MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

ATIVIDADE *IN VITRO* DE *Carapa guianensis* Aublet, *Copaifera officinalis* Jacquin Linnaeus e *Psidium guajava* Linnaeus SOBRE *Haemonchus contortus*

Mestranda: Suellen Alves de Azevedo

Orientador: Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno

BELÉM
2015

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

SUELLEN ALVES DE AZEVEDO

ATIVIDADE *IN VITRO* DE *Carapa guianensis* Aublet, *Copaifera officinalis* Jacquin Linnaeus e *Psidium guajava* Linnaeus SOBRE *Haemonchus contortus*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do grau de Mestre.
Orientador (a): Prof° Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno

BELÉM
2015

A994a Azevedo, Suellen Alves de.

Atividade *in vitro* de *Carapa guianensis* Aublet, *Copaifera officinalis* Jacquin Linnaeus e *Psidium guajava* Linnaeus sobre *Haemonchus contortus*. / Suellen Alves de Azevedo. – Belém - PA, 2015.

p. il.

Orientador (a): Prof. Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) - Universidade Federal Rural da Amazônia.

1. Fitoterapia. 2. Óleo Fixo. 3. Anti-helmíntico. 4. Caprinos. I. Azevedo, Suellen Alves de II. Título.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

SUELLEN ALVES DE AZEVEDO

ATIVIDADE *IN VITRO* DE *Carapa guianensis* Aublet, *Copaifera officinalis* Jacquin Linnaeus e *Psidium guajava* Linnaeus SOBRE *Haemonchus contortus*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno - Orientador
Universidade Federal Rural da Amazônia

_____
Prof. Dr. Rinaldo Batista Viana - 1° Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia

_____
Prof. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro - 2° Examinador
Universidade Federal do Pará

_____
Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses - 3° Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Izalda Alves da Silva e José Jaime de Azevedo, que sempre me apoiaram compartilharam dos meus ideais.

Aos meus irmãos Shirley Alves de Azevedo e Sérgio Alves de Azevedo, pelo exemplo, amizade e ajuda nos momentos difíceis.

A minha avó Auréa por sempre se fazer presente.

Aos meus filhos por todo amor e carinho.

Ao meu querido Alcindo de Carvalho Holanda, namorado, amigo, companheiro de todas as horas, pelo incentivo, companheirismo e paciência. Obrigado por entender a minha ausência, acreditar nos meus sonhos e se fazer presente em todos os momentos de minha vida.

Ao professor Dr. Raimundo Nonato Moraes Benigno, pelo vasto conhecimento, apoio, incentivo, pela paciência e orientação durante todo esse período.

À professora Dra. Claúdia Maria Leal Bevilaqua, pelos ensinamentos, apoio e colaboração na concretização deste trabalho.

Ao professor Dr. Lívio Martins Costa Júnior por acreditar em meu trabalho, agradeço por toda colaboração, e palavras de incentivo.

Aos companheiros do Laboratório de Parasitologia da Universidade Estadual do Ceará, pela amizade e parceria.

Aos companheiros do Laboratório de Parasitologia Animal do Programa de Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, em Chapadinha, Suzana Lopes e Giselle Cutrim pelos ensinamentos, amizade, apoio, agradeço por terem me ajudado no momento em que o trabalho foi árduo.

Ao professor Dr. Carlos Emmerson F. Costa e ao pós-graduando Miguel Braga da UFPA, pelo apoio.

A professora Dra Maria Geovania da Silva Braga, pelos ensinamentos, paciência e incentivo na minha formação.

Agradeço a UFRA pela oportunidade de cursar uma pós-graduação a nível de mestrado.

A UFMA e a UFPA pela parceria.

Gostaria de agradecer a todos os docentes do programa de mestrado pela contribuição na minha formação.

Aos amigos que estiveram presentes comigo durante o curso, nos momentos difíceis e que me incentivaram para realização deste projeto.

Às demais pessoas que não foram citadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.
À CAPES pela concessão da bolsa e ao PROCAD pelo apoio financeiro durante estes dois anos de trabalho.
A todos que contribuíram para essa Vitória.

Dedico esse trabalho

Aos meus pais Izalda e José

Meus irmãos Shirley e Sérgio

Ao meu companheiro Alcindo Holanda

E aos meus filhos.

Adoramos a perfeição, porque não a podemos ter; repugna-la-íamos se a tivéssemos. O perfeito é o desumano porque o humano é imperfeito.

Fernando Pessoa

RESUMO

O parasitismo por *Haemonchus contortus* constitui-se num dos fatores limitantes para a produção de caprinos e ovinos em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais, onde os prejuízos econômicos são mais acentuados. Os estudos de plantas medicinais estão sendo realizados para encontrar um fitoterápico efetivo no controle das populações deste nematóide e assim minimizar os prejuízos na saúde e produção de seus hospedeiros. Desta forma, avaliou-se a atividade anti-helmíntica *in vitro* do óleo fixo da semente de *Carapa guianensis* (andiroba) e *Copaifera officinalis* (copaíba) e do óleo essencial de *Psidium guajava* (goiaba), sobre ovos e larvas de *H. contortus* de caprinos. Foram utilizados testes *in vitro* do óleo das três plantas, avaliando-se a inibição da eclodibilidade dos ovos e do desembainhamento larvar. Para a primeira avaliação, uma alíquota de suspensão de ovos de *H. contortus* foi incubada com os óleos e mantida em estufa BOD a 27 ° C. por 48 horas. O óleo de *C. guianensis* foi o que apresentou melhor resultado, com maior média de inibição de eclodibilidade larvar (54,60%) obtida na maior concentração (20 mg mL^{-1}), que inclusive diferiu das demais concentrações ($p<0,05$). Nesta concentração, os óleos da *C. officinalis* e da *P. guajava* apresentaram um percentual de apenas 6,69 e 10,33% dos ovos. Para a *C. guianensis*, a CE50 encontrada foi de 17,92 (16,92 - 18,93) mg mL^{-1}. Na segunda avaliação, alíquotas de larvas de terceiro estágio foram incubadas com o óleo das plantas e solução de hipoclorito em placas estéreis, observando-se os índices de desembainhamento em intervalos de 20 minutos, finalizando com 60 minutos. Durante as quatro observações (0, 20, 40 e 60 minutos) os percentuais de larvas de *H. contortus* sem bainhas encontrados nas placas tratadas com os óleos, independente da concentração (0,6 mg mL^{-1} e 1,2 mg mL^{-1}), não diferiram daqueles percentuais nos respectivos grupos controles ($p>0,05$), cujos percentuais obtidos no final do experimento (60 minutos) foram 98,09 (*C. guianensis* e *C. guianensis*) e 93,86 (*P. guajava*). Adicionalmente, o óleo de *C. guianensis* foi submetido a análise por cromatografia gasosa, para caracterizar os ácidos graxos presentes na composição, sendo isolados os ácidos palmitoléico, araquídico e behênico que não estão descritos na literatura. *In vitro*, o óleo fixo de *C. guianensis* e *C.officinalis* e o óleo essencial de *P. guajava* não apresentaram índices de inibição da eclodibilidade de ovos e do desembainhamento larvar de *H. contortus* de caprinos.

Palavras-chave: Fitoterapia. Óleo fixo. Anti-helmíntico. Caprinos

ABSTRACT

The parasitism by *Haemonchus contortus* constitutes a limiting factor for the production of goats and sheep in the world, especially in tropical regions, where economic losses are more pronounced. The studies of medicinal plants are being conducted to find an effective herbal medicine in controlling populations of this nematode and so minimize the losses in health and production of their hosts. Thus, we evaluated the anthelmintic activity in vitro of fixed oil of *Carapa guianensis* seed (andiroba) and *Copaifera officinalis* (copaiba) and the essential oil of *Psidium guajava* (goiaba), on eggs and larvae of *H. contortus* goats. The three plants Oil *In vitro* tests were used, evaluating the inhibition hatchability of eggs and larval unsheathing. For the first assessment, *H. contortus* egg suspension rate was incubated with oils and maintained in an environmental chamber at 27 ° C. for 48 hours. *C. guianensis* oil showed the best result, with higher mean inhibition of larval hatchability (54,60 %) obtained in the highest concentration (20 mg mL -1), which also differ from the other concentrations ($p<0,05$). At this concentration, the oils of *C. officinalis* and *P. guajava* showed a percentage of only 6,69 and 10,33 % of the eggs. To *C. guianensis*, EC50 was found to be 17,92 (16,92 - 18,93) mg mL-1 . In the second evaluation of third stage larvae were incubated with aliquots of oil plants and hypochlorite solution into sterile plates observing the unsheathing indices at 20 minute intervals ending with 60 minutes. During the four points (0, 20, 40 and 60 minutes) the percentage of *H. contortus* larvae without sheaths found in the plates treated with oils, independent of concentration (0,6 mg mL^{-1} and 1,2 mg mL^{-1}) did not differ from those percentages in the respective control groups ($p> 0,05$), the percentage obtained at the end of the experiment (60 minutes) was 98,09 (*C. guianensis* and *C. guianensis*) and 93,86 (*P. guajava*). Additionally, *C. guianensis* oil was subjected to gas chromatographic analysis to characterize the fatty acids present in the composition, and the isolated palmitoleic acid, arachidic and behenic that are not described in the literature. *In vitro*, fixed oil of *C. guianensis* and *C.officinalis* and the essential oil of *P. guajava* indices showed no inhibition of hatchability of eggs and larvae of *H. contortus* unsheathing goats.

Keywords: Phytoterapic. Fixed oil. Anthelmintic. Goats

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Adultos de *Haemonchus contortus* no abomaso de ovino da cidade Shooshtar, Iran. 15
Figura 2. Extremidade anterior de *Haemonchus contortus*, mostrando a lanceta dorsal 15
Figura 3. Detalhe depende das espécies, mas o processo de muda ocorre basicamente nesta sequência. (A). Cutícula intacta. (B) Secreção de nova epicutícula e digestão da camada basal. (C) Secreção de nova camada externa e córtex interno, parcial digestão. 17
Figura 4. Larva de terceiro estágio (Aumento 400x), destacando as células intestinais e cutícula que permanece retida após a segunda muda. 18
Figura 5. Desenvolvimento de resistência a anti-helmínticos em ovinos. O ano para resistência relatado indica a publicação da primeira resistência documentada. Em muitos casos existem relatos de suspeita de resistência que antecedem estas datas.. 21
Figura 6. Extração do óleo de copaíba. O óleo escoa pelo orifício 2, quando ambos estão desobstruídos. Ao selar a abertura do orifício 1, cessa-se o escoamento do óleo. 29
Figura 7. Ouriço ovóide com sementes marrons, variando em forma e tamanho. 30
Figura 8. Disposição das folhas, folíolos, brotos e frutos da goiabeira. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenças entre óleos Fixos e Essenciais segundo a Anvisa (1999) 26
Tabela 2. Percentual de eficácia média ± erro padrão do óleo fixo de *Carapa guianensis* na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*. 40
Tabela 3. Percentual da taxa de desembainhamento ± erro padrão do óleo fixo de *Carapa guianensis* na inibição da eliminação cuticular em larvas de *Haemonchus contortus*. 41
Tabela 4. Composição comparativa da composição dos ácidos graxos do óleo fixo de *Carapa guianensis* comparados a Literatura. 41
Tabela 5. Percentual de eficácia média ± erro padrão do óleo fixo de *Copaifera officinalis* na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*. 42
Tabela 6. Percentual da taxa de desembainhamento ± erro padrão do óleo fixo de *Copaifera officinalis* na inibição da eliminação cuticular em larvas de *Haemonchus contortus*. 42
Tabela 7. Percentual de eficácia média ± erro padrão do óleo essencial de *Psidium guajava* na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*. 43
Tabela 8. Percentual da taxa de desembainhamento ± erro padrão do óleo Essencial de *Psidium guajava* na inibição da eliminação cuticular em larvas de *Haemonchus contortus*. 43

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µm	Micrometro
Aubl.	Aublet
BOD	Demanda bioquímica de Oxigênio
CE50	Concentração efetiva a 50%
g	Grama
Jacq.	Jacquin
L1	Larvas de primeiro estágio
Kg	Quilogramas
L.	Linnaeus
L3	Larvas de terceiro estágio
L2	Larvas de segundo estágio
L4	Larvas de quarto estágio
L5	Larvas de quinto estágio
mL	Mililitros
mm	Milimetros
NaCl	Cloreto de Sódio
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
rpm	Rotação por minutos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **12**
2 REVISÃO DE LITERATURA **14**
2.1 *Haemonchus contortus* (RUDOLPHI, 1803) **14**
2.2 Anti-Helmínticos e Resistência Parasitária **19**
2.3 Plantas Medicinais com atividade Anti-helmíntica **21**
2.3.1 Óleos Fixos e Essenciais 26
2.3.2 *Copaifera officinalis* (Jacquin, 1760) Linnaeus, 1762 27
2.3.3 *Carapa guianensis* Aublet, 1775 29
2.3.4 *Psidium guajava* Linnaeus, 1753 31
3 JUSTIFICATIVA **34**
4 HIPOTESE CIENTÍFICA **34**
5. OBJETIVOS **34**
5.1 Objetivo Geral **34**
6 MATERIAL E MÉTODOS **35**
6.1 Locais dos experimentos **35**
6.2 Escolhas das Plantas **35**
6.3 Obtenções de ovos e larvas de *H. contortus* **35**
6.4 Análises *in vitro* **36**
6.3.1 Teste de Eclodibilidade de Ovos (TEO) 36
6.3.2 Teste de Desembainhamento Larvar (TDL) 36
6.5 Análise do óleo de *C. guianensis* por Cromatografia Gasosa **37**
6.6 Análise Estatística **38**
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO **39**
7.1 *Carapa guianensis* **39**
7.2 *Copaifera officinalis* **42**
7.3 *Psidium guajava* **43**
CONCLUSÃO **45**
REFERÊNCIAS **46**

1 INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura desempenha papel importante no perfil socioeconômico da população em áreas tropicais incluindo o nordeste brasileiro, visando a produção sustentada de carne, de leite e seus derivados. A produção de caprinos e ovinos vem aumentando gradativamente, porém esses animais são explorados de forma extensiva e sem o manejo adequado. Dentre os problemas associados a aspectos sanitários, estão as endoparasitoses gastrintestinais que se constituem no principal entrave para a produção de caprinos e ovinos, em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais, onde os prejuízos econômicos são mais acentuados (VIEIRA et al, 1997). Dentre essas parasitoses, ocasionadas por nematoides gastrintestinais, o *Haemonchus contortus* além se ser o mais virulento, é considerado o maior responsável pelo rápido desenvolvimento da resistência em pequenos ruminantes (SANGSTER, 2001).

A utilização de anti-helmínticos como método de controle e redução das perdas de produção é amplamente difundido. Entretanto o uso inadequado e contínuo destes fármacos favorece o desenvolvimento de populações resistentes, sendo um dos principais problemas enfrentados no controle parasitário (MELO et al., 2003).

De acordo com Vieira (2008), uma das alternativas para minimizar o problema de resistência é a utilização do método estratégico de controle. No Nordeste brasileiro a estratégia mais utilizada, consiste em realizar a medicação nos animais quando as condições climáticas são desfavoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência dos nematoides no ambiente, e se aplicada com base em conhecimentos sobre as condições que interferem no desenvolvimento dos nematoides, pode diminuir a frequência da utilização desses produtos químicos. Medicações adicionais são recomendadas em determinadas circunstâncias devendo ser efetuada com produtos que atuem sobre adultos e larvas, porém, quando utilizados a longo prazo, favorece a sobrevivência de parasitos resistentes. Esta forma indevida de aplicação do medicamento, também aumenta os custos de produção e agrega resíduos nos produtos e subprodutos que fazem parte da cadeia produtiva dos animais (VIEIRA et al., 1997; TORRES-ACOSTA).

Na busca de controlar os parasitos associados a verminose gastrintestinal de ruminantes e minimizar alguns desses problemas, a utilização de plantas medicinais surge como uma alternativa viável, oferecendo como vantagem a facilidade de acesso e compatibilidade cultural (COSTA et al., 2008). Esses vegetais são uma fonte botânica rica em substâncias com

efeito anti-helmíntico, antibacteriano e inseticida, sendo amplamente reconhecidas como método no tratamento de enfermidades (AKHTAR et al., 2000). Apesar desta vasta aplicabilidade, os estudos visando determinar seus constituintes químicos e compostos ativos que confirmem a sua eficácia como medicamento semelhante ao dos anti-helmínticos comerciais, ainda são escassos (EGUALE et al., 2007).

Ressalta-se que o correto aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados como forma alternativa devem passar por uma validação de pesquisa científica, envolvendo vários testes que visam confirmar a eficácia e determinar a segurança de sua utilização em organismos vivos (RATES, 2001).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Haemonchus contortus* (RUDOLPHI, 1803)

Este nematóide apresenta a seguinte posição taxonômica:

Reino Animalia; Filo Nemathelminthes; Classe Secernentea; Ordem Strongylida; Subordem Trichostrongylina; Superfamília Trichostrongyloidea; Família Haemonchidae; Subfamília Haemonchinae; Gênero *Haemonchus*; Espécie *H. contortus* (URQUHART et al. 2001; KASSAI, 2002).

O gênero *Haemonchus* originou-se aparentemente da África, com uma diversificação inicial em antílopes e subsequente colonização em outros ruminantes selvagens e, naturalmente desenvolveram colonizações independentes em ruminantes domésticos. Sua expansão para outros continentes ocorreu em função das migrações realizadas pelo homem (LICHTENFELS et al., 1994; ACHI et al., 2003; HOBER et al., 2004).

Está entre os grupos de parasitos que mais infectam pequenos ruminantes, evoluindo de forma direta e em geral não-migratório, apresentando como forma infectante a larva de terceiro estágio (L3). É um parasito gastrintestinal presente no abomaso, hematófago, e apontado como o maior causador de problemas à saúde dos ruminantes (URQUHART et al., 1996), tornando se uma espécie dominante em termos de intensidade de infecção (ACHI et al., 2003), uma vez que os animais parasitados se mostram altamente susceptíveis, estabelecendo infecções com elevadas cargas parasitárias e consequentemente eliminação de milhares de ovos para o meio ambiente (JACQUIET et al., 1998).

Apresenta formato cilíndrico, com uma aparência avermelhada devido ao seu hábito alimentar hematófago (Figura 1). A fêmea é mais longa (18 a 30 mm) do que o macho (10 a 20 mm). Sua aparência bicolor é conferida pelo branco de seus ovários, que contornam o intestino avermelhado em função de seu comportamento alimentar. (JACQUIET et al., 1998).

Figura 1. Adultos de *Haemonchus contortus* no abomaso de ovino da cidade Shooshtar, Iran. **Fonte:**http://onpasture.com/2013/05/07/are-parasites-a-limiting-factor-in-yourflock/#sthash.HnDt1QCD.dpu.

Na região anterior, machos e fêmeas de *H. contortus* apresentam um par de papilas cervicais e uma estrutura perfurante na cavidade oral, denominada de lanceta (Figura 2) que tem a função de perfurar a mucosa do abomaso, para a sucção de fluídos tissulares. (SANGSTER, 1995).

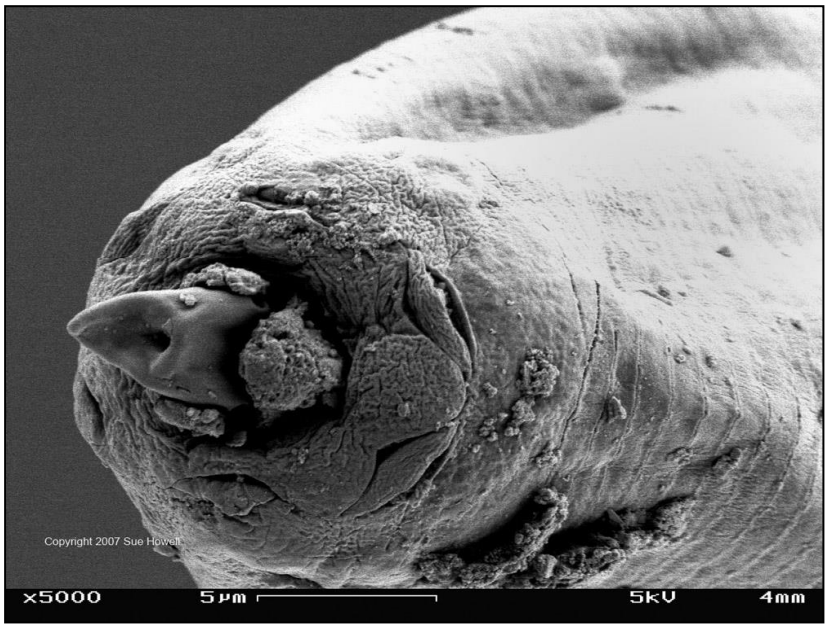

Figura 2. Extremidade anterior de *Haemonchus contortus*, mostrando a lanceta dorsal. Fonte: sciencewatch.com/dr/erf/2008/.../08aprerfKapl.

H. contortus é um parasito que apresenta ciclo biológico do tipo monoxeno que na fase adulta aloja-se no abomaso de pequenos ruminantes e apresentam período pré-patente da infecção de aproximadamente 28 dias. A fêmea realiza postura média de 5.000 ovos por dia (LE JAMBRE, 1995).

Os ovos de nematóides apresentam basicamente três camadas: a interna é uma fina membrana; a mediana que é uma espessa camada de quitina e uma camada externa de proteína (MANSFIELD et al., 1992). A camada interna é responsável pela relativa impermeabilidade da parede dos ovos para compostos polares. A camada média não está presente em uma ou ambas as extremidades dos ovos em muitas espécies, dando origem a um opérculo. A última camada é secretada pela parede do útero da fêmea (LEE, 1965; GAUGLER et al., 2004; TAYLOR et al., 2010).

No desenvolvimento embrionário, a proteólise é um processo metabólico essencialmente necessário para o processamento de proteínas. As proteases de cisteína que estão presentes na fase embrionária e larval de parasitos sugerem que estas moléculas podem funcionar em aspectos relacionados não só ao desenvolvimento de parasitismo e nutricional, mas também para o desenvolvimento embrionário e larvar (HASHMI et al., 2002).

Durante a evolução ocorrem alterações na membrana do ovo a fim de permitir a liberação da larva. Em geral, o processo de eclosão é iniciado por um sinal apropriado, o qual pode ser fornecido pelo hospedeiro ou pelo ambiente. Em Nematoda, a eclosão é iniciada por estímulos ambientais que levam à liberação, pelo embrião, das denominadas enzimas da eclosão. A inibição de algumas destas enzimas causa redução na taxa de eclosão ou em inibição total do processo (SOMMERVILLE et al., 1987).

Inibidores de protease em plantas muitas vezes se acumulam em tecidos de armazenamento, tais como sementes e tubérculos, uma característica comum de todos estes inibidores é que são pequenos e exibem uma estabilidade global que ajuda a minimizar a perda de entropia quando o inibidor se liga à enzima (BATEMAN et al., 2011). Portanto, a inibição da protease pode ser outra estratégia para controlar os parasitos.

A muda é um processo em que a larva perde a sua cutícula e torna-se um novo estágio larval (Figura 3). A cutícula em si é uma estrutura complexa: apresenta três camadas principais, com colágeno em cada um e uma epicutícula. A fase L3 (larva de terceiro estágio) não muda, mas sua cutícula continua a crescer conforme o parasita cresce. Em *H. contortus*, os estágios L1 e L2 alimentam-se das bactérias presentes nas fezes do hospedeiro. A cutícula da larva L3 é um remanescente da cutícula do L2. A larva L3 é totalmente envolta na bainha da

L2, com os orifícios de poro excretor, oral e anal sendo completamente fechados, impedindo a alimentação (SOMMERVILLE e ROGERS, 1987).

O estímulo para o início do desembainhamento da L3, que determina a fase inicial da infecção parasitária, é o contato das larvas com uma solução de pH mais alto ou mais baixo. Dentre diversos fatores, o microclima do rúmen (pH e temperatura) e as concentrações de dióxido de carbono diluído ativam as células neurosecretoras das L3, desencadeando a liberação de enzimas e o início do processo de desembainhamento (SOMMERVILLE e ROGERS, 1987).

Para *H. contortus* nenhuma enzima do hospedeiro é necessária para o desembainhamento. Tudo é dependente de enzimas do parasito. Segundo Sommerville e Rogers (1957), a maioria das larvas perde a bainha após 60 minutos. A persistência da larva no rúmen não aumenta sua sobrevida, podendo ser um fator que diminui as chances de estabelecimento da infecção (ROGERS et al., 1962; LEE,1965; ANDERSON, 1992; RUPPERT e BARNES, 1996).

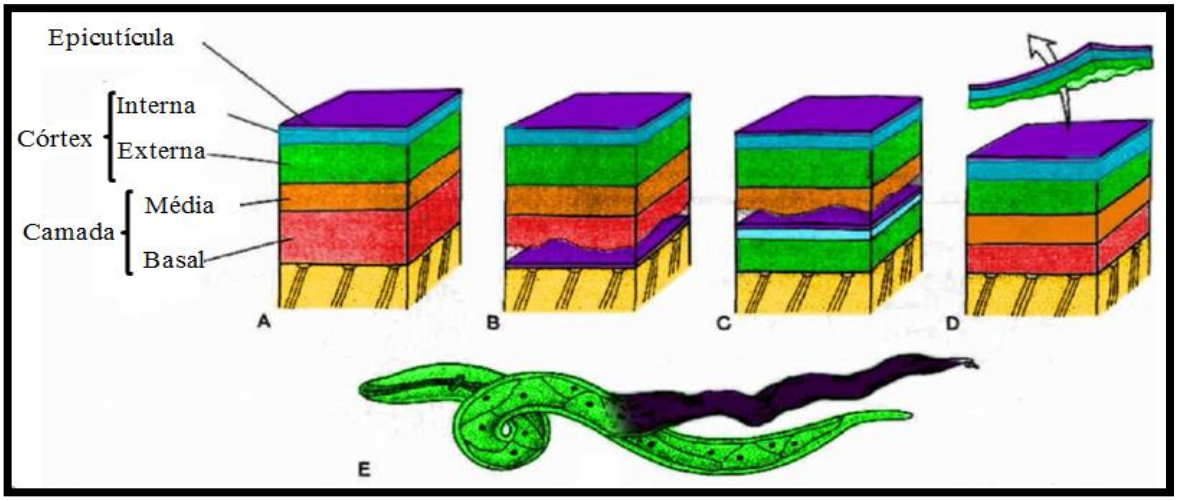

Figura 3. Detalhe depende das espécies, mas o processo de muda ocorre basicamente nesta sequência. (A). Cutícula intacta. (B) Secreção de nova epicutícula e digestão da camada basal. (C) Secreção de nova camada externa e córtex interno, parcial digestão. **Fonte:** Ruppert e Barnes (1996).

A L3 é revestida por duas cutículas: a primeira que foi sintetizada antes da segunda muda e que permanece aderida ao corpo da larva e a segunda que é retida envolvendo-a (Figura 4). Entre as duas cutículas há um espaço que é preenchido por um líquido, rico em glicoproteínas, ao qual é atribuída função lubrificante, impedindo assim a abrasão entre as cutículas (BIRD, 1990).

Essa dupla cutícula confere a L3 proteção e resistência as condições ambientais, sendo que em temperaturas elevadas há um aumento das taxas metabólicas, ocorrendo um

grande gasto de reservas energéticas, diminuindo a expectativa de vida das L3 no pasto, que para O'Conor et al. (2006) será de apenas nove dias em temperatura de 28º C para a espécie *H. contortus*.

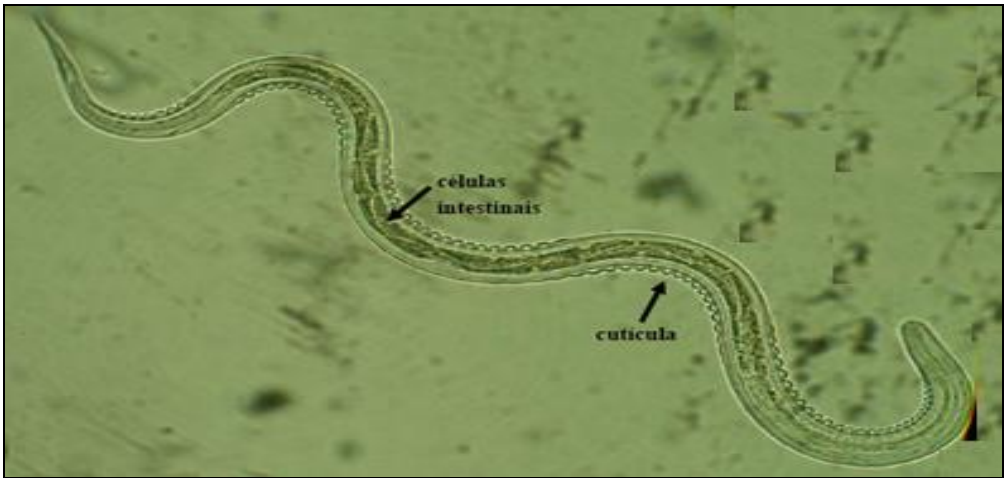

Figura 4. Larva de terceiro estágio (Aumento 400x), destacando as células intestinais e cutícula que permanece retida após a segunda muda. **Fonte:** Carvalho (2012).

Os hospedeiros são infectados pela ingestão das L3 durante o pastejo, as quais perdem a bainha protetora durante a passagem pelo rúmen, evento que pode ser iniciado pelo parasito através da secreção de um fluido do desembainhamento e por componentes de sistema do tampão bicarbonato ruminal (GAMBLE et al., 1989). A L3 de *H. contortus* então penetra na parede do abomaso e dentro de 1 a 4 dias muda para a próxima fase larval (L4).

Alguns estudos *in vitro*, como o teste de desembainhamento larvar artificial com plantas taniniferas, confirmaram que extratos ou óleos de plantas reduzem o estabelecimento larvar ao afetar a eliminação natural da bainha, ou a associação dessas larvas com a mucosa. Acredita se que o estabelecimento larvar, pode ser prejudicado por uma falha no desembainhamento causada pela presença de taninos no trato digestório do hospedeiro (BRUNET; HOSTE, 2006).

A larva de quarto estágio (L4) permanece na mucosa por cerca de 7 a 11 dias e retorna ao lúmen do órgão para evoluir para estágio adulto imaturo, a larva de quinto estágio (L5), até a completa a maturação sexual (RAHMAN e COLLINS, 1990). O período pré-patente é cerca de três semanas em ovinos quando as condições internas e externas são favoráveis. Caso contrário, a L4 pode entrar numa fase temporária de inibição evolutiva ou hipobiose (REINECKE et al., 1989; URQUHART et al., 1996; MILLER et al., 1998; WALLER et al., 2004).

2.2 Anti-Helmínticos e Resistência Parasitária

A dificuldade de realizar um controle efetivo de nematóides gastrintestinais e a alta prevalência desses parasitos demonstra importância devido aos prejuízos causados a produção animal. O uso intensivo de anti-helmínticos nas últimas décadas, pertencentes a classe dos benzimidazóis, das tetrahidropirimidinas (levamisole) e das lactonas macrocíclicas demonstrou efeitos na seleção e propagação de parasitos resistentes (MOLENTO; PRICHARD, 2001).

A classe dos benzimidazóis é composta por anti-helmínticos de amplo espectro que causam alterações ultraestruturais em células intestinais de nematóides por afetar a estrutura do citoesqueleto. O citoesqueleto é composto por microtúbulos, que são polímeros da proteína tubulinas, alfa e beta tubulina. Microtúbulos existem em um estado dinâmico estável, com um equilíbrio entre a montagem e desmontagem das subunidades de tubulina solúvel. Benzimidazóis ligam irreversivelmente a tubulina beta, que faz com que mude seu estado, destruindo os microtúbulos (LACEY, 1988). Esta destruição, eventualmente, leva à morte dos ovos, já que os microtúbulos desempenham um papel crucial em processos celulares (KÖHLER, 2011).

Em nível celular, benzimidazóis inibem o transporte de vesículas secretoras intestinal pela despolimerização de microtúbulos. Benzimidazóis exibem uma toxicidade altamente seletiva para helmintos, apesar do alvo da tubulina beta, que é uma proteína que também pode ser encontrada em hospedeiros mamíferos. Acredita-se que esta toxicidade seletiva é devido a ligação muito mais forte e irreversível entre a droga e a tubulina beta dos helmintos, em comparação com a tubulina beta de mamíferos (LACEY, 1988).

Os tetrahidropirimidinas/imidotiazóis, que inclui o levamisol, agem sobre o sistema nervoso do parasito. As células musculares de superfície dos nematoides possuem receptores nicotínicos de acetilcolina, e estes podem ser abertos por anti-helmínticos nicotínicos como tetrahidropirimidinas/imidotiazóis. A ligação das drogas aos receptores produz despolarização, causando a paralisia espástica muscular do nematóide, o que facilita a eliminação do parasito (MARTIN, 1996). Seu índice terapêutico é relativamente baixo e atua somente contra nematoides, sendo que o levamisol tem boa atividade contra adultos e estádios larvares em desenvolvimento, mas não contra larvas em hipobiose, contrastando com os benzimidazóis, não são ovicidas. (BOGAN; ARMOUR, 1987).

As lactonas macrocíclicas são fármacos classificados como endectocidas e incluem a avermectina e o milbemicina. A ivermectina é talvez a mais conhecida desta classe de fármacos, já que é usada para tratar a oncocercose em humanos. Possuem alta afinidade a canais

de cloro com glutamato que ocorrem nas células nervosas e musculares dos invertebrados, mas ausente nos vertebrados, causando um aumento na permeabilidade da membrana celular para íons cloreto com a hiperpolarização da célula nervosa ou muscular. A hiperpolarização resulta em paralisia e morte do parasito, tanto de forma direta ou pela incapacidade de alimentação em função da paralisia da faringe que é responsável pelo bombeamento do alimento, ocasionando a morte por desnutrição (VASSILATIS et al., 1997; MARTIN, 1997; MARTIN et al., 1997; PAIEMENT et al.,1999). São ativos contra adultos, estádios imaturos e larvas hipobióticas (BOGAN; ARMOUR, 1987).

Nos últimos anos, o problema da resistência ao anti-helmíntico atingiu novos patamares, onde já não pode ser ignorada como uma questão importante no controle de parasitos do gado. Em muitas partes do mundo, múltiplos parasitos são altamente prevalentes e já não é raro encontrar criações de ovelha ou cabra onde a resistência parasitária existe para todos os medicamentos anti-helmínticos disponíveis (HOWELL et al., 2008; CEZAR et al, 2010; da CRUZ et al, 2010).

O primeiro relato sobre resistência a anti-helmínticos no Brasil foi descrito por Dos Santos e Gonçalves (1967). No sul do Brasil, foi detectada resistência no Paraná (CUNHA; FILHO, 1999), e no Rio Grande do Sul (ECHEVARRIA; TRINDADE, 1989). No Sudeste, em São Paulo (FARIAS et al., 1997). No Nordeste, foi detectada resistência primeiramente em caprinos no Ceará (VIEIRA et al., 1989). No Ceará, em caprinos e ovinos (BEVILAQUA; MELO, 1999; MELO, 2001). Ainda no Ceará, foi observada a presença de *H. contortus* resistente em ovinos provenientes do sul do Brasil (VIEIRA et al., 1992).

Os mecanismos de resistência podem ser específicos ou inespecíficos. Os mecanismos específicos estão associados à ação da droga anti-helmíntica, enquanto os inespecíficos referem-se as alterações no receptor ou na modulação da concentração do fármaco (WOLSTENHOLME et al., 2004).

A resistência anti-helmíntica é definida como a capacidade de uma população de parasitas em sobreviver a doses de um agente seletivo que nesse caso são os anti-helmínticos que poderiam ser letais para populações susceptíveis (VIEIRA, 2008). A grande frequência de tratamentos seleciona organismos para resistência diminuindo a vida útil do fármaco. Os nematódeos que sobreviverem a esse tratamento apresentam características biológicas, ou efeitos de mutações que os tornam resistentes aos efeitos tóxicos das drogas (PRICHARD, 1990). Existem vários fatores genéticos que podem levar a resistência como: diversidade genética da população, adaptabilidade dos organismos resistentes, recombinação gênica (SANGSTER, 2001; COLES, 2005).

A resistência apresenta três componentes: estabelecimento, desenvolvimento e dispersão. O estabelecimento da resistência é amplamente influenciado pelo tamanho e diversidade da população e a taxa de mutação do gene envolvido (SUTHERST; COMINS, 1979). Uma consequência inevitável do uso de anti-helmínticos é o desenvolvimento de resistência (WALLER, 1993), pois considera-se uma consequência evolucionária devido ao uso do agente seletivo e a intensidade da seleção determina a rapidez com que se desenvolve e quanto mais elevados são estes fatores, maior será a probabilidade da existência do alelo para a resistência (GEARY et al., 1999).

Resistência anti-helmíntica é extremamente grave nos nematóides de ovinos e caprinos, já que se relatou resistência para todas as três classes principais de anti-helmínticos. As populações de nematóides parasitos tendem a ser grandes e geneticamente heterogêneas, e esta diversidade é um fator essencial para o parasito evitar a susceptibilidade às drogas. Na verdade, a resistência a compostos anti-helmínticos novos geralmente é descoberta em um tempo não muito distante em relação ao seu lançamento no mercado, conforme ilustrado na Figura 5 (SAMARASINGHE, 2010).

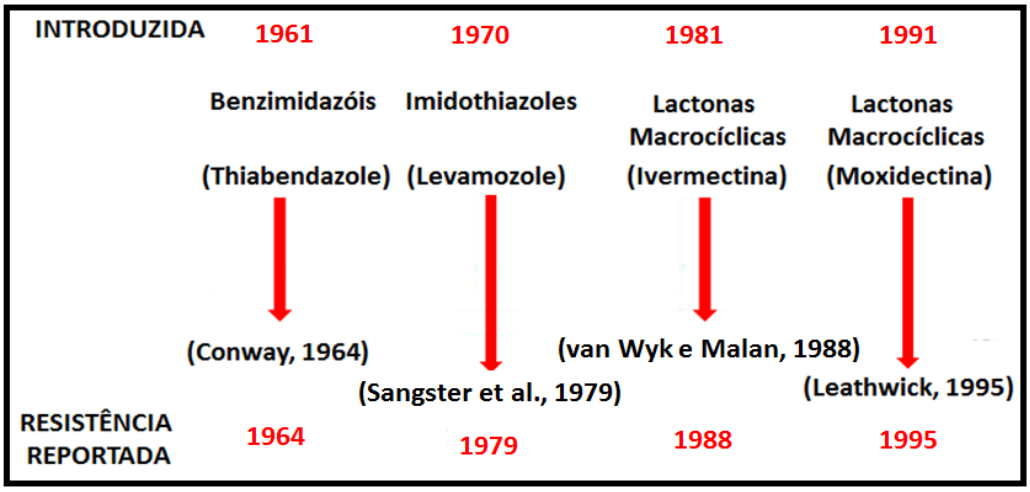

Figura 5. Desenvolvimento de resistência a anti-helmínticos em ovinos. O ano para resistência relatado indica a publicação da primeira resistência documentada. Em muitos casos existem relatos de suspeita de resistência que antecedem estas datas. **Fonte:** Samarasinghe (2010**).**

2.3 Plantas Medicinais com atividade Anti-helmíntica

Desde a Antiguidade há relatos da utilização de plantas com finalidade medicinal. Durante o período da revolução Industrial e com avanço da química na produção de fármacos

sintéticos, a partir de então, houve uma diminuição no estudo e utilização de plantas como medicamento natural. Devido a resistência, alto custo, ineficácia de medicamentos, houve uma revalorização da medicina alternativa para a cura de doenças (MAKKAR et al., 2007).

A planta para ser considerada medicinal tem que conter um ou mais princípios ativos que conferem atividade terapêutica (MARTINS, 1995). No Brasil o uso popular dessas plantas com fins terapêuticos no tratamento de doenças e rituais religiosos, provém de diferentes origens e culturas tradicionais, principalmente de índios brasileiros e seitas afro-brasileiras, e da cultura e tradição africana e europeia (BERG, 1993; CARRARA, 1995; SIMÕES et al., 1998).

A biodiversidade de flora brasileira é bastante diversificada e suas espécies constituem uma de suas maiores riquezas servindo como fonte para obtenção de novas substâncias e compostos químicos para obtenção de metabólitos secundários com finalidade terapêutica (OMENA et al., 2007; DANTAS et al., 2010).

Uma variedade de plantas tem sido utilizada tradicionalmente para tratar doenças parasitárias que acometem os animais de produção. Embora a maioria das evidências da propriedade terapêutica seja baseada em relatos populares, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de investigar e comprovar a atividade anti-helmíntica de plantas (ATHANASIADOU et al., 2004).

Os compostos ativos presentes em plantas podem ser de dois tipos, os metabólitos primários e secundários. Os primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza, encontrados facilmente em sementes e órgãos de armazenamento e são necessários para o desenvolvimento fisiológico, pois participam do metabolismo celular básico. Os secundários são compostos derivados dos metabólitos primários. Frequentemente representam adaptações químicas à pressão ambiental ou defensores químicos contra microrganismos, insetos e predadores superiores (CHAGAS, 2004).

Os metabólitos secundários são os que apresentam compostos mais ativos em relação ao parasitismo gastrintestinal (ATHANASIADOU et al., 2008). Porém são moléculas instáveis cuja atividade depende da estrutura, além das propriedades químicas e físicas. As variações ambientais e sazonais também podem alterar a síntese destes compostos e afetar suas propriedades (ATHANASIADOU et al., 2007). As principais classes de metabólitos secundários são: flavonóides, alcalóides, cumarinas, agliconas, antraquinônicas, triterpenos e/ou esteróides, saponinas, polifenóis e taninos (BAGHESTANI, 1999).

Alguns metabólitos secundários, como os compostos polifenólicos, possuem características potencialmente benéficas na prevenção de doenças e proteção da estabilidade do

genoma, agindo como antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana (SINGH et al., 2003).

Os flavonóides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos dentre outros (MANN, 1987). Eles participam de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DIXON; HARRISON, 1990).

Outro metabólito secundário importante são os alcalóides, substâncias básicas de ocorrência natural em plantas, derivadas de aminoácidos, que possua no mínimo um átomo de nitrogênio em uma estrutura heterocíclica. Vários alcalóides são tóxicos aos insetos e atuam como repelentes para herbívoros (FUMAGALLI et al., 2008).

Os triterpenos que apresentam uma grande diversidade quanto ao esqueleto e funcionalização que é predominantemente oxigenada. Consistem grandemente de compostos cuja estrutura é policíclica podendo ser tetracíclicos ou pentacíclicos que contém no máximo um ou duas ligações duplas respectivamente (OLEA; ROQUE, 1990). Atribui-se a este composto cerca de 90% dos efeitos letais causados nos insetos, e algumas substâncias da classe, como azadiractina, mostrou-se eficaz na inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus* (PESSOA et al., 2001).

Entretanto, o grupo mais abrangente é o dos polifenóis, que compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância. Os compostos polifenolólicos mais encontrados em plantas são os taninos, que apresentam efeitos antiparasitários, sendo que a sua ausência na forma hidrolisável nas leguminosas forrageiras, despertou a atenção para o papel antiparasitário dos taninos condensados (HOSTE et al., 2006).

Os taninos hidrolisáveis estão presentes em folhas de árvores e arbustos lenhosos de regiões tropicais. São polímeros constituídos por um carboidrato central, como a D-glucose, com os grupos hidroxila esterificados pelo ácido gálico ou elágico (MIN et al., 2003). Os taninos hidrolisáveis em ruminantes podem ser degradados pelos microorganismos ruminais e originar compostos potencialmente tóxicos. Provavelmente, a toxicidade é causada pela absorção dos produtos da degradação e alta concentração de fenóis no sangue, que é maior do que a capacidade de detoxificação do fígado (MAKKAR et al., 2007).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são mais comumente encontrados em leguminosas forrageiras, árvores e arbustos (MIN et al., 2003). São polímeros formados por unidades de flavan-3-ol (catequina) ou flavan-3,4-diol (epicatequina) unidas por ligações

carbono-carbono, não suscetíveis à degradação enzimática anaeróbica. São relativamente estáveis no trato digestório dos ruminantes e raramente tóxicos. Procianidinas e prodelfinidinas são as duas principais classes desses taninos (WAGHORN, 2008).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas a fim de verificar, quantificar e validar o efeito dos taninos sobre o parasitismo animal. A atividade anti-helmíntica *in vitro* é avaliada sobre ovos, larvas (L1 e L3) e adultos, demonstrando efeitos como inibição de eclosão, desenvolvimento, motilidade e desembainhamento larvar e mortalidade de adultos (HOSTE et al., 2006).

Dentre os trabalhos realizados utilizando plantas ricas em taninos, no controle de vários estágios de nematóides de ovinos e caprinos, alguns experimentos *in vitro*, podem ser mencionados, como Athanasiadou et al. (2001), ao utilizar a planta *Schinopsis* spp. em teste de migração larvar; Monteiro (2010), em teste de desembainhamento larvar, ao utilizar o extrato de *Jatropha curcas*; Alonso-Díaz et al. (2008), utilizando a planta *Leucaena leucocephala* nos testes de migração larvar e desembainhamento larvar; Molan et al. (2002), testando *Hedysarum coronarium*, em eclodibilidade de ovos e desenvolvimento larvar.

Quanto aos mecanismos de ação dos taninos condensados em nematóides, foram desenvolvidas duas teorias baseadas na sua capacidade de complexação de proteínas. A primeira é de que exista um efeito direto em larvas e adultos, através da ligação direta com a cutícula do parasito que é rica em prolina e hidroxiprolina e alteram suas propriedades físicas e químicas (ATHANASIADOU et al., 2000; HOSTE et al., 2006).

A segunda sugere que a atividade anti-helmíntica dos taninos condensados está relacionada ao efeito indireto, aumentando a resposta imune de pequenos ruminantes contra parasitos, pois estes compostos formam complexos com as proteínas, impedindo sua degradação durante o trânsito ruminal, e consequentemente maior disponibilidade no intestino delgado e no plasma sangúineo na presença de surfactantes endógenos intestinais, favorecendo a condição orgânica dos animais tratados, inclusive aumentando a resiliência daqueles infectados por nematóides gastrintestinais (ATHANASIADOU et al., 2000; ATHANASIADOU et al., 2001; WAGHORN & McNABB, 2003; HOSTE et al., 2006).

As pesquisas visando alternativas de controle de nematóides são bastante intensificadas devido a problemas associados à resistência aos produtos sintéticos comerciais utilizados na produção animal. A validação de plantas usadas em práticas etnoveterinárias, quando comprovadas eficientes, pode auxiliar em problemas encontrados atualmente na medicina veterinária convencional (ELOFF et al., 2010).

Alguns estudos sobre a validação de plantas medicinais utilizadas no controle de helmintos já vêm sendo realizados. No Brasil, Oliveira et al. (1997) observaram a redução da carga parasitária por nematóides gastrintestinais em caprinos que receberam, diariamente, folhas de bananeiras por um período de 25 dias, quando comparados com o grupo controle. A eficácia da folha de bananeira foi de 57,1% para *H. contortus* e 70,4% para *Oesophagostomum* sp.

A planta *Croton zehntneri* demonstrou atividade ovicida *in vitro* satisfatória sobre *H. contortus* na concentração 0,25 µg.mL^{-1} (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007).

Michellin et al. (2005) avaliaram o extrato de *Artemisia absinthium*, conhecida popularmente como losna, onde a mesma, apresentou índice superior a 50% de eficácia anti-helmíntica em camundongos. O *Syzygium cuminii* L (Jambolão) e a *Punica granatum* L (romã) nesse estudo, também revelaram bons índices de eliminação parasitária.

Monteiro et al. (2011) coletaram 55 plantas, distribuídas em 48 gêneros e 34 famílias, que foram indicadas pelos moradores da ilha de Marajó no Pará para 21 diferentes usos medicinais em animais domésticos. Dentre essas a *Jatropha curcas* L. foi uma das plantas com maior valor de uso, e foi selecionada para validação da sua ação anti-helmíntica. O extrato etanólico obtido de sementes de *J. curcas* demonstrou efeito ovicida inibindo em 99,8% a eclosão de larvas na concentração de 50 mg mL^{-1}.

Em (2005), Almeida avaliou a eficácia das plantas, *Momordica charantia* (melão de são Caetano), *Operculina hamiltonii* (batata de purga) e *Curcubita pepo* L (jerimum). Sementes de jerimum e dos extratos alcoólicos do melão de são Caetano e da batata de purga; e do óleo essencial da *Calotropis procera* (flor de seda) sobre infecções helmínticas naturais de caprinos, os resultados encontrados indicaram que as plantas e os extratos estudados, podem ser utilizadas como alternativa no controle de helmintoses gastrintestinais de caprinos, promovendo assim, um controle ecologicamente viável.

Em um estudo sobre a avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* (OEEC), *Eucalyptus staigeriana* (OEES) e *Eucalyptus globulus* (OEEG) sobre nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes, demonstrou que as concentrações efetivas sobre ovos e larvas foram 10,6 e 2,65 mg mL^{-1}; 5,4 e 2,7 mg mL^{-1} e 43,5 e 21,75 mg mL^{-1}, para OEEC, OEES e OEEG, respectivamente (MACEDO, 2009).

2.3.1 Óleos Fixos e Essenciais

Óleos fixos são produtos obtidos de espécies vegetais, constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos, podem conter quantidades de fosfolipídios, ácidos graxos livres, são susceptíveis a decomposição e volatilização durante as etapas de processamento (CMOLIK et al., 1995). Já os óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetais obtidos por processo físico, destilação por arraste a vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado (ANVISA, 1999).

Os constituintes dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades. São extremamente concentrados (1 gota de óleo essencial equivale a cerca de 20 xícaras de chá) e guardam as substâncias que dão a planta as principais propriedades terapêuticas, ou seja, as propriedades capazes de curar doenças (SIMÕES; SPITZER, 2004). A Tabela 1 mostra as principais diferenças entre os óleos fixos e essenciais.

Tabela 1. Diferenças entre óleos Fixos e Essenciais segundo a Anvisa (1999)

ÓLEO FIXO	ÓLEO ESSENCIAL
Contém lipídeos (gorduras/ácidos graxos).	Não contem lipídeos.
Obtidos a partir de prensagem a frio de sementes de plantas oleaginosas.	Extraídos por destilação a vapor, compressão dos frutos, ou extração com uso de solventes.
Ricos em vitaminas, ácidos graxos proteínas e sais minerais.	Apresentam como compostos desde terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, cada qual com sua característica aromática e ação bioquímica.
Podem ser utilizados puros.	Devem ser diluídos em outros veículos, pois são muito concentrados.
Não são solúveis em álcool.	São solúveis em álcool.
Podem ser ingeridos, com algumas exceções.	Não devem ser ingeridos, são recomendados para uso externo.

A hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleuragem, gases supercríticos e micro-ondas, são alguns métodos utilizados para extração do óleo essencial.

Sendo que, o de maior aplicação é o de hidrodestilação que se divide em duas técnicas – arraste a vapor (CRAVEIRO et al., 1981) e coobação (SANTOS et al., 1998).

Para a hidrodestilação o material fica em contato direto com a água, e quando esta entra em ebulição, arrasta os compostos voláteis, forma uma mistura heterogênea, com duas fases, devido à diferença de polaridade e densidade entre a água e o óleo, e depois ocorre a coobação (recirculação de águas condensadas) (SILVA et al. 2010).

2.3.2 *Copaifera officinalis* (Jacquin, 1760) Linnaeus, 1762

Copaifera officinalis é uma árvore comum da América Latina e África Ocidental (FRANCISCO, 2005), sendo encontradas, no Brasil, nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica. Descrita por Nikolaus Joseph von Jacquin e publicada por Cad von Linnaeus. A planta pode atingir uma altura entre 25 e 40 metros (ARAÚJO JÚNIOR et al., 2005), possui casca aromática, folhagem densa, flores pequenas e frutos secos, do tipo vagem. As sementes são pretas e ovóides com um arilo amarelo rico em lipídeos (LORENZI, 1992).

Possuem características de arbustos ou árvores; com tronco cilíndrico, anéis circulares ao longo do tronco. Canais secretores intercelulares, axiais, dispostos em faixas de parênquima axial marginal, concêntricas, no tronco. Folhas alternas, paripinadas; folíolos, opostos, alternos ou subopostos, inteiros. Flores com pétalas ausentes, sésseis ou subsésseis, alvas, cálice tetrâmero formando tubo curto, com pequeno disco; sépalas variando em largura: androceu com 10 estames livres, intercalados na margem do disco, filetes; anteras oblongas. Gineceu com ovário comprimido lateralmente, óvulos alongados, superpostos; estilete filiforme; estigma terminal. Frutos, legumes estipitados; semente, pêndula, oblongo-globosa, coberta por arilo branco ou amarelo, endosperma ausente (MARTINS-DA-SILVA et al., 2008).

Quanto ao óleo de Copaíba, o mesmo provém de canais esquizolizígeos, que são secretores, localizados em todas as partes da árvore (Figura 6). Os mesmos são formados pela dilatação de espaços intercelulares. O lenho é a parte da planta que mais apresenta essa característica saliente, onde os canais longitudinais, distribuídos em faixas concêntricas, nas camadas de crescimento demarcadas pelo parênquima terminal que se reúnem com traçados irregulares em camadas lenhosas muitas vezes sem se comunicarem (ALENCAR, 1982). A secreção ocorre de forma natural e espontânea, e funciona como mecanismo de defesa contra insetos, fungos e bactérias.

É uma substância natural composta de uma parte sólida resinosa não volátil, formada por ácidos diterpênicos (VEIGA JUNIOR et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006). De

acordo com alguns estudos estes diterpenos podem ser ácidos hardwíckico, colavenol, ácido copaífero, ácido copaiferólico, ácido calavênico, ácido patagônico, ácido copálico (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). A concentração de diterpenos pode variar de acordo com extração, período do ano, espécie, fatores abióticos e biológicos (CASCON; GILBERT, 2000).

Alguns compostos encontrados em óleos de copaíba apresentam aromas marcantes, sendo utilizados pela indústria de perfumes, entre os sesquiterpenos que foram encontrados o α-copaeno, β-cariofileno, β-bisaboleno, α e β-selineno, α-humuleno e o δ e γ-cadineno foram descritos em grande parte dos óleos estudados (HARBORNE; BAXTER, 1983).

No trabalho de Djerassi e Nakano (1961) os principais diterpenos observados foram da classe dos labdano, caurano e clerodano, sendo que a *C. officinalis* apresenta mais constituintes da classe dos clerodano. O ácido copálico é o mais encontrado em todos os óleos de copaíba já estudados, o ácido hardwiickico, em 42% dos óleos, e o ácido caurenóico encontrado em cerca de 30 %. A principal função atribuida a esses compostos está relacionada a ação antimicrobiana (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

O óleo tem sido utilizado extensivamente, com diversas funções. Em alguns lugares do norte do Brasil, caboclos fazem uso do mesmo, como combustível na iluminação pública (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Na medicina popular, vem sendo utilizado há vários anos, e tem sua finalidade terapêutica comprovada em diversas doenças, mais estudos sobre seus constituintes vêm sendo elaborados visando novas comprovações. Entre as atividades fitoterápicas comprovadas, estão a ação anti-inflamatória, antibacteriana, anti-fúngica, devido a ação do β-cariofileno, β -bisaboleno, cicatrizante, anti-tumoral, antisséptico, germicida, analgésico (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002), ação contra sífilis (PACHECO et al., 2006), leishmaniose, como antitetânico, antiblenorrágico, antileucorréico e cercaricida (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2006).

Figura 6. Extração do óleo de copaíba. O óleo escoa pelo orifício 2, quando ambos estão desobstruídos. Ao selar a abertura do orifício 1, cessa-se o escoamento do óleo. **Fonte:** Veiga Júnior et al. (2002).

2.3.3 *Carapa guianensis* Aublet, 1775

A *Carapa guianensis*, pertece a família Meliaceae e foi descrita pela primeira vez pelo botânico francês Jean-Baptiste Christopher Fuseé Aublet em 1775, na Guiana francesa. Esta espécie é também conhecida popularmente com carapinha, landirova, angirova e andirova. Ocorre no norte da América do Sul, Antilhas, América Central, África Tropical (CAVALCANTE, 1991). No Brasil ocorre em toda Bacia Amazônica, nas várzeas, nas áreas alagáveis e áreas de terra firme (FERRAZ et al, 2002). Sendo encontrada com maior frequência nos Estados do Amapá, Pará, Acre, Amazonas e Maranhão (CAVALCANTE, 1991).

A árvore é de grande porte, podendo atingir 30 metros de altura, possui nela uma casca cinzenta que se desprende facilmente em grandes placas, a copa é bastante ramosa e de tamanho médio. As folhas são compostas, grandes e escuras, de crescimento apical, sem estípulas. Já as flores são de coloração branca, levemente perfumada, pequena, surgem no período chuvoso, em inflorescências paniculadas terminais ou nas axilas superiores, hermafroditas. Sépalas e pétalas livres. Fruto drupa, baga ou capsular loculicida ou baciforme, que aparecem no período de março a abril, que quando maduros caem no solo e liberam as sementes. Sementes com arilo ou aladas, presas à columela. Estão presentes em um ouriço ovoide, cada fruto pode conter de 1 a 16 sementes (Figura 7) (JOLY, 1987; CAVALCANTE, 1991; BARROSO, 1991; LORENZI, 1992; MUELLNER et al., 2003).

As sementes apresentam cor marrom, há uma grande variação de forma e tamanho; foram encontradas sementes pesando entre 1 e 70g e medindo entre 1 e 6cm de comprimento (FERRAZ, 2002). Estas sementes liberam um óleo amargo, espesso de coloração amarela, sabor amargo e em temperaturas inferiores a 25ºC, solidifica-se. Uma andirobeira pode produzir de 180 a 200 Kg de sementes/ano que contem aproximadamente 60% do óleo em massa (SILVA, 2012). O óleo é muito utilizado para iluminação, na indústria farmacêutica e cosmética, na produção de sabão.

Segundo Farias (2012) os principais ácidos graxos encontrados no óleo da andiroba é o ácido mirístico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico. Além de uma fração insaponificável (2 a 5%) constituída principalmente, de substâncias amargas, chamadas meliacinas ou limonóides, que provavelmente são responsáveis pela atividade biológica do óleo (AMBROZIM et al., 2006).

Em estudos anteriores já foram isolados deste óleo sete limonóides: β hidroxiazadiradiona, 6α-acetoxi-gedunina, 7-deacetoxi-7-oxogedunia, deacetilgedunina, andirobina, gedunina, metil-angolesato (AMBROZIN et al., 2006). Os limonóides encontrados são tetranortriterpenóides altamente oxigenados com polaridade moderada, insolúvel em água, todavia solúvel em hidrocarbonetos, álcool e acetona (MOHAMAD et al., 2009).

Figura 8. Ouriço ovóide com sementes marrons, variando em forma e tamanho. **Fonte:** www.idam.am.gov.br

O óleo é muito utilizado na medicina popular da região norte do Brasil como febrífugo, antirreumático, antinflamatório, antibacteriano e repelente de insetos (NEVES et al., 2004). Em estudos científicos, o óleo de andiroba apresentou atividade inseticida frente ao *Aedes aegypti*, com propriedades repelentes, atividade antimalárica em testes com *Plasmodium falciparum*, atividade vermicida, atividade antialérgica, analgésica e anti-inflamatória (SILVA et al., 2012). Acaricida contra *Rhipicephalus* (*Boophilus) microplus* (CHAGAS et al., 20012). Atividade anti-helmíntica no cultivo de larvas de *Haemonchus* sp., *Oesophagostomum* sp. e *Trichostrongylus* sp. de caprinos e ovinos, apresentando redução no número de larvas totais em todos os tratamentos utilizados (FARIAS et al., 2010). Porém mostrando se inviável na inibição da eclodibilidade de ovos e na migração larvar sobre nematódeos de bovinos (KLOSTER, 2010).

Também não há relatos de toxicidade do óleo da semente de Andiroba, os efeitos do óleo foram investigados sobre variáveis reprodutivas e no desenvolvimento da prole de ratas Wistar. Quatro grupos de fêmeas foram tratados com concentrações de 0,375, 0,75 e 1,5 g/kg ou água durante a gestação. Demonstrando que o óleo não interfere na fertilidade de ratas Wistar e nem no desenvolvimento da prole (COSTA-SILVA, et al, 2006).

2.3.4 *Psidium guajava* Linnaeus, 1753

P. guajava é uma planta rústica, que atinge porte arbustivo ou arbóreo com menos de 10m, é considerada nativa da América tropical, em especial do Brasil e das Antilhas (SILVA, 2010). O tronco é tortuoso, liso e descamante e as folhas se apresentam simples e de textura coriácea, de 8-12 cm de comprimento por 3-6cm de largura (LORENZI, 1992).

O fruto da goiabeira é uma baga, carnosa, casca verde, amarelada ou roxa, possui superfície lisa ou irregular, de cerca de oito centímetros de diâmetro. Diferentes variedades apresentam algumas de polpa rosada, outras brancas ou douradas (GIACOMINO, 2012).

As folhas da goiabeira (Figura 8) possuem um óleo volátil rico em sesquiterpeno, entre eles o bisaboleno, o dietoximetano e dietoxetano, podem ser mencionados como os principais responsáveis pelo aroma dos frutos. Os sesquiterpenos são hidratos de carbono da fórmula química C15H24, formados por três unidades isopreno, C5H8, podendo ser cíclicos ou ramificados. Estes compostos encontram-se em muitas plantas e insetos como agentes de defesa ou feromônio (OLIVEIRA et al., 2012).

Figura 9. Disposição das folhas, folíolos, brotos e frutos da goiabeira.
Fonte: www.uol.com

Infusões ou decoctos preparados com folhas frescas ou desidratadas são indicados para diarréia, disenteria e cólica abdominal. O efeito espasmolítico e antidiarréico está relacionado com o conteúdo dos flavonóides, em particular de derivados da quercetina, que atuam como antagonistas do cálcio nas fibras musculares lisas (MORALES; LOZOYA, 1994).

Contém substâncias capazes de exercer efeito antimicrobiano contra *Staphylococcus*, *Shigella*, *Salmonella, Bacillus*, *Escherichia coli*, *Clostridium*, e *Pseudomonas*, diferentes gêneros de fungos, leveduras (cândida), amebas e *Plasmodium* (TAYLOR, 1984). Almeida et al. (2006), concluiu que o uso indiscrimanado de chás oriundos de folhas verdes, são potencialmente tóxicos e podem causar prejuízos a crianças, gestantes, lactantes, diabéticos, cardíacos e indivíduos que apresentem debilidade metabólica.

Craveiro et al. (1981) caracterizaram e identificaram 21 compostos químicos presentes no óleo essencial da goiaba, dentre estes o α-terpineol, α-humuleno, β-cariofileno e β-guaieno, entre outros. Esses compostos apresentam atividade antimicótica contra *Candida albicans, Candida krusei, Candida parapsilosis* e *Candida stellatoidea* (ALVES et al., 2006). No óleo essencial das folhas da goiabeira já foram identificados os compostos, pineno, limoneno, mentol, acetato de terpenilo, álcool isopropílico, cardineno, curcumeno, quercetina, ácido oleanoico, ácido maslinico e ácido urosolinico, entre outros. Também contém flavonoides, com a maior concentração encontrada na colheita de julho, apresenta de 9 a 10% de taninos nas folhas, e 12 a 30% na casca. São encontrados também compostos como, pentaciclinos, óleos voláteis, ácidos triterpênicos, quercetina e capferol, isoprenóides,

alcaloides, esteroides, atraquinonas e glicosídeos, sendo que, os polifenóis, flavonoides e os taninos os de maior potencial antimicrobiano e anti-helmíntico (AHMED e YAGOUB, 2012; GUTIÈRREZ et al., 2008; SUKHIRTA e GROWTHER, 2012).

Hoste et al. (2006) em estudo da composição química utilizando *P. guajava* isolou taninos da casca, caule e folhas, obtendo efeitos na eclosão de ovos, no desembainhamento e na motilidade de larvas de nematóides em ruminantes.

Em outro estudo sobre a avaliação dos efeitos de extratos metanólicos em *H. contortus*, Sànchez et al. (2013) obtiveram efeitos letais sobre larvas de quarto estágio e em adultos com eficácia significativa na concetração de 50 mg mL^{-1}. Já com óleo essencial, Gonçalves et al. (2000) demonstraram sua alta toxicidade em larvas de segundo estágio.

3 JUSTIFICATIVA

A resistência parasitária aos diversos anti-helmínticos sintéticos requer estudos que busquem alternativas viáveis de controle da hemoncose. Acredita-se que utilização de compostos naturais vegetais, como óleos essenciais, pode ser uma alternativa para controlar o parasitismo, pois apresentam como vantagens um desenvolvimento mais lento da resistência, biodegradabilidade, não causam poluição ambiental, e prolongam a vida útil dos produtos disponíveis no mercado.

4 HIPOTESE CIENTÍFICA

A utilização do óleo fixo de *Carapa guianensis* Aublet. (Andiroba), e *Copaifera officinalis* (Jacquin) Linnaeus (Copaíba Bálsamo), e do óleo essencial de *Psidium guajava* Linnaeus (Goiaba) pode ter ação anti-helmíntica *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

• Analisar a atividade anti-helmíntica *in vitro* de *C. guianensis*, *C. officinalis* e *P. guajava* sobre *H. contortus.*

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar *in vitro* a ação do óleo fixo da semente de *C. guianensis* e *C. officinalis* e do óleo essencial de *P. guajava* sobre ovos e larvas de *H. contortus*.
- Identificar por meio de análise de Cromatografia Gasosa os principais componentes químicos do óleo fixo de *C. guianensis.*

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Locais dos experimentos

Os experimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Parasitologia Animal da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Campus de Ciências Agrárias e Ambientais de Chapadinha-MA e a análise do óleo de *C. guianensis* no Laboratório de Catálise e Oleoquímica da Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém- PA.

O projeto em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal Rural da Amazônia, sob o protocolo de registro 23084.06564/2014-82.

6.2 Escolhas das Plantas

A escolha das plantas *C. guianensis*, *C. officinalis* e *P. guajava* neste estudo, foi feita por abordagem etnofarmacológica tendo como fator determinante a disponibilidade dos óleos associado as suas potencialidades na medicina popular amazônica.

O óleo fixo de andiroba e de copaíba foi adquirido comercialmente na FERQUIMA Ind. e Com. de óleos Vegetais®, (Vargem Grande Paulista, State of São Paulo, Brazil). O óleo essencial das folhas da goiabeira foi doado pela Embrapa Meio-Norte, Parnaíba.

6.3 Obtenções de ovos e larvas de *H. contortus*

Ovos e larvas de *H. contortus* foram obtidos a partir de amostras fecais coletadas diretamente do reto de dois caprinos machos, com aproximadamente um ano de idade, com infecção monoespecífica para *H. contortus*, mantidos em gaiola metabólica no Campus de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Federal do Maranhão de Chapadinha-MA.

No isolamento dos ovos, utilizou-se a metodologia descrita por Colles et al. (1950), amostras fecais foram maceradas, homogeneizadas em água e filtradas, sequencialmente, em peneiras granulometrias de 1 mm, 105 µm, 55 µm e 25µm. Os ovos retidos na peneira de 25 µm foram lavados com água destilada e centrifugados a 1.100 xg/5min. em tubos de 50 mL, sendo adicionado ao material sedimentado uma solução saturada de NaCl para uma nova

centrifugação. O sobrenadante, de cada amostra, foi lavado na peneira de 25 µm e transferido para cálices de decantação.

Para obtenção de larvas utilizou-se a técnica de Roberts e Sullivan (1950) e as larvas infectantes foram colhidas segundo técnica descrita por Ueno e Gonçalves (1998), sendo armazenadas em tubos de 15 mL, utilizando para o teste somente aquelas obtidas há no máximo 30 dias.

6.4 Análises *in vitro*

6.3.1 Teste de Eclodibilidade de Ovos (TEO)

Antes de realizar o teste, cada óleo vegetal, nas suas respectivas concentrações, foi colocado em tubo contendo Tween 80 a 3% e água destilada para a homogeneização da mistura por agitamento em vórtex.

Para cada óleo vegetal testado utilizou-se uma placa com 24 poços, sendo que a cada um, foi colocada uma alíquota de aproximadamente 100 ovos recuperados, juntamente com o óleo teste em cinco concentrações escolhidas aleatoriamente (20; 15; 11,25; 8,44; 6,33 mg mL^{-}1 para *C. guianensis*, e *C. officinalis* e 10; 6; 3,6; 2,16; 1,33 mg mL^{-1} para *P. guajava*), diluídos com solvente Tween 80 a 3% e água destilada previamente homogeneizada, até obter-se um volume final de 1 mL em cada poço. Em cada óleo testado, utilizou-se apenas o controle negativo, contendo apenas, água destilada e Tween.

Todas as placas foram identificadas e colocadas em estufa incubadora tipo BOD a 27ºC por 48 horas (COLES et al.,1992).

6.3.2 Teste de Desembainhamento Larvar (TDL)

Antes de proceder ao teste de desembainhamento larvar artificial, a concentração de hipoclorito necessária para eliminar a cutícula das larvas foi calculada. Para tanto, em duas placas de 24 poços foram adicionadas duas soluções de hipoclorito, utilizando-se quatro poços em duas colunas lineares para cada concentração. Aproximadamente 100 larvas L3 foram colocadas em cada poço e o volume final indicado deve atingir 2 mL. Num intervalo de 10 minutos, lugol foi adicionado a um poço da placa, para cessar a eliminação da cutícula, totalizando 60 minutos de duração do teste. Com o auxílio do microscópio invertido, larvas L3 com e sem cutícula, foram contadas em cada poço. A solução de hipoclorito ideal para o teste

é aquela que aos 60 minutos obtiver 100% das larvas sem cutícula. A perda cuticular deverá ser gradual, e essa determinação da concentração deve ocorrer sempre que o teste for realizado, pois a resistência à ação do hipoclorito varia a cada novo grupo de larvas.

No teste foi analisado o efeito de duas concentrações de cada óleo vegetal e do controle negativo (Tween 3%) na inibição cuticular em larvas de terceiro estágio. Foram analisados quatro poços por tratamento com quatro repetições. As concentrações utilizadas neste teste foram de 0,6 e 1,2 mg mL^{-1} para *C. guianensis* e *C. officinalis* e de 1,2 e 2,4 mg mL^{-1} para *P. guajava.* Em tubos de 15 mL, óleo vegetal, o solvente Tween 3%, as larvas e PBS (Tampão fosfato Salino), foram adicionados até obter um volume final de 2 mL. A solução foi homogeneizada e incubada a 22ºC em BOD por três horas. Após a incubação, foi adicionado 8 mL de PBS em cada tubo, centrifugados a 3000 rpm por seis minutos, repetindo-se esse processo por três vezes, sendo que na última repetição foram retirados 8,8 mL do sobrenadante de cada tubo, obtendo-se um resíduo de 1,2 mL com aproximadamente 1000 larvas. A placa de 24 poços foi preparada, e em cada poço foi adicionado 1000 µL da solução de hipoclorito e 100 µL da solução com larvas. O timer foi ligado e adicionado uma gota de lugol, em um poço de cada tratamento a cada 20 minutos. Transcorridos 60 minutos, o desembainhamento das larvas infectantes foi analisado com o auxílio de microscópio invertido (BAHAUD et al., 2006).

6.5 Análise do óleo de *C. guianensis* por Cromatografia Gasosa

A Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa foi realizada no Laboratório de Catálise e Oleoquímica da UFPA. Para a análise foi utilizado 170 µL do óleo de *C. Guianensis*. Os ésteres metílicos de ácidos graxos de *C. guianensis* foram preparados utilizando o (método AOCS Ce 2-66) e analisados com o (método AOCS Ce 1-62). O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo Varian a gás CP-3800, CP-Wax 52 CB (30 m × 0,32 mm) e detector de ionização de chama. O Hélio foi usado como gás de arraste. O programa de temperatura utilizado foi de 1 minuto a 50 ºC; com aquecimento gradual até 250 ºC a 10 °C/min. Tanto o detector como o injetor foram aquecidos a 250 °C. Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com uma mistura de padrões FAMEs (SIGMA).

6.6 Análise Estatística

Os resultados dos testes *in vitro*, de eficácia da inibição da eclosão de ovos e da eliminação cuticular larvar foram analisados usando Análise de Variância (ANOVA) e comparados através do teste de Tukey com nível de significância de 5% usando o programa Assistat versão 3.0. A eficácia de cada tratamento no teste de eclosão de ovos é determinada com base no percentual de eclosão calculado usando-se a seguinte fórmula: (nº de larvas eclodidas / nº de larvas eclodidas + nº de ovos) x 100. No teste de eliminação da cutícula larvar, a taxa de desembainhamento é calculada usando a fórmula: (n° de larvas (L3) sem bainha / n° de larvas (L3) sem bainha + n° de larvas (L3) com bainha) x 100. A concentração efetiva 50 (CE50), ou seja, a concentração capaz de inibir 50% da eclosão de ovos, calcula-se usando o programa estatístico Graph Pad Prism versão 6.0.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 *Carapa guianensis*

Os testes in *vitro* têm sido utilizados para triagem de plantas medicinais, pois possuem diversas vantagens que estão relacionadas com a simplicidade de execução, baixo custo e rápida avaliação do efeito, além de permitir a utilização da pouca quantidade de material biológico em diferentes estágios parasitários (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). O Teste de Eclodibilidade de Ovos e o Teste de Desembainhamento Larvar foram desenvolvidos para avaliar a eclosão de ovos de helmintos e a eliminação cuticular (MOLENTO; PRICHARD, 2001).

No presente estudo, o óleo de *C. guianensis* apresentou na concentração de 20 mg mL^{-1} o melhor percentual de inibição da eclosão, com 54,60%, diferindo dos resultados encontrados para o controle, sugerindo, portanto, a presença de algum constituinte químico que atua no embrionamento dos ovos, impedindo a eclosão de *H. contortus.* Os dados referentes a estes percentuais de eficácia estão disponíveis na Tabela 2.

No presente estudo, o óleo de *C. guianensis* não demonstrou efetividade na inibição da eclosão das larvas, pois o maior índice obtido foi de 54,60% na concentração mais elevada (20 mg mL^{-1}) (Tabela 2), entretanto há indícios de que este óleo apresenta na sua composição química alguma substância que interfere no processo de embriogênese ou que inibe a produção de algumas enzimas que participam no processo de eclosão do embrião, evento este, relatado por Sommerville et al. (1987). Em concentrações mais baixas (≤ 5%), Kloster (2010) também não detectaram efeito anti-helmíntico contra os nematoides *Cooperia* sp e *Trichostrongylus* sp. pelos testes de eclodibilidade larvar, obtendo índice inferior a 3,5% em todos os tratamentos.

Entretanto, Farias et al. (2010) detectaram efeito anti-helmíntico do extrato hexânico da semente de *C. guianensis* em larvas de terceiro estágio de três nematoides gastrintestinais de caprinos, ao avaliarem cinco concentrações do produto (10, 25, 30, 50 e 100%), demonstrando efeito de grau elevado nos tratamentos 30, 50 e 100 % e moderado nas concentrações 10 e 25%. Independente das perdas que podem ocorrer no desenvolvimento larvar, a redução do número de larvas de *Haemonchus* sp. expostas na concentração mais baixa do óleo (10%) foi de 94,24%, bastante superior ao índice de inibição da eclosão de ovos, obtido no presente trabalho com o óleo fixo da planta, inclusive na concentração máxima (20%; 54,60%).

Por terem utilizado concentrações elevadas do óleo vegetal, esta atividade promissora contra nematoides gastrintestinais de caprinos obtida por Farias et al. (2010), deve ser analisada considerando as relações custo/benefício, praticidade e principalmente sua aplicabilidade *in vivo*, já que no presente estudo, a concentração de 5% do óleo foi equivalente a 38,6 mg/mL, considerada elevada, já que a mesma necessita de grande quantidade de solvente, que pode ser tóxico ao animal, além de causar danos ambientais, de acordo com Melo et al. (2003), Macedo (2008), Kloster (2010), Carvalho et al. (2012) e Chagas et al. (2012).

Tabela 2. Percentual de eficácia média ± erro padrão do óleo fixo de *Carapa guianensis* na inibição da eclosãode ovos de *Haemonchus contortus.*

Concentrações (mg mL $^{-1}$)	Eficácia ± e.p (%)
20	54,60 ± 6,38 ^{e}
15	34,30 ± 7,51 ^{d}
11,25	30,79 ± 5,55 ^{c}
8,44	16,94 ± 2,46 ^{b}
6,33	10,04 ± 2,46 ^{b}
Controle Negativo (3% Tween 80)	0,00 ± 0,00 ^{a}

Letras diferentes indicam significância estatística nas linhas ($p<0,05$)

Neste teste a CE50, ou seja, a concentração efetiva para inibição a 50% foi de 17,92 (16,92 -18,93) mg mL^{-1}. Esta baixa eficácia pode ser explicada pelo fato do óleo fixo apresentar diversas substâncias químicas que interagem entre si, com ações anti-helmínticas ovicida e larvicida, diferentemente dos anti-helmínticos sintéticos, que são substâncias ativas isoladas (MACEDO, 2009).

Na avaliação do desembainhamento larvar do óleo fixo de *C. guianensis* (Tabela 3) observa-se que após 60 minutos de exposição ao óleo fixo, os valores percentuais de desembainhamento das larvas de *H. contortus* nos dois tratamentos foram similares e não diferiram do controle ($p<0,05$), cujo valor foi de 98,09%, comprovando-se *in vitro*, a ineficácia óleo fixo de *Carapa guianensis* nas concentrações analisadas.

Tabela 3. Percentual da taxa de desembainhamento ± erro padrão do óleo fixo de *Carapa guianensis* na inibição da eliminação cuticular em larvas de *Haemonchus contortus*.

Tempo (minutos)	Eficácia ± e.p 0,6 mg mL^{-1} (%)	Eficácia ± e.p 1,2 mg mL^{-1} (%)	Eficácia ± e.p Tween 3% (%)
0	1,96 ± 1,35 [d]	10,49 ± 2,63 [d]	0,41 ± 0,48 [d]
20	39,12 ± 6,42 [c]	44,08 ± 2,42 [c]	16,62 ± 8,65 [c]
40	75,77 ± 8,37 [b]	80,99 ± 8,49 [b]	68,54 ± 11,51 [b]
60	96,27 ± 2,32 [a]	98,16 ± 1,28 [a]	98,09 ± 1,29 [a]

Letras diferentes indicam significância estatística nas linhas ($p<0,05$)

Na composição química de *C. guianensis*, analisada por cromatografia gasosa, foram isolados nove ácidos graxos com a seguinte ordem crescente de concentração: ácido mirístico (0,04%), ácido linolênico (0,21%), ácido behênico (0,32%), ácido palmitoléico (0,82%), ácido araquídico (1,37%), ácido esteárico (8,97%), ácido linoléico (9,50%), ácido palmítico (27,69%) e ácido oléico (50,9%). Destes nove ácidos identificados, seis estão compatíveis com aqueles registrados nos trabalhos de Oliveira (2008) e Farias et al. (2010), com diferenças de percentuais não ultrapassando 4%. Entretanto, a comparação com os dados da ANVISA, observa-se que apenas as composições dos ácidos esteárico, linolênico e mirístico estão compatíveis (Tabela 4). Já que os ácidos não referidos nestas bibliografias, o araquídico, behênico e palmitoléico, suas concentrações somaram apenas 2,51%,

Tabela 4. Composição comparativa da composição dos ácidos graxos do óleo fixo de *Carapa guianensis* comparados a Literatura.

Ácido graxo	Estrutura	Composição (%)				
		Atual	Kloster (2010)	Farias et al. (2010)	Oliveira (2008)	ANVISA (2010)
Ác. Mirístico	C14:0	0,04	-	0,13	0,06	< 0,3
Ác. Palmítico	C16:0	27,69	39,0	28,29	26,81	5,5 - 11,0
Ác. Palmitoléico	C16:1	0,82	-	-	-	-
Ác. Esteárico	C18:0	8,97	-	8,57	7,72	3,0 - 6,0
Ác. Oléico	C18:1	50,9	46,8	49,74	54,56	12,0 - 28,0
Ác. Linoléico	C18:2	9,50	-	7,57	8,09	58,0 - 78,0
Ác. Linolênico	C18:3	0,21	-	1,49	0,19	<1,0
Ác. Araquídico	C20:0	1,37	-	-	-	-
Ác. Behênico	C22:0	0,32	-	-	-	-
Total	-	99,82	-	-	-	-

Apesar da ação comprovada do ácido linoléico no controle de insetos e fitonematóides. Neste trabalho e nos trabalhos de Kloster (2010) e Farias (2010), não foi possível avaliar atividade significativa do óleo, pela ausência ou a baixa produção desse composto, que neste estudo apresentou para o ácido linoléico um percentual de (9,50%), enquanto que a Anvisa preconiza valores entre (58,0 - 78,0%).

7.2 *Copaifera officinalis*

Os testes *in vitro* utilizando o óleo fixo de *C officinalis*, não comprovaram sua efetividade em inibir a eclodibilidade dos ovos de *H. contortus*, pois a sua maior concentração analisada (20 mg mL-1) a taxa de inibição foi de apenas 6,69% (Tabela 5). A inefetividade também foi comprovada na atividade de inibição do desembainhamento larvar, no maior período de contato (60 minutos) com o fluido de desembainhamento, em que 95,24 e 98,09% das larvas do nematoide estavam sem bainha, nas concentrações de 0,6 mg mL^{-1} e 1,2 mg mL^{-1}, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 5. Percentual de eficácia média ± erro padrão do óleo fixo de *Copaifera officinalis* na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus.*

Concentrações (mg mL^{-1})	Eficácia ± e.p (%)
20	6,69 ± 3,73 [b]
15	4,47 ± 1,68 [ab]
11,25	0,00 ± 0,00 [a]
8,44	0,00 ± 0,00 [a]
6,33	0,00 ± 0,00 [a]
Controle Negativo (3% Tween 80)	0,00 ± 0,00 [a]

Letras diferentes indicam significância estatística nas linhas (p<0,05)

Tabela 6. Percentual da taxa de desembainhamento ± erro padrão do óleo fixo de *Copaifera officinalis* na inibição da eliminação cuticular em larvas de *Haemonchus contortus.*

Tempo (minutos)	Eficácia ± e.p 0,6 mg mL^{-1} (%)	Eficácia ± e.p 1,2 mg mL^{-1} (%)	Eficácia ± e.p Tween 3% (%)
0	2,41 ± 0,80 [d]	8,50 ± 2,01 [d]	0,41 ± 0,48 [d]
20	28,93 ± 3,84 [c]	38,97 ± 3,41 [c]	16,62 ± 8,65 [c]
40	74,31 ± 4,63 [b]	80,68 ± 2,61 [b]	68,54 ± 11,51 [b]
60	94,44 ± 5,90 [a]	95,24 ± 1,49 [a]	98,09 ± 1,29 [a]

Letras diferentes indicam significância estatística nas linhas (p<0,05)

A eficácia da planta *C. officinalis* na inibição da eclodibilidade e no desembainhamento larvar, não foi comprovada neste estudo. Apesar do seu uso como fitoterápico ser consagrado pela medicina tradicional por suas propriedades biológicas, antinflamatória e cicatrizante (FRANCISCO, 2005).

7.3 *Psidium guajava*

Os resultados obtidos nos testes *in vitro* de efetividade anti-helmíntica do óleo fixo de *P. guajava*, também não comprovaram efetividade em inibir a eclodibilidade dos ovos e o desembainhamento larvar de *H. contortus*. No primeiro teste, o maior índice obtido foi de apenas 10,33% na mais elevada concentração do óleo (10,33%), (Tabela 7). E no segundo teste, 95,28 e 93,18% das larvas do nematoide estavam sem bainha, nas concentrações de 1,2 mg mL^{-1} e 2,4 mg mL^{-1}, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 7. Percentual de eficácia média ± erro padrão do óleo essencial de *Psidium guajava* na inibição da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*.

Concentrações (mg mL^{-1})	Eficácia ± e.p (%)
10	10,33 ± 4,16 [d]
6	4,33 ± 2,93 [c]
3,6	0,97 ± 1,09 [b]
2,16	1,55 ± 0,37 [b]
1,33	1,94 ± 2,57 [b]
Controle Negativo (3% Tween 80)	1,90 ± 1,33 [a]

Letras diferentes indicam significância estatística nas linhas ($p<0,05$)

Tabela 8. Percentual da taxa de desembainhamento ± erro padrão do óleo Essencial de *Psidium guajava* na inibição da eliminação cuticular em larvas de *Haemonchus contortus*.

Tempo (minutos)	Eficácia ± e.p 2,4 mg mL^{-1} (%)	Eficácia ± e.p 1,2 mg mL^{-1} (%)	Eficácia ± e.p Tween 3% (%)
0	1,59 ± 1,20 [d]	2,05 ± 1,65 [d]	0,97 ± 0,93 [d]
20	11,93 ± 7,65 [c]	42,25 ± 7,27 [c]	23,62 ± 14,16 [c]
40	90,68 ± 3,69 [b]	86,85 ± 2,06 [b]	80,04 ± 11,27 [b]
60	93,18 ± 3,49 [a]	95,28 ± 1,61 [a]	93,86 ± 5,30 [a]

Letras diferentes indicam significância estatística nas linhas ($p<0,05$)

Sanchez et al. (2013), ao testar a planta *P. guajava* na formulação de extratos metanólico, etanólico, acetônico e aquoso, obtiveram resultados favoráveis na mortalidade de

larvas cultivadas de *H. contortus*, quando tratadas com o extrato metanólico e associaram essa eficácia a presença de alguns constituintes químicos da classe dos flavonóides, glicosídeos e ácidos orgânicos, presentes no extrato que podem não estar presentes no óleo essencial de acordo com Craveiro et al. (1981).

Entende se que o baixo efeito dessas plantas, na inibição em ovos e larvas de *H.contortus*, pode ser atribuído ao fato desses óleos não apresentarem compostos com potencial efeito anti-helmíntico, como os terpenos, demonstrados nos testes com *Lippia sidoides* de Carvalho et al. (2003), *Croton zehntneri* e *Cymbopogon martinii* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007), ou mesmo taninos, substâncias que possuem ação comprovada em nematoides gastrintestinais de plantas como *Schinopsis* spp. (ATHANASIADOU et al., 2001), *Leucaena leucocephala* (ALONSO-DÍAZ et al., 2008), *Acacia mearnsii* (MINHO et al., 2008).

É comprovada a ação *in vitro* e *in vivo* dos taninos sobre o desembainhamento de *H. contortus* tratados com extratos de plantas taniníferas (*Castanea sativa, Pinus sylvestris, Erica erigena e Sarothamnus scoparius*), que foi verificada por Bahuaud et al. (2006). Foi descrito por Hoste (2006) e Max (2010), que os taninos, foram os principais responsáveis pela inibição do desembainhamento larvar, uma vez que, agem diretamente na bainha dessas larvas. Alguns fatores também podem interferir na ação inibitória dessa substância, como a espécie de nematoide, a quantidade, a concentração e a estrutura dos taninos presentes na composição de plantas, diferenças fisiológicas entre caprinos e ovinos e o tipo de teste utilizado (HOSTE, 2006).

Ainda que as plantas utilizadas neste estudo apresentem índices de eficácia insatisfatórios, sobre a eclosão dos ovos e desembainhamento larvar de *H. contortus* isoladas de caprinos, as avaliações da atividade anti helmíntica de plantas, a partir de levantamentos etnobotânicos e da comprovação científica, constituem uma forma vantajosa na descoberta de novas substâncias, pois as plantas utilizadas a partir de saberes tradicionais, nem sempre apresentam efeito farmacológico quando testadas *in vitro.*

CONCLUSÃO

O óleo fixo de *Carapa guianensis* e *Copaifera Officinalis*, e o óleo essencial de *Psidium guajava* apresentaram resultados insatisfatórios na avaliação *in vitro* da eclodibilidade de ovos e no desembainhamento larvar artificial de *Haemonchus contortus* de caprinos.

REFERÊNCIAS

ACHI, Y. L.; ZINSSTAQ, J.; YAO, K.; YEO, N.; DORCHIES, P.; JACQUIET, P. Host especificity of *Haemonchus* spp. for domestic rumminants in the savanna in northem Ivory Coast. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 151-158, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999** (Diário Oficial da União: 17/05/1999). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/104_99.htm.> Acesso em 20 de junho de 2014.

AHMED, S. J.; FARAJ, R. A.; AZAWI, R.; ABDAL AL-KAREEM, M. M. Study of comparison of antimicrobial potencies of *Bauhinia variegata* leave extracts with antibiotics against selected bacteria. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v.4, n.3, p.44-46, 2012.

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

ALENCAR, J. Estudos silviculturais de uma população natural de Copaifera multijuga Hayne - Leguminosae, na Amazônia central. 2 – Produção de óleo resina. **Acta Amazônica**, v.12, n.1, p.79-82, 1982.

ALMEIDA, K. C.; BARBOSA, T. R.; SILVA, R. N. R.; JACQUES, D. S.; FREIRE, R. B. Cytotoxic effect of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 87, p. 60-62, 2006.

ALONSO-DÍAZ, M. A.; TORRES-ACOSTA, J. F.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; HOSTE, H. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniniferous plants. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.313-319, 2008.

AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J B.; BUENO, O. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR, M. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.17, n.3, 2006.

ANDERSON, R. C. **Nematode parasites of vertebrates:** Their development and transmission. Wallingford: CAB International. 578p. 1992.

ARAÚJO JÚNIOR, F. A.; BRAZ, N. M.; ROCHA NETO, O. G.; COSTA, F. A.; BRITO, M. V. H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 93-99, 2005.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 631-639, 2004.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasited with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal Parasitology,** v. 30, p. 1025-1033, 2000.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKISA, I.; JACKSON, F.; COOPB, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p. 205-219, 2001.

ATHANASIADOU, S.; GITHIORI, J.; KYRIAZAKIS, I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal**, v. 1, n. 9, p. 1392-1400, 2007.

ATHANASIADOU, S.; HOUDIJKA, J.; KYRIAZAKISA, I. Exploiting synergisms and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheep production systems. **Small Ruminant Research**, v. 76, p. 2-11, 2008.

BAGHESTANI, A.; LEMIEUX, C.; LEROUX, G.; BAZIRAMAKENGA, R. Determination of Allelochemicals in spring cereal cultivars of different competitiveness. **Weed Science**, v. 47, p. 498-507, 1999.

BAHUAUD, D.; MONTELLANO, C. M.; CHAUVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheatment of third-satge larvae of parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 132, p. 545-554, 2006.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F; GUIMARÃES, E. F. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** ED. Imprensa Universitária. v. 2, p. 377, 1991.

BERG, M. E. VAN DEN. **Plantas medicinais na Amazônia:** contribuição ao seu conhecimento sistemático / Maria Elisabeth van den Berg. - 2 ed. Rev. E aum.- Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993.

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

BOGAN, J.; ARMOUR, J. Anthelmintic for ruminants. **International Journal for Parasitology**, v. 17. p. 483-491, 1987.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288-94, 2007.

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

CARRARA, D.P. **O pensamento médico popular.** Ribro Soft Editoria e Informática Ltda. RJ-Brasil, 1995.

CARVALHO, C.O.; CHAGAS, A.C.S.; COTINQUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L.G.; CHAVES, F.C.M.; STEPHAN, M.P.; BIZZO, H.R.; AMARANTE, A.F.T. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus* contortus and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, v.183, n. 3-4, p. 260-268, 2012.

CARVALHO A. F. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essencial oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569–571, 2003.

CAVALCANTE, B. **Frutas Comestíveis da Amazônia**. 5º ed. ED. CEJUP. Belém, 1991.

CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 156-160, 2004.

CHAGAS, A. C. S.; DE BARROS, L. D.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOTI, R.; DE SENA OLIVEIRA, M. C.; BIZZO, H. R. *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 110, n. 1, p. 295-303, 2012.

COLES, G.C. Anthelmintic resistance-looking to the future: a UK perspective. **Research Veterinary Science**, v. 78, n. 2, p. 99-108, 2005.

COLES, G. C. C.; BAUER, F. H. M.; BORGSTEEDE, S.; GREERTS, S.; KLEI, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary, Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle**. Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 99-102, 1950.

COLES, G. C. Anthelmintic resistance looking to the future: a UK perspective. **Research Veterinary Science,** v. 78, n. 2, p. 99-108. 2005.

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

COSTA, C. T. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURA-VASCONCELOS, A. L. F.; MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M. CASTRO, C. M. S.; BRAGA, R. R. E.; OLIVEIRA, L. M. B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus.* **Small Rumininant Research**, v. 74, p. 284-287, 2008.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M. A.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V. M.; ARAÚJO, A. V.; RIBEIRO e RIBEIRO, A.; ARRUDA, A. C.; FRAGA, M. C. C.A.; LAFAYETTE, S. S. L.; WANDERLEY, A. G. Estudo Toxicológico Reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em Ratas Wistar. **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 425-428, 2006.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L.**Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza. ED.: UFC, p.210. 1981.

DANTAS, L. I. S; ROCHA, F. A. G.; MEDEIROS, F. G. M.; SANTOS, J. A. B. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *lippia gracilis* schauer sobre patógenos de importância na indústria de alimentos. **HOLOS**, Ano 26, v. 5, p. 114-126, 2010.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances Genetics**, v. 28, p.165-234, 1990.

DJERASSI, C.; NAKANO, T. Terpenoids. XLVI. Copalic acid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 26, p.167, 1961.

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, v. 9, p. 201-209, 1967.

ECHEVARRIA, F.A.M.; TRINDADE, G.N.P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil. **Veterinary Record**, v. 124, 147-148. 1989.

EGUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN, E. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 110, p. 428-33, 2007.

ELOFF, J. N.; McGAW, L. J. **Methods for Evaluating Efficacy of Ethnoveterinary Medicinal Plants**. In: KATERERE, D. R.; LUSEBA, D. Ethnoveterinary botanical medicine: herbal medicine for animal health. CRC Press, 450p. 2010.

FARIAS, M. T.; BORDIN, E. L.; FORBES, A. B.; NEWCOMB, K. A survey on resistance to anthelmintic in sheep stud farms of southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 209-214. 1997.

FARIAS, M. P. O.; TEIXEIRA, W. C.; WANDERLEY, A. G.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Avaliação *in vitro* dos efeitos do óleo da semente de *Carapa guianensis* Aubl. sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 220-226, 2010.

FRANCISCO, S.G. Uso do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) em inflamação ginecológica**. Femina**, v. 33, n. 2, p. 89-93, 2005.

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C. SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* AUBL. e *Carapa procera* D.C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica**, v. 32, p. 647-661, 2002.

FERREIRA, F. H. **Potencial de extração e comercialização do óleo-resina da copaíba (Copaífera spp.), um estudo de caso na Floresta Estadual do Antimarí, Acre.** 1999. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais), Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 54 p.

GAMBLE, H. R.; PURCELL, J. P.; FETTERER R. H. Purification of a 44 kilo Dalton protease, whichmediates the ecdysis of infective *Haemonchus contortus* larvae. **Molecular and Biochemical Parasitology,** v. 33, p. 49-58, 1989.

GEARY, T. G.; SANGSTER, N. C.; THOMPSON, D. P. Frontiers in anthelmintic pharmacology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 275-295, 1999.

GIACOMINO, A. P. **Cultura da goiaba**. USP – ESALQ, Piracicaba. Disponível em <http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/ACULTURADAGOIABEIRA.pdf> Acesso em 20 de julho de 2014.

GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F. C. O.; ANDRADE NETO, M. **Atividade antagonista do óleo essencial dos frutos de *Capparis flexuosa* em ovos de juvenis de *Meloidogyne incognita*.** In: Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais, 2000, Fortaleza. Anais. Fortaleza: COBRADAN. v. 1, p. 35, 2000.

GUTIÈRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its tradional uses phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 117, p. 1-27, 2008.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**; Taylor & Frost: London, p. 791, 1983.

HASHMI, S.; BRITTON, C.; LIU, J.; GUILIANO, D. B.; OKSOV, Y.; LUSTIGMAN, S. Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 5, p. 3477-3486, 2002. Disponível em <PMid:11707440. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M106117200> Acesso em 15 de fevereiro de 2015.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 253-261, 2006.

HOWELL, S. B.; BURKE, J. M.; MILLER, J. E. TERRILL, T. H.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; ZAJAC, A. M.; KAPLAN, R. M. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the southeastern United States. Journal of the American **Veterinary Medical Association**, v. 233, p. 1913–1919, 2008.

JACQUIET, P.; CABARET, J.; THIAM, E.; CHEIKH, D. Host range and the Maintenance of *Haemonchus* spp. in an adverse arid climate. **International Journal For Parasitology**, v. 28, p. 253-261. 1998.

JOLY, A. B. **Botânica:** Introdução à taxonomia vegetal. 8°ed. São Paulo: ED. Nacional. p.777, 1987.

KASSAI, T. Classificación de helmintos parasitós. **Helmintología Veterinaria**, ED. Acribia S. A. Zaragoza España. p. 23-28, 2002.

KLOSTER, F. S.; CHAGAS, A. C. de S.; BORGES, F. A.; SCHAFER, A. S.; CANEVER, R. J.; BUZATI, A.; MOLENTO, M. B. **Avaliação do potencial antihelmíntico de *hura crepitans* sobre ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos e larvas l3 de *cooperia* sp.** In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 16, Campo Grande. Anais. Campo Grande: CBPV, 2010.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. International **Journal for Parasitology**, v.31, p.336-345, 2001.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal for Parasitology,** v. 20, p. 105-111. 1988.

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

LEE, D. L. **The physiology of nematodes, San Franscisco W.H.** Freeman and Company. 154p. 1965.

LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A.; HOBERG, E. P. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **Journal Parasitology**, v. 80, n.1, p.107-119, 1994.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, p. 269, 1992.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R.; QUEIROZ-JUNIOR, E. M.; PORTELA, B. G.; BARROS, R. S.; CHAGAS, A. C. S. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Eucalyptus globulus* essential oils on *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria** (Online) v.18, n.3, Jaboticabal, 2009.

MAKKAR, H. P. S., et al. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal.** v. 1, n. 9, p. 1371-1391, 2007.

MANN, J. **Secondary metabolism**. Oxford: Clarendon Press; p.374, 1987.

MANSFIELD, L. S.; GAMBLE, H. R.; FETTERER, R. H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus* – I. Structural components. **Comparative Biochemichal Physiology**, v.103B, p.681– 686, 1992.

MARTIN, P. J. Development and control of resistance to anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, v.17, p.493-501, 1987.

MARTIN, R. J. An electrophysiological preparation of *Ascaris* suum pharyngeal muscle reveals a glutamate-gated chloride channel sensitive to the avermectin analogue, milbemycin D. **Parasitology**, v. 112, p.247-252, 1996.

MARTIN, R.J. Modes of action of anthelmintic drugs. **The Veterinary Journal**, v.154, p.11-34, 1997.

MARTINS, E. R; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. M.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: ED. UFV, 220 p, 1995.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; BJORN, H. Target sites of anthelmintics. **Parasitology**, v.114, p.111-124, 1997.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F. e LIMA, H. C. O Gênero Copaifera (Leguminosae – Caesalpinioideae) na Amazônia Brasileira. **Rodriguésia**, v.3, n. 59, p.455-476, 2008.

MAX, R.A. Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 138–143, 2010.

MELO, A. C. F. L.; REIS, F. I.; BEVILAQUA, C. L. M.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematóides resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 339-344, 2003.

MILLER, J. E.; BAHIRATHAN, M.; LEMARIE, S. L.; HEMBRY, F. G.; KEARNEY, M. T.; BARRAS, S. R. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 55-74, 1998.

MIN, G.; ZHOU, G.; SCHAPIRA, M.; SUN, T. T.; KONG, X. P. Structural basis of urothelial permeability barrier function as revealed by Cryo-EM studies of the 16 nm uroplakin particle. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 4087–4094, 2003.

MINHO, A. P.; BUENO, I. C. S.; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.;GENNARI, S. M.; ABDALA, A. L. Effect of Acacia molissima tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, p. 172-181, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>. Acesso em 02 de Agosto de 2013.

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

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**, v.182, p. 259–263, 2011.

MORALES, M. A.; LOZOYA, X. Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic Smooth-muscle, **Planta Medica**, Stuttgart, v. 60, n. 4, p. 313-317, 1994.

MUELLNER, A. N. R; SAMUEL, R.; JOHNSON, S. A.; CHEEK, M.; PENNINGTON, T. D. Molecular phylogenetics of Meliaceae based on nuclear and plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 90, p.471-480, 2003.

NEVES, O. S. C.; BENEDITO, D. S.; MACHADO, R. V.; CARVALHO, J. G. Crescimento, produção de matéria seca e acúmulo de N, P, K, Ca, Mg, e S na parte aérea de mudas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) cultivadas em solo de várzea, em função de diferentes doses de fósforo. **Revista Árvore**, v. 28, n. 3, p. 343-9, 2004.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de 13C. **Química Nova**, v. 13, p. 278-281, 1990.

OLIVEIRA, D.B. **Atividade anti-helmíntica da bananeira (*Musa* spp.) em caprinos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, v.15. 1997, Salvador, BA. Anais**.** Salvador: Sociedade Brasileira de Parasitologia, p.65, 1997.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v. 8, n. 3, p.14-23, 2006.

OLIVEIRA, B.R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*.** Dissertação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2008.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T.; LIMA JÚNIOR, A. F.; ROSA, S. R. A. Cultivo da goiaba: do plantio ao manejo. **Revista Faculdade Montes Belos**. v. 5, n. 4, 2012.

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; DE PAULA, J. E.; LUNA, J. S., FERREIRA DE LIMA, M. R.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549-2556, 2007.

PAIEMENT, J. P., LEGER, C., RIBEIRO, P.; PRICHARD, R. K. *Haemonchus contortus*: effects of glutamate, ivermectin, and moxidectin on inulin uptakeactivity in unselected and ivermectin-selected adults. **Experimental Parasitology**, v. 92, p. 193-198, 1999.

PINTO, P. G. **Características físico-químicas e outras informações sobre as principais oleaginosas do Brasil.** Boletim Técnico. Ministério da Agricultura, Recife, Pernambuco. 1963.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance in nematodes: excent, recent understanding and future directions for control and research. **Internacional Journal Parasitology**, v.20, p. 515-523, 1990.

RAHMAN, W.; COLLINS, G. H. Changes in live weight gain, blood constituents and worm egg output in goats artificially infected with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. **British Veterinary Journal**, London, v. 146, n. 6, p. 543-50, 1990.

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

REINECKE, R. K.; KIRKPATRICK, R.; KRIEL, A. M.; FRANK, F. Availability of infective larvae of parasitic nematodes of sheep grazing on Kikuyu (Pennisetum clandestinum) pastures in the winter rainfall area. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 223-234, 1989.

RIGAMONTE AZEVEDO, O. C., et al. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p. 583-91, 2006.

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

ROGERS, W. P.; SOMMERVILLE, R. I. The physiology of the second ecdysis of parasitics nematodes. **Parasitology**, v.50, p. 329-348, 1962.
RUPPERT, E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. São Paulo: Roca, 1026p. 1996.

SAMARASINGHE, B. **Analysis of RNA interference in the parasitic nematode *Haemonchus contortus***, Escócia. Gasgow. Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Celular). Universidade de Glasgow, Glasgow, 2010.

SANGSTER, N. C. Introduction to symposium on recent research on *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v.11, p.1271-2, 1995.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 98, p. 89-109. 2001.

SILVA, C. A.; LIMA, C. A.; COSTA, D. S. Caracterização química do óleo essencial da casca do *Citrus sinensis* obtido por hidrodestilação em aparelho clevenger. Belém-PA, 2010.

SILVA, S. G.; NUNOMURA, R. C. S. LIMONÓIDES ISOLADOS DOS FRUTOS DE *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) **Química nova**, v. 35, n. 10, p. 1936-1939, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 5ª ed. Porto Alegre. ED. Universidade, UFRGS, p. 173, 1998.

SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognósia: da planta ao medicamento.** Org: Simões, C. M. O. et al. 5ª Ed. Porto Alegre. ED. da UFSC, 467-495, 2004.

SINGH, A. K.; MCINTYRE, L. M.; SHERMAN, L. A. Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1825-1839, 2003.

SOMMERVILLE, R.I.; ROGERS, W.P. The nature and action of host signals. **Advances Parasitology**, v. 26, p. 239–293, 1987.

SUTHERST, R. W.; COMINS, H. N. The management of acaricide resistance in the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae), in Australia. **Bulletin Entomology Research**, v. 69, p. 519–537, 1979.

TAYLOR, D. A. H. The chemistry of the limonoids from meliaceae. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Viena, v. 45, n. 1, p. 1-102, 1984.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasitas de ovinos e caprinos. In: **Parasitologia Veterinária**. 3ª ed. Guanabara Koogan. p. 128 –217, 2010.

TORRES-ACOSTA, J. F. J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Reseach**, v. 77, p. 159-173, 2008.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de bovinos**. 4.ed. Toquio: JIICA, 143p, 1998.

URQUHART, G. M., ARMOUR, J., DUNCAN, J. L., DUNN, A. M., JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária,** 2ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, p. 273, 1996.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENINGS, F. W. Veterinary Helmintology. **Veterinary Parasitology**, 2° ed. Blachwell science Ltd. London. UK. p. 19-22, 2001.

VASSILATIS, D. K.; ARENA, J. P.; PLASTERK, R. H.; WILKINSON, H. A.; SCHAEFFER, J. M.; CULLY, D. F.; VAN DER PLOEG, L. H. Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans.* Isolation and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 33167-33174, 1997.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química nova**, v.25, n.2, p.273-86, 2002.

VIEIRA, L. S.; BERNE, M. E. A.; CAVALCANTE, A. C. R. **Redução do número de ovos por grama de fezes (OPG) em caprinos medicados com anti-helmínticos.** EMBRAPA. Boletim de Pesquisa, v. 11, 24p, 1989.

VIEIRA, L. S.; BERNE, M. E.; CAVALCANTE, A. C.; COSTA, C. A. *Haemonchus contortus* resistance to ivermectin and netobimin in Brazilian sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1-2, p. 111-116, 1992.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciências Agropecuárias**, v.2, p. 49-56, 2008.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. G. R.; XIMENES, L. J. F. **Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste do Brasil**. Circular Técnica, Embrapa Caprinos, Sobral. 49 p., 1997.

WAGHORN, G. C. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - progress and challenges. **Animal Feed Science Technology**, v. 147, p. 116-139, 2008.

WALLER, P. J. Control strategies to prevent resistance. **Veterinay Parasitology**, v. 46, p. 133-142, 1993.

WALLER, P. J.; BERNES, G.; RUDBY-MARTIN, L.; JUNGSTROM, B. L.; RYDZIK, A. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 207-220, 2004.

WOLSTENHOLME, A. J.; FAIRWEATHERB, I.; GEORG VON SAMSON HIMMELSTJERNAD, R. P.; SANGSTER, N. C. Drug resistance in veterinary helminthes. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 469-476, 2004.