.; LOUVANDINI, H.; BEVILAQUA, C. M. L. Effects of Mimosa tenuiflora on larval establishment of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 196 p. 341–346, 2013.

OKPEKON, T.; YOULOU, S.; GLEYE, C.; ROBLOT, F.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; GRELLIER, P.; FRAPPIER, F.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. **Journal of Ethnopharmacology,** Limerick, v. 90, p. 91-97, 2004.

ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 30, p. 203–211, 2005.

PRICHARD, R. K.; HALL, C. A.; KELLY, J. D.; MARTINS, I. C. A.; DONALD, A. D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 56, p. 239-250, 1980.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Oxford, v. 39, p. 603-613, 2001.

RIGUEIRO, M. P. **Plantas que curam**. Manual ilustrado de plantas medicinais. 8. ed. São Paulo: Paulus, 2007.

RIOU, M. Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistance to anthelmintics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, p. 180–187, 2003.

RODRIGUES, A. B.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W.; FARIA, E. B. Sensibilidade dos nematoides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 162-166, 2007.

ROGERS, W. P.; SOMMERVILLE, R. I. The physiology of the second ecdysis of parasitics nematodes. **Parasitology**, London, v. 50, p. 329-348, 1962.

ROTHNIE, A.; THERON, D.; SOCENEANTU, L.; MARTIN, C.; TRAIKIA, M.; BERRIDGE, G.; HIGGINS, C. F.; DEVAUX, P. F.; CALLAGHAN, R. The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence. **European Biophysics Journal**, Berlin, v.30, p. 430-442, 2001.

SALUNKHE, P. K.; CHAVAN, J. K; KADAM, S. S. **Dietary tanins**: consequences and remedies. Boca Raton: CRC Press, 1990.

SANTIAGO, M. A. M.; BENEVENGA, S. F.; COSTA, U. C. Epidemiologia e controle da helmintose ovina no município de Itaqui, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 10, n. 1, p. 1-7, 1976.

SANTOS, V. T.; FRANCO, E. G. O aparecimento de *Haemochus* resistente ao radical benzimidazole em Uruguaiana, RS. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGIA, 1., 1967, Santiago. **Anais...** Santiago: Federation Latinoamericana de Parasitólogos, 1967. p. 105.

SCHACHTER, H. Protein glycosylation lessons from *Caenorhabditis elegans*. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 14, n. 5, p. 607-616, 2004.

SCOTT, I.; POMROY, B.; PAUL, K.; GREG, S.; BARBARA, A.; MOSS, A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 198, p. 166–171, 2013.

SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K. F.; CATTO, J. B.; HONER, M. R.; PAIVA, F. Resistência anti-helmíntica de nematoides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 229-236, 2010.

SIMON, M. K.; AJANUSI, O. J.; ABUBAKAR, M. S.; IDRIS, A. L.; SULEIMAN, M. M. The anthelmintic effect of aqueous methanol extract of *Combretum molle* in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, p. 280-284, 2012.

SILVESTRE, A.; LEIGNEL, V.; BERRAG, B.; GASNIER, N.; HUMBERT, J. F.; CHARTIER, C.; CABARET, J. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. **Veterinary Research**, London, v. 33, p. 465-480, 2002.

SIMPKIN, K. G.; COLES, G. C. C. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 31, p. 66-69, 1981.

SOBRAL, I. S.; SOUZA-NETA, L. C.; COSTA, G.; GUEDES, A. N.; MARTINS. M. L. S.; CRUZ. D.; FREDERICO. G. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de Kielmeyera cuspidata Saddi, Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 3, p. 686-689, 2009.

SOCHOVÁ, I.; HOFMAN, J.; HOLOUBEK, I. Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environment International**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 621-633, 2006.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia y enfermedades parasitarias em los animales domésticos**. Buenos Aires: Nueva Editorial Interamericana, 1992. p. 124-137.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 128-213.

THOMPSON, G.; POMERAI, D. I. Toxicity of short-chain alcohols to the nematode *Caenorhabditis elegans*: a comparison of endpoints. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, New York, v. 19, n. 2, p. 87-95, 2005.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; MENDONZA-DE-GIVES, P.; AGUILAR-CABELLERO, A. J.; CUÉLLAR-ORDAZ, J. A. Anthelmintic resistence in sheep farms: update of the situation in the American continent. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 189, p. 89-96, 2012.

VEGLIA, F. **The anatomy and life-history of the *Haemonchus contortus* (Rud).** Pretoria: Union of South Africa, 1915. p. 349-500.

VENTURA, N.; REA, S. L.; TESTI, R. Long-lived *C. elegans* mitochondrial mutants as a model for human mitochondrial-associated diseases. **Experimental Gerontology**, Tarrytown, v. 41, n. 10, p. 974-991, 2006.

VERISSÍMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. M. P.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHO, L. F. F.; COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H.; CURCI, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, p. 209-216, 2012.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos,** Porto Alegre, v. 4, n. 12, 9 p., 2008.

VIEIRA, L. S. **Alternativas de controle da verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2003. 10 p.

WATERMAN, C.; SMITH, R. A.; PONTIGGIA, L.; DERMARDEROSIAN, A. Anthelmintic screening of Sub-Saharan African plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 127, p. 755-759, 2010.

WINK, M. E. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multicomponent mixtures used in phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 9, p. 996- 1009, 2008.

WHO. **Regulatory situation of herbal medicines**: a world review. Geneva, 1998. Disponível em: <http://apps.who.int/medicinedocs>. Acesso em: 15 jun. 2015.

3. Eficiência dos extratos de plantas leguminosas em testes *in vitro* com *Haemonchus contortus*

Resumo: Parasitas de ovinos possuem resistência contra os principais fármacos anti-helmínticos existentes no mercado. Estudos com extratos de plantas leguminosas têm demostrado eficiência no controle desses nematoides gastrintestinais. Objetivou-se avaliar a atividade anti-helmíntica de 17 extratos de plantas taniníferas pertencentes à família *Fabaceae* no teste de inibição da eclodibilidade dos ovos (TIEO) e no teste de inibição de desembainhamento de larvas (TIDL) de *Haemonchus contortus, in vitro*. Os extratos foram feitos a partir das folhas das plantas de *Arachis pintoi* cv Amarillo, *Caesalpinia echinata, Cajanus cajan, Calopogonium velutinum, Canavalia ensiformis, Centrosema pubencens* cv Cardillo, *Cratylia mollis, Dipteryx alata, Gliricidia sepium, Leucaena leucocephala* cv Cunningham, *Leucaena pulverulenta, Mimosa caesalpiniaefolia, Neonotonia wighiti* cv Cianova, *Noenotonia wighiti* cv Tinaroo, *Piptadenia colubrina, Stylosanthes guianensis* e *Styzolobium aterrimun,* as quais foram coletadas no campo agrostológico do Instituto de Zootecnia em Nova Odessa/SP. Seus princípios ativos foram extraídos por maceração em solução de acetona:água 70:30, o solvente retirado por rotaevaporação, seguido por lavagem com diclorometano e liofilizado. Os resultados obtidos para o TIEO baseados na concentração Inibitória de 50% (CI_{50}), com a maior concentração testada de 50 mg/mL e a menor de 0,0975 mg/mL, em ordem da maior eficácia para a menor eficácia foram para os extratos de *P. colubrina* (0,10 mg/mL), *C. echinata* (0,17 mg/mL) e *M. caesalpiniaefolia* (0,53 mg/mL). Os extratos de *L. pulverulenta, C. cajan, C. mollis e S. aterrimun* foram ineficazes na maior concentração testada (50 mg/mL). Os resultados obtidos para o TIDL baseados na concentração Inibitória de 50% (CI_{50}), com a maior concentração testada de 50 mg/mL e a menor de 0,0975 mg/mL, em ordem da maior eficácia para a menor eficácia foram para os extratos de *S. guianensis* (0,51 mg/mL), *A. pintoi* cv Amarillo (1,04 mg/mL) e *C. echinata* (1,25 mg/mL). Os melhores extratos em ordem decrescente no TIEO contra *H. contortus* foram para *P. colubrina*, *C. Echinata* e *M. caesalpiniaefolia* e os três melhores extratos no TIDL contra *H. contortus* foram para *S. guianensis, A. pintoi* cv Amarillo e *C. echinata.*

Palavras-chave: fitoquímicos, ovinos, sustentabilidade, verminose

3.1. Introdução

A criação de ovinos depara com um grande problema sanitário, os nematoides gastrintestinais. Esses causam grande perda na economia em sua produção e desacelera a expansão da criação dentro da ovinocultura. A verminose causa perdas devido ao baixo desenvolvimento na fase de cria e recria, com o agravo de que esta enfermidade pode levar ao óbito, principalmente os animais jovens e em fêmeas no periparto (BORGES et al., 2013). Em países tropicais, as condições ambientais se tornam favoráveis para a proliferação das espécies parasitárias, como é o caso do nematoide *H. contortus*. Contudo, as infecções geralmente são mistas (ALMEIDA et al., 2010) e o controle destas infecções parasitárias é imprescindível para que haja sucesso na produção de pequenos ruminantes.

É conhecido que existe uma grande resistência dos parasitas aos anti-helmínticos existentes no mercado, esse fato se deu devido ao uso errôneo e indiscriminado dessas substâncias químicas (MOLENTO, 2004; HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2012; VERISSÍMO et al., 2012). Nesse contexto é necessária estratégia sustentável para o controle desses nematoides. Uma alternativa sustentável é o estudo com extratos de plantas leguminosas, que possuem compostos fitoquímicos com ação anti-helmíntica (MARIE-MAGDELEINE et al., 2009; ADEMOLA; ELOFF, 2010; WATERMAN et al., 2010; HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011; HOSTE et al., 2012).

É conhecido que um dos compostos mais investigados na ação anti-helmíntica em criação de pequenos ruminantes são os taninos, os quais são conhecidos como compostos polifenólicos solúveis em água e possuem a capacidade de se ligar através de ligações hidrofóbicas e pelas pontes de hidrogênio à algumas proteínas, em especial à prolina (BAXTER et al., 1997). No entanto, existem outros compostos secundários que indicam possuir também ação anti-helmíntica, tais como as saponinas, flavonóides, terpenos, dentre outros, e que vêm contribuindo com o aumento da lucratividade na criação ovina, auxiliando a diminuição de resíduo no ambiente e ajudando a prolongar a vida útil dos produtos químicos já disponíveis (WATERMAN et al., 2010). Estudos indicam que muitas plantas possuem valor fitoterápico e que vem sido descritas e demonstradas em ação na redução do grau de infecção parasitária em ovinos (JACKSON; GORDON, 2008). Além disso, o controle alternativo pode diminuir o resíduo na carne e no leite desses animais.

A produção desses compostos secundários tem origem a partir de uma relação alelopática entre a planta (espécie e estágio de desenvolvimento) e o ambiente (intemperes e geografia) onde se encontra. Esses compostos secundários são importantes para a planta, e são produzidos em diversas partes da planta, como as folhas, caules, raízes, flores e

sementes, e são armazenados em vacúolos celulares ou em seus tricomas (WINK, 2008; TORRES-ACOSTA et al., 2012).

Para que haja a validação do uso dos extratos das plantas com ação anti-helmíntica, vários testes são feitos para confirmar a sua eficiência e possível utilização em organismos vivos, podendo atuar em diferentes estágios do nematoide, dos ovos no meio ambiente até a larva no hospedeiro, da infecção até a reinfecção. Dentre os testes *in vitro*, destaca-se a utilização de teste de inibição de eclodibilidade dos ovos (TIEO), onde os fitoquímicos presentes no extrato ficam em contato direto com a superfície do ovo, e o teste de inibição de desembainhamento de larvas (TIDL), onde o extrato fica em contato com a bainha da larva na fase L3 do nematoide *H. contortus.*

No presente estudo objetivou-se avaliar o TIEO e o TIDL de *H. contortus* com os extratos de plantas leguminosas, as quais foram: *Arachis pintoi* cv Amarillo, *Caesalpinia echinata, Cajanus cajan, Calopogonium velutinum, Canavalia ensiformis, Centrosema pubencens* cv Cardillo, *Cratylia mollis, Dipteryx alata, Gliricidia sepium, Leucaena leicocephala* cv Cunningham, *Leucaena pulverulenta, Mimosa caesalpiniaefolia, Neonotonia wighiti* cv Cianova, *Noenotonia wighiti* cv Tinaroo, *Piptadenia colubrina, Stylosanthes guianensis e Styzolobium aterrimun.*

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Colheita e processamento das plantas

As plantas foram coletadas no Campo Agrostológico do Instituto de Zootecnia (IZ) na cidade de Nova Odessa/SP no período de setembro de 2012 a fevereiro de 2013. Todas as plantas estão catalogadas e possuem registros no Herbário da própria instituição. Foram colhidas aproximadamente 5 kg de folhas novas (as plantas estavam em estado vegetativo e rebrota) e levadas a estufa de circulação fechada de ar a 35 ºC, até peso constante. Em seguida as folhas foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de 2 mm e armazenadas em ultrafreezer (- 80 ºC) até o início da extração.

3.2.2. Extração dos princípios ativos

O processo de extração dos compostos das plantas foi realizado conforme metodologia descrita por Barrau et al. (2005). Em erlenmeyer de 250 mL contendo 70 gramas da planta moída foi adicionado 140 mL de uma solução de 70:30 (acetona:água) e colocada em agitador automático (WEG CFW-10, G-25) durante 24 horas. Em seguida essa solução foi filtrada a vácuo com auxílio de um kitasato e papel filtro. O filtrado foi armazenado e posteriormente

rotaevaporado (Marconi MA-120) com temperatura ≤ 40 ºC para evaporação da acetona. Após a rotaevaporação, a cada 150 mL de solução foi lavada 3 vezes com 300 mL de diclorometano. A solução final foi liofilizada e armazenada em freezer até o início dos testes.

3.2.3. Qualificação dos taninos das folhas e extratos

As análises dos taninos das folhas das leguminosas secas e moídas e dos extratos liofilizados foram feitas no laboratório de nutrição animal (USP/CENA/LANA) conforme metodologia de Makkar et al. (1993) para os fenóis totais e taninos totais, os quais são expressos em equivalente grama de ácido tânico/kg de MS, e para o tanino condensado foi feito conforme metodologia de Porter et al. (1986) e expresso em equivalente grama de leucocianidina/kg de MS

3.2.4. Teste de inibição da eclodibilidade dos ovos (TIEO)

O TIEO foi realizado no Instituto de Zootecnia (IZ) em Nova Odessa/SP. Para os testes *in vitro* foram mantidos 3 animais doadores infectados unicamente com *H. contortus.* Os animais foram mantidos em baias fechadas, com disponibilidade de água e alimentação, seguindo recomendação do "Animal Welfare Approved Standards for Sheep" (ANIMAL WELFARE INSTITUTE, 2011). Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animal (CEUA/ESALQ) e recebeu protocolo número 2013-1.

Para o TIEO foram retirados cerca de 5 g de fezes diretamente do reto no animal. As fezes foram levadas ao laboratório e homogeneizadas em água destilada com temperatura em torno de 37 ºC. Em seguida, foram filtradas com auxílio de peneira de 1,00 mm, passando pelas peneiras de 105 μm, 55 μm e 25 μm. Nessa última, os ovos ficaram retidos e transferidos para tubo de polietileno tipo falcon e completados com água destilada. Os tubos contendo ovos foram centrifugados a g = 2.950 (4000 RPM – Kindly KC5, com o valor da força centrifuga relativa em durante três minutos. O sobrenadante foi descartado e os ovos ficaram retidos no fundo do tubo. Na sequência, foi adicionada uma solução hipersaturada de NaCl. Procedeu-se nova centrifugação, por três minutos. Ao final da centrifugação os ovos ficaram na superfície. O sobrenadante juntamente com os ovos foram transferidos para peneira de 25 μm e lavados com água destilada em abundância para retirada do sal. A solução contendo ovos foi novamente mantida em tubo tipo falcon (JACKSON; HOSTE, 2010). Dez alíquotas de 10 μL dessa solução contendo ovos foram

quantificadas por meio de microscópio ótico a fim de determinar a concentração média de ovos.

O TIEO foi realizado em placas de cultura de poliestireno de 24 poços. As concentrações utilizadas nos testes foram de 50 mg/mL a 0,0975 mg/mL, totalizando 10 concentrações. Para cada concentração foram realizadas 6 repetições contendo 100 ovos em cada. Concomitantemente, foram feitos os testes controle com água destilada e ovos, o teste contendo PVPP e os ovos, controle contendo Tiabendazol®, o teste com água mais polivinilpolipirrolidona (150 mg de PVPP) com os extratos (50 mg para cada extrato) e os ovos. Utilizou-se o teste com o PVPP somente com os ovos para constatar ou não a ação dos taninos presentes nos extratos, pois o mesmo tem a função de inibir a ação dos taninos, no teste do extrato mais PVPP mais os ovos ou as larvas foram realizados para os testes três vezes mais a maior concentração de extrato testada. As placas foram incubadas a 27 ºC por 24 horas e a contagens dos ovos e as larvas (L1) foram realizadas para determinação da CI_{50}.

3.2.5. Teste de inibição de desembainhamento de larvas (TIDL)

O TIDL foi realizado no Instituto de Zootecnia (IZ) em Nova Odessa/SP. Para o TIDL *in vitro*, as larvas infectantes (L3) foram recuperadas por coprocultura, conforme técnica descrita por Roberts e O'Sullivan (1950). Após a coprocultura, 10 alíquotas contendo 10 μL dessa solução com L3 foram quantificadas com auxílio de microscópio ótico a fim de determinar a concentração média de larvas, as quais foram armazenadas em tubos de polietileno tipo falcon. A concentração de L3 utilizada nos testes foi de 100 L3 para cada concentração.

O TIDL foi realizado conforme descritos por Bahuaud et al. (2006). Os extratos foram diluídos em uma solução tampão fosfato-salino (PBS) com pH de 7,2. Os testes foram realizados em tubos criogênicos com capacidade máxima de 2 mL, cada tubo continha 1 mL da solução com extrato em PBS, 700 μL de PBS, por último foi adicionado 300 μL com 100 L3. A maior concentração testada para o cálculo da CI_{50} para o TIDL foi de 50 mg/mL e a menor foi de 0,0975 mg/mL. As larvas permaneceram em contato com a solução de extrato durante 3 horas em temperaturas de 23 °C, após esse período os tubos foram levados para a centrifuga *minispin* e feita três lavagens com PBS para retirar o extrato do contato com as L3. Após esse procedimento as larvas foram submetidas ao processo de desembainhamento com uma solução de hipoclorito de sódio e cloreto de sódio, conforme descrita por Bahuaud et al. (2006). O desembainhamento das larvas foi acompanhado com auxílio de um microscópio

invertido nos tempos de 20, 40 e 60 minutos após o contato das L3 com a solução de hipoclorito. Contagem e identificação das L3 com e sem a bainha foram feitas após 60 minutos e com a adição de Lugol, com auxílio de microscópio invertido. Foram feitas três repetições para cada extrato avaliado. Concomitantemente, foram realizados os testes controle somente com o PBS, teste controle contendo PVPP com os extratos (E+PVPP) e as larvas (somente na maior concentração 50 mg/mL) e o controle contendo PVPP e as larvas, e por fim, o teste com a molécula de Galocatequina [Sigma®] (BRUNET e HOSTE, 2006; BRUNET, JACKSON e HOSTE, 2007) que foi utilizada como o teste de controle positivo.

3.2.6. Estatística

O cálculo para a concentração capaz de inibir a eclosão de 50% dos ovos e inibir o desembainhamento de 50% das larvas foram realizados por regressão utilizando a distribuição normal e logística, com a estimativa de parâmetros destas equações obtidas por máxima perspectiva. O programa utilizado foi o SAS Probit para estimar a concentração Inibitória de 50% (CI_{50}) com as variáveis independentes (dose) transformadas por logaritmo natural (log dose).

3.3. Resultados

Os valores de Fenóis Totais (FT expressos em equivalente grama de ácido tânico/kg de MS), Taninos Totais (TT expressos em equivalente grama de ácido tânico/kg de MS) e Taninos Condensados (TC expresso em equivalente grama de leucocianidina/kg de MS), das folhas das plantas e de seus respectivos extratos encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Valores de Fenóis Totais (FT), Taninos Totais (TT) e Taninos Condensados (TC) das folhas das plantas e dos seus respectivos extratos

Plantas	Fenóis Totais*		Taninos Totais*		Taninos Condensados**	
	Folhas	Extrato	Folhas	Extrato	Folhas	Extrato
Arachis pintoii cv Amarillo	48,76	171,97	32,84	120,34	59,47	56,98
Caesalpinia echinata	136,24	462,79	95,9	364,25	59,87	211,63
Cajanus cajan	135,63	286,01	91,61	205,22	241,13	584,51
Canavalia ensiformis	20,28	102,97	12,72	77,72	1,02	2,89
Calopogonium velutinum	32,88	148,43	23,01	118,31	0,53	4,41
Gliricidia sepium	27,23	66,17	17,71	48,99	2,01	1,98
Cratylia mollis	67,96	194,14	47,09	145,69	95,77	190,03
Centrosema pubencens cv Cardillo	14,51	73,73	10,4	55,09	0,35	1,76
Dipteryx alata	147,04	362,24	109,1	292,82	199,76	502,43
Leucaena leucocephala cv Cunninghan	89,98	417,11	74,96	244,72	55,66	265,56
Leucaena pulverulenta	90,68	325,47	75,26	284,93	69,68	242,42
Mimosa caesalpineafolia	159,54	387,06	108,7	304,42	100,85	277,32
Neonotonia wighitii cv Cianova	18,21	87,63	11,19	57,44	0,30	1,86
Neonotonia wighitii cv Tinaroo	18,56	88,44	11,14	61,43	0,99	2,58
Piptadenia colubrina	143	340	127,38	293,69	8,94	22,43
Stylosanthes guianensis	34,01	219,92	24,62	171,48	10,01	37,32
Styzolobium aterrimun	28,50	60,33	20,39	39,78	7,17	48,95

*Valores expressos em equivalente de g de ácido tânico/kg de MS;
** Valores expressos em equivalente de g de leucocianidina/kg de MS.

Os extratos de *M. caesalpiniaefolia* e *C. echinata* foram os que obtiveram maiores valores de FT, TT e TC nas folhas e nos extratos e os quais tiveram a menor CI_{50} nos resultado do TIEO (Tabelas 3.2). Os extratos de *C. cajan*, *D. alata*, *L. leucocephala* cv Cunningham e *L. pulverulenta* obtiveram elevados teores de FT, TT e TC (Tabela 3.1), porém não foram eficazes no TIEO para a CI_{50} (Tabela 3.2).

O extrato de *P. colubrina* obteve valor de TC mais baixo no extrato (TC = 22,43 eq g leuco/kg de MS), no entanto, foi o extrato que apresentou a menor CI_{50}. Os valores de TC dos extratos de *C. echinata* e *M. caesalpiniaefolia* justificam os menores valores obtidos para a CI_{50} nos TIEO, como observado nos resultados apresentados na Tabela 3.2. Na mesma Tabela também se encontra o resultado em porcentagem de ovos que não eclodiram na presença do PVPP mais o extrato (E+PVPP), ficando semelhante com a porcentagem de ovos que não eclodiram quando comparado com o teste utilizando somente extrato mais os ovos.

Tabela 3.2 – Valores encontrados em ordem decrescente para a Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) dos extratos das plantas e a porcentagem da não eclodibilidade do ovos com os extratos mais PVPP (E+PVPP) que foram avaliados para o Teste de Inibição da Eclodibilidade dos Ovos (TIEO) de *H. contortus*

EXTRATOS DAS PLANTA	CI_{50} (mg/mL)	Intervalo de confiança	E+PVPP (%)
Piptadenia colubrina	0,10	0,10 a 0,11	99,6
Caesalpinia echinata	0,17	0,13 a 0,22	86,4
Mimosa caesalpiniaefolia	0,53	0,49 a 0,56	67,6
Centrosema pubescens cv Cardillo	0,75	0,69 a 0,80	89
Stylosanthes guianensis	4,45	3,27 a 5,50	25
Dipteryx alata	4,63	3,94 a 5,49	67
Arachis pintoi	4,90	4,63 a 5,80	100
Gliricidia sepium	32,9	24,28 a 52,26	89
Neonotonia wightii cv Tinaroo	42,3	40,15 a 44,86	50
Neonotonia wightii cv Cianova	42,8	41,03 a 44,95	6,9
Canavalia ensiformis	46,0	43,36 a 49,29	52,5
Leucaena leucocephala cv Cunningham	82,3	60,82 a 126,88	23
Calopogonium velutinum	98,90	82,38 a 125,22	1,9
Styzolobium aterrimun	sem efeito	---	---
Leucaena pulverulenta	sem efeito	----	---
Cajanus cajan	sem efeito	----	---
Cratylia mollis	sem efeito	----	---
Controle com Tiabendazol	1,31	1,18 a 1,45	---

Os extratos mais eficiente de CI_{50} foram encontrados para os extratos de *P. colubrina* (0,10 mg/mL), o extrato de *C. echinata* encontrou a CI_{50} de 0,17 mg/mL e o extrato de *M. caesalpiniaefolia* CI_{50} de 0,53 mg/mL. De todos os extratos avaliados, apenas três (*L. pulverulenta, C. cajan* e *C. mollis*) não obtiveram efeito ovicida até a maior concentração avaliada, impedindo assim, o cálculo para a CI_{50} (Tabela 3.2). Segundo Barrau et al. (2005), Marie-Magdeleine et al. (2009) e Alonzo-Dias et al. (2011) relataram que a CI_{50} em torno de 0,30 mg/mL de extrato é uma boa resposta no controle dos nematoides gastrintestinais em testes realizados *in vitro*.

Os testes foram realizados com os ovos e as larvas separadamente utilizando somente com o PVPP, verificando que a eclodibilidade dos ovos ou o desembainhamento das larvas foram afetados na presença do PVPP, obtendo a não eclosão de 95% dos ovos e quase 100% das larvas não desembainharam. De posse desta informação iniciou-se os testes *in vitro* com os extratos adicionados ou não o PVPP para confirmar a ação anti-helmíntica do tanino.

As correlações entre as variáveis de FT, TT e TC das plantas e dos extratos e a CI_{50} encontram-se na Tabela 3.3. Entre as diferentes concentrações dos grupos fenólicos houve correlações positivas ($R = 0,51$ a $0,97$ e $P<0,001$). Ao avaliar as concentrações das frações de tanino com as CI_{50} de cada extrato foi observada correlação negativa entre elas, porem estas foram baixas e não significativas.

Tabela 3.3 – Correlação entre os valores encontrados de Fenóis Totais (FT), Taninos Totais (TT), Taninos Condensados (TC) das folhas das plantas (p) e dos extratos (e) com a Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) dos extratos avaliados

	FTp	TTp	TCp	FTe	TTe	TCe	CI_{50}
FTp	1,0000						
TTp	0,9841 (P<0,0001)	1,0000					
TCp	0,6942 (P<0,0020)	0,6138 (P<0,0088)	1,0000				
FTe	0,8896 (P<0,0001)	0,8951 (P<0,0001)	0,5150 (P<0,0412)	1,0000			
TTe	0,9115 (P<0,0001)	0,9218 (P<0,0001)	0,4950 (P>0,0512)	0,9739 (P<0,0001)	1,0000		
TCe	0,7505 (P<0,0008)	0,6836 (P<0,0035)	0,9660 (P<0,0001)	0,6500 (P<0,0064)	0,6107 (P<0,0120)	1,0000	
CI_{50}	-0,3813 (0,1986)	-0,3581 (0,2295)	-0,3184 (0,2889)	-0,2329 (0,4437)	-0,3235 (0,2809)	-0,2154 (0,4797)	1,0000

Os resultados encontrados para o TIDL encontram-se na Tabela 3.4 juntamente com o resultado de porcentagem de larvas que não foram desembainhadas quando testadas com os extratos mais o PVPP (E+PVPP), a porcentagem de larvas não desembainhadas em ambos os testes, extrato mais larvas e E+PVPP mais as larvas, foram semelhantes. Os resultados mais eficientes para a CI_{50} na inibição do desembainhamento das larvas ocorreram para os extratos de *S. guianensis* (0,51 mg/mL), seguida com o extrato de *A. pintoi* (1,04 mg/mL) e em terceiro para o extrato de *C. echinata* (1,25 mg/mL). Para a realização do teste para o controle positivo foi utilizado uma molécula isolado do composto secundário, tanino, chamada de Galocatequina (Sigma®). A escolha da utilização dessa molécula para obter os resultados do controle positivo foi devido a trabalhos realizados por Brunet e Hoste (2006) e Brunet, Jackson e Hoste (2007). No presente trabalho, o resultado encontrado da CI_{50} para o controle positivo utilizando a molécula de Galocatequina foi menor quando comparado com os resultados dos extratos testados, como observado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Valores encontrados em ordem decrescente para a Concentração Inibitória 50 % (CI_{50}) dos extratos das plantas e a porcentagem do desembainhamento das larvas com os extratos mais PVPP que foram avaliados para o Teste de Inibição de Desembainhamento das Larvas (TIDL) de *H. contortus*

PLANTA	CI_{50} (mg/mL)	Intervalo	E+PVPP (%)
Stylosanthes guianensis	0,51	0,40 a 0,63	98
Arachis pintoi cv Amarillo	1,04	0,87 a 1,23	94
Caesalpinia echinata	1,25	1,16 a 1,35	99
Dipteryx alata	1,42	1,23 a 1,63	98
Styzolobium aterrimun	1,51	1,27 a 2,92	74
Leucaena leucocephala cv Cunningham	1,58	1,22 a 1,95	84
Cratylia mollis	1,94	1,13 a 2,79	68
Mimosa caesalpiniaefolia	2,11	1,99 a 2,24	100
Neonotonia wighti cv Tinaroo	2,41	2,11 a 3,53	72
Piptadenia colubrina	2,70	2,49 a 2,93	90
Gliricidia sepium	3,03	2,73 a 3,33	67
Centrosema pubens cv Cardillo	3,21	2,92 a 3,54	90
Leucaena pulverulenta	3,40	2,39 a 4,43	80,7
Calopogonium velutinum	3,61	2,71 a 4,50	80,7
Cajanus cajan	4,79	4,14 a 5,40	91
Canavalia ensiformis	9,50	8,42 a 10,61	76,5
Neonotonia wighti cv Cianova	9,60	8,71 a 10,56	83,5
Gallocatequina	0,014	0,013 a 0,016	---

3.4. Discussão

A menor CI_{50} determinada foi a do extrato da planta de *P. colubrina* (0,10 mg/mL) no TIEO. No entanto, o extrato desta planta apresentou um teor de TC de 22,43 eq g leuco/kg de MS (Tabela 1), valor esse baixo quando comparado com outros extratos avaliados. Outros extratos apresentaram concentrações de TC maiores, porem com CI_{50} maiores, quando comparado com o extrato de *P. colubrina.* O TIDL feito com o extrato de *P. colubrina* com larvas *H. contortus* no terceiro estágio obteve resultado maior (2,70 mg/mL) para a CI_{50} quando comparado com o resultado encontrado no TIEO (CI_{50} 0,10 mg/mL).

Concomitantemente, todos os testes realizados com os extratos também foram realizados utilizando PVPP. O extrato de *P. Colubrina* com o PVPP (E+PVPP) demonstrou que o extrato em questão não teve resposta favorável para a substância tanino, ou a quantidade de PVPP utilizada, três vezes mais que a concntração de extrato não foi suficiente para precipitar os taninos. A utilização do PVPP inibe o efeito do tanino caso estivesse presente no extrato (MAKKAR et al. 1993). Os testes realizados tanto para o extrato mais os ovos bem como o teste realizado com o E+PVPP, apresentaram porcentagem de não eclosão semelhante, mais de 91% dos ovos não eclodiram utilizando o extrato de *P. Colubrina*. O extrato em questão teve efeito devido, provavelmente, alguma outra substância presente na planta, e consequentemente no extrato, pois mesmo com a presença do PVPP o extrato teve efeito, indicando que não tenha sido o tanino o causador do efeito ovicida.

O TIEO com o extrato de *C. echinata* obteve a CI_{50} de 0,17 mg/mL e o valor encontrado para TIDL foi com a CI_{50} de 1,25 mg/mL. O teor de TC encontrado no extrato de *C. echinata* foi de 221,63 (eq g leuco/kg de MS), mesmo com um valor de TC alto, quando foram feitos os testes com o E+PVPP mais os ovos e o E+PVPP mais as larvas, ambos mostraram resultados parecidos quando comparado com os resultados encontrado nos testes feitos somente utilizando os extratos mais os ovos e os extratos mais as larvas. Os ovos não eclodiram 100% nos testes realizados com os extratos mais os ovos e, em torno de 87% dos ovos não eclodiram no teste com E+PVPP mais os ovos. No teste com as larvas, em ambos as larvas não desembainharam em torno de 99%. O que pode ter ocorrido é a quantidade de PVPP utilizado ter sido insuficiente na realização dos testes, a qual não precipitou o tanino que poderia estar presente no extrato, já que a quantidade de tanino encontrado no extrato em questão foi elevada. Tanto o tanino quanto, possivelmente, outras substâncias presentes no extrato de *P. Colubrina* contribuiu para o resultado encontrado.

A terceira menor CI_{50} encontrada no presente trabalho para o TIEO foi para o extrato de *M. caesalpiniaefolia* de 0,53 mg/mL, contudo o mesmo extrato ficou no ranque de número oito para o TIDL com a CI_{50} de 2,11 mg/mL. O valor de TC encontrado para o presente extrato foi de 277,32 (eq g leuco/kg de MS). O extrato de *M. caesalpiniaefolia* foi o único extrato que obteve resultado menos próximo na porcentagem, da não eclosão, quando utilizado PVPP (E+PVPP+ovos) e o teste sem PVPP (E+ovos). Teste feito somente com o extrato mais os ovos teve uma inibição de eclodibilidade de 97%, e o teste feito com o E+PVPP encontrou valores em torno de 68%. Notando que, provavelmente, algum composto secundário presente no extrato de *M. caesalpiniaefolia* ocasionou esse efeito, o qual, possivelmente possa ter sido auxiliado pela presença de taninos no extrato em questão. Esse relato pode explicar o porquê de alguns extratos de plantas leguminosas possuírem mais eficiência na atividade ovicida e nas larvas em comparação a outros extratos.

O teste feito com o extrato de *M. caesalpiniaefolia* mostrou-se possuir uma alta afinidade com a superfície dos ovos no TIEO, pois o resultado obtido no TIDL não foi satisfatório. O resultado encontrado no TIEO com o extrato de *M. caesalpiniaefolia* pode ter ocorrido devido a presença de uma proteína na superfície do ovo, chamada de lectina, pois Hillrichs et al. (2012) relataram que essa proteína não imunológica presente nos ovos possui uma alta afinidade em se ligar com TC, possivelmente, esse processo pode ter ocorrido e ocasionado a inibição dos ovos de *H. contortus.*

O extrato de *S. guianensis* obteve a menor CI_{50} no TIDL (0,51 mg/mL), no entanto, não obteve resultado satisfatório (ranque: quinto) no TIEO (CI_{50} de 4,45 mg/mL) quando comparado com outros extratos já discutido no presente trabalho. O teor de TC do extrato de *S. guianensis* foi de 37,32 (eq g leuco/kg de MS), valor esse baixo quando comparado com outros extratos que obtiveram resultados de CI_{50} no TIDL maiores e com o teor de TC maior.

O resultado obtido com o teste feito com o extrato de *S. guianensis* mais as larvas apresentou resultado bem próximo quando comparado com o teste de E+PVPP mais as larvas, em torno de 99% não desembainharam. O sucesso obtido no resultado do TIDL utilizando o extrato de *S. guianensis*, possivelmente, não tenha sido devido ao tanino e sim que tenha vindo de outro composto secundário presente na planta, o qual ocasionou o resultado encontrado. Fetterer e Rhoads (1993) relataram que alguns compostos secundários possuem a afinidade em se ligar com substâncias como a prolina e a hidroxiprolina, quando esse processo ocorre há alterações nas propriedades físicas e químicas da bainha de *H. contortus*, algumas substâncias presentes no extrato podem ter corroborado com os resultados encontrados nos TIDL, pois era nítido que o extrato em contato com a larva acarretou alguma

mudança em seu processo biológico, inibindo seu desembainhamento.

O extrato da planta *A. pintoi* cv Amarillo obteve a segunda menor CI_{50} no TIDL (1,04 mg/mL) e no TIEO o mesmo extrato ficou no ranque sétimo com uma CI_{50} de 4,90 mg/mL. O teor de TC encontrado para esse extrato foi de 56,98 (eq g leuco/kg de MS). Esses teores baixos de TC pode indicar uma alternativa favorável para a alimentação de pequenos ruminantes nas propriedades rurais, pois além de assessorar no controle da verminose também se torna uma ótima fonte de alimento para os ovinos. Plantas que apresentam alto teores de TC são necessário que ocorra cautela ou estratégia em seu fornecimento aos animais a fim de não ultrapassar o limite do teor de TC na dieta, pois é sabido que altos teores de TC na dieta dos animais causa danos de toxidade e redução no consumo devido a redução da aceitabilidade da dieta, devido à sua adstringência (formação de complexo TC-proteína salivar durante a mastigação) e, consequentemente, o baixo consumo dos nutrientes e a diminuição da digestibilidade dos nutriente ocasionando a diminuição da produtividade dos animais (HOSTE, el at. 2006).

Os valores encontrados para a CI_{50} nos TIDL com os extratos avaliados apresentaram, possivelmente, esses valores devido a função dos compostos ativos presente nos extratos não serem capazes de penetrar e/ou causar danos na bainha desse parasita no estágio (L3), pois existe diferença na superfície da bainha da larva infectante quando comparada com a superfície do ovo de *H. contortus*. A larva de *H. contortus* na fase L3 possui em sua bainha uma camada de proteção mais resistente chamada de cuticlin, e essa camada atua na proteção do nematoide, pois é extremamente resistente diminuindo assim a ação anti-helmíntica nessa fase (FETTERER; RHOADS, 1990).

Os extratos avaliados no presente trabalho pode conter compostos fitoquimícos, como a saponina, o flavonóide, os terpenos, os alcalóides, os aminoácidos, as xantonas dentre outros (SOBRAL et al., 2009; MARIE-MAGDELEINE et al., 2009; WATERMAN et al., 2010; HOSTE e TORRES-ACOSTA, 2011), dos quais possam ter auxiliado no efeito anti-helmíntico (não eclosão) nos testes realizados com os extratos mais os ovos de *H. contortus* e, também, auxiliado a larvas (L3) de *H. contortus* para não desembainharem. Deve-se, portanto em trabalhos futuros avaliar o perfil das substâncias presentes no extrato a fim de elucidar qual componente deve estar agindo. Todavia é sabido que algumas substâncias, como a clorofila, resina e gordura, foram carregadas pelo diclorometano na preparação dos extratos (BARRAU, et al., 2005; EZANDO et al., 2011).

Estudos feitos por Marie-Magdeleine et al. (2009) utilizaram extrato aquoso de *Cucurbita moschata* (diclorometano) em testes *in vitro*, na inibição da eclosão,

desenvolvimento da larva e migração da L3 com *H. contortus*, descreveram que os aminoácidos (cucurbitina e cucurmosina), terpenóides e as saponinas foram as substâncias responsáveis pelos resultados obtidos nos testes da CI_{50} (entre 0,75 a 2,40 mg/mL). Os mesmos autores relataram em outro trabalho que o extrato de *Manihot esculenta* (diclorometano) obteve uma resposta favorável nos testes devido a presença de taninos condensados e de terpenóides, os testes foram realizados para inibição o desenvolvimento da larva de *H. contortus* e a CI_{50} encontrada foi de 0,85 mg/mL, porem os autores relataram que não obtiveram respostas favoráveis para os testes de eclodibilidade, migração da L3 e motilidade das larvas adultas (MARIE-MAGDELEINE, et al., 2010). Em outro trabalho Marie-Magdeleine et al. (2010) avaliaram o extrato de *Tabernaemonta na citrifolia* (diclorometano) e observaram resposta favorável para o teste de inibição de eclosão dos ovos de *H. contortus* com a CI_{50} de 2,32 mg/mL e descreveram que essa CI_{50} encontrada foi devido a presença de alcalóides no extrato.

Segundo Mansfield et al. (1992) a estrutura externa do ovo possui em sua composição lipídios e proteínas, essa estrutura protéica presente na superfície do ovo pode ter facilitado a interação com algumas das substâncias presentes nos extratos causando a inibição da eclosão dos ovos. Já Riou et al. (2003) relataram que os ovos na fase final quando estão prestes a eclodir ocorre uma reação bioquímica (embriogênese) entre os lipídios e as proteínas ali presentes fazendo com que o ovo fique mais susceptível a ação anti-helmíntica.

Nesse estudo foi observado visualmente que em alguns extratos, *P. colubrina* (para as larvas), *M. caesalpiniaefolia* (para os ovos) e *C. echinata* (tanto para os ovos quanto para as larvas) deixavam a casca do ovo com um aspecto gelatinoso, sendo que dentro do ovo havia a larva, mas por algum motivo essa larva não conseguia eclodir em relação ao controle. Riou et al. (2003) relataram que existe uma fase no desenvolvimento do ovo que acontece algumas mudanças bioquímicas em sua estrutura e que resulta na instabilidade e na resistência desse ovo, no entanto, no presente trabalho foi observado que o ovo em contato com o extrato apresentou aspecto gelatinoso, tornando-o flexível dificultando o rompimento da casca. A mesma observação foi feita no TIDL, a bainha da L3 quando analisada em microscópio apresentava uma aparência afrouxada e a larva não conseguia se desembainhar. A bainha além de apresentar lipídios e proteínas, também apresenta carboidratos em sua estrutura, provavelmente, esse outro componente juntamente com os outros fitoquímicos do extrato podem ter auxiliado nos resultados diferentes encontrados com os mesmos extratos avaliados nos testes.

Pesquisa feita por Ademola e Eloff em 2010 com extrato de *Combretum molle* (acetona, butanol, clorofórmio, metanol) verificou que foi a saponina presente no extrato que inibiu a eclosão dos ovos de *H. contortus* (CI_{50} entre 0,0075 a 1 mg/mL) nos testes realizados *in vitro.* Oliveira et al. (2009) relataram a presença de compostos secundários no extrato de acetato de etila da planta *Cocos nucifera* (taninos condensados, flavonóides e esteróides) e descreveram que obtiveram a CI_{50} de 2,20 mg/mL para a inibição dos ovos de *H. contortus*.

Destaca-se no presente trabalho o extrato de *C. echinata*, o qual apresentou resultados satisfatórios nos dois testes, tanto no TIEO como no TIDL com *H. contortus*. Provavelmente, devido a alguns fitoquímicos que estão presentes e que potencializou o efeito em ambos os testes. Luna et al. em 2005 relataram que o extrato da planta *C. echinata*, feito a partir das folhas, apresenta fenóis, flavononas, flavonas, flavonóides, esteróides, triterpenos, antraquinonas e antronas. Estuds feito por Silva em 2001 indicou que a planta *C. echinata* apresenta abundantemente taninos como fitoquímicos e outra substância muito abundante na planta é a brasilina, que o produto de sua oxidação, forma a brasileína, a qual é responsável pela coloração vermelha do caule da planta (OLIVEIRA et al, 2002). Pesquisa realizada por Rezende et al. (2004) identificaram a presença de compostos secundários nas folhas e flores, o composto E-beta-ocimero foi o mais encontrado nas flores e o composto (E)-3-hexeno-1-ol foi o mais encontrado nas folhas, os compostos mais presentes na *C. echinata* são os compostos fenólicos. Também foram relatados a presença de monoterpenos, ácidos carboxílicos, cumarinas e ésteres (Rezende et al, 2004). No presente trabalho, utilizaram-se as folhas para processar o extrato, possivelmente esses compostos das folhas podem ter corroborado com os resultados encontrados para inibir a eclosão dos ovos bem como para inibir o desembainhamento das larvas.

3.5. Conclusão

Os melhores extratos em ordem decrescente no TIEO contra *Haemonchus contortus* foram para *Piptadenia colubrina*, *Caesalpinia echinata* e *Mimosa caesalpiniaefolia* e os três melhores extratos no TIDL de *H. contortus* foram para *Stylosanthes guianensis*, *Arachis pintoi* cv Amarillo e *Caesalpinia echinata* demonstrando potencial para a realização de teste *in vivo*.

Referências

ADEMOLA, I. O.; ELOFF, J. N. In vitro anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. Ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 169, n. 1-2, p. 198-203, 2010.

ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TOGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multiple resistances to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 59, p. 622-625, 2010.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; HOSTE, H. Comparing the sensitivity of two in vitro assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against Haemonchus contortus. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, p. 360–364, 2011.

ANIMAL WELFARE INFORMATION CENTER. **Policy on the care and use of sheep for scientific purposes based on good practice**. Washington, DC: USDA/NAL, 2005. Disponível em: <www.animalwelfare.net.au/comm/download/sheepcare.pdf>.

BARRAU, E.; FABRE, N.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Efect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, London, v.131, p.531-538, 2005.

BAHUAUD, D.; MARTINEZÓRTIZ DE MONTELLANO, C.; CHAUVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage of parasitic nematodes. **Parasitology,** London, v. 132, n. 4, p. 545-554, 2006.

BAXTER, N. J.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E.; WILLIAMSON, M. P. Multiple interactions between polyphenols and salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precitation. **Biochemistry**, New York, v. 36, p. 5566-5577, 1997.

BORGES, F. A.; ALMEIDA, G. D.; HECKLER, R. P.; LEMES, R. T.; ONIZUKA, M. K. V.; BORGES, D. G. L. Impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 45, p. 723-727, 2013.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, n. 20, p. 7481-7487, 2006.

BRUNET, S.; JACKSON, F., HOSTE, H. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. **International Journal for Parasitology,** Oxford, v. 38, p. 783–790, 2008.

FETTERER, R. H.; RHOADS, M. L. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 46, n. 1-4, p. 103-111, 1993.

HILLRICHS, K.; SCHNIEDER, T.; FORBES, A. B.; SIMCOCK, D. C.; PEDLEY, K. C.; SIMPSON, H. V. Use of fluorescent lectin binding to distinguish *Teladorsagia circuncincta* and *Haemonchus contortus* eggs, third-stage larval and adult worms. **Parasitology Research,** Heidelberg, v. 110, p. 449-458, 2012.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 253–261, 2006.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solution for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 144-154, 2011.

HOSTE, H.; MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; MANOLARAKI, F.; BRUNET, S.; OJEDA-ROBERTOS, N.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A. Direct and indirect effects of bioactive tannin rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 186, p. 18-27, 2012.

JACKSON, F.; GORDON, Y. Screening plants for anthelmintic activity: a challenging situation. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., 2008, Curitiba. **Anais…** Curitiba: Laboratório de Doenças Parasitárias, 2008.

JACKSON, F.; HOSTE, H. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: VERCOE, P. E.; MAKKAR, H. P. S.; SCHLINK, A. C. (Ed.). ***In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants**: nuclear and related methodologies. Amsterdam: Springer Netherlands, 2010. p. 25-45.

LUNA, J. D. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 97, p. 199-206, 2005.

MAKKAR, H. P. S.; BLUMMEL M.; BOROWY, N. K.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** London, v. 61, p. 161-165, 1993.

MARIE-MAGDELEINE, C.; HOSTE, H.; MAHIEU, M.; VARO, H.; ARCHIMEDE, H. *In vitro* effects of *Curcubita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n. 1-2, p. 99-105, 2009.

MARIE-MAGDELEINE, C.; UDINO, L.; PHILIBERT, L.; BOCAGE, B.; ARCHIMEDE, H. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 85-92, 2010.

MARIE-MAGDELEINE, C.; MAHIEU, M. L.; PHILIBERT, P.; DESPOIS, H. A. Effect of Cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 10-18, 2010.

MANSFIELD, L. S.; GAMBLE, H. R.; FETTERER, R. H. Characterization of the eggshell of Haemonchus contortus. I. Structural components. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 103, p. 681-686, 1992.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, supl. 1, p. 82-87, 2004.

OLIVEIRA, L. F. C.; EDWARDS, H. G. M.; VELOZO, E. S.; NESBITT, M. Vibrational spectroscopic study of brazilin and brazilein, the main constituents of brazilwood from Brazil. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 28, p. 143-249, 2002.

OLIVEIRA, L. M. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; BARROS, R. S.; RODRIGUES, A. C. M.; NAVARRO, A. M. C. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 159, p. 55-59, 2009.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 223-230, 1986.

REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F. S.; COSTA, A. V. M. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata,* Lam.). **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 414- 416, 2004.

RIOU, M. Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistance to anthelmintics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, p. 180-187, 2003.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 1, p. 99-102, 1950.

SILVA, R. C. **Plantas medicinais na saúde bucal**. Vitória, ES, 2001.

SOBRAL, I. S.; SOUZA-NETA, L. C.; COSTA, G.; GUEDES, A. N.; MARTINS. M. L. S.; CRUZ, D.; FREDERICO. G. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de Kielmeyera cuspidata Saddi, Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 19, n. 3, p. 686-689, 2009.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; HOSTE, H.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; CÁMARA-SARMIENTO, R.; ALONSO-DÍAZ, M. A. Nutritional manipulation of sheep and goats Fo the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 103, p. 28-40, 2012.

VERÍSSIMO, C. J.; NICIURA, S. C. M.; ALBERTI, A. L. L.; RODRIGUES, C. F. C.; BARBOSA, C. F. C.; CHIEBAO, D. P.; CARDOSO, D.; SILVA, G. S.; PEREIRA, J. R.; MARGATHO, L. F. F.; COSTA, R. L. D.; NARDON, R. F.; UENO, T. E. H.; CURCI, V. C. L. M.; MOLENTO, M. B. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, n. 1-2, p. 209-216, 2012.

WATERMAN, C.; SMITH, R. A.; PONTIGGIA, L.; DERMARDEROSIAN, A. Anthelmintic screening of Sub-Saharan African plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 127, p. 755-759, 2010.

WINK, M. E. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multicomponent mixtures used in phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, Hilversum, v. 9, p. 996-1009, 2008.

4. Teste de motilidade com *Caenorhabditis elegans* para triagem de plantas leguminosas

Resumo: É sabido da existência da resistência antiparasitária dos principais produtos químicos existentes no mercado. Uma alternativa sustentável é a utilização de extratos de plantas leguminosas, os quais vêm demostrando eficiência no controle de nematoides. Perante isso objetivou-se avaliar a atividade anti-helmíntica de 17 extratos de plantas leguminosas em teste de motilidade do *Caenorhabditis elegans* (TMCE). Os extratos foram feitos a partir das folhas das plantas de *Arachis pintoi* cv Amarillo, *Caesalpinia echinata, Cajanus cajan, Calopogonium velutinum, Canavalia ensiformis, Centrosema pubencens* cv Cardillo, *Cratylia mollis, Dipteryx alata, Gliricidia sepium, Leucaena leucocephala* cv Cunningham, *Leucaena pulverulenta, Mimosa caesalpiniaefolia, Neonotonia wighiti* cv Cianova, *Noenotonia wighiti* cv Tinaroo, *Piptadenia colubrina, Stylosanthes guianensis* e *Styzolobium aterrimun,* as quais foram coletadas no campo agrostológico do Instituto de Zootecnia em Nova Odessa/SP. Seus princípios ativos foram extraídos por maceração em solução de acetona:água 70:30, o solvente retirado por rotaevaporação, seguido por lavagem com diclorometano e liofilizado. Os resultados obtidos para no TMCE foram baseados na concentração Inibitória de 50% (CI_{50}), sendo que as concentrações testadas nos nematoides adultos de *C. elegans* juntamente com os extratos foram de 50 mg/mL para a maior e a menor de 0,039 mg/mL. O resultado obtido com maior eficiência para a CI_{50} no TMCE foi para o extrato de *C. echinata* com a CI_{50} de 0,49 mg/mL, seguido com o extrato de *M. caesalpiniaefolia* com 1,03 mg/mL, o terceiro extrato mais eficiente foi para *Dipteryx alata* com 1,50 mg/mL, seguido pelo extrato de *P. colubrina* com 1,56 mg/mL, o extrato de *Leucaena leucocephala* cv Cunningham com 1,98 mg/mL, o extrato de *Cratylia mollis* com 2,02 mg/mL, o extrato de *Cajanus Cajan* com 2,13 mg/mL, extrato de *Leucaena pulverulenta* com 2,97 mg/mL, o extrato de *Gliricidia sepium* com 4,14 mg/mL, o extrato de *Centrosema pubescens* cv Cardillo com 6,19 mg/mL, o extrato de *Stylozobium aterrimum* com 6,70 mg/mL, o extrato de *Stylosanthes guianensis* com 17,10 mg/mL, o extrato de *Arachis pintoi* cv Amarillo com 28,68 mg/mL, o extrato com a menor eficácia foi para a planta *Canavalia ensiformis* com 40,56 mg/mL. Os extratos *Neonotonia wighti* cv Tinaroo, *Calopogonium velutinum* e *Neonotonia wighti* cv Cianova foram ineficazes na maior concentração testada (50 mg/mL). Concomitantemente foram testado o controle positivo (concentrações de 50 mg/mL a 0,09 mg/mL) utilizando Zolvix® (monepantel) com CI_{50} 0,26 mg/mL. O melhor resultado para a CI_{50} no TMCE foi com o extrato de *C. echinata* (0,49 mg/mL).

Palavras-chave: composto fitoquímicos, *Haemonchus contortus,* leguminosas, ovinos, sustentabilidade

4.1. Introdução

O nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) por ser da Ordem Rhabditida possui uma afinidade íntima com a Ordem Strongylida, que é a ordem onde se encontra os principais nematoides que causa grandes perdas nas criações de pequenos ruminantes, mais especificamente os ovinos, onde se destaca o parasita *Haemonchus contortus* (*H. contortus*) que ataca o trato gastrintestinal (abomaso) e leva o animal infectado a morte, quando não, essa infecção causa perda econômica, redução no crescimento dos animais, perda de ganho de peso, redução no consumo, queda na produção de leite, baixa fertilidade entre outros problemas (SOULSBY, 1992; STEAR et al., 2007; BORGES et al., 2013).

Em estudos feitos por McGaw et al. (2007) e Waterman et al. (2010) relataram que o modelo em questão (*C. elegans*) é uma ferramenta que vem auxiliando e mostrando aos pesquisadores qual caminho percorrer e quais estratégias para o controle de nematoides de várias espécies animais, incluindo estudos feitos no controle dos nematoides gastrintestinais dos ovinos, como o *H. contortus*. Pesquisas feitas com *C. elegans* juntamente com anti-helmínticos comerciais, concluíram que esse nematoide corresponde adequadamente os critérios necessários nos testes *in vitro* que foram realizados, os autores relataram que foi um teste econômico, de fácil disponibilidade e fácil de manusear (SIMPKIN; COLES, 1981). A partir daí outros pesquisadores vêm utilizando *C. elegans* como modelo na procura de novas formulas anti-helmíntica. Kaminsky et al. (2008) relataram o surgimento de um novo anti-helmíntico, o monepantel (amino-acetonitrilo – DAA), o quel se originou utilizando *C. elegans* como modelo juntamente com o *H. contortus* em testes *in vitro*.

Pesquisadores relataram que produtos que foram testados, *in vitro*, com *C. elegans* obtiveram respostas favoráveis na sua eficiência e os resultados foram com baixas concentrações. Os autores descreveram que esses produtos testados podem possuir ação anti-helmíntica satisfatória quando for testados nos nematoides como o *H. contortus* (THOMPSON et al., 1996). Muitas pesquisas que estão sendo feitos com *C. elegans* vem trazendo respostas com os extratos vegetais, com fração purificada, compostos fitoquímicos, os óleos essenciais, essas pesquisas são feitas basicamente com produtos vindo a partir de uma planta ou parte dela, como as folhas, caules, raízes e/ou frutos (SMITH et al., 2009; KATIKI et al., 2011; 2013). Contudo, a melhor forma para testar um produto que possa possuir ação anti-helmíntica ainda é a utilização de animais naturalmente infectados, porem isso requer instalações adequadas, grande quantidade de animais e volumosa quantidade da planta a ser testada, tornando a pesquisa ainda mais caro e inviável. Para facilitar o estudo com plantas que possa ter ação anti-helmíntica, vários testes *in vitro* tem sido utilizados,

incluindo ensaios de eclosão dos ovos, ensaio de desembainhamento das larvas, entre outros (HOSTE et al., 2006; EGUALE et al., 2007; BRUNET et al., 2008). Todavia, testes que envolvem nematoides na fase adulta são escassos, devido a dificuldade de adquirir esses nematoides, pensando nisso, o modelo *C. elegans* veio para auxiliar a substituição do nematoide na fase adulta e baratear os custos dos testes *in vitro* (MARIE-MAGDELEINE et al., 2009).

Frente a isso, o aumento dos estudos com compostos naturais expandiu muito, isso ocorreu devido a algumas respostas positivas demonstradas, tais como, o baixo impacto gerado no meio ambiente e a isenção de resíduos indesejáveis nos produtos de origem animal, como a carne e o leite. Existem muitos estudos que relatam a eficiência anti-helmíntica de alguns fitoquímicos naturais que estão presentes nas plantas, tais como, os terpenos, as saponinas, os alcalóides, os flavonóides e os taninos, e além de possuir ação anti-helmíntica alguns deles possuem também benefícios na alimentação animal (IQBAL et al., 2002; MUELLER-HARVEY, 2006; MARIE-MAGDELEINE et al., 2009; MARIE-MAGDELEINE et al., 2010; ADEMOLA; ELOFF, 2010; WATERMAN et al., 2010; HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011; HOSTE et al., 2012). Pesquisas feitas por Molan et al. (2003) relataram que os flavonóides testados, galocatequina e epigalocatequina, obtiveram respostas favoráveis na inibição da eclosão dos ovos e inibição no desenvolvimento larval de *T. colubriformis*. Outro estudo relatou a eficiência como efeito anti-helmíntico dos compostos procianidinas e prodelfinidinas no desembainhamento larval dos nematoides *T. colubriformis* e *H. contortus* (BRUNET; HOSTE, 2006). Katiki et al. (2013) relataram eficiência, em testes *in vitro*, na utilização de extratos de plantas ricas em taninos condensados (TC) e para plantas ricas em taninos hidrolisáveis (TH). Os testes foram realizados com o modelo *C. elegans* e a CI_{50} encontrada para o extrato que continham maior teor de TC foi de 0,75 mg/mL (*Quercus alba*) e a CI_{50} encontrada para o extrato que continha mais TH foi de 0,73 mg/mL (*Robinia pseudoacacia*).

Diante do exposto, objetivou-se no presente trabalho testar 17 extratos de folhas de plantas leguminosas (*Arachis pintoi* cv Amarillo, *Caesalpinia echinata, Cajanus cajan, Calopogonium velutinum, Canavalia ensiformis, Centrosema pubencens* cv Cardillo, *Cratylia mollis, Dipteryx alata, Gliricidia sepium, Leucaena leicocephala* cv Cunningham, *Leucaena pulverulenta, Mimosa caesalpiniaefolia, Neonotonia wighiti* cv Cianova, *Noenotonia wighiti* cv Tinaroo, *Piptadenia colubrina, Stylosanthes guianensis e Styzolobium aterrimun*) em teste de motilidade com *C. elegans* (TMCE).

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Colheita e processamento das plantas

As plantas foram coletadas no Campo Agrostológico do Instituto de Zootecnia (IZ) na cidade de Nova Odessa/SP no período de setembro de 2012 a fevereiro de 2013. Todas as plantas estão catalogadas e possuem registros no Herbário da própria instituição. Foram colhidas aproximadamente 5 kg de folhas novas (as plantas estavam em estado vegetativo e rebrota) e levadas a estufa de circulação fechada de ar a 35 ºC, até peso constante. Em seguida as folhas foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de 2 mm e armazenadas em ultrafreezer (- 80 ºC) até o início da extração.

4.2.2. Extração dos princípios ativos

O processo de extração das plantas foi realizado conforme metodologia descrita por Barrau et al. (2005). Em erlenmeyer de 250 mL contendo 70 gramas da planta moída foi adicionado 140 mL de uma solução de 70:30 (acetona:água) e colocada em agitador automático (WEG CFW-10, G-25) durante 24 horas. Em seguida essa solução foi filtrada a vácuo com auxílio de um kitasato e papel filtro. O filtrado foi armazenado e posteriormente rotaevaporado (Marconi MA-120) com temperatura ≤ 40 ºC para evaporação da acetona. Após a rotaevaporação, a cada 150 mL de solução foi lavada 3 vezes com 300 mL de diclorometano. A solução final foi liofilizada e armazenada em freezer até o início dos testes.

4.2.3. Quantificação dos taninos das folhas e extratos

As análises dos taninos das folhas das leguminosas secas e moídas e dos extratos liofilizados foram feitas no laboratório de nutrição animal (USP/CENA/LANA) conforme metodologia de Makkar et al. (1993) para os fenóis totais e taninos totais, os quais são expressos em equivalente grama de ácido tânico/kg de MS, e para o tanino condensado foi feito conforme metodologia de Porter et al. (1986) e expresso em equivalente grama de leucocianidina/kg de MS.

4.2.4. Cultivo do *Caenorhabditis elegans*

Todo o teste *in vitro* foi realizado no Instituto de Zootecnia (IZ) localizado no município de Nova Odessa/SP/Brasil, sendo que, o nematoide testado (*C. elegans* – "*Strain Wild*") foi fornecido pela Embrapa de Plataforma Nacional de Recursos Genéticos

(Cenargen – Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia) localizado na cidade de Brasília/DF/Brasil.

C. elegans foram mantidos em um meio axênico descrito por Chitwood e Feldlaufer em 1990, esse meio continha 90 mL de água destilada, 3 g de extrato de soja (Sigma – Aldrich Corp), 3 g de peptona de soja, 1,0 g de dextrose e 0,25 mL de colesterol (Sigma – Aldrich Corp), sendo que para dissolver o colesterol em questão foram utilizados 5 mg do colesterol (Sigma) em 1,0 mL de álcool a 95%, essa solução leva o nome de Meio E. O Meio E foi altoclavado e logo após esse Meio E foi levado para a capela de fluxo laminar vertical (Veco – modelo VLFS12) e acrescido hemoglobina (Sigma – Aldrich Corp). O Meio E mais a hemoglobina foi filtrada por duas vezes em um filtro de 0,22 μm posteriormente armazenada em congelador até ser utilizada para replicar o *C. elegans*.

Para que houvesse sucesso na réplica e no crescimento da população dos *C. elegans*, os mesmo eram mantidos em frasco de vidro borosilicato autoclavados com tampa de rosca (capacidade de 20 mL) e vedados com parafilme. A réplica foi feita colocando 1 mL do Meio E mais hemoglobina axenico nos frascos e acrescido aproximadamente seis gotas de uma população já estabelecida de *C. elegans*, todo o procedimento e manuseio com *C. elegans* foram feito dentro da capela de fluxo laminar vertical. Ao término da replica do *C. elegans* foram vedados com parafilme e mantidos em temperatura controlada (25 ºC) em uma estufa incubadora tipo BOD (Tecnal – Modelo TE 371). Para o crescimento dessa população replicada do *C. elegans* foi necessário aguardar em torno de 20 dias, em temperatura controlada a 25 ºC, para poder começar a realizar os testes *in vitro*. A estimativa do crescimento do *C. elegans* em 20 dias vai depender da temperatura que o mesmo foi armazenado.

4.2.5. Teste de motilidade do *Caenorhabditis elegans* (TMCE)

Após os 20 dias de incubação, *C. elegans* foram separados em nematoides jovens adultos e os nematoides adultos, essa separação foi feita com o auxílio de uma peneira estéril com malha de 38 μm. Os nematoides jovens adultos e adultos ficavam retidos na peneira e os outros nematoides passavam pela peneira. Os nematoides que passavam pela peneira eram incubados novamente em Meio E mais hemoglobina e os nematoides adultos e jovens adultos que ficaram retidos na peneira foram lavados com uma solução de sal balanceada chamada de Meio M9 (1,5 g de K_2HPO_4; 3,0 g de Na_2HPO_4; 2,5 g de NaCl; 0,5 mL de uma solução de 1 mol de $MgSO_4$ e 500 mL de água destilada) (BRENNER, 1974; KATIKI et al., 2011), todo o processo de lavagem do *C. elegans* e os testes feitos com os extratos foram utilizados e

realizados com o Meio M9. Todo Meio M9 utilizado foi autoclavado. A lavagem desses nematoides retidos eram feitas com auxílio de uma pipeta de 5 mL de Meio M9 e colocada em uma placa de petri, os nematoides ficavam na placa de petri até o início dos testes *in vitro*. Após a separação e lavagem dos nematoides adultos e jovens adultos, 6 amostra de 10 μm desses nematoides foram levado ao microscópio para a contagem, e os testes foram feitos utilizando aproximadamente 100 *C. elegans*/repetição.

Os extratos em suas concentrações foram preparados dentro da capela de fluxo laminar após o isolamento dos nematoides jovens adultos e adultos. A maior concentração testada dos extratos juntamente com *C. elegans* foi de 50 mg/mL e a menor de 0,39 mg/mL, totalizando 8 concentrações. O TMCE foi realizado em placas de cultura de poliestireno de 48 poços. Para cada concentração foram realizadas 6 repetições para cada concentração e aproximadamente 100 *C. elegans* em cada. Simultaneamente, foi feito controle positivo contendo Zolvix® mais *C. elegans*, controle negativo somente com M9 e o teste com o Meio M9 mais polivinilpolipirrolidona (PVPP na concentração de 150 mg, três vezes mais a maior concentração de extrato utilizada) mais os extrato (na maior concentração 50 mg) mais *C. elegans*, esses testes foram feitos para constatar ou não à presença de taninos nos extratos, pois o PVPP tem a função de inibir a ação dos taninos existentes nos extratos. As placas foram incubadas a 25 ºC por 24 horas e a leitura das placas de poços com *C. elegans* foram realizadas para determinação da CI_{50} com auxílio de microscópio invertido.

4.2.6. Estatística

O cálculo para a concentração Inibitória (CI) dos testes realizados *in vitro* foram realizadas por regressão utilizando a distribuição normal e logística, com a estimativa de parâmetros destas equações obtidas por máxima perspectiva. O programa utilizado foi o SAS Probit para estimar a CI_{50} com as variáveis independentes (dose) transformadas por logaritmo natural (log dose).

4.3. Resultado

As análises com os valores de fenóis totais (FT: expressos em equivalente grama de ácido tânico/kg de MS), taninos totais (TT: expressos em equivalente grama de ácido tânico/kg de MS) e taninos condensados (TC: expresso em equivalente grama de leucocianidina/kg de MS) das folhas das plantas e de seus extratos conforme Tabela 3.1 do capítulo anterior (página 55 – Tabela 3.1 – Valores de Fenóis Totais (FT), Taninos Totais (TT) e Taninos Condensados (TC) das plantas e dos seus respectivos extratos).

Os extratos de *C. echinata* (TC extrato = 211,63; TC folha = 59,87), *D. alata* (TC extrato = 502,43; TC folha = 199,76) *e M. caesalpiniaefolia* (TC extrato = 277,32; TC folha = 100,85) foram os que obtiveram maiores valores de FT, TT e TC nas folhas e em seus extratos, e, as quais obtiveram a menor Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) no TMCE. Os extratos de *Neonotonia wighti* cv Tinaroo, *Calopogonium velutinum* e *Neonotonia wighti* cv Cianova obtiveram valores de FT, TT e TC baixos (Tabela 3.1) e os mesmos foram os que não tiveram efeito no TMCE (Tabelas 3.2). Encontra-se também, na Tabela 4.1, a porcentagem de *C. elegans* morto quando testado com os extratos mais o PVPP (E+PVPP).

Tabela 4.1 – Valores encontrados em ordem decrescente para a Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) dos extratos das plantas avaliados no Teste de Motilidade do *C. elegans* (TMCE) e a porcentagem do *C. elegans* mortos com os extratos mais PVPP (E+PVPP)

Planta	CI_{50} (mg/mL)	Intervalo	E+PVPP (%)
Caesalpinia echinata	0,49	0,45 a 0,53	92,5
Mimosa caesalpiniaefolia	1,03	0,92 a 1,15	83
Dipteryx alata	1,50	1,38 a 1,63	96
Piptadenia colubrina	1,56	1,39 a 1,73	83,5
Leucaena leucocephala cv Cunningham	1,98	1,82 a 2,15	93
Cratylia mollis	2,02	1,83 a 2,23	88
Cajanus cajan	2,13	1,94 a 2,34	96
Leucaena pulverulenta	2,97	2,75 a 3,20	98,9
Gliricidia sepium	4,14	3,68 a 4,65	77
Centrosema pubenses cv Cardillo	6,19	5,37 a 7,10	86
Stylozobium aterremum	6,70	6,11 a 7,34	95
Stylosanthes guianensis	17,10	13,18 a 35,62	64
Arachis pintoi cv Amarillo	28,68	23,75 a 35,62	74
Canavalia ensiformis	40,56	34,21 a 50,74	55
Calopogonium velutinum	sem efeito	---	---
Neonotonia wighiti cv Cianova	sem efeito	---	---
Neonotonia wighiti cv Tinaroo	sem efeito	---	---
Zolvix®	0,26	0,24 a 0,30	---

O extrato que obteve maior eficiência no TMCE com a menor CI_{50} foi com a planta da *Caesalpinia echinata* com 0,49 mg/mL. O extrato de *Mimosa caesalpiniaefolia* obteve a segunda menor CI_{50} no TMCE (1,03 mg/mL). A terceira menor CI_{50} foi de 1,50 mg/mL com o extrato de *Dipteryx alata* e a quarta menor CI_{50} foi com o extrato de *Piptadenia colubrina* (1,56 mg/mL). Os extratos de *Calopogonium velutinum*, *Neonotonia wighiti* cv Cianova e

Neonotonia wighiti cv Tinaroo não obtiveram efeito para a CI_{50} na maior concentrtação testada (50 mg/mL) ficando inviável aumentar a concentração para adquirir a CI_{50} desses extratos. O controle foi testado com o mais recente vermífugo existente no mercado, chamado Zolvix (monepantel) com a CI_{50} de 0,26 mg/mL. Estudos feitos por Baur et al. (2015) relataram que os nematoides de *H. contortus* que apresentarem o gene MPTL-1 poderão apresentar resistência a substância monepantel e que os nematoides *C. elegans* que apresentarem o gene ACR-23 também poderão apresentar resistência a mesma substância.

4.4. Discussão

Os extratos das plantas de *Cajanus cajan, Dipteryz alata, Mimosa caesalpiniaefolia* e *Leucaena leucocephala* cv Cunningham foram os extratos que obtiveram valores de TC mais elevados, respectivamente, 584,51, 502,43, 277,32 e 265,56, valores esses expressos em equivalente de g de leucocianidina/kg de MS. No entanto, apenas o extrato de *M. caesalpiniaefolia*, dentre esses, que obteve um resultado satisfatório no TMCE ficando com a segunda menor CI_{50} (1,03 mg/mL). Possivelmente, os resultados encontrados no TMCE *in vitro* realizados nesse trabalho com o extrato de *M. caesalpiniaefolia* não pode ser atribuído aos taninos, e sim, outras substâncias que estejam presentes no extrato. Pois quando realizado o teste utilizando E+PVPP mais *C. elegans* a porcentagem de *C. elegans* morto foi semelhante ao teste realizado somente com o extrato mais *C. elegans*, em torno de 83% do *C. elegans* morreu em ambos.

Katitki et al. (2013) avaliaram extratos de plantas ricas em taninos condensados (TC) em testes *in vitro* com *C. elegans*. Os autores expuseram que o extrato de *Lespedeza cuneata* continha 45,5 % de TC , no entanto o valor encontrado para a CI_{50} foi de 31,04 mg/mL. Esses valores mostram que mesmo a *L. cuneata* possuir elevado teor de TC a CI_{50} encontrada para o mesmo extrato também foi elevada, demonstrando assim, que não houve uma relação entre o TC e a CI_{50}. O presente trabalho também não encontrou relação entre os extratos testados que apresentaram maiores teores de TC com os extratos que apresentaram menores valores na CI_{50}.

Os menores resultados encontrados no TMCE com os quatros primeiros extratos avaliados podem, provavelmente, estar relacionados com a afinidade encontrada entre a membrana externa dos nematoides e as substâncias presentes em cada extrato. *C. elegans*, assim como outros nematoides, o *H. contortus* e o *T. colubriformis* possuem em sua membrana externa alguns tipos de proteínas hidrofóbicas, como é o caso da perforina (porinas), dentre outras (HART et al., 2015). Palmer relatou em 1998 que 40 % das proteínas

encontradas no *C. elegans* podem ser achadas em outros organismos. Algumas dessas proteínas existentes no *C. elegans*, possivelmente, sofreu algum tipo de interação com os compostos fitoquimícos presentes nos extratos e acarretou na mortalidade dos nematoides.

C. elegans possui em sua estrutura uma substância denominada de glicano, a qual está ligada com a lectina, tais substâncias são encontradas também na espécie *H. contortus*. Essa lectina quando se une com o glicano na glicoproteína ou no glicolipídeos acarreta a inibição do desenvolvimento da larva ocasionando até mesmo sua morte (HEIM et al., 2015). Todo esse processo, possivelmente, pode estar relacionado com os resultados encontrados nesse trabalho, pois pode ter ocorrido alguma interação entre algumas substâncias presentes no extrato e ter provocado a união entre a lectina e o glicano presentes na estrutura dos nematoides.

Outro fator que pode ter contribuído com os resultados encontrados no presente trabalho e que reforça a escassa participação do tanino nos testes foi que todos os extratos testados também foram testados juntamente com o PVPP mais *C. elegans*. É notório que o PVPP inibe a ação dos taninos. Testes realizados com a presença do E+PVPP obtiveram resultados semelhantes quando comparado os testes dos extratos somente com *C. elegans*, em ambos a porcentagem de nematoides mortos foram altas, esses resultados pressupõem que os efeitos alcançados das baixas dosagens para a CI_{50} nos testes devem ter sido proveniente de outras substâncias presentes nos extratos, tais como, os terpenos, as saponinas, os alcalóides, os flavonóides, entre outros.

Os valores encontrados de TC no extrato de *C. echinata* foi mais baixo (211,63 – valor expresso em equivalente de g de leucocianidina/kg de MS) quando comparado com o valor encontrado para o extrato de *M. caesalpiniaefolia* (502,43 – valor expresso em equivalente de g de leucocianidina/kg de MS), contudo, a CI_{50} foi menor (0,49 mg/mL) para o extrato de *C. echinata* quando comparada com o extrato de *M. caesalpiniaefolia* (1,03 mg/mL). Outra observação vista nesses dois extratos testados foi que durante a preparação dos extratos, no início do processo da extração, os extratos quando eram agitados, para obter homogeneidade, formava muita espuma, essa espuma provavelmente pode indicar a presença de saponinas (FERNANDES et al., 2015).

Os resultados encontrados reforçam, possivelmente, a existência de outras substâncias presente no extrato de *C. echinata* e que esteja auxiliando como efeito anti-helmíntico na mortalidade do *C. elegans*. Rezende et al. (2004) mencionaram que *C. echinata*, além dos taninos, a planta também contém outros compostos secundários, como os, terpenos (mirceno, linalol e neo-allo-ocimeno), grupos derivados de C6 (n-hexanol, [E]-2-hexenal,

[Z]-3-hexenol e 1-hexanol) e os compostos nitrogenados como o indol e o antranilato de metila. Foi relatado por Luna et al. (2005) a presença de outros compostos secundários no extrato de folhas de *C. echinata*, tais como, fenóis, flavononas, flavonas, flavonóides, esteróides, triterpenos, antraquinonas, antronas, proantocianidinas condensadas e açúcares redutores. Estudos feitos por Tsao e Yu em 2000 relataram que as substâncias existentes em plantas como os terpenos (monoterpenos) possuem uma ação mais eficaz como nematicida do que os próprios nematicidas que são comercializados, como o oxamil.

Os autores Xu e Lee (2004) mencionaram que a planta *C. echinata* possui ação antibacteriana, principalmente contra cepas multirresistentes. Luna et al. (2005), buscando alternativas para o controle de doenças de países tropicais, observaram que o extrato de *C. echinata* possuiu resposta positiva no controle de inibição de eclosão de ovos de alguns insetos. Shen et al. (2007) relataram que a substância que mais se encontra na planta *C. echinata* é a brasilina. Todos os autores descreveram a existência de muitos estudos com a *C. echinata* principalmente na medicina humana.

A segunda menor concentração encontrada no TMCE ficou com o extrato da planta *M. caesalpiniaefolia.* Provavelmente esse resultado demonstra à existência de substâncias que estejam presentes na planta, das quais assessoraram no resultado encontrado no teste com *C. elegans.* Kokane et al. (2009) relataram que a planta *M. caesalpiniaefolia* possui fitoquímicos como as flavonas *C*-glicosiladas, flavonas *O*-glicosiladas, mimosina, *β*-sitosterol, ácido linoléico mimopudine, 7,3,4'-trihydroxy 3,8-dimetoxi flavona, ácido *p*-cumarico e lupeol. Nunes et al. em 2008 descreveram a presença de compostos secundários como os alcalóides, taninos, flavonóides, terpenóides e carotenóides nas folhas e na casca de *M. caesalpiniaefolia*. O uso medicinal de *M. caesalpiniaefolia* como anti-helmíntico, anti-inflamatório, adstringente, colestérico, anti-hemorrágico, diurético e analgésico já foi relatado em alguns trabalhos feitos por Sukanya et al. (2009) e Kokane et al. (2009). Em estudos feito por Silva et al. em 2012 disseram que o extrato de folhas da planta *M. caesalpiniaefolia* continha a presença de flavanóides (quercetina e catequina) e de ácido gálico. Todos esses trabalhos relatados demonstram os compostos que estão presentes na planta, os quais, provavelmente, podem ter contribuído com os resultados encontrados no TMCE com o extrato de *M. caesalpiniaefolia.*

Outro extrato que foi analisado nesse trabalho foi o extrato da planta *Dipteryx alata.* O extrato de *D. alata* ranqueou o segundo maior teor de TC encontrado nos extratos estudados (502,43 – eq de g de leucocianidina/kg de MS), no entanto no TMCE esteve em terceiro colocado no teste *in vitro*, com a CI_{50} de 1,50 mg/mL. Esses resultados pressupõem

novamente que além de compostos como os taninos a planta têm outros compostos secundários, os quais interagiram e auxiliaram no resultado encontrado. Alguns autores relataram que a planta *D. alata* contém compostos secundários como os flavonóides, alcalóides, taninos, saponinas, antraquinonas e substâncias terpênicas (THAKUR et al., 2011; WILLIAMS, 2012; NITIEMA et al., 2012; KUMAR; PANDEY, 2013). Trabalho conduzido por Piza et al. (2015) com extrato da folha de *Dipteryx alata*, em testes *in vitro*, obtiveram uma inibição com ovos de nematoides de pequeno ruminante de 56,9% utilizando uma concentração de 25 mg/mL do extrato.

O extrato da *Piptadenia colubrina* estabeleceu na quarta colocação para a CI_{50} no TMCE (1,56 mg/mL), sendo que, na quantificação de TC foi um dos extratos que menos continha TC (22,43 – valor expresso em equivalente de g de leucocianidina/kg de MS). Esses resultados mostram a possibilidade da existência de outros compostos na planta, as quais contribuíram com o resultado exposto. Pachter et al. em 1959 relataram que o extrato do caule de *P. colubrina* apresentou um composto alcalóide chamado de Bufotenina, substância essa classificada como alucinógena. Nakaoka e Vanillo (1990) pesquisaram extratos das cascas de 31 espécies de plantas, os autores relataram que o extrato da casca de *P. colubrina* continha taninos, antraderivados, que são substancias de coloração alaranjada e que possui uma relação direta com antraquinona, esteroides e triterpenóides.

Gutierreaz-Lugo et al. (2004) descreveram que o esteróide e o triterpenóides encontrado no extrato de *P. colubrina* é, respectivamente, o β-sitosterol e o lupenona e lupeol, substâncias essas que são comprovadas serem antibacteriana, além disso, os autores Beltrame et al. (2002) descreveram que essas substâncias também são antifúngicas. Golçalves (2005) relatou que a ação antimicrobiana da *P. colubrina* se deu devido a presença de flavonóides e taninos presentes nas folhas e nas cascas da planta. Além desses compostos já relatados, os autores Santos et al. (2003) e Braga et al. (2007) citaram que a planta em questão também apresenta catequina, saponina, triterpenos e xantonas.

Todas essas substâncias que foram aqui relatadas, provavelmente, devem estar presentes nos extratos avaliados e podem ter auxiliado no TMCE e na CI_{50} que foram descritas aqui. Destacando-se ainda que os compostos secundários presentes nos extratos das plantas que foram avaliados no TMCE, *in vitro*, no presente trabalho podem ter apresentado resultados isoladamente ou em sinergismo entre eles, as quais corroboraram com os resultados apresentados.

4.5. Conclusão

O extrato que obteve a menor CI_{50} no TMCE foi com o extrato de folha da planta *C. echinata*, seguido pelo extrato de folhas de *M. caesalpiniaefolia*, o extrato de folhas *Dipteryx alata* e, por fim, o extrato de folhas de *Piptadenia colubrina*. Resultados esses que podem apresentar potencial para a realização de teste *in vivo*.

Referências

ADEMOLA, I. O.; ELOFF, J. N. *In vitro* anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. Ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 169, n. 1-2, p. 198-203, 2010.

BARRAU, E.; FABRE, N.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Efect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, London, v. 131, p. 531-538, 2005.

BAUR, R.; BEECH, R.; SIGEL, E.; RUFENER, L. Monepantel irreversibly binds to and opens *Haemonchus contortus* MPTL-1 and *Caenorhabditis elegans* ACR-20 receptors. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 87, p. 96-102, 2015.

BELTRAME, F. L.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; DIAS FILHO, B. P.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides.* **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2002.

BORGES, F. A.; ALMEIDA, G. D.; HECKLER, R. P.; LEMES, R. T.; ONIZUKA, M. K. V.; BORGES, D. G. L. Impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 45, p. 723-727, 2013.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, Bethesda, v. 77, p. 71-94, 1974.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, n. 20, p. 7481-7487, 2006.

BRUNET, S.; JACKSON. F.; HOSTE, H. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. **International Journal for Parasitology,** Oxford, v. 38, p. 783-790, 2008.

CHITWOOD, D. J.; FELDLAUFER, M. F. E. Ecdysteroids in axenically propagated *Caenorhabditis elegans* and culture medium. **Journal of Nematology**, College Park, v. 22, p. 598-607, 1990.

EGUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN, E. *Haemonchus contortus*: in vitro and in vivo anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 116, p. 340-345, 2007.

FERNANDES, L. C. B.; ALBUQUERQUE, C. C.; SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, F.; MESQUITA, F.; GURGEL, E. P.; MESQUITA, M. V.; SILVA, M. D. S. Fungitoxicidade dos extratos vegetais e óleo essencial de *Lippia gracilis Schauer* sobre o fungo *Monosporascus cannonballus Pollack* e *Uecker*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 41, n. 2, p. 153-155, 2015.

GEARY, T. G.; THOMPSON, D. P. *Caenorhabditis elegans*: how good a model for veterinary parasites? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 101, p. 371-386, 2001.

GUTIERREAZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B. N. Lipoxygenase inhibition by anadanthoflavona, a new flavonoid from the aerials parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, n. 3, p. 263-265, 2004.

GONÇALVES, A. L.; FILHO, A. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

HART, E. H.; BROPHY, P. M.; PRESCOTT, M.; BARTLEY, D. J.; WOLF, B. T.; HAMILTON, J. V. A new enabling proteomics methodology to investigate membrane associated proteins from parasitic nematodes: case study using ivermectin resistant and ivermectin susceptible isolates of *Caenorhabditis elegans* and *Haemonchus contortus*, **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 207, n. 3-4, p. 266-275, 2015.

HEIM, C.; HERTZBERG, H.; BUTSCHI, A.; BLEULER-MARTINEZ, S.; AEBI, M.; DEPLAZES, P.; KUNZLER, M.; STEFANIC, S. Inhibition of *Haemonchus contortus* larval development by fungal lectins. **Parasites & Vectors**, London, v. 8, p. 425, 2015.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solution for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 144-154, 2011.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology,** Oxford, v. 32, p. 253-261, 2006.

HOSTE, H.; MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; MANOLARAKI, F.; BRUNET, S.; OJEDA-ROBERTOS, N.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A. Direct and indirect effects of bioactive tannin rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 186, p. 18-27, 2012.

IQBAL, Z.; MUFTI, K. A.; KHAN, M. N. Anthelmintic effects of condensed tannins. **International Journal of Agriculture and Biology,** Faisalabad, v. 4, p. 438-440, 2002.

KAMINSKY, R.; DUCRAY, P.; JUNG, M.; CLOVER, R.; RUFENER, L.; BOUVIER, J.; GAUVRY, N. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. **Nature**, London, v. 452, n. 7184, p. 176-180, 2008.

KATIKI, L. M.; CHAGAS, A. C.; BIZZO, H. R.; FERREIRA, J. F.; AMARANTE, A. F. Anthelmintic activity of Cymbopogon martinii, Cymbopogon schoenanthus and Mentha piperita essential oils evaluated in four different in vitro tests. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, p. 103–108, 2011.

KATIKI, L. M.; FERREIRA, J. F. S.; GONZALEZ JAVIER, M.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S.; CHAGAS, A. C. S.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 192, p. 218–227, 2013.

KOKANE, D. D.; MORE, R. Y.; KALE, M. B.; NEHETE, M. N.; MEHENDALE, P. C.; GADGOLI, C. H. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica.* **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 124, p. 311-315, 2009.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2013, p. 1-16, 2013.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT´ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 97, p. 199-206, 2005.

MARIE-MAGDELEINE, C.; HOSTE, H.; MAHIEU, M.; VARO, H.; ARCHIMEDE, H. *In vitro* effects of *Curcubita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 161, n. 1-2, p. 99-105, 2009.

MARIE-MAGDELEINE, C.; UDINO, L.; PHILIBERT, L.; BOCAGE, B.; ARCHIMEDE, H. *In vitro* effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 173, n. 1-2, p. 85-92, 2010.

MARIE-MAGDELEINE, C.; MAHIEU, M. L.; PHILIBERT, P.; DESPOIS, H.; ARCHIMÈDE, H. Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition, parasite infection and growth of lambs. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 93, p.10-18, 2010.

MARTÍNEZ-VALLADARES, M.; MARTÍNEZ-PÉREZ, J. M.; ROBLES-PÉREZ, D.; CORDERO-PÉREZ, C.; FAMULARO, M. R.; FERNANDEZ-PATO, N.; CASTAÑÓN-ORDÓÑZ, L.; ROJO-VAZQUEZ, F. A. The present status of anthelmintic resistence in gastrointestinal nematode infection of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 191, p. 177-181, 2013.

MCGAW, L. J.; VAN der MERWE, D.; ELOFF, J. N. In vitro anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. **Veterinary Journal**, London, v. 173, p. 366-372, 2007.

MOLAN, A. L.; MEAGHER, L. P.; SPENCER, P. A.; SIVAKUMARAN, S. Effect offlavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology,** Oxford, v. 33, p. 1691-1698, 2003.

MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** London, v. 86, p. 2010-2037, 2006.

NAKAOKA, S. M.; VALLILO, M. I. Estudos fitoquímicos preliminares em espécie florestais do Parque Estadual do Morro do Diabo, estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal,** São Paulo, v. 2, n. 2, p. 215-226, 1990.

NITIEMA, L. W.; SAVADOGO, A.; SIMPORE, J.; DIANOU, D.; TRAORE, A. S. *In vitro* antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. **International Journal of Microbiological Research**, Mumbai, v. 3, n. 3, p. 183-187, 2012.

NUNES, P. X.; MESQUITA, F. R.; SILVA, D. P.; COSTA, V. C. P.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, p. 120-129, 2008.

PACHTER, I. L.; ZACHARIAS, D. E.; RIBEIRO, O. Indole alkaloids of *Acer saccharinum* (the silver maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia colubrine*, and *Mimosa hostilis.* **Journal of Organic Chemistry**, Columbus, v. 24, p. 1285-1287, 1959.

PIZA, M. L. S. T.; FÉBOLI, A.; GARCIA, J. A.; LAURENTIZ, R. S.; LAURENTIZ, A. C.; ANJOS, L. A.; MARINHO, J. R. D. Avaliação da atividade anti-helmíntica de plantas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 25., 2015, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 2015.

REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F. S.; COSTA, A. V. M.; CASTRO, B. C. S.; ALVES, R. J. V. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). **Quimíca Nova**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 414-416, 2004.

SIMPKIN, K. G.; COLES, G. C. C. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Chichester, v. 31, p. 66-69, 1981.

PALMER. S. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, Washington, DC, v. 282, p. 2012-2018, 1998.

SHEN, J.; ZHANG, H.; LIN, H.; SU, H.; XING, D.; DU, L. Brazilein protects the brain against focal cerebral ischemia reperfusion injury correlating to inflammatory response suppression. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 558, n. 1-3, p. 88-95, 2007.

SILVA. M. J. D.; ENDO, L. H.; DIAS, A. L. T.; SILVA, G. A.; SANTOS, M. H.; SILVA, M. A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. (Mimosaceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences,** Araraquara, v. 33, p. 267-274, 2012.

SMITH, R. A.; PONTIGGIA, L.; WATERMAN, C.; LICHTENWALNER, M.; WASSERMAN, J. Comparison of motility, recovery, and methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay for use in screening plant products for anthelmintic activity. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 105, p. 1339-1343, 2009.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia y enfermedades parasitarias em los animales domésticos**. Buenos Aires: Nueva Editorial Interamericana, 1992. p. 124-137.

STEAR, M. J.; DOLIGALSKA, M.; DONSKOW-SCHMELTER, K. Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. **Parasitology**. London, v. 134, p. 139-151, 2007.

SUKANYA, S. L.; SUDISHA, J.; HARIPRASAD, P.; NIRANJANA, S. R.; PRAKASH, H. S.; FATHIMA, S. K. Antimicrobial activity of leaf extracts of Indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, p. 6677-6682, 2009.

THAKUR, M.; MELZIG, M. F.; FUCHS, H.; WENG, A. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. **Botanics: Targets and Therapy**, Auckland, v. 1, p. 19-29, 2011.

THOMPSON, D. P.; KLEIN, R. D.; GEARY, T. G. Prospects for rational approaches to anthelmintic discovery. **Parasitology**, London, v. 113, S217–S238. 1996.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; MENDONZA-DE-GIVES, P.; AGUILAR-CABELLERO, A. J.; CUÉLLAR-ORDAZ, J. A.; Anthelmintic resistence in sheep farms: update of the situation in the American continent. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 189, p. 89-96, 2012.

TSAO, R, e YU, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. **Journal of Essential Oil Research**, Milton Park, v. 12, p. 350-354, 2000.

WATERMAN, C.; SMITH, R. A.; PONTIGGIA, L.; DERMARDEROSIAN, A. Anthelmintic screening of Sub-Saharan African plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 127, p. 755-759, 2010.

WILLIAMS, P. Review of modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 6, p. 1261_1261, 2012.

XU, H. X.; LEE, S. F. The antibacterial principle of *Caesalpinia sappan*. **Phytotherapy Research**, London, v. 18, p. 647-651, 2004.

5. Utilização de *Arachis pintoi* cv Amarillo e *Caesalpinia echinata* em testes *in vivo* no controle de *Haemonchus contortus*

Resumo: A resistência dos nematoides gastrintestinais aos principais fármacos existentes no mercado é um fato, devido a isso objetivou-se neste trabalho avaliar as plantas *Arachis pintoi* cv Amarillo e *Caesalpinia echinata* no controle do *Haemochus contortus* em ovinos. Foram utilizados 30 ovinos, com PV médio de 32 kg +/- 0,59 kg, mestiços Dorper com Santa Inês, machos, não castrados, divididos em três tratamentos: *A. pintoi* (A), *C. echinata* (B) e controle (C) infectados sem tratamento, cada tratamento continha 10 animais, infectados com 5.750 L3 de *H. contortus*. Durante 41 dias os animais dos tratamentos A e B receberam diariamente 10 g da planta moída juntamente com o concentrado. Foram colhidos sangue, para análise bioquímico e fezes para análises de OPG. Ao final do experimento os animais foram abatidos para a contagem e determinação do comprimento dos *H. contortus* adultos. Nos ovinos do grupo A verificou-se menor número de ovos (1015) nas fezes (OPG) em relação aos dos grupos B (1244) e C (1537) ($P<0,05$). Nas análises de sangue (hemograma e bioquímico), números de vermes adultos e fecundidade das fêmeas não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Os comprimentos dos nematoides machos foram 1,24 cm (A); 1,31 cm (B) e 1,35 cm (C) e para as fêmeas 1,83 cm (A); 1,91 cm (B) e 1,97 cm (C), sendo que o tamanho foi menor nos nematoides do tratamento A em relação aos demais tratamentos. Conclui-se que o tratamento A utilizando a planta *Arachis pintoi* cv Amarillo apresentou as menores contagem de OPG quando comparado com o tratamento C controle, ocasionando assim uma menor contaminação da pastagem.

Palavras-chave: compostos secundários, cordeiros, leguminosas, nematoide gastrintestinal, sangue

5.1. Introdução

A ovinocultura brasileira tornou-se mais uma alternativa de renda em muitas propriedades, no entanto os problemas nutricionais, de manejo e sanitários restringem a produção e consequentemente gera perdas econômicas e redução na rentabilidade na produção do rebanho ovino (LIMA et al., 2010; SPRENGER et al., 2013). O sucesso produtivo no rebanho de pequenos ruminantes depende de vários fatores, dentre eles, o controle sanitário efetivo e estratégico.

Dentro do rebanho ovino a maior perda é causada pelo prejuízo com os nematoides gastrintestinais (VIEIRA et al., 2014), principalmente o nematoide da espécie *Haemonchus contortus*, que é a espécie que causa maior prejuízo ao rebanho, por ser um nematoide hematófago, causa anemia, perda de peso dos animais, redução da produção de carne, leite e lã (FORTES et al., 2013). Todavia, os ovinos podem ser parasitados por vários tipos de nematoides, que agravam a situação sanitária do plantel (TAYLOR et al., 2007).

O controle desses nematoides se advém do emprego de fármacos anti-helmínticos existentes no mercado, sendo que a eficácia desses fármacos é alcançada quando são associadas as suas características farmacológicas, a fisiologia do hospedeiro e aos nematoides (NARI; EDDI, 2003), porem esses fármacos quando administrados de maneira errônea e com o passar do tempo com seu uso, através de processo natural, os nematoides adquirem linhagens resistentes (SANTOS et al., 2012). A resistência por parte dos nematoides é um grande problema na cadeia produtiva da ovinocultura, estudos demonstram que o alelo SS (homozigoto susceptível) vem sendo substituído com muita rapidez pelos alelos RR (homozigoto resistente), o qual acarreta a resistência dos nematoides diante aos fármacos comerciais (MOTTIER; PRICHARD, 2008). Outro ponto negativo com o uso desses fármacos é a questão da poluição para com o ambiente, o resíduo deixado na carne e no leite e o aumento do custo na produção dos pequenos ruminantes (MOLENTO, 2005; KUNSA; ABEBE, 2009).

Com os prováveis resíduos nos produtos oriundos da ovinocultura e o prejuízo que os fármacos podem causar no meio ambiente, percebeu-se a necessidade de reduzir o uso desses anti-hemintícos existentes no mercado (SILVA, 2007). Diante dos aspectos negativos que os fármacos estão causando, estudos e estratégias vêm sendo desenvolvidos como alternativa sustentável para o controle dos nematoides gastrintestinais (OLIVEIRA et al., 2011). Uma das estratégias sustentáveis que vêm sendo bastante pesquisada é o uso de plantas medicinais, as quais possuem compostos fitoquímicos, e que vem mostrando resultados promissores na atividade anti-helmíntica (BARRABÍ-PUERTA; ARECE-GARCIA, 2013),

além de possuir baixo custo ao produtor (SOUSA et al., 2013). Um ponto positivo no controle dos nematoides gastrintestinais com o uso de plantas com compostos bioativos é a redução do uso de fármacos pelos produtores, fazendo com que a vida útil desses fármacos sejam prolongadas, outro ponto positivo é a ausência de resíduo no meio ambiente, e o principal, a ausência de resíduos nos produtos oriundos da ovinocultura, como carne e leite (MOLENTO, 2005; SILVA, 2007; KUNSA e ABEBE, 2009).

Vários são os estudos frente a diferentes espécies vegetais as quais vêm mostrando propriedades anti-helmínticas em ruminantes (MANOLARAKI et al., 2010; ALONSO-DÍAZ et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; KATIKI et al., 2011; HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011; VON SON-DE FERNEX et al., 2012; KATIKI et al., 2011; HOSTE et al., 2012, KATIKI et al., 2013). A planta *Arachis pintoi* é uma leguminosa da América tropical, muito bem adaptada em solos que possui baixa fertilidade e acidez (VALLS; SIMPSON, 1994) também conhecida como amendoim forrageiro perene, é uma planta muito bem aceita pelos animais em pastoreio e possui alto valor nutritivo, com PB que varia de 14 a 20%. Estudos relatam que os principais fitoquímicos encontrados no *A. pintoi* são os derivados de estilbenos, principalmente o resvenatol, responsável pela atividade antifúngica e antimicrobiana, os derivados de flavonóides, ácidos fenólicos (encontrado principalmente nas folhas), fitoesteróides, triterpenos, alcalóides e cumarina (STEVENSON et al., 1993; BILBIS et al., 2002; ANYASOR et al., 2009; BARKLEY et al., 2010). Estudos feitos por Rojas et al. (2006) com *A. pintoi* reafirmaram o alto valor nutricional, a aceitabilidade pelos animais e que o *A. pintoi* apresentou efeito anti-helmíntico promissor nos testes realizados *in vivo* contra *H. contortus.* Fernex et al. (2012) avaliaram extratos de folhas de *A. pintoi*, *Gliricidia sepium* e *Cratylia argentea,* em testes *in vitro,* no desembainhamento da larva de *H. contortus* e relataram que na maior avaliada (1,2 mg) todos os extratos inibiram completamente o desembainhamento da larva de *H. contortus*.

A planta *C. echinata* é uma arvore da Mata Atlântica abundante na época do descobrimento do Brasil em regiões litorâneas. *C. echinata* possui um corante natural, presente no caule, denominado de brasilina, que em contato com o ar, auto-oxida, e se transforma em brasileína, corante que era muito utilizado para corar tecidos, penas e tinta para escrever (AGUIAR; PINHO, 2007). Rezende et al. (2004) avaliaram os fitoquimícos presentes nas folhas e flores da *C. echinata*, descobriram que as flores são ricas em E-beta-ocimeno (terpenos) (57%) e as folhas ricas em (E)-3-hexano-l-ol (composto orgânico) (30,8%), sendo os compostos fenólicos mais abundantes na *C. echinata*, além de monoterpenos, ácidos carboxílicos, ácidos fenólicos e ésteres. Pesquisa feita por Luna et al.

em 2005, relataram que o extrato das folhas de *C. echinata* apresentavam compostos fitoquímicos como os fenóis, flavonóides, xantonas, heterósidos, flavononas, flavonas, antraquinonas e antronas. No levantamento bibliográfico realizado não foi observado estudo sobre o uso da *C. echinata* no controle de nematoides gastrintestinais de ruminantes. Objetiva-se com este estudo avaliar em teste *in vivo* o efeito anti-helmíntico de duas espécies leguminosas, o *Arachis pintoi* cv Amarillo e a *Caesalpinia echinata*, no controle do nematoide *Haemonchus contortus*.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Local do experimento, colheita e processamento das plantas

O experimento *in vivo* foi realizado no Instituto de Zootecnia (IZ) localizado no município de Nova Odessa/SP, com a aprovação pelo Comitê de Ética do Uso dos Animais (CEUA) número 2013-1. As plantas *Arachis pintoi* cv Amarillo e *Caesalpinia echinata* foram coletadas no Campo Agrostológico da própria instituição, as mesmas estão catalogadas e possuem registros no Herbário da instituição. Foram colhidas aproximadamente 10 kg de folhas novas e levadas a estufa de circulação fechada de ar a 35 ºC, até peso constante. Em seguida as folhas foram moídas em moinho tipo Willey com peneira de 2 mm e armazenadas até o início do teste *in vivo*.

A escolha das plantas *Arachis pintoi* cv Amarillo e *Caesalpinia echinata* para o teste *in vivo* foi devido a um ranqueamento feito com todos os extratos testados nos testes *in vitro*. Sendo *C. echinata* a primeira planta, seguida por *Dipteryz alata*, *Stylosanthes guianensis* e *Arachis pintoi*. Porém como *C. echinata* e a Dipteryx alata são arbustivas, optamos por testar uma leguminosa arbustiva (*C. Echinata*) e outra rasteira, o *A. pintoi*, a qual pode servir de alimento para os animais como pastoreio. O *S. guianensis* não foi colhido, pois como se tratava de campo agrostológico e devido a seca que acometeu toda a região no ano de 2014, a planta tinha sido eliminado do campo agrostológico e não teria tempo de plantar e esperar para a colheita, então optamos em testar a planta que ficou no ranque de número quatro, o *A. pintoi*.

5.2.2. Animais, manejo e alimentação

Foram utilizados 30 animais mestiços, raça Dorper com Santa Inês, machos, não castrados, com idade de 5 meses e peso médio de 32 kg +/- 0,59 kg. Antes do início do experimento os animais foram pesados, vermifugados (Zolvix e Ripercol), identificados e alojados em baias individuais com cama de bagaço de cana e com disponibilidade de feno e água a vontade. O cálculo para o fornecimento do alimento foi baseado em 3% do peso vivo segundo NRC de 2007, com 30% de concentrado (85,5% de milho moído, 11% de farelo de soja, 1,5% de sal mineral, 1% de sal branco, 1% de calcário calcítico) e de feno de gramínea (*Cynodon* spp) à vontade. Análise bromatológica da dieta e os valores de Fenóis Totais (FT), Taninos Totais (TT) e Taninos Condensados (TC) das plantas *A. pintoi* e *C. echinata* se encontram na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Análise bromatológica dos componentes da dieta e os valores de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados das plantas utilizadas no experimento

Bromatológica	Feno	Concentrado	Dieta Total	*A. pintoi*	*C. echinata*
Matéria seca	873,81	946,46	932,76	910,57	912,38
Proteína bruta*	117,26	154,25	116,57	216,44	116,90
Fibra em detergente neutro*	734,55	491,98	544,35	682,47	557,93
Fibra em detergente ácido*	385,51	74,72	254,01	438,03	450,38
Matéria mineral*	54,07	30,79	45,13	68,02	56,65
Matéria orgânica*	945,93	969,21	954,87	931,98	943,35
Fenóis Totais**	---	---	---	48,76	136,24
Taninos Totais**	---	---	---	32,84	95,5
Taninos Condensados***	---	---	---	59,47	59,87

MS expressa em g/kg de matéria verde; *Valores expressos em g/kg de matéria seca; **Valores expressos em equivalente de g de ácido tânico/kg de MS; ***Valores expressos em equivalente de g de leucocianidina/kg de MS

O experimento teve duração de 41 dias seguindo o protocolo apresentado na Figura 5.1, após certificação da ausência de ovos nas fezes. Ao final do experimento os animais foram abatidos com retirada do abomaso e seu conteúdo padronizado com amostragem de 10% e preservado com formalina até a contagem, separação por sexo e medição do comprimento dos vermes. Nas fêmeas foi avaliado a fecundidade com a contagem dos ovos em seu anterior segundo Kloosterman et al. (1978).

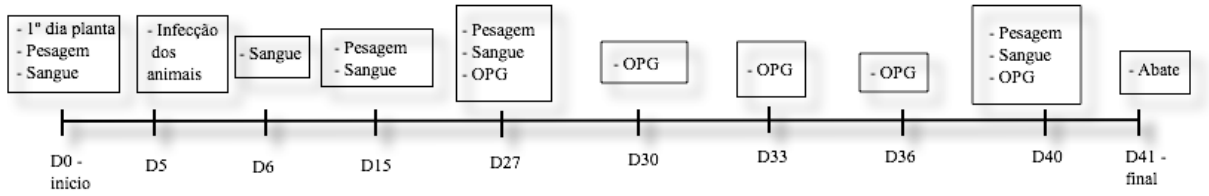

Figura 5.1 – Protocolo experimental utilizado

5.2.3. Teste *in vivo*

Antes do início do experimento os animais foram divididos em três tratamentos. Tratamento A: 10 animais tratados com 10 g diárias de *Arachis pintoi* misturado ao concentrado. Tratamento B: 10 animais tratados com 10 g diárias de *Caesalpinia echinata* misturado ao concentrado. O feno foi fornecido nos cochos somente após a ingestão total do concentrado juntamente com a planta. Tratamento C: animais infectados sem adição de planta, apenas o feno e concentrado. Os animais do tratamento A e B começaram a receber o tratamento com as plantas no dia zero (D0) até o final, após seis dias de tratamento com as plantas todos os animais (tratamento A, B e C) foram infectados artificialmente com *H. contortus* via oral com dose de 5.750 L_3/animal.

Durante todo o experimento foram feitas pesagens dos animais e colheitas de sangue e fezes para análises de OPG. Foram utilizados tubos sem anticoagulante para análise de bioquímico e tubos com anticoagulante (EDTA) para as análises de hemograma e lâminas. A colheita de sangue foi para as análises bioquímicas (Creatinina, Ureia, Aspartato Amino Transferase [AST] e Gama Glutamil Transferase [GGT]) e para análise sanguínea de hemograma completo. O sangue colhido dos animais foi analisado pelo aparelho hematológico veterinário (poch-100iv Diff) para a obtenção das informações das células brancas, células vermelhas, hemoglobina, hematócritos e plaquetas de cada animal individual. Logo após, foram feitas as lâminas individuais identificadas e, em seguida, o sangue de ambos os tubos foram centrifugado e o soro/plasma colocado (1 mL) em tubos de polietileno identificados e armazenados em congelador até posteriores análises de bioquímica com o soro.

A colheita de fezes foram feitas diretamente do reto de cada animal com auxilio de saquinhos plásticos identificados para cada animal individual. A análise de OPG foi feita conforme descrita por Gordon e Whitlock (1939).

5.2.4. Abate dos animais

No D40 após o término da pesagem, colheitas de fezes e sangue os animais entraram em jejum e foram levados ao biotério do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) em Piracicaba/SP onde foram abatidos no D41. Os animais foram insensibilizados com o uso de pistola propulsora provida de dardo cativo, seguido da sangria através da secção da veia jugular. Após o abate de cada animal, as vísceras eram levadas a uma mesa de inox para a recuperação e separação do abomaso individualmente para necropsia parasitológica. O abomaso recuperado era lavado com até dois litros de água corrente dentro de um balde, dessa água foi retirado uma amostragem (solução com vermes adultos) de 10% (200 mL). Em seguida essa solução contendo os vermes foi colocada em um recipiente contento 20 mL de formol mais os 200 mL da solução com os vermes adultos, esse procedimento foi feito para cada animal. Ao final do abate a solução com os vermes adultos foi levada ao laboratório de Biotecnologia do Instituto de Zootecnia e feito todo o procedimento de recuperação dos nematoides adultos. O conteúdo recuperado de cada animal com a solução com os vermes adultos foram lavados com água corrente e auxílio de uma peneira para retirar o excesso de formol e, em seguida, essa solução dos *H. contortus* adultos foram colocados em uma placa de petri e levado para a lupa, a qual assessorou na separação e na contagem dos vermes em machos e fêmeas. Após a separação dos vermes em machos e fêmeas houve a medição de comprimento de 10 machos de *H. contortus* e a medição de 10 fêmeas de *H. contortus*. Em seguida, os machos foram descartados e as fêmeas colocadas em formol para posterior fecundidade dessas fêmeas (KLOOSTERMAN et al., 1978).

A fecundidade das 10 fêmeas de *H. contortus* recuperadas de cada animal abatidos foram feitas em eppendorf. Em cada eppendorf continha uma fêmea e 950 μL de cloro a 2,5%. Essa solução foi homogeneizada, após três minutos a fêmea dentro do eppendorf foi desintegrada restando apenas os ovos que havia dentro dela. Em seguida foi acrescido 50 μL de tiossulfato de sódio a 1% para bloquear a ação do cloro. Restando apenas a solução com os ovos, a partir daí foram feitas 10 contagem contendo 10 μL dessa solução dos ovos de cada fêmea para verificar a quantidade de ovos em cada fêmea. Todo esse procedimento foi feito para as 10 fêmeas medidas de cada animal abatido (KLOOSTERMAN et al., 1978).

5.2.5. Estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso com três tratamentos e dez repetições (animais), para as variáveis repetidas no tempo foi utilizado o PROC MIXED e para aquelas avaliadas apenas uma única vez o PROC GLM do programa estatístico SAS. Os dados de OPG foram transformados em log (x+10) e as médias entre tratamentos foram comparadas usando o teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

5.3. Resultado

Somente na média geral de todo o período experimental é que foi verificada redução do OPG (Tabela 5.2) nos ovinos que receberam o *A. pintoi* em relação ao controle (P<0,05), não havendo diferença significativa entre os demais tratamentos em todos os dias coletados. Já na comparação do OPG através do tempo dentro de cada tratamento, houve aumento do OPG em todos, porém com menor diferença nos animais tratados com *A. pintoi*.

Tabela 5.2 – Número de ovos por grama de fezes (OPG) dos ovinos nos tratamentos e ao longo do período experimental

Tratamento	Ovos por grama de fezes – OPG Médias			Erro Padrão (+/-)
	Controle (C)	*A. pintoi* (A)	*C. echinata* (B)	
D27	15 A	15 A	20 A	464,05
D30	1360 B	645 AB	1095 BC	349,28
D33	1415 B	1050 B	925 B	273,67
D36	1930 BC	1150 B	1755 BC	329,92
D40	2965 C	2215 B	2425 C	8,92
Média	1537 b	1015 a	1244 ab	144,33

Letras minúsculas se diferem na linha; P<0,05

O número e comprimento de nematoides por sexo e a fecundidade das fêmeas estão descritos na Tabela 5.3. Não houve diferença na carga parasitária dos animais e fecundidade das fêmeas entre os tratamentos avaliados (P>0,05). No entanto, observou-se que houve redução no tamanho dos nematoides (machos e fêmeas) no tratamento A em relação aos tratamentos B e C (P<0,05).

Tabela 5.3 – Quantidade e comprimento dos machos e fêmeas de *H. contortus* e fecundidade das fêmeas nos tratamentos utilizados

Sexo	Controle (C)	*A. pintoi* (A)	*C. echinata* (B)	Erro Padrão (+/-)
Quantidade de nematoides *				
Fêmeas	35	35	41	3,92
Machos	33	30	31	3,56
Total	68	65	72	6,91
Comprimento dos nematoides (cm)*				
Fêmeas (cm)	1,97 a	1,83 b	1,91 a	0,021
Machos (cm)	1,35 a	1,24 b	1,31 a	0,016
Fecundidade das fêmeas (ovos/fêmeas)*				
Fêmeas	771	719	722	34,16

Letras iguais não se diferem estatisticamente; $P \leq 0,05$; *valores referente a 10% do total.

As médias dos resultados das análises do sangue (hemograma e bioquímico) encontram-se dentro da faixa normal para ovinos (Tabela 5.4), não havendo diferença entre tratamentos (P>0,05). Somente os teores de GGT apresentaram estar acima dos valores normais.

Tabela 5.4 – Parâmetros sanguíneos (hemograma e bioquímico) dos ovinos de cada tratamento experimental

Tratamento	Controle (C)	*A. pintoi* (A)	*C. echinata* (B)	Erro Padrão (+/-)	Referência
Bioquímico – média					
Creatinina (mg/dL)	1,27	1,35	1,20	0,025	1,20 – 1,90
Ureia (mg/dL)	30,64	30,86	32,68	1,02	17 – 42
GGT (UI/L)	67,58	59,17	64,45	2,80	20 – 52
AST (UI/L)	98,08	103,5	98,24	4,24	60 – 280
Bilirrubina (mg/dL)	0,1	0,1	0,1	0,009	0,1 – 0,5
Hemograma – média					
Hemácias ($x10^6/\mu L$)	12,53	13,09	13,17	0,28	8 – 16
Volume globular (%)	33,40	36,12	35,19	0,82	24 – 50
Hemoglobina (g/dL)	8,78	9,58	10,84	1,45	8 – 15
Leucócitos ($x10^3/\mu L$)	7,23	5,85	6,19	0,25	4 – 12
Neutrófilos (%)	52,54	52,20	53,72	1,53	10 – 50
Linfócitos (%)	44,92	44,02	42,48	1,55	40 – 75
Eosinófilos (%)	1,52	2,12	1,74	0,22	0 – 10
Monócitos (%)	1,54	2,28	1,94	0,18	0 – 6
Plaquetas ($x10^5/\mu L$)	754,52	864,4	934,46	61,81	300 – 800

AST = Aspartato amino transferase; GGT = Gama Glutamil Transferase; Referencia = Meyer & Harvey, 2004 e Kaneko et al., 2008

5.4. Discussão

Os resultados evidenciados nas análises de sangue (hemograma e bioquímico) não apresentaram diferença entre tratamentos (P<0,05) e apenas os valores de Gama Glutamil Transferase (GGT) ficaram acima dos valores preconizado por Meyer e Harvey (2004) e por Kaneko et al. (2008).

O presente trabalho indicou que dentre as plantas avaliadas *A. pintoi* conseguiu redução significativa no OPG (1015) quando comparado com o controle (1537), elevação do OPG do início ao final do experimento (P<0,05), indicando ação negativa sobre o postura do *H. contortus*, o que foi confirmado pelos resultados encontrados nos comprimentos dos nematoides machos (1,24 cm) e fêmeas (1,83 cm) nos ovinos alimentados com a *A. pintoi* (P<0,05). A presença de fitoquímicos nesta planta, como por exemplo, os flavonóides e os polifenóis, podem ter sido responsáveis pelo efeito anti-helmíntico (MOLAN et al., 2003; BARRAU et al., 2005), ou ainda, os estilbenos, resvenatol, ácidos fenólicos, fitoesteróides, triterpenos, alcalóides e cumarina (STEVENSON et al., 1993; BILBIS et al., 2002; ANYASOR et al., 2009; BARKLEY et al., 2010), havendo necessidade de mais estudos a fim de aprofundar o conhecimento sobre qual ou quais substâncias poderiam estar agindo sobre o crescimento desses nematoides, uma vez que a planta não impediu a implantação da verminose, pois o número de vermes entre tratamentos foram semelhantes.

Os compostos fitoquímicos como os taninos condensados, estão presentes na planta de *A. pintoi*, talvez os taninos isoladamente ou na presença de outras substâncias presentes na planta tenham se complexado e se potencializado resultando na atividade anti-helmíntica. Esse procedimento pode ter auxiliado nos resultados encontrados no presente trabalho. É sabido que substância como o tanino apresenta a capacidade de se complexar com outras substâncias demonstrando seu potencial a uma resposta favorável no controle de nematoides de pequenos ruminantes. Esse procedimento, que provavelmente possa ter ocorrido explica o porquê de uma planta apresentar efeito e a outra não (TERRIL et al., 1994).

O *A. pintoi* possui compostos fitoquímicos os quais são derivados de estilbenos, principalmente o resvenatol, que é responsável pela atividade antifúngica e antimicrobiana, os derivados de flavonóides, ácidos fenólicos (encontrado principalmente nas folhas), os fitoesteróides, triterpenos, alcalóides e cumarina (STEVENSON et al., 1993; BILBIS et al., 2002; ANYASOR et al., 2009; BARKLEY et al., 2010). Tais compostos, possivelmente, podem ter contribuído com os resultados encontrados no presente trabalho, relembrado que, essa planta pode possuir um potencial promissor, pois a dosagem fornecida aos animais foi terapêutica, somente 10 g/animal, e mesmo com essa pequena quantia e num curto período, os

animais apresentaram resposta favorável no controle desses NGI. No entanto, esses resultados estão longe de ser o ideal, porem pode contribuir para uma menor deposição de ovos nas pastagens e ao longo do tempo um controle sustentável desses nematoides.

Para os resultados encontrados nos comprimentos dos nematoides machos e fêmeas para cada tratamento foi significativo, sendo que, o comprimento dos nematoides machos (1,24 cm) e o comprimento dos nematoides fêmeas (1,83 cm) para o tratamento A foram menores quando comparados com os nematoides machos e fêmeas do tratamento B (1,31 e 1,91 cm) e tratamento C (1,35 e 1,97 cm), respectivamente, mostrando uma diferença de 14 mm no comprimento entre as fêmeas do tratamento A e as fêmeas do tratamento C. Entre os tratamentos B e C não foram encontrados diferenças significativas. Sendo assim, o tratamento A mostrou uma diferença significativa para o comprimento dos nematoides em ambos os sexos, em suma, quando ocorre dos nematoides fêmeas serem menores significa que em seu interior caberá menos ovos, e consequentemente, menos ovos serão eliminados pelas fezes e, consequentemente, menos ovos eliminados no meio ambiente. Esses valores podem ser confirmados pelo número de OPG encontrado no presente trabalho, onde o OPG do tratamento A (1015) foi menor quando comparado com os demais tratamentos (B = 1244 e C = 1537), os quais obtiveram comprimentos dos nematoides maiores.

O que pode ter contribuído com os resultados do presente trabalho em relação ao comprimento dos nematoides, provavelmente, foram os complexos que se formaram entre os compostos fitoquímicos presentes na planta *A. pintoi* e as proteínas, lipídios e carboidratos que estão presentes na bainha do nematoide. É conhecido que a bainha que envolve a larva infectante do *H. contortus* (L3) apresenta em sua estrutura colágeno, proteínas, lipídios e carboidratos e a larva adulta (L5) é praticamente revestida por colágeno. Quiçá algumas dessas substâncias presentes na bainha dos nematoides, ou no nematoide adulto, possam ter interagido, de alguma maneira, com algum composto secundário presente na planta, ocasionando algum prejuízo em seu crescimento e/ou até mesmo no seu desenvolvimento, deixando os nematoides dos animais tratados com *A. pintoi* menores quando comparados com os nematoides dos animais dos tratamentos B e C. Esse complexo entre os fitoquímicos da planta e as substâncias presentes na bainha também pode ter corroborado com os resultados encontrados no OPG do presente trabalho.

Outro fator que pode ter ocasionado os resultados encontrados no presente trabalho foi que, provavelmente, os fitoquímicos encontrados na planta *A. pintoi* possam não ter sido absorvido no trato gastrintestinal ou ter tido uma menor absorção pelos animais (NIEZEN et al., 2002) e assim corroborado, de alguma forma, a prejudicar as condições dos nematoides no

abomaso, o qual possa ter acarretado alguma mudança em seu crescimento, estrutura e/ou fisiologia e, consequentemente, conduziu as fêmeas dos nematoides *H. contortus* eliminarem menos ovos nas fezes dos animais infectados e, também, ter interferido no crescimento das fêmeas.

O que pode também ter gerado a diminuição da eliminação de ovos nas fezes e afetado o crescimento desses nematoides, possivelmente, foi devido a presença de prolina e hidroxiprolina, pois os nematoides apresentam em sua superfície essas substâncias (ALONSO-DIAS et al., 2011), incumbindo com que essas substâncias se ligassem uma nas outras, devido a presença dos fitoquímicos na planta e, devido a isso, pode ter acarretado algum dano no nematoide que resultou em um menor crescimento das fêmeas e, consequentemente, fez com que as fêmeas eliminassem menos ovos nas fezes.

A quantidade da planta utilizada pelos animais foi de apenas 10 g, com finalidade terapêutica, no entanto os resultados foram promissores, logo pode despertar grande interesse na sua utilização em dieta dos ruminantes como alimento funcional ou nutraceutico, uma vez que o *A. pintoi* é uma leguminosa perene de porte baixo, com plantio através de semente, estolão ou coroa com parte da raiz e é muito bem aceita pelos animais, tornando-a uma fonte alimentar de fácil manejo pelo fazendeiro. Além disto, os teores dos compostos fitoquímicos desta planta não apresentam fatores que impeçam seu fornecimento como fonte de alimento, podendo ser fornecida aos animais como pastoreio ou feno, além de tudo possui alto valor nutritivo, com PB que varia de 14 a 20%, sendo visível a preferência dos animais por essa planta quando existe a opção de escolha (VALLS; SIMPSON, 1994; ROJAS et al., 2006).

Outros estudos também indicam qua a planta *A. pintoi* possui ação anti-helmíntica. Trabalho realizado por Fernex et al. (2012) com extrato de folhas de *A. pintoi* em testes *in vitro* observaram inibição por completo no desembainhamento da larva de *H. contortus* na maior dosagem avaliada (1,2 mg). Rojas et al. (2006) descreveram que a *A.pintoi* apresentou efeito anti-helmíntico promissor nos testes realizados *in vivo* contra *H. contortus.* López et al. (2005) avaliaram a molécula isolada de tanino condensado (TC) extraído da planta *A. pintoi* e descreveram a eficiência dessa molécula contra a larva infectante (L_3) de *H. contortus,* os autores relataram que na dosagem de 0,1 ppm a eficiência foi de 11,5% na mortalidade das L_3 e na dosagem de 45 ppm a mortalidade das larvas foi de 100%, os autores expuseram que a dosagem mais eficiente foi com 0,3 ppm de TC extraído do *A. pintoi* devido a porcentagem da mortalidade da L_3 ter sido de 65,5.

5.5. Conclusão

O tratamento com a planta *Arachis pintoi* cv Amarillo foi aquele que propiciou redução no OPG e no comprimento dos *H. contortus* sugerindo ação anti-helmíntica com potencial de uso no controle sustentável desta verminose em ovinos.

Referências

AGUIAR, F. A. e PINHO, R. A. **Pau-brasil, *Caesalpinia echinata* Lam**. Sao Paulo: Árvore Nacional, 2007.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; HOSTE, H. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus.* **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v. 181 p. 360-364, 2011.

ANYASOR, G. N.; OGUNWENMO, K. O.; OYELANA, O. A.; AJAYI, D.; DANGANA, J. Chemical analyses of groundnut (*Arachis hypogaea*) oil. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 8, p. 269-272, 2009.

BARKLEY, N. A.; CHAMBERLIN, K. D. C.; WANG, M. L.; PITTMAN, R. N. Development of a real-time PCR genotyping assay to identify high oleic acid peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 25, p. 541-548, 2010.

BARRABÍ-PUERTA, M.; ARECE-GARCÍA, J. Actividad antihelmíntica in vitro de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvário. **Revista de Salud Animal**, La Habana, v. 35, p. 103-108, 2013.

BARRAU, E.; FABRE, N.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Efect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, London, v. 131, p. 531-538, 2005.

BILBIS, L. S.; SHEHU, R. A.; ABUBAKAR, A. G. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of aqueous extract of *Arachis hypogaea* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 9, p. 553–555, 2002.

FERNEX, E. V. S.; ALONSO-DÍAZ, M. A.; VALLES-DE LA MORA, B.; CAPETILLO-LEAL, C. M. In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 131, p. 413-418, 2012.

FORTES, F. S.; KLOSTER, F. S.; SCHAFER, A. S.; BIER, D.; BUZATTI, A.; YOSHITANI, U. Y.; MOLENTO, M. B. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 183-187, 2013.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Commonwealth Scientific and lndustrial Research Organization**, Canberra, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F. J. Non chemical control of helminths in ruminants: Adapting solution for changing worms in a changing world. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 180, p. 144-154, 2011.

HOSTE, H.; MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; MANOLARAKI, F.; BRUNET, S.; OJEDA-ROBERTOS, N.; FOURQUAUX, I.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A. Direct and indirect effects of bioactive tannin rich tropical and temperate legumes against nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 186, p. 18-27, 2012.

KANEKO, J. J. Clinical **biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 2009. 932 p.

KATIKI, L. M.; CHAGAS, A. C.; BIZZO, H. R.; FERREIRA, J. F.; AMARANTE, A. F. Anthelmintic activity of Cymbopogon martinii, Cymbopogon schoenanthus and Mentha piperita essential oils evaluated in four different in vitro tests. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 183, p. 103-108, 2011.

KATIKI, L. M.; FERREIRA, J. F.; GONZALEZ, J. M.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S.; CHAGAS, A. C.; AMARANTE, A. F. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, p. 218–227, 2012.

KATIKI, L. M.; FERREIRA, J. F. S.; GONZALEZ JAVIER, M.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S.; CHAGAS, A. C. S.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, p. 218-227, 2013.

KLOOSTERMAN, A.; ALBERS, G.; BRINK, R.; VAN DEN BRINK, R. Genetic variation among calves in resistance to nematode parasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 4, p. 353-68, 1978.

KUNSA, B.; ABEBE, G. Multi antielmintic resistance of goat farm in Hawassa (South Ethiopia). **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 41, p. 655-662, 2009.

LIMA, W. C.; ATHAYDE, A. C. R.; MEDEIROS, G. R.; LIMA, D. A. S. D.; BORBUREMA, J. B.; SANTOS, E. M.; VILELA, V. L. R.; AZEVEDO, S. S. Nematoides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 1003-1009, 2010.

LOPEZ, J.; IBARRA, O. F.; CANTO, G. J.; VASQUEZ, C. G.; TEJADA, Z. I.; SHIMADA, A. *In vitro* effect of con- densed tannins from tropical fodder crops against eggs and larvae of the nematode *Haemonchus contortus*. **International Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsink, v. 3, p. 191-194, 2005.

LUNA, J. D. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 97, p. 199-206, 2005.

MANOLARAKI, F.; SOTIRAKI, S.; STEFANAKIS, A.; SKAMPARDONIS, V.; HOSTE, M.; HPSTE, H. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. **Parasitology**, London, v. 137, n. 4, p. 685-696, 2010.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine:** interpretation & diagnosis. 2. ed. Philadelphia: Sauders, 2004. 351 p.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitaria em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 35, p. 1469-1477, 2005.

MOLAN, A. L.; MEAGHER, L. P.; SPENCER, P. A.; SIVAKUMARAN, S. Effect offlavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, p. 1691-1698, 2003.

MOTTIER, M. L.; PRICHARD, R. K. Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. **Pharmacogenetics Genomics**, Hagerstown, v. 18, n. 2, p.129-140, 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of small ruminants**. Washington, DC: NRC, 2007. 362 p.

NARI, A.; EDDI, C. Resistance to ecto and endo-parasites: a challenge for the XXI century? In: INTERNATIONAL SEMINAR IN ANIMAL PARASITOLOGY, 5., 2003, Merida. **Anais...** Merida: FAO, 2003. v. 1. p. 53-60.

NIEZEN, J. H.; WAGHORN, G. C.; GRAHAM, T.; CARTER, J. L.; LEATHWICK, D. M. The effect of diet fed to lambs on subsequent developmentof *Trichostrongylus colubriformis* larvae in vitro and on pasture.**Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 105, p. 269-283, 2002.

OLIVEIRA, L. M. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; MACEDO, I. T. F.; MORAIS, S. M.; MACHADO, L. K. A.; CAMPELLO, C. C.; MESQUITA, M. A. Effects of Myracrodrum urundeuva extracts on egg hatching and larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 109, n. 3, p. 893-898, 2011.

REZENDE, C. M.; CORREA, V. F. S.; COSTA, A. V. M.; CASTRO, B. C. S. Constituintes químicos voláteis das folhas e flores do Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*). **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 414-416, 2004.

ROJAS, D. K.; LÓPEZ, I.; TEJADA, V.; VÁSQUEZ, A.; SHIMADA, D.; SÁNCHEZ, F.; IBARRA, F. Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Pelibuey lambs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 128, p. 218–228, 2006.

SANTOS, F. C. C.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G. Extrato aquoso de alho (*Allium sativum*) sobre nematoides gastrintestinais de ovinos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pelotas, v. 7, p. 139-144, 2012.

SILVA, L. Fitoterápicos no controle de endoparasitoses de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 1, n. 2, p. 37-43, 2007.

SOUSA, R. G.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; MELO DINIZ, M. F. F.; BATISTA L. M. Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Paulínia, v. 15, p. 287-292, 2013.

SPRENGER, L. K.; AMARAL, C. H.; LEITE FILHO, R. V.; AGUIAR, T. N.; MOLENTO, M. B. Eficácia do fosfato de levamisol em nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 18, n. 1, p. 29-39, 2013.

STEVENSON, P. C.; ANDERSON, J. C.; BLANEY, W. M.; SIMMONDS, M. S. J. Developmental inhibition of Spodoptera litura (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinic acid from the wild groundnut, Arachis paraguariensis (Chod et Hassl.). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, p. 2917-2933, 1993.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary parasitology**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 2007. 874 p.

TERRILL, T. H.; WAGHORN, G. C.; WOOLLEY, D. J.; MCNABB, W. C.; BARRY, T. N. Assay and digestion of C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. Br. **Journal of Nutrition**, Rockville, v. 72, p. 467-477, 1994.

VALLS, J. F.; SIMPSON, C. E. Taxonomy, natural distribution, and attributes of *Arachis pintoi*. In: KERRIDGE, P. C.; HARDY, B. **Biology and agronomy of the forage Arachis**. Cali: CIAT, 1994. p. 1-18.

VIEIRA, V. D.; FEITOSA, T. F.; VILELA, V. L. R.; AZEVEDO, S. S.; ALMEIDA NETO, J. L.; MORAIS, D. F.; RIBEIRO, A. R. C.; ATHAYDE, A. C. R. Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba state, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 46, p. 355-361, 2014.

VON SON-DE FERNEX, E.; ALONSO-DIAZ, M. A.; VALLES-DE La MORA, B.; CAPETILLO-LEAL, C. M. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 131, n. 4, p. 413-418, 2012.