

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**TESTES *IN VITRO* COM EXTRATOS DE PLANTAS
COLETADAS NO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE
SOBRE *HAEMONCHUS PLACEI* (NEMATODA:
TRICHOSTRONGYLIDAE)**

Dyego Gonçalves Lino Borges

CAMPO GRANDE, MS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

TESTES *IN VITRO* COM EXTRATOS DE PLANTAS COLETADAS NO
PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE SOBRE *HAEMONCHUS*
***PLACEI* (NEMATODA: TRICHOSTRONGYLIDAE)**

***IN VITRO* TEST WITH EXTRACT OF PLANTS COLECTED IN**
PANTANAL OF MATO GROSSO DO SUL AGAINST *HAEMONCHUS*
***PLACEI* (NEMATODA:TRICHOSTRONGYLIDAE)**

Dyego Gonçalves Lino Borges

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2014

A Deus, a minha família e aos meus amigos, eu
dedico este trabalho.

Agradecimentos

A Deus, que me permitiu concluir este trabalho, mantendo-me com passos firmes mesmo nos momentos em que o solo parecia movediço debaixo dos pés.

Aos meus pais, Moacir José da Silva Borges e Vera Lúcia Gonçalves Lino Borges, bases sólidas a partir das quais comecei a construir o homem e profissional Dyego Borges. Agradeço pela paciência, compreensão e pelo constante apoio, mesmo que às vezes notados ao longe, sempre estiveram presentes.

Aos meus irmãos, Moacir Diony e Viviany Borges, peças fundamentais desta árdua caminhada. A minha namorada, Maryene Beatriz, que esteve do meu lado durante estes dois anos de labuta dando mais sentido aos meus dias com seu belo e sutil sorriso, que sempre me encanta.

Aos meus avós, Eduardo Borges da Silva e Marina da Silva Borges (*in memoriam*), que sempre me incentivaram a continuar nos estudos e fizeram com que eu mantivesse firmes os meus ideais. Minha avó foi “escola” com seus conhecimentos acerca das plantas medicinais. Assim surgiu a ideia inicial deste projeto de pesquisa com fitoterápicos e helmintos gastrintestinais.

Aos meus padrinhos, Vitor e Lucimara, sempre presentes em todas as etapas de minha vida.

Agradeço especialmente ao Dr. Fernando de Almeida Borges, meu orientador. Obrigado pelos conselhos e pela liberdade sempre concedida nas frentes de pesquisa.

Ao Dr. Carlos Alexandre Carollo, pela orientação quanto ao preparo e utilização dos extratos durante os ensaios de atividade biológica.

Aos meus amigos, Rafael Heckler, Rubiane Heckler, Antônio Jacinto Ramiro, Larissa Bezerra, Matheus Vieira, Marcus Amorim, Mário Conde, Franciely Moura, Isabel Parizzoto, Juliana Souza, Bárbara Papassoni, Cássia Leal, Ricardo Lemos, Antônio Souza e à Rafaela Fantatto, com quem dividi muitas dúvidas acerca dos testes *in vitro*.

Aos amigos e colaboradores diretos que passaram horas contando ovos e larvas de *Haemonchus placei*, terminamos mais uma etapa. São eles: Jessica Teles, Tamires Lima, Mariana Green e Gustavo Albuquerque.

A todos vocês dedico esta conquista, que não é minha, mas nossa!

*De passos é composta uma caminhada, de grãos uma
espiga e de células um corpo. Assim são as conquistas,
ninguém as alcança a sós!*
(Anônimo)

Resumo

BORGES, D. G. L. Testes *in vitro* com plantas coletadas no Pantanal sul-mato-grossense sobre *Haemonchus placei* (NEMATODA: TRICHOSTRONGYLIDAE). 2014. xx f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

No Pantanal de Mato Grosso do Sul, estudos com plantas de interesse médico veterinário são escassos. No presente trabalho, avaliou-se o efeito de extratos de plantas deste bioma sobre ovos de *H. placei*. Amostras de plantas foram coletadas, no período de cheia entre dezembro de 2011 e maio de 2012, secas e processadas em extrator de fluido pressurizado utilizando como solvente etanol/água 7:3, e os extratos rotaevaporados e refrigerados. O trabalho foi dividido em três experimentos: I) teste de triagem dos extratos nas concentrações de 50, 10 e 1 mg/mL, II) determinação das concentrações efetivas (CE) para inviabilização de 50 e 90% dos ovos (extratos ativos e tiabendazole) e III) avaliação do efeito da precipitação dos extratos de *Tabebuia serratifolia*, *Senna occidentalis* e *Tocoynea formosa* sobre a taxa de eclodibilidade larval. *Melanthera latifolia*, *Casearia aculeata* e *Ocotea diospyrifolia* não se mostraram efetivas. Foi observado para tiabendazole CE50 de 0.002 µg/mL e CE90 de 0.006 µg/mL, para *Angelonia hirta* (2,206; 6,875), *Aspilia latissima* (1,281; 2,477), *Centratherum punctatum* (12,42; 42,07), *Diodia kuntzei* (2,603; 4,746), *Echinodorus paniculatus* (6,433; 21,45), *Hyptis mutabilis* (2,429; 5,506), *H. brevipes* (3,339; 5,713), *Ipomoea chilantha* (0,5361; 1,178), *Lantana canescens* (0,7521; 1,699), *Sebastiana hispida* (1,879; 2,719), *Tabebuia serratifolia* (0,828; 1,943), *Tocoynea formosa* (10,08; 14,52) e *Vitex cymosa* (13,13; 174,6) em mg/mL, respectivamente. A precipitação dos extratos influenciou significativamente a taxa de eclodibilidade larval nos ensaios com *T. serratifolia* ($p < 0,0001$), *S. occidentalis* ($p < 0,0001$) e *T. formosa* ($p < 0,0001$). Estes resultados permitem inferir que foram encontradas plantas com potencial anti-helmíntico.

Palavras-chave: Parasitos; ruminantes; fitoterapia.

Abstract

BORGES , D. G. L. In vitro test with extract of plants collected in Pantanal of Mato Grosso do Sul on *Haemonchus placei* (Nematoda : Trichostrongylidae) . In 2014. xx f . Dissertation (Master) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul , Campo Grande , MS , 2014.

In the Pantanal of Mato Grosso do Sul, studies with plants veterinary medical interest are scarce. Was evaluated the effect of plant extracts this biome against eggs of *H. placei*. Plant samples were collected in the rainy season between December 2011 and May 2012, dried and processed in a pressurized fluid extractor using as ethanol/water 7:3 solvent, and rotaevaporados and refrigerated extracts. The work was divided into three experiments: I) screening test extracts at concentrations of 50, 10 and 1 mg/mL, II) determining the effective concentrations (EC) to inviability of 50 and 90 % of eggs (active extracts and thiabendazole) and III) evaluation of the effect of precipitation of extracts of *T. serratifolia*, *Senna occidentalis* and *Tocoynea formosa* against larval hatchability. *Melanthera latifolia*, *Casearia aculeata* and *Ocotea diospyrifolia* have proven ineffective. Was observed for thiabendazole EC50 of 0.002 mg/mL and CE90 of 0.006 mg/mL, for *Angelonia hirta* (2.206, 6.875), *Aspilia latissima* (1.281, 2.477), *Centratherum punctatum* (12.42, 42.07), *Diodia kuntzei* (2.603, 4.746), *Echinodorus paniculatus* (6.433, 21.45), *Hyptis mutabilis* (2.429, 5.506), *H. brevipes* (3.339, 5.713) , *Ipomoea chiliantha* (0.5361, 1.178), *Lantana canescens* (0.7521, 1.699), *Sebastiania hispida* (1.879, 2.719), *T. serratifolia* (0.828, 1.943), *Tocoynea formosa* (10.08, 14.52) and *Vitex cymosa* (13.13, 174.6) mg/mL, respectively. The precipitation of the extracts significantly influenced the rate of larval hatchability in trials with *T. serratifolia* ($p < 0.0001$), *S. occidentalis* ($p < 0.0001$) and *T. formosa* ($p < 0.0001$). These results suggest that plants with anthelmintic potential were found.

Keywords : Parasites ; ruminant; phytotherapy.

Lista de ilustrações

Figura 1.	Comportamento dose-resposta das diferentes espécies de plantas avaliadas em ensaios de 10 concentrações frente ao Tiabendazole	49
Figura 2.	Eficácia comparada de extratos de <i>T. serratifolia</i> (A), <i>S. occidentalis</i> (B) e <i>T. formosa</i> (C) em ensaios de avaliação da influência do precipitado formado durante o período de contato entre ovos e extratos	50

Lista de tabelas

Tabela 1.	Famílias, espécies, local de coleta das amostras, parte da planta coletada e nomenclatura popular dos espécimes utilizados nos ensaios de avaliação da atividade ovicida sobre <i>H. placei</i>	46
Tabela 2.	Espécies de plantas e concentrações avaliadas durante os ensaios de triagem e seus respectivos percentuais de eclodibilidade e o valor de p (água/concentração de extrato)	47
Tabela 3.	Espécies, concentração efetiva média para inviabilização de 50% (CE50) e 90% (CE90) dos ovos de <i>H. placei</i> e intervalos de confiança, fator de inclinação da curva (HillSlope) e fator de determinação (R^2), gerados a partir da avaliação seriada de 10 concentrações	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
FITOTERAPIA.....	14
METODOLOGIAS DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS.....	15
METODOLOGIAS IN VITRO PARA AVALIAÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DE FITOTERÁPICOS	16
COMPOSTOS DE ORIGEM VEGETAL IMPLICADOS À AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA	18
ENSAIOS DE EFICÁCIA ANTI-HELMÍNTICA COM FITOTERÁPICOS: TESTES IN VITRO	21
RELATOS DE EFICÁCIA ANTI-HELMÍNTICA COM FITOTERÁPICOS: TESTES IN VIVO	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS	25
AÇÃO OVICIDA DE EXTRATOS DE PLANTAS COLETADAS NO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE SOBRE HAEMONCHUS PLACEI	33

1. INTRODUÇÃO

As infecções por helmintos gastrointestinais em ruminantes provocam redução no desempenho desses animais, a qual pode ser observada entre outros, no déficit de desenvolvimento na fase de cria, recria e terminação (BORGES et al., 2013; CATTO et al., 2005; FAO., 2003; FAZZIO et al., 2012; WALKER et al., 2013) e redução da imunocompetência (GUNN; IRVINE, 2003), determinando perdas econômicas.

A verminose gastrointestinal, dentre as parasitoses, pode ser identificada como um dos principais fatores que impactam na produção de bovinos, porém, frequentemente, manifesta-se de forma subclínica, o que dificulta a visualização dos prejuízos por parte dos pecuaristas.

Os nematodas gastrintestinais merecem destaque, dentre os helmintos parasitos de bovinos. O efeito negativo das nematodioses, por sua vez, é dependente da espécie do parasito e do nível de parasitismo e recebe ainda a influência de diversos fatores que interagem entre si, dentre eles a condição climática, idade e raça do hospedeiro, manejo e estado fisiológico e nutricional (BIANCHIN et al. 2007).

Quanto à variável espécie parasitária, Bianchin et al. (1987) após longo período de estudos inferiram que os helmintos de maior importância na região Centro-Oeste do Brasil, para a pecuária bovina, são *Cooperia* spp. *Haemonchus* spp. *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomum radiatum*, sendo os dois primeiros gêneros os mais prevalentes nessa mesma ordem.

Haemonchus placei é uma das espécies mais patogênicas para bovinos em virtude da ação de hematofagismo, e além disso determina no hospedeiro quadros de dispepsia e hipoproteinemia, podendo ser responsabilizado por elevado prejuízo econômico (GENNARI et al., 1991).

No intuito de se mensurar o impacto da verminose em animais de produção, diversos estudos foram desenvolvidos. Bianchin et al. (1995) ao final de seis anos de estudos concluíram que animais da raça Nelore nas condições do Centro-Oeste brasileiro, no período pós-desmama, desde que desverminados três vezes ao ano (maio, julho e setembro) podem ter valores adicionais em peso que variam de 22 a 41 kg, em relação a animais não tratados sob condição natural de infecção e sem suplementação, exceto a mineral.

Animais em confinamento quando parasitados por *Cooperia punctata* ingerem 0,68 kg a menos de matéria seca que animais não parasitados e o ganho de peso diário pode ser 7,5% menor (STROMBERG et al., 2012). Diferenças no ganho de peso diário da ordem de 200 g podem ser encontradas entre animais parasitados e não parasitados, a depender do período de análise e da raça avaliada (DIMANDER et al., 2000).

Em bovinos, assim como nas demais espécies, o controle de parasitos é realizado principalmente com base no tratamento químico com a utilização de anti-helmínticos. O desconhecimento de fatores epidemiológicos, os baixos custos do tratamento (FAO., 2003) e a utilização massiva de antiparasitários levaram a ocorrência do fenômeno da resistência a anti-helmínticos, problemática que não pode ser ignorada como uma questão importante no controle parasitário (KAPLAN et al., 2012).

Diante da resistência e do impacto da verminose sobre a produção pecuária, medidas auxiliares de controle parasitário como a utilização de vacinas, pastejo rotacionado e alternado (FERNANDES et al., 2004), nutrição (TORRES-ACOSTA et al., 2012), seleção de hospedeiros resistentes (AMARANTE, 2004), utilização de fungos nematófagos (ARAÚJO et al., 2006; WAGHORN et al., 2002) e fitoterapia têm sido cada vez mais estudadas (Cezar et al., 2008) sendo esta última apontada por Nery et al. (2009) como medida promissora quanto ao controle de parasitos gastrintestinais.

Medidas de controle auxiliar podem reduzir a influência das nematodioses em bovinos e, considerando a pesquisa com plantas há também a possibilidade de detecção de novas moléculas anti-helmínticas em detrimento da simples utilização de extratos de plantas de forma direta aos animais ou como aditivos alimentares. Neste sentido, em decorrência da diversidade da flora Sul-matogrossense e das características edafoclimáticas locais o estado de Mato Grosso do Sul, por abranger em seu território o Pantanal e parte do Cerrado brasileiro, situa-se em posição de destaque como fonte de moléculas de origem vegetal, embora poucos estudos tenham sido realizados (Pereira et al., 2007).

Esta revisão tem por objetivo demonstrar a necessidade de pesquisas com plantas na Medicina Veterinária em decorrência da atual dificuldade no controle das nematodioses gastrointestinais, utilizando como referência estudos de atividade biológica encontrados na literatura nacional e internacional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Fitoterapia

A utilização de plantas para o tratamento de enfermidades, fitoterapia, é prática corrente entre tribos em todo o mundo (AMOROZO, 1988; KUMAR et al., 2012). O conhecimento gerado a partir da relação temporal homem:planta, denominada como etnobotânica, se incorporou ao cotidiano dessas populações e constitui-se como patrimônio cultural das mesmas, o qual se mantém ativo a partir da transmissão verbal do conhecimento entre as diferentes gerações (RODRIGUES; GUEDES, 2006, OLIVEIRA et al., 2010).

Com o aumento da integração regional entre as comunidades brasileiras as comunidades tradicionais, caboclas e ribeirinhas, passaram a receber influência das comunidades modernas dando início a um processo de incorporação cultural (AMOROZO, 1988). Como em qualquer processo de fusão cultural, perdas e acréscimos de conhecimento podem ocorrer. Em primeiro instante quando se trata do conhecimento acerca do número de espécies utilizadas na medicina tradicional, a ampliação do mesmo pode ser verificada por aporte externo, no entanto, com o passar dos anos e o aumento das influências externas que culminam até mesmo em mudanças socioeconômicas locais este conhecimento pode passar por processo de restrição, refletindo-se em diminuição da variedade de espécimes utilizados medicinalmente, os quais podem se limitar a plantas cultivadas e invasoras de distribuição cosmopolita, trazidas pelos colonizadores (AMOROZO, 2002).

Recentemente, a demanda por plantas medicinais tem aumentado de maneira considerável devido à busca de novos princípios farmacológicos pela indústria química, fazendo dessas, valiosos recursos genéticos vegetais (KUMAR et al., 2012). Nesse sentido, a utilização de plantas com potencialidades terapêuticas para o tratamento de enfermidades, fitoterapia, tem despertado grande interesse nos campos da medicina humana e animal (RODRIGUES; CARLINI, 2003), mostrando-se, nesta última, bastante promissora em avaliações de atividade antiparasitária.

Estudos com a utilização de plantas com potencialidades medicinais foram considerados urgentes por Amorozo (1988), isso em decorrência da grande velocidade de perda dos conhecimentos populares. Quando estes são associados à pesquisa

científica o caminho a ser percorrido entre a escolha de uma espécie a ser estudada e a comprovação do seu efeito biológico pode ser diminuído, uma vez que o ponto de partida é uma espécie sobre a qual recaem suspeitas de atividade medicinal. Como desvantagem, a utilização dos conhecimentos populares na pesquisa científica pode limitar a chance de descoberta de novas moléculas químicas, ao passo que condição contrária ocorre com a escolha aleatória de plantas, a partir da utilização do método randômico de seleção de espécies vegetais (Maciel et al., 2002).

Dessa forma pesquisas mais representativas sobre plantas de uma dada região podem ser realizadas, o que segundo Hoste et al., (2008) é a primeira forma de identificar plantas com potencialidade anti-helmíntica, o mesmo sendo válido para qualquer outra potencialidade.

Segundo Costa et al. (2002), a validação científica dos fitoterápicos é uma etapa inicial e obrigatória para a utilização correta de plantas medicinais ou de seus compostos ativos. Esta etapa é caracterizada pela realização de testes *in vitro* com extratos de plantas, o que permite reconhecer a existência de propriedades anti-helmínticas nos mesmos. Concomitantemente deve-se realizar a caracterização química dos extratos e a identificação dos compostos ativos.

Metodologias de obtenção de extratos vegetais

A obtenção do material vegetal para a realização dos ensaios necessários ao estudo de atividade biológica inicia-se a partir da coleta de amostras de plantas no campo e o posterior processamento em laboratório. Uma vez que as amostras estejam no laboratório, excluindo-se os estudos com óleos essenciais, as amostras são secas e armazenadas em sacolas plásticas e caixas de papelão, que permanecem ao abrigo da luz. A secagem propicia a interrupção da atividade celular e as constantes reações químicas de oxidação e hidroxilação que podem produzir alterações estruturais descaracterizando os metabólitos secundários (MACIEL et al., 2002).

As próximas etapas se iniciam com a trituração da planta coletada, constituindo-se a droga vegetal, sendo esta submetida às metodologias de extração dos metabólitos, que são numerosas e escolhidas de acordo com as classes de metabólitos desejadas. Os extratos resultantes, alvos de avaliação, são aquelas preparações líquidas, pastosas ou em pó, obtidas após a retirada das substâncias químicas antes retidas na

matéria vegetal, por meio dessas metodologias (CECHINEL et al., 1998; MARQUES, 2005).

Quando se desconhece a constituição fitoquímica de uma dada espécie vegetal opta-se por metodologias de extração mais simples como a percolação que se caracteriza pelo contato estático ou dinâmico de um solvente, neste caso misturas de água e álcool, com a planta. Método de extração a quente, Soxhlet, também pode ser utilizado (MACIEL et al., 2002).

Metodologias mais avançadas de extração buscam reduzir a influência dos solventes orgânicos, muitas vezes utilizados visando a extração de substâncias menos solúveis em preparações simples de água:álcool, como metanol, hexano, acetato de etila, clorofórmio entre outros, a partir da extração com fluido pressurizado em altas temperaturas em curto período de tempo (ONG, 2004). Neste caso as ligações químicas produzidas por interações eletrostáticas entre os metabólitos e seus sítios de armazenamento são rompidas pelas altas temperaturas e os compostos arrastados pelo solvente (água:álcool) sobre pressão.

Após a elaboração dos extratos há a evaporação dos solventes utilizados e o sólido remanescente constitui a amostra alvo dos ensaios de atividade biológica, sendo o mesmo dissolvido em soluções apropriadas que garantam a homogeneidade do mesmo, antes das atividades de avaliação.

Atividades de caracterização da constituição química podem ser associadas aos estudos biológicos visando o conhecimento e isolamento das substâncias ativas, sendo elas ligadas aos diferentes métodos de cromatografia e técnicas espectrais com ultravioleta, infravermelho e ressonância magnética nuclear (CECHINEL et al., 1998).

2.4. Metodologias *in vitro* para avaliação anti-helmíntica de fitoterápicos

A validação de fitoterápicos como anti-helmínticos inicia-se com a submissão de extratos provindos das plantas hipoteticamente ativas a diversos testes (HOSTE et al., 2011), sendo estes, coincidentes com os utilizados para detecção de resistência a antiparasitários: teste de eclodibilidade larval (MONTEIRO et al., 2011; NCHU et al., 2011; VASCONCELOS, 2006), teste de inibição da migração larval (ALONSO-DIAZ et al., 2011; LORIMER et al., 1996), teste de inibição do desenvolvimento larval (KAMARAJ et al., 2010; VASCONCELOS, 2006) e menos frequentemente testes de

inibição do desembainhamento (MONTEIRO et al., 2011) e de motilidade de larvas ou adultos (WATERMAN et al., 2010), sendo este, por pela alta subjetividade, pouco utilizado.

A técnica de eclodibilidade larval (COLES et al., 1992) inicialmente descrita para avaliação da ocorrência de resistência a benzimidazóis pode ser ajustada (CHAGAS et al., 2010) para a utilização em testes com plantas supostamente medicinais. Esses ajustes se dão a partir de pequenas alterações como a redução do número de ovos colocados em teste e o aumento do volume da solução tratamento, o que facilita a contagem de ovos além de garantir maior contato entre ovos e extrato. Isso, em se tratando de compostos de comportamento desconhecido, deve diminuir as chances de erros de interpretação e variações nos resultados.

Esse teste tem a finalidade de avaliar a capacidade dos extratos em impedir a eclosão de larvas dos ovos submetidos ao contato com o mesmo. Nesse caso o que se obtêm em avaliações que detectam compostos bioativos é a interrupção do processo de desenvolvimento blastular do embrião do nematoda (NERY et al., 2009) ou mesmo de vias enzimáticas ou de enzimas associadas a eclosão.

O teste de inibição da migração larval (TIML) (D'ASSONVILE et al., 1996), visa avaliar a resistência a anti-helmínticos que possuem como sítio de atuação a musculatura somática, seja pela atuação em vias estimuladoras ou inibitórias. Baseia-se na avaliação da capacidade migratória de larvas de terceiro estágio, após período de incubação com a solução tratamento, em Agar gel. Essa técnica sofreu algumas modificações (MOLENTO; PRICHARD, 2001), porém, ainda mantém baixa repetibilidade, o que ocorre em virtude da não quantificação de larvas não migrantes. Além disso, as metodologias descritas restringem-se à utilização com isolados puros. Demeler (2005) propôs uma técnica mais sensível do TIML, podendo o aumento da sensibilidade ser atribuído a constância das observações sobre larvas migrantes e não migrantes. Ainda, deve-se ressaltar que esta última metodologia pode se aplicar também a isolados mistos, uma vez que, não se realiza a prática de desembainhamento das larvas de terceiro estágio o que permite a detecção de resistência por gênero.

A avaliação da capacidade inibitória sobre o desenvolvimento larval (COLES et al., 2006; TAYLOR, 1990) desenvolvida primariamente para estudos referentes a resistência a benzimidazóis e ao levamisol, por sua vez, também tem aplicação a pesquisa de extratos com atividade biológica (CHAGAS et al., 2010), sendo talvez o

teste mais abrangente. Isso ocorre uma vez que, em organismo complexo como os nematodas em que o equilíbrio dinâmico entre seus diversos sistemas orgânicos é imprescindível ao seu desenvolvimento, compostos que tenham a capacidade de comprometer prejudicialmente qualquer ponto que desestabilize a homeostase desses sistemas, podem ser identificados, em detrimento a outros testes que se detêm a análises mais restritas.

Mesmo sendo um teste de elevada acurácia, sua implantação no estudo da resistência aos antiparasitários ou mesmo em ensaios de bioprospecção pode sofrer limitações, sendo estas relacionadas as espécies de helmintos de interesse. Testes de desenvolvimento larval podem ser encontrados para helmintos de ovinos e caprinos (TAYLOR, 1990), de suínos (VÁRADY et al., 1996) e de eqüinos (CRAVEN et al., 1999), no entanto, para nematodas de bovinos há poucos estudos como o de Mshanga (2007) e os mesmos se restringem ao gênero *Cooperia*.

Os demais testes não serão descritos. Deve-se salientar que a melhor forma de se avaliar um composto fitoterápico é a partir da realização de testes que incidam sobre os diferentes estágios de desenvolvimento do parasita, numa tentativa de elucidar, e caracterizar, as formas de atuação de extratos sobre as fases parasitárias expostas aos mesmos.

Deve-se ressaltar que diferenças de sensibilidade entre metodologias de avaliação de propriedade anti-helmíntica de extratos de plantas podem ocorrer, porém, a diferença não ocorre em virtude de limitações técnicas das metodologias, mas devido ao maior potencial inibitório de uma determinada substância sobre uma fase de desenvolvimento parasitário (ALONSO DIAZ et al., 2011).

Compostos de origem vegetal implicados à ação anti-helmíntica

Os compostos apontados como nematodocidas pertencem a uma ampla classe de substâncias químicas chamada de metabólitos secundários, que tem sua origem a partir de relações alelopáticas entre as plantas e o ambiente que as cerca. Estas substâncias, como o próprio nome indica, não são associadas ao metabolismo primário da planta e, portanto, não são indispensáveis ao seu desenvolvimento. São sintetizados por vias alternativas do metabolismo celular envolvendo o ácido chiquímico e aminoácidos (SANTOS, 2010) e são armazenados em compartimentos, vacúolos

celulares ou tricomas (apêndices de origem epidérmica) na dependência da natureza química dos mesmos, muitas vezes em órgãos e células distantes dos pontos de síntese (WINK, 2008).

As plantas possuem diversas substâncias sendo produzidas ao mesmo tempo e em diferentes pontos do seu organismo, as quais são direcionadas aos distintos estímulos aos quais foram expostas (ACAMOVIC; BROOKER, 2005), podendo em alguns casos, haver a produção de mais de uma substância em resposta ao mesmo agente. Segundo Luz (2009) metabólitos secundários podem ser produzidos nas diversas partes da planta (folhas, caules, raízes, flores e sementes) sendo a concentração dos mesmos afetada pela espécie, estágio de desenvolvimento, condições climáticas e geográficas.

Os metabólitos secundários são muitas vezes produtos associados a mecanismos defensivos, sendo denominados fitoprotetores, no entanto, podem ainda atuar como substâncias atraentes para polinizadores, em flores, e para dispersores de sementes, em frutos, defesa contra outras plantas competindo por nutrientes, proteção contra raios ultravioletas e facilitação da fixação de nitrogênio (ACAMOVIC; BROOKER, 2005). Em animais essas substâncias são capazes de interagir com diferentes moléculas e sítios celulares como enzimas, receptores de hormônios e neurotransmissores, de forma que dificilmente há um sítio celular sobre o qual não há metabólitos que possam atuar (ACAMOVIC & BROOKER, 2005).

Destacam-se entre os metabólitos as saponinas, alcalóides, aminoácidos não protéicos, taninos e outros polifenóis, lignina e glicosídeos, sendo que os compostos que mais têm sido associados à atividade anti-helmíntica são os taninos (GITHIORI et al., 2006; HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011).

No caso dos compostos polifenóis, com destaque para os taninos, já é bem conhecida a capacidade dessas substâncias em se ligarem a algumas proteínas. Taninos são classificados de acordo com suas estruturas químicas em taninos condensados e hidrolizáveis, sendo os primeiros, comumente encontrados em forrageiras tropicais, subdivididos ainda em diversas outras classes com destaque para as prodelphinidinas e procianidinas, essas relacionadas com ações anti-helmínticas (HOSTE; TORRES-ACOSTA, 2011).

Ainda de acordo com Hoste & Torres-Acosta (2011), em ruminantes a ligação a proteínas, sobretudo as ricas em prolina (BAXTER et al., 1997), se realiza em

ambiente ruminal e propicia a diminuição da degradação protéica por bactérias da microbiota local. Já no compartimento abomasal, em virtude do baixo pH, o complexo macromolecular tanino/proteína se desfaz e as proteínas seguem sendo degradadas e absorvidas no trato intestinal. Desta forma, com melhor aporte protéico, há aumento da capacidade de resposta imunológica frente a agentes nocivos, dentre eles os nematodas, o que representa uma atuação indireta desses metabólitos sobre infecções helmínticas.

O efeito direto dos taninos também advém da afinidade em se ligar a proteínas, e ocorre sobre a cutícula do parasito (região bucal e vulva de fêmeas, entre outras) provocando alterações em sua arquitetura, quadros degenerativos na musculatura e em células intestinais (BRUNET et al., 2011).

Em consequência a estas lesões, pode haver redução da motilidade do indivíduo, em virtude de alterações metabólicas advindas de quebras estruturais da cutícula. A nutrição do parasito pode ser afetada em decorrência das alterações na extremidade anterior, também ocorrendo prejuízos na liberação de ovos em fêmeas que tenham seu apêndice reprodutivo desestruturado (HOSTE et al., 2012).

Além dos taninos, Rios-de-Álvarez et al. (2012) sugeriram que lectinas, proteínas não imunológicas, possuam ação direta sobre a fecundidade de *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis*, e efeito indireto por ativação da resposta imune local do hospedeiro, com aumento de eosinófilos, células produtoras de muco e tendência ao aumento de células T *helper* na mucosa do trato gastrointestinal de indivíduos infectados.

Atuação direta de concavalina-A, uma lectina, foi demonstrada em *Strongyloides ratti* a partir de sua ligação a terminais açúcares presentes em receptores anfídeos do mesmo parasito afetando sua capacidade quimiocinética (TOBATA-KUDA et al., 2005).

Duas espécies de helmintos já podem ser diferenciadas entre si nas suas diferentes fases de desenvolvimento a partir da utilização de lectinas (HILLRICHS et al., 2012) como ocorre em *Teladorsagia circumcincta* e *Haemonchus contortus*, isso devido a capacidade que as lectinas possuem em se ligar a açúcares localizados na superfície do parasito. Nesse sentido pode-se observar que a constituição química da cutícula em relação aos carboidratos de superfície pode variar entre espécies e que as lectinas podem evidenciar algum grau de seletividade de ligação, devendo esse fato ser levado em consideração no estudo dessas substâncias e suas implicações no controle

parasitário. Além disso, algumas lectinas podem possuir propriedades inibidoras sobre ribossomos (WINK, 2008) impedindo a síntese protéica.

Saponinas possuem característica anfipática atuando como soluções detergentes e quando ingeridas são absorvidas prontamente ou como micelas pelas células intestinais (ACAMOVIC; BROOKER, 2005). Em contato com membranas biológicas algumas saponinas podem provocar a desestabilização das mesmas com consequente influência sobre o intercâmbio iônico (WINK, 2008), culminando com o aumento da concentração de íons cálcio no ambiente intracitoplasmático ativando, em consequência, proteínas pró-apoptóticas cálcio-dependentes, como observado para dammaranes, uma classe de saponina (MAN et al., 2010). No ambiente intestinal de mamíferos expostos ao contato com saponinas processos de absorção de moléculas são prejudicados e transporte de açúcares inibidos (Johnson et al., 1986) sendo os helmintos, provavelmente, comprometidos da mesma forma (ACAMOVIC; BROOKER, 2005) pelo contato via sangue no caso de helmintos hematófagos ou contato direto a partir da ingesta rica em saponinas.

Saponinas presentes em *Medicago sativa* demonstraram efeito inibidor sobre nematodas parasitas de plantas (D'ADDABBO et al., 2011).

Representantes de outras classes de metabólitos secundários também tiveram suas atividades anti-helmínticas demonstradas. Vasconcelos, (2006) observou a atividade anti-helmíntica em *Croton zehntneri* e *Lippia sidoides* de seus principais constituintes, anetol e timol (terpenos), a partir de testes de inibição da eclodibilidade e de desenvolvimento larval em *Haemonchus contortus*. Lorimer et al. (1996) também identificaram a ação de compostos polifenóis inibindo a migração de larvas de terceiro estágio de nematodas.

Ensaio de eficácia anti-helmíntica com fitoterápicos: testes *in vitro*

Os primeiros ensaios visando validação de um fitoterápico se baseiam em avaliações *in vitro* dos extratos das plantas, nas quais se consideram apenas a droga candidata e o parasito livres de condições externas, ambiente e hospedeiro (COSTA et al., 2002). Nesse sentido diversas espécies de plantas foram avaliadas quanto a ação anti-helmíntica.

Extrato bruto de *Flemingia vestita* apresentou atividade trematodicida e cestodicida (TANDON et al., 1997). Os parasitas submetidos ao tratamento com o extrato apresentam alterações na arquitetura do tegumento que culminam com a morte dos mesmos.

Fração acetona de *Peltophorum africanum* (folhas, cascas e raízes) foi avaliada sobre ovos e larvas de *Trichostrongylus colubriformis* e apresentou inibição completa da eclosão de ovos e do desenvolvimento de larvas com concentrações entre 5 e 25 mg/mL (BIZIMENYERA et al., 2006).

Allocasuarina torulosa, *Neolitrea dealbata*, *Acacia holosericea*, *Acacia salicina*, *Callitris endlicheri* e *Casuarina cunninghamiana*, fração metanólica, mostraram-se ativas inibindo a migração de larvas de *Haemonchus placei* e *Cooperia* sp. (MORENO et al., 2010).

Waterman et al. (2010), ao investigarem a atividade anti-helmíntica de 17 espécies de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas para o tratamento contra parasitas gastrintestinais na África Sub-sahariana, a partir do teste de motilidade larval em *Caenorhabditis elegans*, observaram que 12 das espécies possuíam atividade anti-helmíntica, e destas, oito foram consideradas ativas (acima de 52% de eficácia em pelo menos uma das frações de extrato na concentração de 1 mg/mL).

Marie-Magdeleine et al. (2010) avaliaram o efeito *in vitro* das frações (aquosa, metanólica e diclorometanólica) de frutos, folhas e raízes de *Tabernaemontana citrifolia* frente ao nematoda *H. contortus*, utilizando-se de quatro metodologias diferentes (eclodibilidade larval, desenvolvimento larval, inibição da migração larval e motilidade de adultos). Observou-se efeito significativo, porém diferente, dos extratos de diferentes partes da planta, o qual foi fortemente dependente do estágio de desenvolvimento do parasito e da fração do extrato avaliada. Os maiores efeitos inibidores foram observados para o extrato metanólico sobre o desenvolvimento larval, variando de 88,9-99,8% (dose dependência) para frutos, 72,1-83,8% para raízes e 33,5-85% para folhas.

Extratos aquoso e hidro-alcoólico de *Melia azedarach* foram avaliados sobre ovos e larvas de *H. contortus* a partir do teste de eclodibilidade e desenvolvimento larval. Inibição de 99,4% e 100% da eclodibilidade e 100% de desenvolvimento larval na concentração de 12,5 mg/mL foram observados respectivamente (KAMARAJ et al., 2010).

Markhamia obtusifolia, extrato aquoso e acetônico, foi avaliada sobre *T. colubriformis* a partir do teste de inibição da eclodibilidade larval e percentuais de eficácia dose dependentes que chegaram a 87,3% para extrato acetônico 50 mg/mL e 96,3% para extrato aquoso 100 mg/mL foram observados (NCHU et al., 2011).

Monteiro et al. (2011) ao avaliarem a atividade anti-helmíntica de frações hexano, acetato de etila e etanólica de *Jatropha curcas* a partir de testes de inibição da eclodibilidade e inibição do desembainhamento larval observaram 99,8% de inibição da eclodibilidade larval com a fração etanólica. Na tentativa de se avaliar a influência da presença de taninos na eficácia do extrato etanólico, foi acrescentado polivinil polirrolidona (PVPP), substância capaz de se complexar com taninos formando macromoléculas inertes, e novo teste foi realizado. Após a adição de PVPP a eficácia se reduziu a 91,9% indicando fraca influência de taninos sobre a inibição do desenvolvimento blastular por redução de mitoses. No teste de inibição do desembainhamento utilizando a fração etanólica houve 81,1% de inibição, percentual revertido pela adição de PVPP. Desta forma observa-se que taninos são mais eficazes contra estágios larvares. As frações hexano e acetato de etila proporcionaram percentuais de desembainhamento semelhantes ao do grupo controle (solução salina tamponada com fosfato).

Payne et al. (2013) realizaram *screening in vitro* com extratos brutos de 37 espécies de plantas nativas da Austrália para avaliação da atividade anti-helmíntica sobre larvas de ciatostomíneos e observaram inibição completa do desenvolvimento larval com extratos de *Acacia baileyana*, *Acacia melanoxylon*, *A. podalyrrifolia*, *Alectryon oleifolius*, *Duboisia hopwoodii*, *Eucalyptus gomphocephala* e *Santalum spicatum*.

Ainda, extratos etanólicos de *Pistacia lentiscus* e *Phillyrea latifolia* foram avaliados sobre o desenvolvimento de isolado misto de *Teladorsagia circumcincta*, *T. colubriformis* e *Chabertia ovina* e percentuais de 80 a 97% de inibição foram observados para essas duas plantas, respectivamente (AZAIZEH et al., 2013).

Relatos de eficácia anti-helmíntica com fitoterápicos: testes *in vivo*

Githiori et al. (2002) avaliaram a atividade anti-helmíntica de folhas e frutos de duas plantas utilizadas como anti-helmínticas em comunidades rurais do Quênia,

Myrsine africana e *Rapanea melanophloeos*, a partir do teste de redução da contagem de ovos nas fezes de cordeiros infectados artificialmente com *H. contortus*. Os extratos foram obtidos após a cocção de folhas (125 g/ 500 mL de água/animal) e frutos (50 g/250 mL de água/animal) de *M. africana* e *R. melanophloeos* e o extrato resultante foi administrado por via oral aos animais em dose única. O efeito anti-helmíntico não foi observado para nenhuma das plantas avaliadas.

Como mencionado pelos autores, não se pode dizer que folhas e frutos das espécies avaliadas não têm atividade anti-helmíntica. Fatores intrínsecos a planta como fase vegetativa e idade, além de fatores ambientais, podem influenciar na constituição e concentração de compostos químicos de exemplares testados, de forma que quando esses fatores são modificados, alterações climáticas, localização geográfica ou de desenvolvimento vegetativo, as mesmas espécies podem demonstrar atividade anti-helmíntica diferente. Além disso, o caráter especificidade quanto à ação anti-helmíntica possui grande influencia sobre os resultados dos ensaios. Espécies de helmintos podem ser naturalmente resistentes a determinadas substâncias presentes em plantas testadas, o que torna interessante a utilização de isolados mistos em estudos investigativos com plantas medicinais. A característica, especificidade, também pode estar relacionada à fase de desenvolvimento do parasito (GITHIORI et al., 2002).

Além dos fatores relacionados ao ambiente e as plantas também se deve considerar aqueles relacionados aos animais, sobretudo os ruminantes. A flora ruminal pode possuir grande influência sobre substâncias administradas por via oral, de forma que substâncias químicas apontadas como bioativas em ensaios *in vitro*, podem sofrer alterações estruturais perdendo sua atividade no ambiente ruminal (SANTOS et al., 2012), o que poderia estar relacionado com os insucessos em parte dos ensaios *in vivo* com substâncias sabidamente ativas. Com isto, outras vias de administração devem ser avaliadas buscando a eliminação da influência da flora ruminal.

Gradé et al. (2008) demonstraram atividade anti-helmíntica da casca pulverizada de *Albizia anthelmintica* fornecida via oral a ovinos naturalmente infectados e observaram percentuais de redução na contagem de ovos nas fezes que variaram de 66,5 a 78,3%.

Vatta et al. (2011) encontraram efeito anti-helmíntico dose dependente de mistura fresca de diferentes porções da parte aérea, exceto espinhos, de *Cereus jamaruca* sobre *H. contortus* e *T. colubriformis* em cordeiros artificialmente infectados,

com redução entre 18 e 65% na contagem de ovos nas fezes após dosificações semanais de 64,6g/cordeiro por seis semanas.

Deve-se ressaltar, que muitos dos compostos fitoprotetores podem apresentar algum nível de toxicidade, principalmente, quando administrados em grande quantidade a animais de produção, como observado por Gadir et al. (2003) em avaliação *in vivo* da toxicidade de *Jatropha curcas* em caprinos, na qual observaram alterações no aparelho circulatório, respiratório e gastrointestinal.

Ensaio de toxicidade *in vitro* representam etapa preliminar aos testes em modelos *in vivo* (COSTA et al., 2002), de forma que, proporcionam o conhecimento de potencialidades tóxicas que devem ser consideradas no estabelecimento da concentração de compostos fitoterápicos a serem utilizados em modelos animais, dessa forma impedindo a ocorrência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro.

Considerações finais

A pesquisa por plantas com atividade nematodocida representa uma fonte em potencial de substâncias químicas passíveis de utilização em atividades auxiliares de controle das nematodioses gastrointestinais em ruminantes e, além disso, apresenta-se como fonte de possíveis novas moléculas anti-helmínticas.

REFERÊNCIAS

- ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, p. 403-412, 2005.
- 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**, 2011.
- AMARANTE, A. F. T. Resistência genética a helmintos gastrintestinais. **V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, 2004.
- AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Lerverger, MT, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 16, p. 189-203, 2002.
- AMOROZO, M. C. M.; GÉLY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas. Barcarena, PA, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Botânica**, v. 4, nº1, 1988.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, nº1, p. 65-71, 2004.

AZAIZEH, H.; HALAHLEH, F.; ABBAS, V.; MARKOVICS, A.; MUKLADA, H.; UNGAR, E. D.; LANDAU, S. Y. Polyphenols from *Pistacia lentiscus* and *Phillyrea latifolia* impair the exsheathment of gastro-intestinal nematode larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 191, p. 44-50, 2013.

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 precipitation. **Biochemistry**, v. 36, p. 5566-5577, 1997.

BIANCHIN, I.; CATTO, J. B.; KICHEL, A. N.; TORRES, R. A. A.; HONER, M. R. The effect of the control of endo- and ectoparasites on weight gains in cross bred cattle (*Bos Taurus Taurus* x *Bos Taurus indicus*) in the Central Region of Brazil. **Tropical Animal Health Production**, v. 39, p. 287-296, 2007.

BIANCHIN, I.; HONER, M. R. Helminth parasites of beef cattle in the cerrado region of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 19, nº 1, p. 39-45, 1987.

BIANCHIN, I.; HONER, M. R.; NUNES, S. G.; NASCIMENTO, Y. A. Effect os stocking rates and anthelmintic treatments on weight gain in weaned Nelore cattle on improved pasture in the Brazilian cerrado. **Tropical Animal Health and Production**, v. 27, nº 1, p. 1-8, 1995.

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 *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**. 142, 336–343, 2006.

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 Production**, v. 45, p. 723-727, 2013.

BRUNET, S.; FOURQUAUX, I.; HOSTE, H. Ultrastructural changes in the third stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sanfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. **Parasitology International**, v. 60, p. 419-424, 2011.

CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.; TORRES JUNIOR, R. A. A. Efeitos da everminação de matrizes e de bezerros lactentes em sistema de produção de bovinos de corte na região de Cerrado. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 188-194, 2005.

CECHINEL, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CEZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**. 38, 2083-2091, 2008.

CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B. Protocolos fenotípicos para nematóides gastrintestinais. In: CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B.; NICIURA, S. C. M. Editores técnicos. Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. **Embrapa Informação Tecnológica**. Brasília, DF, 2010.

COLES, C. G.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. W. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**. 44, 35-44, 1992.

COLES, C. G.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCRUYSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 167-185, 2006.

COSTA, C. T. C.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 11, 57-60, 2002.

CRAVEN, J.; BJØRN, H.; BARNES, E. H.; HENRIKSEN, S. A.; NANSEN, P. A. A comparison of *in vitro* test and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p. 49-59, 1999.

D'ADDABBO, T.; CARBONARA, T.; LEONETTI, P.; RADICCI, V.; TAVA, A.; AVATO, P. Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. **Phytochem Ver**, v. 10, p. 503-519, 2011.

D'ASSONVILE, J. A.; JANOVSKEY, E.; VERSTER, A. In vitro screening of *Haemonchus contortus* third larvae for ivermectin resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 61, p. 73-80, 1996.

DEMELER, J. The Physiological Site of Action and the Site of Resistance to the Macrocyclic Lactone Anthelmintics in Sheep Parasitic Trichostrongyloid Nematodes. University of Veterinary Medicine, Hannover, 2005.

DIMANDER, S. O.; HÖGLUND, J.; SPÖÖRNDLY, E.; WALLER, P. J. The impact of internal parasites on the productivity of young cattle organically reared on semi-natural pastures in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v. 90, p. 271-284, 2000.

FAO. Resistencia a los antiparasitarios: Estado Actual con Énfasis em América Latina. Roma: **FAO**, Salud Animal. 1-52, 2003.

FAZZIO, L. E.; YACACHURY, N.; GALVAN, W. R.; PERUZZO, E.; SÁNCHEZ, R. O.; GIMENO, E. J. Impact of ivermectin resistant gastrointestinal nematodes in feedlot cattle in Argentina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 419-423, 2012.

FERNANDES, L. H.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T.; SOUZA, H.; BELLUZZO, C. E. F. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 733-740, 2004.

GADIR, A. W. S.; ONSA, T. O.; ALI, W. E. M.; EL BALLWI, S. M. A.; ADAM, S. E. I. Comparative toxicity of *Croton macrostachys*, *Jatropha curcas* and *Piper abyssinica* seeds in Nubian goats. **Small Ruminant Research**, 48, 61-67, 2003.

GENNARI, S. M.; VIEIRA BRESSAN, M. C. R.; ROGERO, J. R.; MACLEAN, J. M.; DUNCAN, J. L.. Pathophysiology of *Haemonchus placei* infection in calves. **Veterinary Parasitology**, v.38, p.163-172, 1991.

GITHIORI, J. B.; HÖGLUND, J.; WALLER, P.J.; BAKER, R. L. Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine Africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite, *Haemonchus contortus*, of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**. 80, 187-191, 2002.

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

GRADÉ, J. T.; ARBLE, B. L.; WELADJI, R. B.; VAN DANME, P. Anthelmintic efficacy and dose determination of *Albizia anthelmintic* against gastrointestinal nematodes in naturally infected Ugandan sheep. **Veterinary Parasitology**. 157, 267-274, 2008.

GUNN, A.; IRVINE, R. J. Subclinical parasitism and ruminant foraging strategies- a review. **Wildlife Society Bulletin**, v. 31, p. 117-126, 2003.

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

HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J. F.; ALONSO-DIAZ, M.A.; BRUNET, S.; SANDOVAL-CASTRO, C.; ADOTE, S. H. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. **Tropical Biomedicine**, v. 25, p. 56-72, 2008.

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**, 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**, v. 180, p. 144-154, 2011.

JOHNSON, I. T.; GEE, J. M.; PRICE, K.; CURL, C.; FENWICK, G. R., Influence of saponins on gut permeability and active nutrient transport *in vitro*. **The Journal of Nutrition**, v. 116, p. 2270-2277, 1986.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A.; BAGAVAN, A.; MOHAMED, M. J.; ELANGO, G.; RAJAKUMAR, G.; ZAHIR, A. B.; SANTHOSHKUMAR, T.; MARIMUTHU, S. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Melia azedarach* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). **Prarasitology Research**. 106, 1071-1077, 2010.

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

KUMAR, A.; PANDEY, V. C.; SINGH, A. G.; TEWARE, D. D. Traditional uses of medicinal plants for dermatological healthcare management practices by the tharu tribal community of Uttas Pradesh, India. **Genetic Resources Crop Evolution**, 2012.

LORIMER, S.; PERRY, N. B.; FOSTER, L. M.; BURGESS, E. J. A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. **Journal Agricultural Food Chemical**. 44, 2842-2845, 1996.

LUZ, S. M. Prospecção de moléculas químicas com propriedades alelopáticas em *Acacia mangium* (Willd.). Pará, Brasil. **Dissertação (Mestrado)**-Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIG, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAN, S.; GAO, W.; ZHANG, Y.; HUANG, L.; LIU, C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. **Fitoterapia**, v. 81, p. 703-714, 2010.

MARIE-MAGDELEINE, C.; MAHIEU, M.; D'ALEXIS, S.; PHILIBERT, L.; ARCHIMEDE, H. In vitro effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 88-92, 2010.

MARQUES, L. C. Preparação de extratos vegetais. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, nº2, p. 74-76, 2005.

MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; PONDELEK, D. A. S.; BORGES, F. A.; CHAGAS, A. C. S.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; GEDHOF, P. Challenger of nematode control in ruminants: Focus on Latin America. **Veterinary Parasitology**. 180, 126-132, 2011.

MONTEIRO, M. V. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACHADO, L. K. A.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; CAMPELLO, C. C.; RIBEIRO, W. L. C.; MESQUITA, M. A. Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**. 182, 259- 263, 2011.

MORENO, F. C.; GORDON, I. J.; WRIGHT, A. D.; BENVENUTTI, M. A.; SAUMELL, C. A. *In vitro* anthelmintic effect of plant extracts against infective larvae of ruminants gastrointestinal nematode parasites. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 42, p. 155-163, 2010.

NCHU, F.; GITHIORI, J. B.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Anthelmintic and cytotoxic activities of extracts of *Markhamia obtusifolia* Sprague (Bignoniaceae). **Veterinary Parasitology**. 183, 184– 188, 2011.

NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Eficácia de plantas para o controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 11, 330-338, 2009.

OLIVEIRA, H. R.; KFFURI, C. W.; CASALI, V. W. D. Ethnopharmacological study of medicinal plants used in Rosário da Limeira, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 256-260, 2010.

ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 23-33, 2004.

PAIVA, F.; SATO, M. O.; ACUÑA, A. H.; JENSEN, J. R.; BRESSAN, M. C. R. V. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **Hora Veterinária**, v. 120, p. 29-34, 2001.

PAYNE, S. E.; KOTZE, A. C.; DURMIC, Z.; VERCOE, P. E. Australian plants show anthelmintic activity toward equine cyathostomins in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 153-160, 2013.

PEREIRA, Z. V.; GOMES, C. F.; LOBTCHENKO, G.; GOMES, M. E. S.; SIMÕES, P. D. A.; SARUWATARI, R. P. S.; RIGO, V. F.; CORDEIRO, W. P. Levantamento das Plantas Mediciniais do Cerrado *Sensu Stricto* da Fazenda Paraíso – Dourados, MS. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 249-251, 2007.

RÍOS-DE ÁLVAREZ, L.; JACKSON, F.; GREER, A. W.; GRANT, G.; JACKSON, E.; MORRISON, A. A.; HUNTLEY, J. F. Direct anthelmintic and immunostimulatory effects of oral dosing semi-purified phytohaemagglutinin lectin in sheep infected with

Teladorsagia circumcincta and *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, 2012.

RODRIGUES, A. C. C.; GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no povoado Sapucaia, Cruz das Almas-Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Botucatu**, v. 8, p. 1-7, 2006.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. A. Levantamento etnofarmacológico realizado entre um grupo de quilombolas do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v.1, n.2, p. 80-87, 2003.

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

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6º edição, 1º reimpressão, Porto Alegre: editorada UFRGS; Florianópolis: editora da UFSC, 2010.

SANTOS, T. R.; LOPES, W. D. Z.; BUZULINE, C.; BORGES, F. A.; SAKAMOTO, C. A. M.; LIMA, B. C. A.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Fauna helmintológica de bovinos da região Centro-oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**, v.40, nº4, p. 934-938, 2010.

STROMBERG, B. E.; GASBARRE, L. C.; WAITE, A.; BECHTOL, D. T.; BROW, M. S.; ROBINSON, N. A.; OLSON, E. J.; NEWCOMB, H. *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity? **Veterinary Parasitology**, v. 183, p. 284-291, 2012.

TANDON, V.; PAL, P.; ROY, B.; RAO, H. S. P.; REDDY, K. S. In vitro anthelmintic activity of root-tuber extract of *Flemingia vestita*, an indigenous plant in Shillong, India. **Parasitology Research**. 83, 492±498, 1997.

TAYLOR, M. A. A larval development test for detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 49, p. 198-202, 1990.

TOBATA-KUDO, H.; KUDO, H.; TADA, I. *Strongyloides ratti*: Chemokinesis of glycolytic enzyme and lectin-treated third-stage infective larvae *in vitro*. **Parasitology International**, v. 54, p. 147-152, 2005.

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*, v. 103, p. 28-40, 2012.

VÁRADY, M.; BJØRN, H.; NANSEN, P. *In vitro* characterization of anthelmintic susceptibility of field isolates of the pig nodular worm *Oesophagostomum* spp.,

susceptible or resistant to various anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, v. 26, p. 733-740, 1996.

VASCONCELOS, A. L. C. F. Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *lippia sidoides* e *croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. Ceará, Brasil. **Tese (Doutorado)**, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza., 2006.

VATTA, A. F.; KANDU-LELO, C.; ADEMOLA, I. O.; ELOFF, J. N. Direct anthelmintic effects of *Cereus jamacaru* (Cactaceae) on trichostrongylid nematodes of sheep: *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**. 180, 279-286, 2011.

WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M.; CHEN, L.-Y.; GRAY, R. A. J.; SKIPP, R. A. Influence of nematophagus fungi, earthworms and dung burial on development of the free-living stage of *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* in New Zealand. **Veterinary Parasitology**, v. 104, p. 119-129, 2002.

WALKER, R. S.; MILLER, J. E.; MONLEZUN, C. J.; LaMAY, D.; NAVARRE, C.; ENSLEY, D. Gastrointestinal nematode infection and performance of weaned stocker calves in response to anthelmintic control strategies. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 152-159, 2013.

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

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

1
2 AÇÃO OVICIDA DE EXTRATOS DE PLANTAS COLETADAS NO PANTANAL
3 SUL-MATO-GROSSENSE SOBRE *HAEMONCHUS PLACEI*
4

5 Este artigo segue as normas da revista Veterinary Parasitology

6
7 Dyego Gonçalves Lino Borges^{1*}, Fernando de Almeida Borges²
8

9 ¹Mestrando em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

10 ²Professor Adjunto, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato
11 Grosso do Sul

12
13 * Autor correspondente

14 Programa de Pós-graduação em Ciência Animal/Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

15 Avenida Senador Filinto Müller 2443, Ipiranga, Caixa Postal 549

16 CEP: 79074-460, Campo Grande-MS

17 Tel. 3345-3612

18 dyegogborges@hotmail.com
19

20 **Abstract:** In the Pantanal of Mato Grosso do Sul, studies with plants veterinary medical interest are
21 scarce. Was evaluated the effect of plant extracts this biome against eggs of *H. placei*. Plant samples were
22 collected in the rainy season between December 2011 and May 2012, dried and processed in a pressurized
23 fluid extractor using as ethanol/water 7:3 solvent, and rotaevaporated and refrigerated extracts. The work
24 was divided into three experiments: I) screening test extracts at concentrations of 50, 10 and 1 mg/mL, II)
25 determining the effective concentrations (EC) to inviability of 50 and 90 % of eggs (active extracts and
26 thiabendazole) and III) evaluation of the effect of precipitation of extracts of *T. serratifolia*, *Senna*
27 *occidentalis* and *Tocoynea formosa* against larval hatchability. *Melanthera latifolia*, *Casearia aculeata*
28 and *Ocotea diospyrifolia* have proven ineffective. Was observed for thiabendazole EC50 of 0.002 mg/mL
29 and CE90 of 0.006 mg/mL, for *Angelonia hirta* (2.206, 6.875), *Aspilia latissima* (1.281, 2.477),
30 *Centratherum punctatum* (12.42, 42.07), *Diodia kuntzei* (2.603, 4.746), *Echinodorus paniculatus* (6.433,
31 21.45), *Hyptis mutabilis* (2.429, 5.506), *H. brevipes* (3.339, 5.713) , *Ipomoea chiliantha* (0.5361, 1.178),
32 *Lantana canescens* (0.7521, 1.699), *Sebastiania hispida* (1.879, 2.719), *T. serratifolia* (0.828, 1.943),
33 *Tocoynea formosa* (10.08, 14.52) and *Vitex cymosa* (13.13, 174.6) mg/mL, respectively. The
34 precipitation of the extracts significantly influenced the rate of larval hatchability in trials with *T.*

serratifolia ($p<0.0001$), *S. occidentalis* ($p<0.0001$) and *T. formosa* ($p<0.0001$). These results suggest that plants with anthelmintic potential were found.

Keywords: Parasites; ruminant; phytotherapy.

Resumo: No Pantanal de Mato Grosso do Sul, estudos com plantas de interesse médico veterinário são escassos. No presente trabalho, avaliou-se o efeito de extratos de plantas deste bioma sobre ovos de *H. placei*. Amostras de plantas foram coletadas, no período de cheia entre dezembro de 2011 e maio de 2012, secas e processadas em extrator de fluido pressurizado utilizando como solvente etanol/água 7:3, e os extratos rotaevaporados e refrigerados. O trabalho foi dividido em três experimentos: I) teste de triagem dos extratos nas concentrações de 50, 10 e 1 mg/mL, II) determinação das concentrações efetivas (CE) para inviabilização de 50 e 90% dos ovos (extratos ativos e tiabendazole) e III) avaliação do efeito da precipitação dos extratos de *Tabebuia serratifolia*, *Senna occidentalis* e *Tocoynea formosa* sobre a taxa de eclodibilidade larval. *Melanthera latifolia*, *Casearia aculeata* e *Ocotea diospyrifolia* não se mostraram efetivas. Foi observado para tiabendazole CE50 de 0.002 µg/mL e CE90 de 0.006 µg/mL, para *Angelonia hirta* (2,206; 6,875), *Aspilia latissima* (1,281; 2,477), *Centratherum punctatum* (12,42; 42,07), *Dioidia kuntzei* (2,603; 4,746), *Echinodorus paniculatus* (6,433; 21,45), *Hyptis mutabilis* (2,429; 5,506), *H. brevipes* (3,339; 5,713), *Ipomoea chiliantha* (0,5361; 1,178), *Lantana canescens* (0,7521; 1,699), *Sebastiania hispida* (1,879; 2,719), *Tabebuia serratifolia* (0,828; 1,943), *Tocoynea formosa* (10,08; 14,52) e *Vitex cymosa* (13,13; 174,6) em mg/mL, respectivamente. A precipitação dos extratos influenciou significativamente a taxa de eclodibilidade larval nos ensaios com *T. serratifolia* ($p<0,0001$), *S. occidentalis* ($p<0,0001$) e *T. formosa* ($p<0,0001$). Estes resultados permitem inferir que foram encontradas plantas com potencial anti-helmíntico.

Palavras-chave: Parasitos; ruminantes; fitoterapia.

1.0. Introdução

A nematodiose gastrointestinal é uma das enfermidades parasitárias mais frequentes em bovinos, possui caráter subclínico, está intimamente relacionada ao desempenho dos indivíduos acometidos e é fator impactante sobre o ganho de peso (Borges et al., 2013).

A utilização indiscriminada de anti-helmínticos ao longo dos anos visando o controle dessa enfermidade promoveu a seleção de helmintos e o estabelecimento do fenômeno da resistência anti-helmíntica (Kaplan et al., 2012) tornando a nematodiose ainda mais importante como condição desfavorável no ambiente produtivo, assim como suas medidas de controle e prevenção.

Frente às dificuldades crescentes no controle de populações de nematodas parasitos com produtos quimioterápicos convencionais, a pesquisa com fitoterápicos tem demonstrado ser viável (Cezar et al., 2008), apontando estes como medida auxiliar no manejo sanitário da helmintose.

O Cerrado e o Pantanal Sul-mato-grossenses são detentores de vasta diversidade de espécies, famílias e gêneros vegetais e são poucos os estudos conduzidos especialmente na região do Pantanal com referência a catalogação e caracterização de espécies com potencial interesse farmacêutico (Pereira et al., 2007).

Considerando a grande diversidade da flora desses biomas, a possibilidade de obtenção de grande variedade de substâncias químicas e o crescimento da importância econômica de *Haemonchus placei* em decorrência do aumento de sua intensidade média de parasitismo e dos relatos de resistência (Santos et al., 2010), objetivou-se avaliar extratos de plantas de diferentes famílias coletadas no bioma Pantanal do Mato Grosso do Sul, disponíveis no banco de extratos do Laboratório de Farmacognosia da UFMS, sobre ovos de *H. placei* atentando-se para os parâmetros: concentração efetiva para inviabilizar 50% e 90% dos ovos, como critério para seleção de plantas ativas.

2.0. Material e métodos

2.1. *Haemonchus placei*

O isolado de *Haemonchus placei* (HpIBR1) é mantido criopreservado no Laboratório de Parasitologia Veterinária da UFMS e foi caracterizado como resistente a ivermectina (IVM), a qual apresentou ineficácia absoluta na redução da contagem de ovos nas fezes (Feliz, 2011).

Para a manutenção deste isolado, um bezerro foi desverminado por três dias consecutivos com sulfóxido de albendazole (Ricobendazole® Ourofino) 7,5 mg/Kg por via oral. O animal foi avaliado diariamente quanto à infecção por nematodas gastrintestinais pela contagem de ovos por grama de fezes pela técnica de McMaster (Gordon & Witlock, 1939) e foi considerado livre de infecção helmíntica quando somados 30 dias sem a observação de ovos de helmintos nas fezes. Em seguida o animal foi inoculado por via oral com 10.000 larvas de terceiro estágio (HpIBR1) e, a partir do 30º dia pós-inoculação, coletas diárias de fezes foram realizadas visando o isolamento de ovos a serem utilizados na avaliação dos extratos vegetais.

2.2. Coleta das espécies vegetais

Foram selecionadas 18 espécies vegetais do conjunto de espécies coletadas (Tabela 1) na região do Rio Miranda/Abobral, na Fazenda São Miguel (19°36'30"S; 57°2'8"O), Estrada Parque (19°37'5"S; 57°2'4"O), Base de Estudos do Pantanal – UFMS (19°34'36"S; 57°1'11"O) e Fazenda São Bento (19°34'7"S; 57°1'15"O), no período de cheia, dezembro a março/2012. De cada espécime coletado foi preparada uma exsicata, a qual foi depositada no Herbário CG/UFMS.

As espécies foram selecionadas pelo método randômico (Maciel et al., 2002), o qual propicia maior chance de descoberta de novas moléculas químicas.

2.3. Extratos de plantas

Inicialmente, as diferentes partes coletadas foram estabilizadas e secas em estufa de ar circulante a 40°C. Para extração utilizou-se extrator de fluido pressurizado (DIONEX®) (ASE 150), método bruto, solvente (etanol/água 7:3), 100 °C, 1.600 psi, ciclo único, tempo estático 5 minutos, 60 % lavagem e 50 segundos de purga. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo e posteriormente foram armazenados em frascos de polietileno com capacidade para 14 mililitros identificados, vedados e mantidos a -20° C até a realização dos ensaios.

2.4. Avaliação anti-helmíntica

O efeito anti-helmíntico dos extratos vegetais foi avaliado frente a ovos de *H. placei* pelo teste de eclodibilidade larval (TEL).

Os extratos foram pesados e posteriormente diluídos em água destilada com auxílio de agitador mecânico tipo Vortex (IKA® Genius 3) e em seguida avaliados nas concentrações (100 mg/mL, 50 mg/mL, 10 mg/mL e 1 mg/mL), como indicado na Tabela 2 (experimento I - teste de triagem). Os extratos considerados ativos foram avaliados em 10 concentrações assim como o tiabendazole que foi utilizado como droga de referência (experimento II). Nesta avaliação, a concentração responsável pelo menor percentual de eclodibilidade (experimento I) foi utilizada para determinação da concentração inicial, a partir da qual nove outros pontos, na razão 1:2, foram obtidos, desta forma se constituindo as 10 concentrações.

No experimento II foram avaliadas 13 espécies vegetais, consideradas ativas nos testes de triagem: *Angelonia hirta*, *Aspilia latissima*, *Centratherum punctatum*, *Dioidia kuntzei*, *Echinodorus paniculatus*, *Hyptis brevipes*, *Hyptis mutabilis*, *Ipomoea chiliantha*, *Lantana canescens*, *Sebastiana hispida*, *Tabebuia serratifolia*, *Tocoynea formosa* e *Vitex cymosa*. *Senna occidentalis* e *H. volubilis* não foram incluídas nesta avaliação, em decorrência da quantidade insuficiente de extrato disponível, e desta forma a CE50 e CE90 não foram calculadas.

No experimento III, *Tabebuia serratifolia*, *Tocoynea formosa* e *Senna occidentalis* foram avaliadas quanto a influência da camada de sedimento formada pela precipitação do extrato durante o período de incubação, sobre os percentuais de eclodibilidade larval. Esta avaliação foi necessária em decorrência da não observação do efeito dose-resposta em concentrações elevadas durante a realização de testes piloto. As concentrações utilizadas para as plantas variaram de 120 a 0, 023 mg/mL. Para *T. serratifolia*, *T. formosa* os testes considerados para determinação da CE50 e CE90 foram aqueles nos quais não havia a presença de precipitado formado a partir dos extratos.

Angelonia hirta foi avaliada com concentrações entre 100 e 0, 2 mg/mL, *Aspilia latissima* (50-0,008 mg/mL), *Centratherum punctatum* (120-0,234 mg/mL), *Dioidia kuntzei* (100-0,2 mg/mL), *Echinodorus paniculatus* (100-0,2 mg/mL) *Hyptis mutabilis* (80 e 0,156 mg/mL), *H. brevipes* (100-0,2 mg/mL), *Ipomoea chiliantha* (50-0,08 mg/mL), *Lantana canescens* (10-0,0019 mg/mL), *Sebastiana hispida* (50-0,08 mg/mL), *Tabebuia serratifolia* (3,29-0,09 mg/mL), *T. formosa* (120-0,2344 mg/mL) e *Vitex cymosa* entre 50-0,08 mg/mL.

2.4.1 Teste de eclodibilidade larval (TEL)

A recuperação de ovos de *H. placei* em amostras frescas de fezes, imediatamente após a coleta, foi realizada de acordo com Coles et al. (1992), modificado por Bizimenyera et al. (2006) e os testes foram realizados segundo metodologia preconizada por Chagas et al. (2010) com modificações. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração de extrato utilizando-se placa de cultivo celular (24 poços). Nos poços foram depositados 500 µL de água contendo em média 100 ovos e em seguida 500 µL da solução tratamento ou água para o controle. Seguiu-se incubação por 24 horas a 27°C.

Para a avaliação do efeito da precipitação dos extratos, nos poços das placas de incubação, sobre a taxa de eclodibilidade, os extratos foram diluídos 24 horas antes da exposição aos ovos, acondicionados em tubos de polietileno com capacidade de dois mililitros e deixados em estufa com demanda de oxigênio (B.O.D) a 27°C. Em seguida os extratos foram centrifugados a 6000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para avaliação da atividade ovicida.

2.5. Análise estatística

Para o teste de triagem a taxa de eclodibilidade foi expressa em percentual (Coles et al., 1992):

$$\text{Taxa de eclodibilidade \%} = [\text{número de larvas}/(\text{número de ovos} + \text{larvas}) \times 100]$$

Os dados foram submetidos a análise de variância considerando apenas o fator eclodibilidade, seguido do pós-teste de Bonferroni ($\alpha=0.05$) no qual todos os tratamentos foram comparados frente ao controle negativo e entre si. Foram considerados ativos aqueles extratos que apresentaram percentuais de eclodibilidade inferiores aos da água ($p<0.05$) em pelo menos uma das concentrações.

Foram construídas curvas sigmóides de regressão não linear da relação dose x resposta dos extratos ativos a partir da avaliação com 10 concentrações. As concentrações foram transformadas ($X = \log X$) e as eficácias, por repetição, foram expressas como percentual (0 a 100%) da frequência. Foi calculada a concentração efetiva média (CE50) requerida para inviabilizar 50% dos ovos e a CE90 concentração requerida para inviabilizar 90% dos ovos a partir das seguintes equações: $Y = 100 / (1 + 10^{((\log EC_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$, e $\log EC_{50} = \log EC_{90} - (1 / \text{HillSlope}) * \log(90 / (100 - 90))$ em que $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\log EC_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$, respectivamente, onde: X= logaritmo da

concentração, Y= percentual de eficácia, Bottom= eficácia mínima, Top= eficácia máxima e HillSlope = o fator de inclinação da curva dose-resposta.

A influência do sedimento sobre os percentuais de eclodibilidade foi avaliada a partir de análise de variância de dois fatores (two way ANOVA) seguido do pós-teste de Bonferroni com $\alpha=0.05$, na qual as variáveis presença e ausência de sedimento foram comparadas, para cada concentração de extrato, utilizando-se as eficácias (percentual de inviabilização de ovos). Para *T. serratifolia* os ensaios foram realizados com seis repetições por variável avaliada e para *S. occidentalis* e *T. formosa* apenas três.

As análises estatísticas foram realizadas empregando o programa GraphPad Prism. Version 5.03 (GraphPad Software, San Diego, California,. USA, <http://www.graphpad.com>).

O percentual de redução da eclodibilidade, do TEL, de cada extrato em diferentes concentrações foi calculado com a seguinte fórmula (Coles et al., 1992):

$$\text{Redução da eclodibilidade \%} = [\text{número de ovos}/(\text{número de ovos} + \text{larvas}) \times 100].$$

3.0. Resultados

Extratos de 15 espécies vegetais se mostraram ativos nos testes de triagem com percentuais de redução da eclodibilidade que variaram entre 40,5% ($p < 0,0001$) e 100% ($p < 0,0001$), (Tabela 2).

Melanthera latifolia, *Casearia aculeata* e *Ocotea diospyrifolia* não foram eficazes nos testes de triagem (Tabela 2) sendo observados percentuais de inibição da eclodibilidade de 19,85%, 10,35% e 15,9% respectivamente, nas soluções mais concentradas. Observou-se maior percentual de eclodibilidade ($p=0,0023$) quando ovos de *H. placei* foram expostos a extratos de *M. latifolia* ($p=0,0023$) e *O. diospyrifolia* ($p=0,0143$), nas concentrações de 1 e 10 mg/mL, do que quando expostos a água.

Hippocratea volubilis foi avaliada somente no ensaio de triagem, no qual apenas a concentração de 10 mg/mL mostrou-se ativa, reduzindo significativamente a taxa de eclodibilidade larval ($p=0,0155$), não sendo avaliada em 10 concentrações em decorrência da pequena quantidade de extrato disponível.

Assim como para *H. volubilis*, pode-se observar para *T. formosa* maior taxa de inibição da eclodibilidade larval na concentração intermediária, 10 mg/mL ($p=0,0001$). *Lantana canescens* também se apresentou com comportamento anômalo com ausência de relação dose-resposta na avaliação de triagem (Tabela 2). Maiores taxas de inibição da eclodibilidade foram encontrados em baixas

concentrações (100% a 10 mg/mL) enquanto que taxas inferiores foram observados em maiores concentrações (92.34% a 100 mg/mL), embora diferenças estatísticas não tenham sido observadas entre as concentrações de extrato ($p>0,05$), para esta espécie.

Nos testes de triagem e ensaios de 10 concentrações notou-se a precipitação dos extratos e ausência do efeito dose-resposta nas maiores concentrações para *T. serratifolia* e *T. formosa*, ou seja, observou-se maior percentual de eclodibilidade em concentrações mais elevadas. O mesmo foi observado em testes piloto para *S. occidentalis*. A hipótese do efeito da presença do sedimento, oriundo da precipitação dos extratos, sobre a taxa de eclodibilidade foi comprovada para *S. occidentalis* ($p<0,0001$) e *T. formosa* ($p<0,0001$). Para *T. serratifolia* observou-se interação entre o sedimento e as concentrações de extrato ($p<0,0001$) visualizada a partir de diferenças significativas entre percentuais de inibição da eclodibilidade, em parte das concentrações avaliadas, quando testes com presença e ausência de sedimento foram analisados comparativamente: 30 mg/mL ($p<0,001$), 15 mg/mL ($p<0,001$), 7.5 mg/mL ($p<0,001$), 3,75 mg/mL ($p<0,05$), 1,875 mg/mL ($p<0,001$). Para *S. occidentalis* diferenças significativas foram observadas nas concentrações 120 mg/mL ($p<0,01$), 60 mg/mL ($p<0,001$), 30 mg/mL ($p<0,001$), 15 mg/mL ($p<0,001$), 7,5 mg/mL ($p<0,001$) e 3,75 mg/mL ($p<0,01$) (Figura 2). Para *T. formosa*, diferenças foram observadas nas concentrações 120 mg/mL ($p<0,01$), 60 mg/mL ($p<0,05$), 15 mg/mL ($p<0,05$) e 7,5 mg/mL ($p<0,01$).

Os 13 extratos avaliados em 10 concentrações (*A. latissima*; *C. punctatum*; *D. kuntzei*; *E. paniculatus*; *H. mutabilis*; *H. brevipes*; *I. chiliantha*; *L. canescens*; *S. hispida*; *T. serratifolia*; *V. cymosa*, *A. hirta*, *T. formosa*) mostraram efeito dose dependente havendo gradual aumento dos percentuais de eficácia à medida que as concentrações foram elevadas (Tabela 3). Concentrações efetivas médias (CE50) entre 0,5 a 13,13 mg/mL foram observadas para as diferentes espécies (Figura 1) ao passo que CE50 de 0.002 µg/mL (0,0019-0,0022 IC95%) foi encontrada para tiabendazole. A concentração efetiva necessária para inviabilização de 90% dos ovos (CE90), para os extratos, variou de 1,18 a 174,6 mg/mL, concentrações bem superiores à do tiabendazole que foi de 0,06 µg/mL (0.004-0.009 IC95%).

Inibição completa da eclodibilidade larval de *H. placei* foi observada com extratos de *A. hirta* (100 mg/mL), *D. kuntzei* (25 mg/mL), *H. brevipes* (25 mg/mL), *A. latissima* (6,25 mg/mL), *T. formosa* (15 mg/mL), *I. chiliantha* (6,25 mg/mL), *L. canescens* (5 mg/mL) e *T. serratifolia* (2,33 mg/mL).

E. paniculatus e *M. latifolia*, embora pertencentes à mesma família (Alismataceae), não apresentaram ação ovicida semelhante, sendo que *M. latifolia* não foi considerada ativa. Observou-se

maior eclodibilidade dos ovos quando expostos ao extrato desta espécie ($p=0,0023$) do que quando expostos somente a água. Contrariamente, *E. paniculatus* inibiu significativamente ($p<0,0001$) a eclodibilidade dos ovos de *H. placei*, observando-se 97% de eficácia na inviabilização dos ovos na concentração de 100 mg/mL.

5.0. Discussão

Neste trabalho as 18 plantas que foram avaliadas quanto à ação anti-helmíntica foram estudadas pela primeira vez frente a ovos do nematoda *H. placei*.

Destas 18 espécies estudadas quanto à ação ovicida sobre *H. placei* 15 foram ativas, sendo elas: *Angelonia hirta*, *Aspilia latíssima*, *Centratherum punctatum*, *Dioidia kuntzei*, *Echinodorus paniculatus*, *Hippocratea volubilis*, *Hyptis brevipes*, *Hyptis mutabilis*, *Ipomoea chiliantha*, *Lantana canescens*, *Sebastiania hispida*, *Senna occidentalis*, *Tabebuia serratifolia*, *Tocoynea formosa* e *Vitex cymosa*.

Assim como observado para substâncias anti-helmínticas conhecidas, houve forte relação entre os percentuais de inibição da eclodibilidade e a concentração dos extratos avaliados em *H. placei*, evidenciando comportamento dose-dependente, efeito também observado por Bizimenyera et al., (2006) em *Trichostrongylus colubriformis*, Kamaraj et al. (2010) em *H. contortus*, Kamaraj & Rahuman (2011) em *H. contortus*, e Wabo-Poné et al. (2011) em *Heligmosomoides bakeri*, em seus ensaios de eclodibilidade larval com extratos de diferentes plantas. O comportamento dos extratos, quando comparados ao tiabendazole, foi inferior quanto à inviabilização dos ovos (Figura 1), porém, as plantas consideradas ativas são promissoras, uma vez que foram utilizados extratos brutos sem enriquecimento ou fracionamento.

Concentrações efetivas médias próximas à faixa observada no presente trabalho (0,5362 mg/mL e 13,13 mg/mL) foram observadas por Kamaraj & Rahuman (2011) que trabalharam com diferentes frações dos extratos de *Annona squamosa*, *Eclipta prostrata*, *Solanum torvum*, *Terminalia chebula* e *Catharantus roseus* (3,80 mg/mL a 8,82 mg/mL) em *H. contortus* e por Peña et al. (2013), que trabalhando com a avaliação do efeito ovicida de lactonas sesquiterpênicas de *Cichorium intybus* em *Cooperia oncophora* observaram CE50 de 0,64 mg/mL. Nchu et al. (2011) também observaram CE50 próxima as observadas no presente estudo quando realizaram ensaios de atividade ovicida do extrato

acetona de *Markhamia obtusifolia* em *T. colubriformis* (0,8 mg/mL), porém CE50 inferior (0,46 mg/mL) quando avaliaram a ação do extrato aquoso.

O cálculo da CE90 pode ser utilizado como parâmetro de avaliação da efetividade de extratos, fator determinante para a escolha de plantas mais efetivas e com melhores perfis de atividade.

A concentração efetiva para inviabilização de 90% dos ovos (10,7 mg/mL) observada por Nchu et al., (2011) foi superior a CE90 da maioria das plantas avaliadas no presente trabalho e apresentou-se 23 vezes maior que sua CE50. Em contrapartida, as CEs 90 observadas neste estudo apresentam-se entre 1,44 e 13,30 vezes suas CEs 50, o que demonstra que mesmo possuindo CEs 50 superiores às do referido trabalho as plantas avaliadas neste estudo podem ser mais potentes uma vez que concentrações superiores, porém relativamente próximas a CE50 foram suficientes para a inviabilização de 90% dos ovos de *H. placei*.

A solubilização dos extratos é fator limitante durante a realização de um ensaio de avaliação anti-helmíntica, de forma que, quando o extrato não permanece distribuído de forma homogênea na solução o efeito do extrato pode não ser pronunciado e a ação ovicida fica restrita à parcela de ovos que entrou em contato com o mesmo.

Durante os ensaios observou-se a precipitação dos extratos de *T. serratifolia*, *S. occidentalis*, *H. volubilis* e *T. formosa* nas soluções mais concentradas. Com a formação do precipitado as taxas de eclodibilidade foram comprovadamente influenciadas de forma que o aumento das taxas de inviabilização dos ovos, observado com o aumento da concentração, passou a não ser visualizado para *T. serratifolia*, *S. occidentalis* e *T. formosa*. O efeito da presença do sedimento foi evidenciado quando os extratos foram submetidos a centrifugações, sendo a massa de precipitado formada durante este processo retirada da solução. Com isso o efeito dose-dependente foi estabelecido e a diminuição das taxas de eclodibilidade passaram a ser observadas com o aumento da concentração dos extratos.

Algumas das espécies estudadas no presente trabalho, em particular aquelas avaliadas nos testes de 10 concentrações (experimento II), ou mesmo outras espécies do mesmo gênero que não constam neste estudo, foram também estudadas por outros autores quanto, atividade nematodocida, acaricida e constituição química.

Ácido pomólico, lantanólico e lantóico, constituintes das folhas de *Lantana* sp., proporcionaram 100% de mortalidade dos indivíduos adultos do fitonematoda *Meloidogyne incognita* a 1 mg/mL após 24 horas de incubação (Begum et al., 2008). Em se tratando do mesmo gênero as mesmas

substâncias podem estar presentes em *L. canescens* podendo ser responsáveis pelo efeito ovicida. A distância filogenética é menor entre espécimes de um mesmo gênero que entre espécimes de uma mesma família. Neste estudo observou-se que plantas da mesma família podem diferir quanto à atividade anti-helmíntica ao ponto de algumas a possuírem e outras não, como pode ser observado para a família Alismataceae.

Santos et al. (2013) avaliaram 21 espécies de plantas sobre larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo parte destas avaliadas sobre ovos de *H. placei*, no presente trabalho. *L. canescens*, *M. latifolia*, *C. castaneifolia*, *S. hispida*, *H. volubilis*, e *H. mutabilis* mostraram-se ativas sobre as larvas do carrapato, eficácia superior a 95% na concentração de 400 mg/mL.

A sensibilidade de larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e de ovos de *H. placei* a extratos de *L. canescens*, *S. hispida*, *H. mutabilis* parece ser diferente. A concentração necessária para inviabilizar pelo menos 95% dos ovos de *H. placei* é 160 vezes menor do que a concentração necessária para inviabilizar o mesmo percentual de larvas e adultos do carrapato, considerando o extrato de *L. canescens*, 128 e 40 vezes menor para *S. hispida* e *H. mutabilis*, respectivamente.

Dentre as outras espécies avaliadas na segunda fase não se tem estudos fitoquímicos sobre *S. hispida*. *V. cymosa* possui flavonas, flavonóis, ácidos triterpenicos de ursano e oleanano, iridóides assim como fenóis simples (Leitão et al., 2011), *H. mutabilis* possui metil betulinato, ácido oleanólico (acetato e ursólico), ácido maslínico e triterpenóides (Pereda-Miranda & Gascón-Figueroa, 1988), *I. chiliantha* possui esteróides, triterpenos, flavonóides e derivados de ácido caféico e ácido *p*-cumárico esterificado (Ferreira et al., 2011) e em *T. serratifolia* foram observados derivados de quinonas (Oliveira et al., 1990), substâncias essas que associadas ou isoladas podem ser dotadas de atividade ovicida.

Muito pouco se conhece sobre a atuação de metabólitos secundários sobre helmintos parasitos e estudos como este, que visem a catalogação de plantas bioativas, são fundamentais para que avaliações mais complexas sejam realizadas. Com este trabalho foi possível observar que o bioma Pantanal possui espécies vegetais promissoras para o controle de *H. placei*.

6.0. Referências

Begum, S., Zehra, S. Q., Siddiqui, B. S., Fayyaz, S., Ranzan, M., 2008. Pentacyclic triterpenoids from the aerial parts of *Lantana camara* and their nematocidal activity. *Chemistry & Biodiversity*, 5, 1856-1866.

- Bizimenyera, E. S., Githiori, J. B., Eloff, J. N., Swan, G. E., 2006. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, 142, 336–343.
- Borges, F. A., Almeida, G. D., Heckler, R. P., Lemes, R. T., Onizuka, M. K. V., Borges, D. G. L., 2013. Impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. *Tropical Animal Health Production*, 45, 723–727.
- Cezar, A. S., Catto, J. B., Bianchin, I., 2008. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. *Ciência Rural*, 38, 2083–2091.
- Chagas, A. C. S., Molento, M. B., 2010. Protocolos fenotípicos para nematóides gastrintestinais. In: CHAGAS, A. C. S.; MOLENTO, M. B.; NICIURA, S. C. M. Editores técnicos. Manual prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF.
- Coles, C. G., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J. W., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44, 35–44.
- Feliz, D. C. Resistência a anti-helmínticos em nematodas gastrintestinais de bovinos de corte, no Mato Grosso do Sul, Brasil. 2011. 41f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.
- Ferreira, F. P., Pott, A., Oliveira, D. C. R. Derivados fenilpropanóides e outros constituintes de *Ipomoea chiliantha*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 34, 2011 Florianópolis SC. Resumos...
- Gordon, H. M.; Whitlock, H. V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of Council for Scientific Industrial Research* 12, 1, 50–52.
- Kamaraj, C., Rahuman, A. A. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against. *Research in Veterinary Science*, 91, 400–404, 2011.
- Kamaraj, C., Rahumar, A. A., Bagavan, A., Mohamed, M. J., Elango, G., Rajakumar, G., Zahir, A. A., Santhoshkumar, T., Marimuthu, S. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Melia azedarach* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Parasitology Research*, 106, 1071–1077, 2010.
- Kaplan, R. M., Vidyashankar, A. N., 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186, 70–78.
- Leitão, S. G., Santos, T. C., Monache, F. D., Matheus, M. E., Fernandes, P. D., Marinho, B. G., 2011. Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leaf extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21, 874–883.
- Maciel, M. A., Pinto, A. C., Veig, V. F., Grynberg, N. F., Echevarria, A., 2002. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, 25, 429–438.
- Nchu, F., Githiori, J. B., McGaw, L. J., Eloff, J. N., 2011. Anthelmintic and cytotoxic activities of extracts of *Markhamia obtusifolia* Sprague (Bignoniaceae). *Veterinary Parasitology*, 183, 184–188.
- Oliveira, A. B., Raslan, D. S., Miraglia, M. C. M., Mesquita, A. A. L., Zani, C. L., Ferreira, D. T., Maia, J. G. S., 1990. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de bignoniáceas brasileiras. *Química Nova*, v. 13, p. 302–307.
- Peña, M., Williams, A., Enemark, H., Thamsborg, 2013. Direct anthelmintic effects of purified chicory extract against cattle nematode: preliminary results with *Cooperia oncophora*. In: International Conference at the Word Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 24th, Australia, Anais...Australia, CD-ROM.
- Pereda-Miranda, R. and Cascón-Figueroa, M., 1988. Chemistry of *Hyptis mutabilis*: new pentacyclic triterpenoids. *Journal of Natural Products*, 51, 996–998.
- Pereira, Z. V., Gomes, C. F., Lobtchenko, G., Gomes, M. E. S., Simões, P. D. A., Saruwatari, R. P. S., Rigo, V. F., Cordeiro, W. P., 2007. Levantamento das Plantas Medicinais do Cerrado *Sensu Stricto* da Fazenda Paraíso – Dourados, MS. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5, 249–251.
- Santos, L. B., Souza, J. K., Papassoni, B., Borges, D. G. L., Junior, G. A. D., Souza, J. M. E., Carollo, C. A., Borges, F. A., 2013. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22, 532–538.
- Santos, T. R., Lopes, W. D. Z., Buzulline, C., Borges, F. A., Sakamoto, C. A. M., Lima, R. C. A., Oliveira, G. P., Costa, A. J., 2010. Helminth fauna of bovines from the Central-Western, Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural* 40, 4, 934–938.

392 Wabo Poné, J., Ngankam, N. J. D., Bilong Bilong, C.F., Mpoame, M., 2011. A comparative study of the
393 ovicidal and larvicidal activities of aqueous and ethanolic extracts of pawpaw seeds *Carica*
394 *papaya* (Caricaceae) on *Heligmosomoides bakeri*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*,
395 447-450.
396
397
398
399
400

Tabela 1. Famílias, espécies, local de coleta das amostras, parte da planta coletada e nomenclatura popular dos espécimes utilizados nos ensaios de avaliação da atividade ovicida sobre *H. placei*.

Família	Espécie	Local de coleta	Parte coletada	Nome popular
Alismataceae	<i>Echinodorus paniculatus</i>	Base de Estudos do Pantanal - UFMS	PA/FL	Chapéu-de-couro
Alismataceae	<i>Melanthera latifolia</i>	Base de Estudos do Pantanal - UFMS	PA/FL	...
Asteraceae	<i>Aspilia latissima</i>	Base de Estudos do Pantanal - UFMS	FO	Fumeiro
Asteraceae	<i>Centratherum punctatum</i>	Estrada Parque	PA/FL	Balaio-de-velho
Bignoniaceae	<i>Tabebuia serratifolia</i>	Base de Estudos do Pantanal - UFMS	FL	Ipê amarelo
Convolvulaceae	<i>Ipomoea chiliantha</i>	Estrada Parque	PA	Cipó-de-leite
Euphorbiaceae	<i>Sebastiania hispida</i>	Fazenda São Bento	PA	Mercúrio
Hippocrateaceae	<i>Hippocratea volubilis</i>	Fazenda São Bento	RF/FO	Fava de arara
Lamiaceae	<i>Hyptis brevipes</i>	Fazenda São Bento	PT/FL	Alfavaca-do-mato
Lamiaceae	<i>Hyptis mutabilis</i>	Fazenda São Bento	PA/FL	Sambacuité; cheirosa e betônica-brava
Lauraceae	<i>Ocotea diospyrifolia</i>	Fazenda São Miguel	RF/FO	Canela-preta
Leguminosae	<i>Senna occidentalis</i>	Fazenda São Bento	PA/FL/FR	Fedegoso
Rubiaceae	<i>Diodia kuntzei</i>	Fazenda São Bento	PT/FL	...
Rubiaceae	<i>Tocoynea formosa</i>	Fazenda São Bento	RF/FO	Genipapinho
Salicaceae	<i>Casearia aculeata</i>	Fazenda São Bento	RF/FO/FL	Cruzeiro
Scrophulariaceae	<i>Angelonia hirta</i>	Fazenda São Bento	PA/FL/FR	...
Verbenaceae	<i>Lantana canescens</i>	Estrada Parque	PA/FL	Camara; cidreira
Verbenaceae	<i>Vitex cymosa</i>	Fazenda São Bento	RF/FO	Azeitona do mato, Jaramantaia e Tarumã

RF: ramos finos; FO: folhas; FR: fruto; PA: parte aérea (inclui folhas, ramos finos e caule); FL: flores; RA: raiz; PT: parte total (inclui raiz, folhas e ramos finos).

Tabela 2. Espécies de plantas e concentrações avaliadas durante os ensaios de triagem e seus respectivos percentuais de eclodibilidade e o valor de p (água/concentração de extrato).

Espécie	Percentual de eclodibilidade larval (%)					Valor de p
	Água	1 mg/mL	10 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	
<i>Angelonia hirta</i>	78,4 ^b	79,3 ^b	58,5 ^a	40,3 ^a		0,0001
<i>Aspilia latissima</i>	73,4 ^b	80,1 ^b	5,7 ^a	0,0 ^a		<0,0001
<i>Casearia aculeata</i>	89,7 ^a	88,7 ^a	92,7 ^a	89,8 ^a		0,0789
<i>Centratherum punctatum</i>	86,5 ^c		59,5 ^b	57,0 ^{ab}	2,3 ^a	<0,0001
<i>Diodia kuntzei</i>	79,2 ^c	58,6 ^b	18,5 ^a	18,0 ^a		<0,0001
<i>Echinodorus paniculatus</i>	78,0 ^c	78,5 ^{bc}	0,6 ^{ab}	21,4 ^{ab}		<0,0001
<i>Hippocratea volubilis</i>	80,7 ^b	84,9 ^{ab}	74,9 ^a	83,9 ^{ab}		0,0155
<i>Hyptis brevipes</i>	76,7 ^c	73,7 ^{bc}	57,3 ^{bc}	43,3 ^{ab}		0,0199
<i>Hyptis mutabilis</i>	81,0 ^b	78,9 ^b	12,6 ^a	8,4 ^a		<0,0001
<i>Ipomoea chiliantha</i>	95,3 ^b		4,2 ^a	0,7 ^a	0,6 ^a	<0,0001
<i>Lantana canescens</i>	83,4 ^b		0,0 ^a	19,3 ^a	7,9 ^a	0,0024
<i>Melanthera latifolia</i>	74,0 ^a	86,0 ^b	88,0 ^b	80,0 ^{ab}		0,0023
<i>Ocotea diospyrifolia</i>	75,4 ^a	89,2 ^b	88,9 ^b	84,4 ^{ab}		0,0143
<i>Sebastiania hispida</i>	93,2 ^b		0,7 ^a	2,7 ^a	2,9 ^a	<0,0001
<i>Senna occidentalis</i>	85,7 ^c		13,8 ^a	66,9 ^b	10,6 ^a	<0,0001
<i>Tabebuia serratifolia</i>	84,0 ^d	95,4 ^d	40,9 ^c	18,5 ^b	0,0 ^a	<0,0001
<i>Tocoyena formosa</i>	81,0 ^b	83,9 ^b	53,8 ^a	72,5 ^b		0,0001
<i>Vitex cymosa</i>	83,0 ^c		57,4 ^b	1,4 ^a	0,0 ^a	<0,0001

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística.

Tabela 3. Espécies, concentração efetiva média para inviabilização de 50% (CE50) e 90% (CE90) dos ovos de *H. placei* e intervalos de confiança, fator de inclinação da curva (HillSlope) e fator de determinação (R²), gerados a partir da avaliação seriada de 10 concentrações.

Espécie	CE50 mg/ml	IC 95%	HillSlope	R ²	CE90 mg/ml	IC 95%	HillSlope	R ²
<i>Angelonia hirta</i>	2, 606	1, 982-3,426	1, 082	0,89	6, 875	5, 343-8, 848	4, 899	0,95
<i>Aspilia latissima</i>	1, 281	0, 9902-1, 657	1, 556	0, 88	2, 477	1, 835-3, 344	7, 033	0, 98
<i>Centratherum punctatum</i>	12,42	10, 19-15, 13	1, 544	0, 93	42, 07	23, 17-76, 36	1, 993	0, 95
<i>Diodia kuntzei</i>	2, 603	2, 327-2, 911	2, 921	0, 96	4, 746	3, 903-5, 770	4, 556	0, 96
<i>Echinodorus paniculatus</i>	6, 433	5, 36-7, 72	1, 304	0, 94	21, 45	14, 36-32, 04	2, 07	0, 97
<i>Hyptis brevipes</i>	3, 339	3, 043-3, 663	3, 032	0, 97	5, 713	5, 096-6, 404	4, 704	0, 99
<i>Hyptis mutabilis</i>	2, 429	1, 980-2, 980	1, 59	0, 91	5, 506	4, 686-6, 470	4, 039	0, 98
<i>Ipomoea chiliantha</i>	0, 5362	0, 349-0, 823	1, 035	0, 73	1, 178	0, 195-7, 112	15, 49	0, 98
<i>Lantana canescens</i>	0, 7521	0, 465-1, 216	1, 464	0, 43	1, 699	0, 709-4, 09	8, 349	0, 98
<i>Sebastiania hispida</i>	1, 879	1, 643-2, 150	3, 862	0, 93	2, 719	2, 133-3, 464	7, 072	0, 98
<i>Tabebuia serratifolia</i>	0, 828	0, 716-0, 958	2, 882	0, 83	1, 943	1, 254-3, 011	3, 163	0, 88
<i>Tocoynea formosa</i>	10, 08	5, 546-18, 1834	0, 576	0, 64	14, 52	4, 978-42, 34	2, 987	0, 74
<i>Vitex cymosa</i>	13,13	6, 535-26, 38	0, 447	0, 57	174, 6	1, 611-18915	1, 289	0, 78
Tiabendazole	2x10 ⁻⁶	1.9x10 ⁻⁶ -2.2x10 ⁻⁶	1, 683	0, 98	6x10 ⁻⁶	4x10 ⁻⁶ -9x10 ⁻⁶	1, 256	0, 98

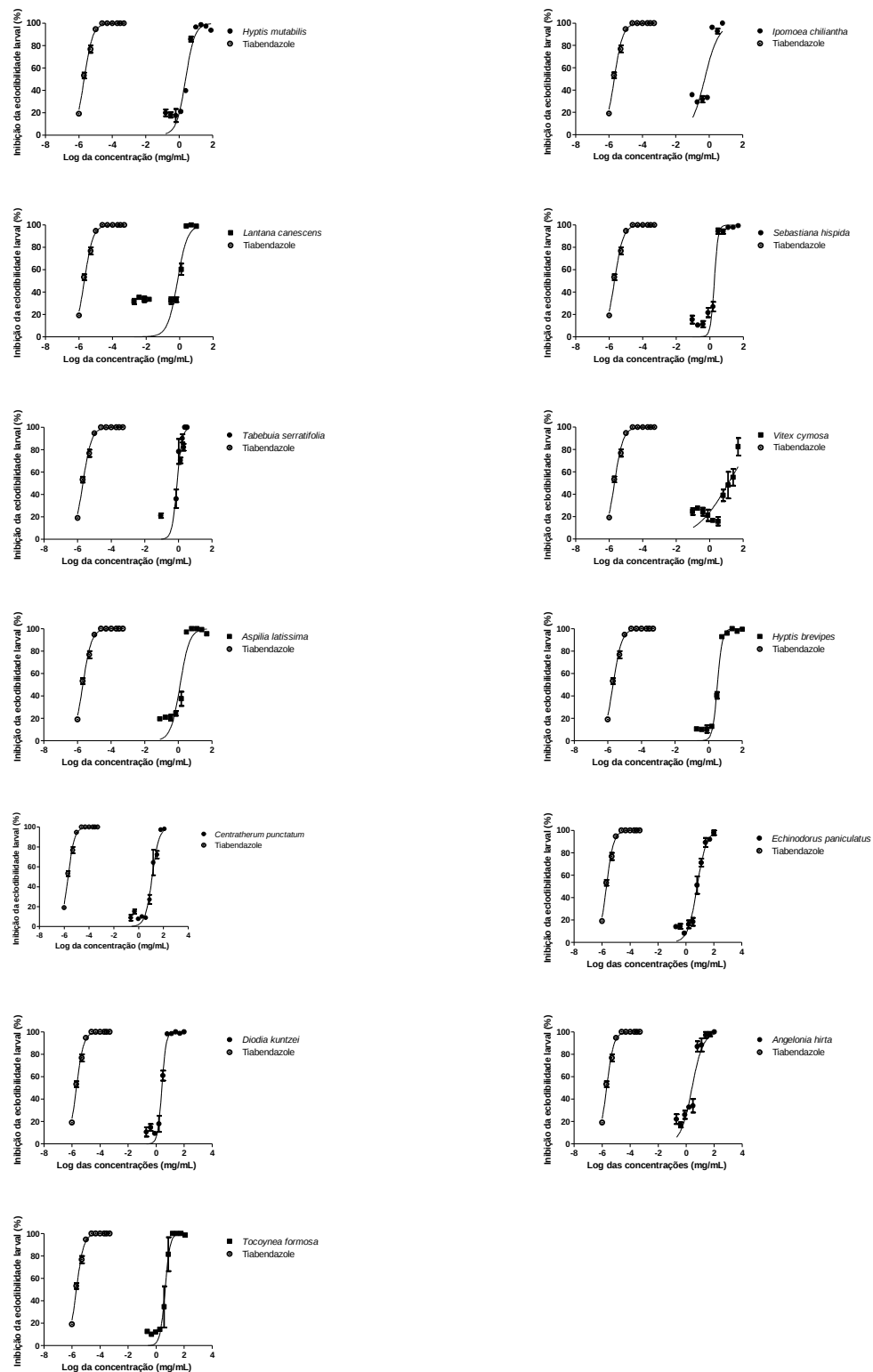


Figura 1. Comportamento dose-resposta das diferentes espécies de plantas avaliadas em ensaios de 10 concentrações frente ao Tiabendazole.

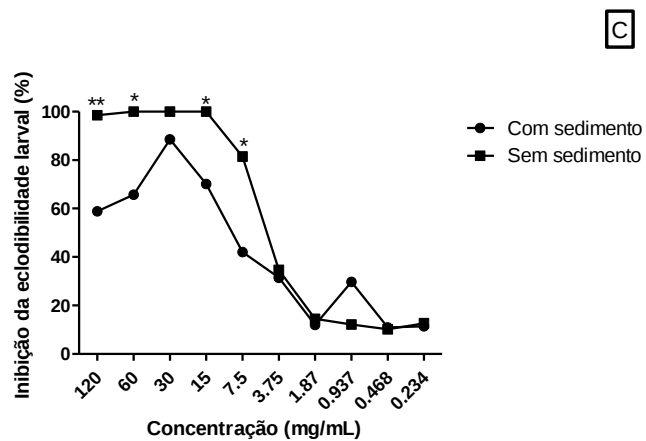
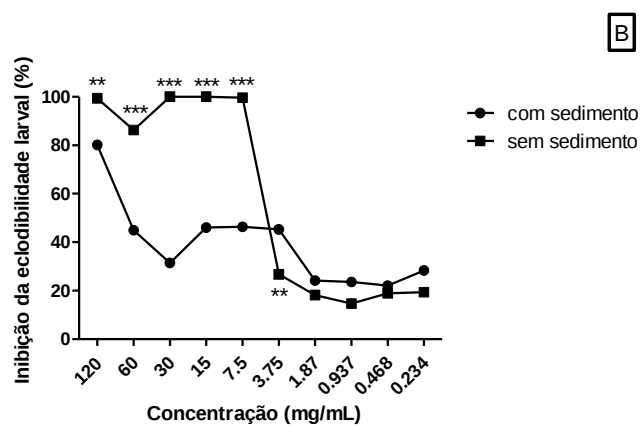
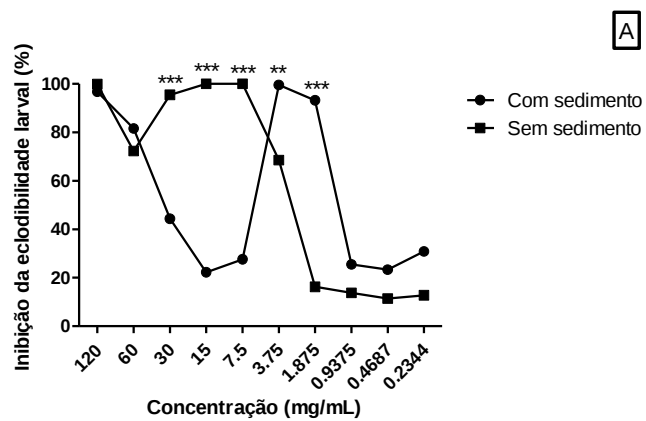


Figura 2. Inibição da eclodibilidade larval de extratos de *T. serratifolia* (A), *S. occidentalis* (B) e *T. formosa* (C) em ensaios de avaliação da influência do precipitado formado durante o período de contato entre ovos e extratos. *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$).