

MARCO ANTÔNIO MARTINS CALDEIRA

**Folhas de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) no controle de
*Haemonchus contortus***

MONTES CLAROS

2017

MARCO ANTÔNIO MARTINS CALDEIRA

**Folhas de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) no controle
*Haemonchus contortus***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Produção Animal.

Área de concentração: Controle integrado de parasitoses criações de animais.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte.

Coorientadora: Dra. Franciellen Morais Costa.

MONTES CLAROS

2017

Caldeira, Marco Antonio Martins.

C146f

2017 Folhas de *Annona crassiflora* Mart.(Annonaceae) no controle de *Haemonchus contortus* / Marco Antonio Martins Caldeira. Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2017.

68 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

Orientador Prof. Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Yule Roberta Ferreira Nunes, Neide Judith Faria de Oliveira, Franciellen Moraes Costa, Eduardo Robson Duarte.

Referências: f: 90-94.

1. Ovinos -Parasitose. 2. Fitoterapia - Cerrado. I. Duarte, Eduardo Robson. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 636.32

Elaborada pela Biblioteca Comunitária em Ciências Agrárias do ICA/UFMG

MARCO ANTÔNIO MARTINS CALDEIRA

**Folhas de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) no controle de
*Haemonchus contortus***

Prof^o. Dra. Yule Roberta Ferreira Nunes
(UNIMONTES)

Prof^a. Dr^a. Neide Judith Faria de Oliveira
(ICA – UFMG)

Dra. Franciellen Morais Costa
(Coorientadora – ICA/UFMG)

Prof^o. Dr. Eduardo Robson Duarte
(Orientador - ICA – UFMG)

Aprovada em 17 de fevereiro de 2017.

Montes Claros
2017

Dedico aos meus pais,
Osmar e Lucília, à minha
esposa Rita e aos meus
filhos Maria Teresa e
Rafael.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que ouviu minhas orações e me deu esta oportunidade de cursar este mestrado. À sua Mãe, sob a invocação de Aparecida, que tanto me ajudou ao longo do curso.

Ao Professor Eduardo Robson, exemplo como profissional e como pessoa, pela paciência e incentivo na orientação, pela confiança, ensinamentos e conselhos. Serei eternamente grato por ter tido a benção de ter um orientador tão especial e que ainda conferiu prestígio e valor a meu trabalho. À doutora Franciellen, que tanto dedicou ao meu crescimento e que me apoiou com paciência e amizade durante todo o tempo do curso.

A toda a minha família, pelo apoio com palavras e ações este meu empreendimento. Em especial agradeço à minha esposa, Rita de Cássia, que praticamente fez o mestrado comigo, ao acordar em muitas madrugadas para me levar à UFMG. À minha filha, Maria Teresa pela ajuda na coleta das folhas para a realização do experimento. Ao meu filho Rafael, que me estimulou a lhe dar exemplo de ser bom profissional. O meu cunhado José Maria se dispôs a ir comigo ao campo para coletar o material para o experimento.

A minha mãe por me incentivar desde o princípio para cursar este mestrado e que com palavras e ações me pôs para frente. O meu tio Saulo também por ter conseguido para mim o material necessário para completar meu artigo e minha dissertação.

A Vanessa com seu exemplo de dedicação pelo incentivo para fazer este curso. O meu colega Frederico, que me falou da existência deste mestrado, que até então eu desconhecia. Minha diretora, Hivanilda Aguiar pela ajuda tanto na distribuição das aulas e assim me possibilitou cursar o mestrado sem problemas. O superintendente José Gomes, que me apoiou na minha empreitada.

Os meus companheiros de trabalhos Viviane, Otávio, Ana Cláudia, Evely, Kaike, Dheison, Bruna, Carol, Mateus, Herculano, Luís, Iara, Isabela e Valdo que me ajudaram tanto nos experimentos e sem os quais seria impossível eu chegar aonde cheguei.

Os meus colegas de turma que me acompanharam nesta caminhada. Os professores e a todos os funcionários do ICA/UFMG pelo acolhimento e que com sua paciência e benevolência me proporcionaram tempo tão agradável e inesquecível.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram tanto e que não desejo ser ingrato ao esquecer de seu apoio. Que Deus abençoe e recompense a todos!

“O sucesso é ir de fracasso
em fracasso sem perder
entusiasmo”.

Winston Churchill

RESUMO

A produção de ruminantes é importante para economia de diferentes regiões agrícolas. Entretanto um dos grandes obstáculos para a criação são as helmintoses gastrintestinais, que causam grandes perdas na produtividade. A resistência aos anti-helmínticos convencionais dificulta o controle desses nematódeos principalmente em pequenos ruminantes. Dessa forma, a busca por novas formas de controle é fundamental e a fitoterapia tem sido destaque como alternativa. A literatura etnofarmacológica tem registrado propriedades medicinais de e anti-helmíntica em plantas do gênero *Annona*. *Annona crassiflora*, conhecida como panã, é espécie de presente no Cerrado e importante para produção de frutos saborosos. Nesta pesquisa, os objetivos foram avaliar a composição fitoquímica das folhas dessa planta e seus efeitos *in vitro* e *in vitro* para o controle do nematódeo *Haemonchus contortus* em ovinos. Os cromatogramas em HPLC do extrato aquoso (EA), extrato etanólico (EE) e extrato de acetato de etila (AE) de *A. crassiflora* indicaram a presença de flavonoides. Os teores de tanino para o AE, EE e AE foram 6,93; 12,05 e 0,64%, respectivamente. No teste de inibição da eclodibilidade, o extrato etanólico foi o mais efetivo, com CL₉₀ de apenas 8,96 mg/mL. Entretanto, após a remoção dos taninos, o extrato aquoso foi o mais eficaz, apresentando CL₉₀ de 4,27 mg/mL. Ao avaliar a inibição do desenvolvimento larval, o EA apresentou CL₉₀ 69,14 mg/g de coprocultura. No testes *in vivo*, foram fornecidas folhas secas de *A. crassiflora* a 2,75g (ms) /kg durante três dias, entretanto não foram constatadas eficácias na redução de ovos por grama de fezes e alterações no ganho de peso e parâmetros fisiológicos sanguíneos, comparando-se com o grupo de borregos não tratados. Neste estudo verificou-se alta eficácia para inibição da eclodibilidade e do desenvolvimento larval de *H. contortus* e após a remoção dos taninos, os extratos foram mais eficientes. Futuros estudos devem avaliar a administração da planta ou de seus extratos em maiores períodos ou maiores doses e em formulações protegidas da ação ruminal para promover melhor redução do OPG em animais com hemoncose.

ABSTRACT

The production of ruminants is important for the economy of different agricultural regions. However, one of the great obstacles for the creation is the gastrointestinal helminthoses, that cause great losses in the productivity. Resistance to conventional anthelmintic makes it difficult to control these nematodes mainly in small ruminants. In this way, the search for new forms of control is fundamental and phytotherapy has been highlighted as an alternative. The ethnopharmacological literature has registered medicinal and anthelmintic properties in plants of the genus *Annona*. *Annona crassiflora*, known as Panã, is a species present in the Cerrado and important for the production of tasty fruits. In this research, the objectives were to evaluate the phytochemical composition of the leaves of this plant and its in vitro and in vitro effects for the control of the nematode *Haemonchus contortus* in sheep. High performance liquid chromatography chromatograms of the aqueous extract (AE), ethanolic extract (EE) and ethyl acetate (AE) extract of *A. crassiflora* indicated the presence of flavonoids. The tannin contents for AE, EE and AE were 6.93; 12.05 and 0.64%, respectively. In the hatchability inhibition test, ethanolic extract was the most effective, with CL₉₀ of only 8.96 mg / mL. However, after the removal of the tannins, the aqueous extract was the most effective, presenting LC₉₀ of 4.27 mg / mL. When evaluating inhibition of larval development, EA presented CL₉₀ 69.14 mg / g coproculture. In the in vivo tests, dry leaves of *A. crassiflora* were given at 2.75g (ms) / kg for three days, however no efficacy was found in fecal egg reduction per gram of feces and changes in weight gain and physiological parameters, comparing with the group of untreated lambs. In this study, high efficacy was observed for inhibition of hatchability and larval development of *H. contortus* and after the removal of tannins, the extracts were more efficient. Future studies should evaluate the administration of the plant or its extracts in longer periods or higher doses and in formulations protected of the ruminal action to promote better reduction of eggs per gram of feces in animals with haemonchosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1

41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	43
Tabela 2	44
Tabela 3	45
Tabela 4	46
Tabela 5	46
Tabela 6	47
Tabela 7	48
Tabela 8	48

SUMÁRIO

	Pag.
Introdução.....	14
Objetivos.....	16
CAPÍTULO 1.....	17
Eficácia anti-helmíntica de Annonaceae.....	17
Introdução.....	17
Helmintosesgastrintestinais.....	18
Controle das helmintoses gastrintestinais.....	19
Resistência dos nematódeos aos anti-helmínticos convencionais.....	20
Alternativas fitoterápicas para controle de nematódeos em ruminantes.....	21
Família Annonaceae.....	22
<i>Annona crassiflora</i>	23
Considerações finais.....	24
Referências.....	24
 CAPÍTULO 2.....	 33
Folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart. (Annonaceae) no controle de <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i>	33
Resumo.....	33
Abstract.....	34
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	36
Material vegetal.....	36
Preparo dos extratos.....	36
Determinação dos metabólitos secundários.....	37
Inibição da eclodibilidade.....	37
Inibição do desenvolvimento larval (IDL)	38
Teste <i>in vivo</i> de redução de ovos em fezes de ovinos.....	39
Análises sanguíneas.....	40

Resultados.....	40
Discussão.....	50
Conclusão.....	52
Referências.....	53
Anexo.....	60

INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade explorada em quase todos os continentes, em diferentes climas, relevos e vegetações. No entanto, somente em alguns países a atividade apresenta expressão econômica e é conduzida, na maioria dos casos, de forma empírica e extensiva, com baixos níveis de tecnologia (LEITE, 2000).

As verminoses são ocasionadas por nematódeos, que se alojam no trato gastrointestinal de ovinos e prejudicam o desempenho e a lucratividade. Esses helmintos ocasionam perda de peso, comprometem a conversão alimentar, desnutrição e menor crescimento e fertilidade, além ocasionar óbito em quadros grave (VIEIRA, 2005).

O tratamento frequente dos ovinos com anti-helmínticos tem sido a única medida de controle das helmintoses gastrintestinais adotada por criadores (CHARLES, 1995). Esses produtos são compostos químicos que apresentam diferentes mecanismos de ação contra os nematódeos. Em virtude do elevado custo desses produtos e do pouco esclarecimento técnico, produtores e tratadores utilizam sub ou superdosagens, com periodicidade inadequada, o que conseqüentemente favorece a seleção de parasitos resistentes e a contaminação dos animais e do ambiente com resíduos medicamentosos.

A resistência aos produtos anti-helmínticos é o principal problema para o tratamento da helmintose ovina e, juntamente com as perdas diretas e indiretas, pode comprometer ou até inviabilizar essa atividade. Desta forma, o controle desses parasitos somente com anti-helmínticos tem se mostrado ineficaz (GENNARI; AMARANTE, 2006). Assim, tem se tornado de grande importância a busca por outros métodos de controle, com o objetivo de superar essa resistência e manter o controle efetivo dos parasitas nos rebanhos (MOLENTO; PRICHARD, 2001).

Existe uma necessidade de se repensar o uso do anti-helmínticos, bem como desenvolver novas abordagens no controle de parasitas (WALLER, 1995). Idealmente, isto pode implicar uma abordagem integrada, incluindo o controle biológico, frequência reduzida de tratamentos com anti-helmínticos sintéticos, raças resistentes a parasitas, bem como a utilização de plantas com propriedades antiparasitárias.

A atividade terapêutica dos vegetais está relacionada aos metabólitos secundários, que possuem como principal função a de proteção do vegetal contra predadores (CHAGAS, 2004). Esses compostos têm sido utilizados como pesticidas no controle de diversos tipos de pragas e parasitas (CHAGAS *et al.*, 2002).

Apesar da grande variabilidade de plantas com relatos de atividade anti-helmíntica, poucos compostos bioativos promotores dessa ação nematicida já foram identificados (GHISALBERTI, 2002). Em contraste à medicina humana, a fitoterapia não é tão desenvolvida na medicina veterinária (HAMMOND *et al.*, 1997). GIRÃO *et al.* (1992), relataram que dentre as espécies de plantas utilizadas no tratamento de várias doenças,

algumas são conhecidas como anti-helmínticas. Entretanto, poucas foram avaliadas cientificamente (HAMMOND *et al.*, 1997).

A família Annonaceae compreende cerca de 130 gêneros e 2300 espécies, distribuídas em países de clima tropical e subtropical (ALALI *et al.*, 1999). O gênero *Annona*, que possui mais de 120 espécies catalogadas, é muito apreciado no Brasil, por fornecer frutos comestíveis, como *Annona crassiflora* (araticum), *Annona squamosa* (fruta do conde) e *Annona muricata* (graviola). Os frutos são normalmente consumidos *in natura* ou usados em sucos, sobremesas e sorvetes (CORREA, 1984). Casca, folhas, raízes, frutos e sementes de espécies de *Annona* têm sido utilizados na medicina popular contra diabetes, malária e infecções (SOUSA *et al.*, 1991).

Annona crassiflora ('araticum' ou 'marolo') é uma espécie nativa de árvore do Cerrado pertencente as Annonaceae (LORENZI, 1998; SILVA, 2001). O fruto de *A. crassiflora* é apreciado por seu cheiro e sabor. A polpa da fruta é consumida *in natura*, e é também utilizado para preparar licor, doces, sorvetes e bolos (RIBEIRO *et al.*, 2000).

Extratos de *A. crassiflora* sementes também são usadas na medicina popular para tratar picadas de cobra (CORREIA, 1984). Santos *et al.* (1996) purificou um composto de sementes de *A. crassiflora*, denominado araticulin, que mostraram citotoxicidade em células humanas de carcinoma do pulmão e melanoma, ao passo que os extratos obtidos a partir de folhas de *A. crassiflora* mostrou propriedades antifúngica (SILVA *et al.*, 2001). Devido à importância da espécie, frutos de *A. crassiflora* são frequentemente sendo coletadas no Cerrado (extrativismo). Machado *et al* (2015) indicaram que o extrato etanólico de folha de *A. crassiflora* tem um bom potencial como fonte nematocida natural.

Os tratamentos com extratos de sementes e folhas de *A. crassiflora* apresentaram 99,43% e 89,81% de eficácia anti-helmíntica, respectivamente. Os demais extratos não apresentaram eficácia significativa, sendo estatisticamente iguais ao tratamento com água. Os extratos de semente e folhas de *A. crassiflora*, apresentaram eficácia anti-helmíntica de 99,43% e 89,81%, respectivamente, e representam alternativas promissoras para o controle das helmintoses de ovinos, que poderão ser confirmadas após testes de toxicidade e avaliações *in vivo*, para a obtenção de anti-helmínticos naturais, de fácil aquisição, baixo custo e com menores impactos ambientais negativos (NOGUEIRA *et al*, 2009).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das folhas de *Annona crassiflora* sobre o controle de *Haemonchus contortus* em ovinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar os principais componentes com ação anti-helmíntica.

Caracterizar extratos das folhas com e sem taninos e os efeitos na inibição da eclodibilidade.

Analisar a eficácia *in vivo* para redução de ovos do nematódeo em fezes de ovinos alimentados com a folha da espécie.

Analisar os parâmetros sanguíneos dos animais tratados com *A. crassiflora*

Capítulo 1. Revisão de literatura

Eficácia anti-helmíntica de Annonaceae

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade explorada em quase todos os continentes, em diferentes climas, relevos e vegetações. No entanto, somente em alguns países a atividade apresenta expressão econômica e é conduzida, na maioria dos casos, de forma empírica e extensiva, com baixos níveis de tecnologia (LEITE, 2000).

As verminoses são ocasionadas por nematódeos, que se alojam no trato gastrointestinal de ovinos e prejudicam o desempenho e a lucratividade. Esses helmintos ocasionam perda de peso, comprometem a conversão alimentar, desnutrição e menor crescimento e fertilidade, além ocasionar óbito em quadros grave (VIEIRA, 2005).

O tratamento frequente dos ovinos com anti-helmínticos, empregado por criadores, tem sido a única medida de controle das helmintoses gastrointestinais (CHARLES, 1995). Esses produtos são compostos químicos que apresentam diferentes mecanismos de ação contra os nematódeos. Em virtude do elevado custo desses produtos e do pouco esclarecimento técnico, produtores e tratadores utilizam sub ou superdosagens, com periodicidade inadequada, o que conseqüentemente favorece a seleção de parasitos resistentes e a contaminação dos animais e do ambiente com resíduos medicamentosos (VIEIRA, 2012).

A resistência aos produtos anti-helmínticos é o principal problema para o tratamento da helmintose ovina e, juntamente com as perdas diretas e indiretas, pode comprometer ou até inviabilizar essa atividade. Dessa forma, o controle desses parasitos somente com anti-helmínticos tem se mostrado ineficaz (AMARANTE, 2004). Assim, tem se tornado de grande importância a busca por outros métodos de controle, com o objetivo de superar essa resistência e manter o controle efetivo dos parasitas nos rebanhos (MOLENTO; PRICHARD, 2001).

Existe uma necessidade de se repensar o uso do antihelmínticos, bem como desenvolver novas abordagens no controle de parasitas (WALLER, 1995). Idealmente, isto pode implicar uma abordagem integrada, incluindo o controle biológico, frequência reduzida de tratamentos com antihelmínticos sintéticos, raças resistentes a parasitas, bem como a utilização de plantas com propriedades antiparasitárias (VIEIRA, 2012).

A atividade terapêutica dos vegetais está relacionada aos metabólitos secundários, que possuem como principal função a de proteção do vegetal contra predadores (CHAGAS, 2004). Esses compostos têm sido utilizados como pesticidas no controle de diversos tipos de pragas e parasitas (CHAGAS *et al.*, 2002).

Apesar da grande variabilidade de plantas com relatos de atividade anti-helmíntica, poucos compostos bioativos promotores dessa ação nematicida já foram identificados (GHISALBERTI, 2002). Em contraste à medicina humana, a fitoterapia não é tão desenvolvida na medicina veterinária (HAMMOND *et al.*, 1997). GIRÃO *et al.* (1992), relataram que dentre as espécies de plantas utilizadas no tratamento de várias doenças, algumas são conhecidas como anti-helmínticas. Entretanto, poucas foram avaliadas cientificamente (HAMMOND *et al.*, 1997).

A família Annonaceae compreende cerca de 130 gêneros e 2300 espécies, distribuídas em países de clima tropical e subtropical (ALALI *et al.*, 1999). O gênero *Annona*, que possui mais de 120 espécies catalogadas, é muito apreciado no Brasil, por fornecer frutos comestíveis, como *Annona crassiflora* (araticum), *Annona squamosa* (fruta do conde) e *Annona muricata* (graviola). Os frutos são normalmente consumidos *in natura* ou usados em sucos, sobremesas e sorvetes (CORREA, 1984). Casca, folhas, raízes, frutos e sementes de espécies de *Annona* têm sido utilizados na medicina popular contra diabetes, malária e infecções (SOUSA *et al.*, 1991).

Annona crassiflora ('araticum' ou 'marolo') é uma espécie nativa de árvore do Cerrado pertencente as Annonaceae (LORENZI, 1998; SILVA, 2001). O fruto de *A. crassiflora* é apreciado por seu cheiro e sabor e apolpa é consumida *in natura* e também utilizado para preparar licor, doces, sorvetes e bolos (RIBEIRO *et al.*, 2000).

Extratos de *A. crassiflora* sementes também são usados na medicina popular para tratar picadas de cobra (CORREIA, 1984). Santos *et al.* (1996) purificou um composto de sementes de *A. crassiflora*, denominado araticulin, que mostraram citotoxicidade em células humanas de carcinoma do pulmão e melanoma, ao passo que os extratos obtidos a partir de folhas de *A. crassiflora* mostrou propriedades antifúngica (SILVA *et al.*, 2001). Devido à importância da espécie, frutos de *A. crassiflora* são frequentemente sendo coletadas no Cerrado (LORRENZI *et al.*, 2002).

Em estudos preliminares, os tratamentos com extratos de sementes e folhas de *A. crassiflora* apresentaram 99,43% e 89,81% de eficácia anti-helmíntica para nematódeos gastrintestinais de ovinos, respectivamente. Entretanto a eficácia de utilização desses metabólitos precisa ser confirmada após testes de toxicidade e avaliações *in vivo*, para a obtenção de anti-helmínticos naturais, de fácil aquisição, baixo custo e com menores impactos ambientais negativos. (NOGUEIRA *et al.*, 2009).

1.1 HELMINTOSES GASTRINTESTINAIS

A ocorrência das helmintoses gastrintestinais é um dos grandes obstáculos para o desenvolvimento pleno da criação de ruminantes em todo o mundo, principal em países de clima tropical (COLGRAVE *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2011). É considerado o maior entrave para a produção de pequenos ruminantes. (BASSETO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011).

Uma alta mortalidade principalmente para animais mais jovens e matrizes ovinas e caprinas, no periparto é associada com redução do ganho de peso, da produção leiteira e do desempenho reprodutivo dos animais (BORGES *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 2011). A morbidade é elevada e os animais jovens que se recuperam podem constituir refugos na criação (COLGRAVE *et al.*, 2008; GRAMINHA *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 2011). Leva-se em consideração que alguns animais infectados, aparentemente saudáveis, não conseguem atingir o potencial máximo de produtividade, aumentando os custos da produção, além de serem potenciais reservatórios (GIROTTI *et al.*, 2008).

2. CONTROLE DAS HELMINTOSES GASTRINTESTINAIS

Com o objetivo de acabar com os prejuízos causados por nematódeos gastrintestinais, ao longo dos anos, o uso de anti-helmínticos, com distintas bases químicas tem sido amplamente aplicado (CONDI *et al.*, 2009). Os grupos de anti-helmínticos de amplo espectro mais usados são os benzimidazóis (como sulfóxido de albendazol), os agonistas nicotínicos (imidazotiazóis e hidropirimidinas) e as lactonasmacrocíclicas (avermectinas) (COLES *et al.*, 2006; STEAR *et al.*, 2007). As salicilanilidas e os nitrofenóis, são dois outros grupos de espectro restrito que têm sido utilizados para o controle de *Haemoncus contortus* em ovinos (COLES *et al.*, 2006).

As interações parasita/hospedeiro são essenciais à adoção de métodos de controle efetivo bem como o conhecimento da epidemiologia das helmintoses (ARAÚJO *et al.*, 2004). É fundamental identificar as épocas críticas de contaminação para indicar as vermifugações, que são os tratamentos táticos adotados em determinadas regiões de acordo com as variações climáticas (SAUERESSIG, 2001).

Muitos estudos têm buscado alternativas de controle para complementar o uso dos anti-helmínticos sintéticos de acordo com Almeida *et al.* (2007),. Dentre essas soluções, diferentes técnicas de manejo têm sido adotadas (RUAS; BERNE, 2001). Uma dessas técnicas consiste no manejo do rebanho nas pastagens, que depende do conhecimento de fatores epidemiológicos dependentes do clima, das espécies de parasitas presentes e do tipo e do manejo das pastagens (EYSKER *et al.*, 2005). Uma vez que parte do ciclo biológicos desses parasitas ocorre nas pastagens (CÉZAR *et al.*, 2008).

O pastejo rotacionado é uma das estratégias de manejo que pode interromper o ciclo dos parasitas, de acordo com Cézar *et al.* (2008). Porém, é preciso que o tempo de permanência do rebanho nos piquetes seja inferior ao de desenvolvimento das larvas infectantes e o intervalo de descanso seja suficiente para inviabilizá-las ou destruí-las. A adoção do diferimento de áreas, bem como a descontaminação prévia das pastagens, também pode ser utilizada, principalmente para introduzir os animais mais suscetíveis (AMARANTE, 2004).

A alternância de categorias e/ou de espécies de hospedeiros no pastejo é outra estratégia de manejo utilizada. Animais adultos eliminam fezes em grande volume, mas com

OPG baixo, o que diminui a quantidade de larvas nas pastagens (COLES, 2006). A alternância com outras espécies ajuda no controle, pois quando as larvas infectantes são ingeridas por um hospedeiro não preferencial, o nematódeo tem o estabelecimento e a reprodução dificultados ou interrompidos Amarante (2004).

3. RESISTÊNCIA DE NEMATÓDEOS AOS ANTI-HELMÍNTICOS CONVENCIONAIS

A utilização dos vermífugos químicos tem sido realizada ao longo dos anos, sem conhecimento da epidemiologia e das interações parasita e hospedeiro, o que interfere na população parasitária (ARAÚJO *et al.*, 2004). O desconhecimento sobre o assunto induziu tratamentos indiscriminados com esses produtos sintéticos, utilizando subdosagens e com diagnósticos equivocados, com baixa rotatividade entre as bases anti-helmínticas (SOUZA *et al.*, 2008).

Essas práticas induzem seleção de populações de nematódeos resistentes aos fármacos e em determinados casos, houve resistência múltipla a diferentes bases farmacológicas (MEJÍA *et al.*, 2003). E sucede que diversos nematódeos possuem características genéticas que favorecem o desenvolvimento da resistência aos anti-helmínticos, entre elas estão as rápidas taxas na evolução da sequência de nucleotídeos e grande população efetiva, possibilitando elevada diversidade genética (BLOUIN *et al.*, 1995). Dessa forma, possuem meios de assegurar a disseminação dos genes da resistência além de apresentarem potencial genético para responder contra os fármacos químicos (KAPLAN, 2004).

Os nematódeos gastrintestinais têm apresentado um aumento expressivo na manifestação de resistência às principais classes de anti-helmínticos nas criações de ovinos de muitos países nos últimos 20 anos (TAYLOR *et al.*, 2009). O primeiro relato de um isolado de *Trichostrongylus colubriformis* resistente à moxidectina foi feito por Le Jambreet *al.* (2005) na Austrália. Quatro rebanhos analisados na Escócia, apresentaram resistência às bases dos três grupos de anti-helmínticos de amplo espectro segundo Sarginson *et al.* (2007). O primeiro relato de resistência de *Trichostrongylus axei* ao febendazol foi descrito por Palcyet *al.* (2010) na França.

Relatos de resistência em rebanhos ovinos Também no Brasil há relatos de resistência em rebanhos ovinos. Rosalinsk-Moraes *et al.* (2007) verificaram resistência à ivermectina, em 100% dos rebanhos da região da Associação dos Municípios do Alto Irani, oeste de Santa Catarina, e resistência à moxidectina, em 66,7% dos rebanhos do estado. Resistência à moxidectina em um rebanho em Jaboticabal, São Paulo, foi constatada por Buzzulini *et al.* (2007) t. Falbo *et al.* (2009) registraram, na área central do Paraná pela primeira vez, a ocorrência de resistência de *H. contortus* ao closantel em cordeiros.

Foi detectada no estado do Mato Grosso do Sul resistência dos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum* às bases farmacológicas

albendazol, ivermectina, levamisole, triclorfon, moxidectina, closantel e à associação entre albendazol, ivermectina e levamisole, em maior ou menor intensidade, sendo o mais resistente o gênero *Haemonchus* (Sczesny-Moraes *et al.*, 2010). Esses autores reportaram também um caso de resistência múltipla no estado. Duarte *et al.* (2012) observaram resistência ao albendazol em rebanhos ovinos no norte de Minas Gerais; levando em consideração que os gêneros de maior ocorrência foram *Haemonchus* e *Trichostrongylus*, sendo as larvas do primeiro, as mais prevalentes, mesmo após o tratamento dos animais.

Existe portanto, evidência que a estratégia de controle químico tem se tornado ineficaz devido ao aparecimento de populações de nematódeos resistentes aos medicamentos convencionais (AMARANTE, 2004). Assim, tem se tornado de grande importância a busca por outros métodos de controle, com o objetivo de superar essa resistência e manter o controle efetivo dos parasitas nos rebanhos (MOLENTO; PRICHARD, 2001).

4. ALTERNATIVAS FITOTERÁPICAS PARA CONTROLE DE NEMATÓDEOS EM RUMINANTES

Fitoterapia é o processo que consiste no tratamento por meio da utilização de plantas e tem sido praticada por toda a população mundial durante séculos, para o controle de uma variedade de problemas, desde doenças infecciosas às causadas por parasitas na pecuária e nos seres humanos (HAMMOND *et al.*, 1997). São comumente referidos como medicamentos etno-veterinário ou etno-médico e, geralmente, eram evitados pela medicina convencional e tradicionalista (BEHNKE *et al.*, 2008).

Entretanto, por ser uma alternativa sustentável ao uso de quimioterápicos, tem aumentado o interesse em propriedades antiparasitárias nos extratos de plantas (ATHANASIADOU *et al.*, 2007). Conforme Krychak-Furtado (2006), a fitoterapia pode também contribuir para aumentar os lucros da criação, uma vez que pode reduzir os custos, com a utilização dos fármacos convencionais.

A atividade terapêutica dos vegetais está relacionada aos metabólitos secundários, que possuem como principal função a de proteção do vegetal contra predadores (CHAGAS, 2004). Esses compostos têm sido utilizados como pesticidas no controle de diversos tipos de pragas e parasitas (CHAGAS *et al.*, 2002).

Anteriormente, as evidências das propriedades antiparasitárias das plantas eram baseadas em relatos e em observações. Entretanto o número de estudos controlados, que visam à verificação, à validação e à quantificação da atividade medicinal dessas plantas tem aumentado significativamente nos últimos anos (ATHANASIADOU *et al.*, 2007).

Apesar da grande variabilidade de plantas com relatos de atividade anti-helmíntica, poucos compostos bioativos promotores dessa ação nematicida já foram identificados (GHISALBERTI, 2002). Em contraste à medicina humana, a fitoterapia não é tão desenvolvida na medicina veterinária (HAMMOND *et al.*, 1997). GIRÃO *et al.* (1992),

relatarem que dentre as espécies de plantas utilizadas no tratamento de várias doenças, algumas são conhecidas como anti-helmínticas. Entretanto, poucas foram avaliadas cientificamente (HAMMOND *et al.*, 1997).

5. FAMÍLIA ANNONACEAE

A família Annonaceae compreende cerca de 130 gêneros e 2300 espécies, distribuídas em países de clima tropical e subtropical (ALALI *et al.*, 1999). O gênero *Annona*, que possui mais de 120 espécies catalogadas, é muito apreciado no Brasil, por fornecer frutos comestíveis, como *Annona crassiflora* (araticum), *Annona squamosa* (fruta do conde) e *Annona muricata* (graviola). Os frutos são normalmente consumidos *in natura* ou usados em sucos, sobremesas e sorvetes (CORREA, 1984). Casca, folhas, raízes, frutos e sementes de espécies de *Annona* têm sido utilizados na medicina popular contra diabetes, malária e infecções (SOUSA *et al.*, 1991). Essas atividades, no âmbito fitoquímico, foram inicialmente atribuídas aos alcalóides, constituintes químicos muito comuns nessa família, identificados em várias partes das plantas, pertencendo principalmente às classes benziltetraidroisoquino-línicos, aporfínicos e oxaporfínicos (ALALI *et al.*, 1999). Diversas atividades biológicas têm sido relacionadas a outra classe de compostos naturais isolados nesta família, as acetogeninas, sendo isoladas em praticamente todas as partes da planta (ALALI *et al.*, 1999).

As acetogeninas são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa isoladas exclusivamente a partir de plantas pertencentes à família Annonaceae (PETTIT *et al.*, 2008). Esses produtos naturais apresentam ampla variedade de propriedades biológicas, tais como atividades citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana, e tem sido despertado interesse crescente devido ao potencial para inibir células resistentes a múltiplos fármacos (BERMEJO *et al.*, 2005).

Diferentes espécies de *Annona* têm apresentado efeitos nematicidas. Em ensaio *in vitro*, foi observado que o extrato aquoso de *Annona senegalensis* promoveu redução significativa no desenvolvimento de ovos de *Haemonchus contortus* (Alawaet *et al.*, 2003). Danget *et al.* (2011) também confirmaram o efeito nematicida de extratos metanólicos e de acetato de etila de sementes de *Annona squamosa* contra os nematódeos parasitas de plantas *Meloidogyne incognita* e *Bursaphelenchu xylophilus*.

Outro estudo conduzido por Ferreira e colaboradores (2013) demonstrou a eficácia do extrato aquoso de *Annona muricata* contra ovos, larvas e vermes adultos de *H. contortus*. Recentemente, a pesquisa de Machado *et al.* (2015) revelou que o extrato de folhas de *A. crassiflora* apresentou alta atividade contra *Caenorhabditi selegans* quando comparadas com o controle positivo sintético. Essa potente ação nematicida observada no extrato hidroalcoólico pode ser relacionada aos conhecidos compostos nematicidas presentes nela. Metabólitos importantes são ácido fórmico, tóxico em nematódeo expostos (Djinet *et al.*, 1994) e ácido γ -aminobutírico, que paralisar músculos dos helmintos (Perry *et al.*, 2004).

Trigonelina, presente no extrato hidroalcolico de *A. crassiflora*, desempenha um papel importante na resistência das plantas ao ataque de patógenos e possui atividade inibitória contra acetilcolinesterase, que representa alvo de vários nematicidas comerciais (Satheeshkumaret al., 2010).

Outra classe de componentes químicos desse gênero de planta são os flavonoides, que têm efeitos importantes sobre a quimioprevenção e terapia do câncer. Santos e Salantino (2000) estudaram flavonoides foliares de Annonaceae e relataram a presença de kaempferol e quercetina (flavonoides) em *A. crassiflora*. Um grande número de cientistas relatou que alguns flavonoides têm atividades antimutagênica e anticancerígenas contra agentes genotóxicos (Santos, Salantino, 2000; Galati, O'Brien, 2004).

Ünderet al. (2004) relataram que a quercetina foi capaz de reduzir significativamente a ruptura da cadeia de DNA induzida por mitomicina C em linfócitos humanos. Além disso, campferol e quercetina foram capazes de inibir a hemólise, peroxidação de lipídeos e formação de radicais peróxidos, exercendo atividade antioxidante potente (NG et al., 2003). Embora o mecanismo de ação da quercetina e outros flavonoides para proteger contra danos no DNA e a potencialidade contra carcinogênese sejam desconhecidos, sugere-se que os flavonoides sequestrantes podem atuar como antioxidantes de radicais livres, inibidores de crescimento de células tumorais, indutores de apoptose, moduladores da reparação do DNA ou inativadores cancerígenos (Lee et al, 2003;. Duthie, Dobson, 1999).

5.1 *Annona crassiflora*

Annona crassiflora ('araticum' ou 'marolo') é uma espécie nativa de árvore do Cerrado pertencente as Annonaceae (LORENZI, 1998; SILVA, 2001). O fruto de *A. crassiflora* é apreciado por seu cheiro e sabor. A polpa da fruta é consumida *in natura*, e também utilizada para preparar licor, doces, sorvetes e bolos (RIBEIRO et al., 2000).

Extratos de *A. crassiflora* sementes também são empregados na medicina popular para tratar picadas de cobra (CORREIA, 1984). Santos et al. (1996) purificou um composto de sementes de *A. crassiflora*, denominado araticulin, que mostraram citotoxicidade em células humanas de carcinoma do pulmão e melanoma, ao passo que os extratos obtidos a partir de folhas de *A. crassiflora* mostrou propriedades antifúngica (SILVA et al., 2001). Devido à importância da espécie, frutos de *A. crassiflora* são frequentemente sendo coletadas no Cerrado (extrativismo). Além disso, a ocupação agrícola do Cerrado está impedindo a regeneração natural de espécies.

Em estudo preliminar, Machado et al.(2015) indicaram que o extrato etanólico de folha de *A. crassiflora* tem um bom potencial como fonte nematicida natural. Verificou-se também que os tratamentos com extratos de sementes e folhas de *A. crassiflora* apresentaram 99,43% e 89,81% de eficácia anti-helmíntica, respectivamente. Os extratos de semente e folhas de *A. crassiflora*, apresentaram alternativas promissoras para o

controle das helmintoses de ovinos, que poderão ser confirmadas após testes de toxicidade e avaliações *in vivo*, para a obtenção de anti-helmínticos naturais, de fácil aquisição, baixo custo e com menores impactos ambientais negativos. (NOGUEIRA *et al.*, 2009)

6. Considerações finais

O uso de extratos de plantas anonáceas pode representar alternativa promissora contra helmintos, possibilitando a obtenção de novos compostos com ação nematicida em parasitos multiresistentes. A bibliografia sobre esses compostos ainda é escassa e fomenta novas pesquisas sobre a ação dos metabólitos secundários componentes característicos dessa família de vegetais contra diferentes classes de parasitos de animais e humanos.

REFERÊNCIAS

ALALI, F.Q.; LIU, X.X.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceousacetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, v.62, n.3, p.504-40, 1999.

Alawa, C.B.I., A.M. Adamu, J.O. Gefu, O.J. Ajanusi, P.A. Abdu, N.P. Chiezey, J.N. Alawa and D.D. Bowman. In vitro screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernoniaamygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v. 1,n. 113, p. 73- 81.2003.

ALMEIDA, M. A. O.; DOMINGUES, L. F.; ALMEIDA, G. N.; SIMAS, M. M. S.; BOTURA, M. B.; CRUZ, A. C. F. G.; SILVA, A. V. A. F.; MENESES, T. P.; BATATINHA, M. J. M.; Efeitos dos extratos de folhas de *Menthapiperita* L. e de *Chenopodiumambrosoides* L. sobre cultivos de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 16, n. 1, p. 57-59. 2007.

AMARANTE, A. F. T., AMARANTE, M. R. V. Breeding sheep for resistance to *nematode infections*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 2, n. 3, p. 147-161, 2004.

ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; CAMPOS, A. K.; SÁ, N. C.; ASSIS, R. C. L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporiumthamasium*.**Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 457-463, 2004.

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

BASSETTO, C. C.; SILVA, B. F.; FERNANDES, S.; AMARANTE, A. F. T. Contaminação da pastagem com larvas infectantes de nematóides gastrintestinais após o pastejo de ovelhas resistentes ou susceptíveis à verminose. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 63-68, 2009.

BEHNKE, J. M.; BUTTLE, D. J.; STEPEK, G.; LOWE, A.; DUCE, I. R. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 1, n. 29, 2008. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2559997/>>. Acesso em 10 abr. 2017.

BERMEJO, A.; FIGADERA, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Report**, London, v.22, p.269-303, 2005.

BIANCHIN, I.; HONER, M. R.; NUNES, S.; NASCIMENTO, Y. A. The effect of stocking rates and treatment schemes on the weight gain of weaned Nellore steers in the Brazilian savanna. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 27, p. 1-8, 1995.

BLOUIN, M. S.; YOWELL, C. A.; COURTNEY, C. H.; DAME, J. B. Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. **Genetics**, v. 141, n. 3, p. 1007-1014, 1995.

BORGES, F. A.; SILVEIRA, D. M.; GRAMINHA, E. B. N.; CASTAGNOLLI, K. C.; SOARES, V. E.; NASCIMENTO, A. A.; COSTA, A. J. Fauna helmintológica de bovinos da região de Jaboticabal, Estado de São Paulo, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2001.

BUZZULINI, C.; SOBRINHO, A. G. S.; COSTA, A. J.; SANTOS, T. R.; BORGES, F. A.; SOARES, V. E. Eficácia anti-helmíntica comparativa da associação albendazole, levamisole e ivermectina à moxidectina em ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 891-895, 2007.

CATTO, J. B.; BIANCHIN, I.; TORRES JUNIOR, R.A.A. Effects of deworming of cow-calf beef herds in brazilian savannas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 188-194, 2005.

CÉZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 2083-2091, 2008.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 156-160, 2004.

CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrado emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

CHARLES, T. P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrointestinais parasitas de ovinos deslanados no semiárido pernambucano. **Ciência Rural**, v. 25, n. 1, p. 437-442, 1995.

COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCRUYSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 3-4, p. 167-185, 2006.

COLGRAVE, M. L.; KOTZE, A. C.; HUANG, Y. H.; O'GRADY, J.; SIMONSEN, S. M.; CRAIK, D. J. Cyclotides: natural, circular plant peptides that possess significant activity against gastrointestinal nematode parasites of sheep. **Biochemistry**, v. 47, n. 20, p. 5581-5589, 2008.

CONDI, G. K.; SOUTELLO, R. G. V.; AMARANTE, A. F. T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3-4, p. 213-217, 2009.

CORRÊA, E. S.; COSTA, F. P.; MELO FILHO, G. A.; CEZAR, I. M.; PEREIRA, M. A.; COSTA, N. A.; SILVEIRA FILHO, A.; TEIXEIRA NETO, J. F. **Sistema e custo de produção de gado de corte no Estado do Pará – Região de Paragominas**. Campo Grande, MS: EMBRAPA, 2005. 8p. (Comunicado Técnico, 96).

CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, 1984. 195p.

DANG Q.L., KIM W.K., NGUYEN C.M., CHOI Y.H., CHOI G.J., JANG K.S., PARK M.S., LIM C.H., LUU N.H., KIM J.C. Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. **Journal Agriculture Food Chem**, v.59, n. 20, p.11160-11167, 2011.

DJIAN C.; PONCHET M.; CAYROL J.C. Nematocidal properties of carboxylic acids and derivatives. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [v. 50, n 3](#), p. 229-239, 1994.

DUTHIE, S. J.; DOBSON, V. L. Flavonóides dietéticos protegem o DNA colonócítico humano do ataque oxidativo *in vitro*. **European Journal of Nutrition**, v. 38, n. 1, p. 28-34, 1999.

DUARTE, E. R.; SILVA, R. B.; VASCONCELOS, V. O.; NOGUEIRA, F. A.; OLIVEIRA, N. J. F. Diagnóstico do controle e perfil de sensibilidade de nematódeos de ovinos ao albendazol e ao levamisol no norte de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 147-152, 2012.

DUARTE, E. R.; SILVA, R. B.; VASCONCELOS, V. O.; NOGUEIRA, F. A.; OLIVEIRA, N. J. F. Diagnostic of the control and sensitivity profile of nematodes from sheep to albendazole and levamisole in northern Minas Gerais, Brazil **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.32 n.2, 2012. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000200010>. Acesso em 10 abr. 2017.

EYSKER, M.; BAKKER, N.; KOOYMAN, F. N. J.; PLOEGER, H. W. The possibilities and limitations of evasive grazing as a control measure for parasitic gastroenteritis in small ruminants in temperate climates. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 95-104, 2005.

FALBO, M. K.; SOCCOL, V. T.; SANDINI, I. E.; NEUMANN, M.; ISHIY, T. M. Atividade anti-helmíntica do triclorfon e closantel em cordeiros naturalmente infectados por *Haemonchus* sp. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 926-930, 2009.

FERREIRA, L. E.; CASTRO, P. M. N.; CHAGAS, A. C. S.; FRANÇA, S. C.; BELEBONI R. O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 327-332, 2013.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Toxicidade potencial de flavonóides e outros compostos fenólicos alimentares: significado para suas propriedades quimiopreventivas e anticancerígenas. **Biologia Médica de radicais livres**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolites with antinematodal activity. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 26, p. 425-506, 2002.

GIRÃO, E.S.; MEDEIROS, L.P.; GIRÃO, R.N. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrointestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. **Ciência Rural**, v.22: 197-202, 1992.

GIROTTI, M. J.; AQUINO, L. F. B.; PEREZ, R. B.; NEVES, M. F.; SACCO, S. R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 1, n. 10, 2008. Disponível em <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ny1YeBL8accnOBG_2013-5-28-16-5-59.pdf>. Acesso em 10 abr. 2017.

GRAMINHA, E. B. N.; MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; CÂNDIDO, R. C.; SILVA, G. S.; COSTA, A. J. Avaliação in vitro da patogenicidade de fungos predadores de nematódeos parasitos de animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 11-16, 2001.

GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolites with antinematodal activity. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier Science BV, v. 26, p. 425–506, 2002.

HAMMOND, J. A; FIELDING, D. & BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical Veterinary Medicine. **Veterinary Research Communications**. v. 21, 1997. p. 214-217.

HENNON, S.P. **Les Résistances aux anthelminthiques: synthèse bibliographique des connaissances actuelles**. (THESE Docteur vétérinaire). Diplôme d'Etat. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 1993.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 477-481, 2004.

KRYCHAK-FURTADO, S. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Departamento de fitotecnia e fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LEE, JC., KIM, J., PARK, JK., CHUNG, GH. . e JANG, YS. O anti-oxidante, em vez de pró-oxidante: as atividades da quercetina sobre as células normais: quercetina protege timócitos de camundongos a partir de apoptose mediada glucose-oxidase. **Experimental Cell Research** , v. 291, n. 2, p. 386-397, 2003.

LEITE, E. **Ovinocaprinocultura no Nordeste: organização e crescimento** - 2000. Disponível

em:<<http://www23.sede.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/b1bbbc852ee1057183256800005ca0ab/dde186b38a693506832569030061ee63?OpenDocument>>. Acesso em: 11 de março de 2011.

LE JAMBRE, L. F.; GEOGHEGAN, J.; LYNDAL-MURPHY, M. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1-2, p. 83-90, 2005.

LIU, G. E.; BROWN, T.; HEBERT, D. A.; CARDONE, M. F.; HOU, Y.; CHOUDHARY, R. K.; SHAFFER, J.; AMAZU, C.; CONNOR, E. E.; VENTURA, M.; GASBARRE, L. C. Initial analysis of copy number variations in cattle selected for resistance or susceptibility to intestinal nematodes. **Mamm Genome**, v. 22, n. 1-2, p. 111-121, 2011.

LORENZI, H. Árvores brasileiras - **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP, Editora Plantarum, v. 2, 1998.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: exóticas e cultivadas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, Nova Odessa, SP, Editora Plantarum 2002.

MACHADO, A.R.T.; FERREIRA, S.R.; MEDEIROS, F.S.M., FUJIWARA, R.T.; FILHO, J.D.S. ; LÚCIA PINHEIRO SANTOS PIMENTA, L.P.S. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites & Vectors**, v.8, p.113, 2015.

MEJÍA, M. E.; FERNÁNDEZ IGARTÚA, B. M.; SCHMIDT, E. E.; CABARET, J. Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? **Veterinary Research**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 461-467, 2003.

MILLER, J. E.; BURKE, J. M.; TERRILL, T. H.; KEARNEYA, M. T. A comparison of two integrated approaches of controlling nematode parasites in small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3-4, p. 300- 310, 2011.

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

NG, TB.; LIU, F.; LU, Y.; CHENG, CHK. e WANG, Z.. A atividade antioxidante de compostos a partir da erva medicinal *tataricusAster*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 136 v. 2, p. 109-115, 2003.

PALCY, C.; SILVESTRE, A.; SAUVE, C.; CORTET, J.; CABARET, J. Benzimidazole resistance in *Trichostrongylus axei* in sheep: Long-term monitoring of affected sheep and genotypic evaluation of the parasite. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 1, p. 68-74, 2010.

PERRY R.N, MAULE A.G. Physiological and biochemical basis behavior. In: Gauler R, Bilgrami L, editors. **Nematode Behavior**. New Jersey: CABI Publishing; 2004.

PETTIT, G.R. et al. Antineoplastic agents 558 *Ampelocissus* sp. cancer cell growth inhibitory constituents. **Journal of Natural Products**, v.71, n.1, p.130-133, 2008.

RIBEIRO, J.F.; BRITO, M.A DE; SCALOPPI JUNIOR, E.J.; FONSECA, C.E.L. **Da Araticum (Annona crassiflora Mart.)**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 52p. (Série frutas nativas)

ROSALINSK-MORAES, F.; MORRETO, L. H.; BRESOLIN, W. S.; GABRIELLI, I.; KAHER, L.; ZANCHET, I. K.; SONAGLIO, F.; THOMAZ-SOCCOL, V. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do Alto Irani (AMAI) oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 559-565, 2007.

RUAS, J. L.; BERNE, M. E. A. Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos. In: Riet-Correa, F. (Org.); Schild, A. L.; Méndez, M. D. C.; Lemos, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Livraria Varela, v. 2, cap. 1, p. 89-105, 2001.

SANTOS, D; SALATINO, M. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: Taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, no. 6, p. 567-573, 2000.

SARGINSON, N. D.; JACKSON, F.; BARTLEY, D. J.; WILSON, D. J.; STENHOUSE, L. J.; PENNY, C. D. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 145, n. 1-2, p. 65-76, 2007.

SATHEESHKUMAR N, MUKHERJEE PK, BHADRA S, SAHA BP. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L and its constituents. **Phytomedicine**, v.17, n. 3-4, p.292-295, 2010.

SAUERESSIG, T. M. **Controle estratégico da verminose bovina em propriedades rurais no Distrito Federal**. (Recomendação técnica, 26).Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2001, 2p.

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

SILVA, D.B.; SILVA, J.A.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. 2001. **Frutas do Cerrado**. EMBRAPA/Cerrados. Planaltina, DF.

SIQUEIRA, E.R.; ROÇA, R. Q.; FERNANDES, S.; UEMI, A. Características sensoriais da carne de cordeiros das raças Hampshire Down, Santa Inês e mestiços Bergamácia x Corriedale, abatidos com quatro distintos pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n.3, p.1269-1272, 2002.

SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A. **Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 1991. 771p.

SOUZA, W. M. A.; RAMOS, R. A. N.; ALVES, L. C.; COELHO, M. C. O. C.; MAIA, M. B. S. Avaliação *in vitro* do extrato hidroalcoólico (EHA) de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre o desenvolvimento de ovos de nematódeos gastrointestinais (Trichostrongylidae).**Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 12, n. 3, p. 278-281, 2010.

STEAR, M. J.; DOLIGALSKA, M.; DONSKOW-SCHMELTER, K. Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock.**Parasitology**, v. 134, n. 2, p. 139-151, 2007.

STRATFORD, C.H.; MCGORUM, B.C.; PICKLES, K.J.; MATTHEWS, J.B. An update on cyathostomins: anthelmintic resistance and diagnostic tools. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, Suppl. 39, p. 133-139, 2011.

TAYLOR, M. A.; LEARMOUNT, J.; LUNN, E.; MORGAN, C.; CRAIG, B. H. Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of methods used for their detection. **Small Ruminant Research**, v. 86, n. 1-3, p. 67–70, 2009.

ÜNDEGER, U.; AYDÝN, S.; BAŞARAN, A A. e BAŞARAN, N S.. Os efeitos de modulação de quercetina e rutina sobre danos ao DNA induzidos mitomicina C. **Toxicology Letters**, v. 151, n. 1, p. 143-149, 2004.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 99-103, 1999.

VIEIRA, T. M.. **Extratos de fungos na inibição da eclodibilidade e do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus***, Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

VIEIRA, L. S. **Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos**. Sobral: Embrapa CNPC, 2005.

WALLER, P. J.; DASH, K. M.; BARGER, I. A.; LE JAMBRE, L. F.; PLANT, J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. **Veterinary Research**, v.136 p. 411-413, 1995.

CAPÍTULO 2

Folhas de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) no controle de *Haemonchus contortus*

Formatado de acordo com as normas do periódico

Tropical Animal Health Production

Federal University of Minas Gerais, Brazil, Institute of Agricultural Sciences. Avenida Universitária, 1000 - Bairro Universitário - Montes Claros - Minas Gerais. 39400-006, Brasil.* Corresponding author. Tel.: + 55 38-2101-7707; Fax: + 55 38 2101-7703. E-mail address: duartevet@hotmail.com (E. R. Duarte).

Resumo

A produção de ovinos tem se destacado no Brasil, e consequentemente no mundo de forma muito representativa. Entretanto, tem enfrentado problemas que afetam seu desempenho e, entre eles, a ação parasitária. Para tentar diminuir este entrave, os produtores têm usado de forma sistemática anti-helmínticos, juntamente com diferentes técnicas de manejo. Porém, devido à utilização incorreta desses fármacos tem-se favorecido a seleção de populações de nematódeos resistentes. Assim, tem aumentado o interesse em propriedades antiparasitárias de extratos de plantas, por ser uma alternativa sustentável ao uso de quimioterápicos. *Annona crassiflora*, conhecida como panã, araticum ou articum, é espécie de vegetal do Cerrado, que tem sido mencionada com uso nematicida. A literatura etnofarmacológica registra propriedades medicinais de suas folhas como medicação anti-helmíntica. Nesta pesquisa, o estudo fitoquímico de extratos desta planta permitiu determinar a presença de flavonoides. Realizaram-se testes de inibição de desenvolvimento larval (IDL), da inibição da eclodibilidade (IE) e da redução do ovos por grama de fezes *in vivo* para a determinação da eficácia da ação dos extratos e da administração via oral de folhas secas. Para averiguar o comportamento dos metabólitos secundários nos organismos dos animais, analisou-se os parâmetros sanguíneos dos mesmos no período da administração das folhas. O extrato aquoso das folhas com tanino apresentou 97,2% de eficácia na concentração de 168 mg/ml. Sem o tanino, esta eficácia foi de 100% na concentração de 5 mg/ml. O extrato etanólico com tanino foi eficaz em todas as concentrações. Entretanto, com tanino, a eficácia foi de 93%, na concentração de 10 mg/ml. O extrato de acetato de etila com tanino teve eficácia acima de 90% a partir da concentração de 84,3 mg/ml. Sem o tanino, a partir da concentração de 5 mg/ml, a eficácia foi superior a 90%. No teste de inibição do desenvolvimento larval, a eficácia foi acima de 97

% em todas as concentrações. No teste *in vivo* não foi constatado eficácia na administração das folhas, porém observou-se um aumento no ganho de peso corporal, ao longo do tempo. Não foram observadas alterações fisiológicas em parâmetros do sangue após 15 dias da administração de *A. crassiflora*, o que indica que os metabólitos da planta não promoveram inibição da hematopoiese. Conclui-se que *A. crassiflora* apresenta grande potencial no controle da verminose em ovinos, sendo necessário novos testes de toxicidade, por outras vias e em espécies animais de interesse, além de testes *in vivo* com diferentes formas de preparo, para serem indicados como alternativa no tratamento das helmintoses gastrintestinais.

Palavras-chave: Ovinos, anti-helmínticos, extratos de plantas, coprocultura, Cerrado, Parametros sanguíneos, hemoncose.

Abstract

The production of sheep has been prominent in Brazil, and consequently in the world in a very representative way. However, it has faced problems which affect its performance, among them the parasitic action. Trying to reduce this barrier, producers have been using anti-helminths systematically along with different handling techniques. However, due to the incorrect use of these drugs, the selection of resistant nematode populations has been favored. Thus, interest in antiparasitic properties of plant extracts has increased, as it is a sustainable alternative to the use of chemotherapeutics. *Annona crassiflora*, known as panã, araticum or articum, is a Cerrado plant species that has been mentioned with nematicidal use. The ethnopharmacological literature registers medicinal properties of its leaves as anthelmintic medication. In this research, the phytochemical study of extracts of this plant allowed to determine the presence of flavonoids. Inhibition of larval development (IDL), inhibition of hatchability (IE) and reduction of eggs per gram of feces *in vivo* were performed for the determination of the efficacy of extracts and oral administration of dry leaves. In order to investigate the behavior of the secondary metabolites in the organisms of the animals, the blood parameters of the animals were analyzed in the period of administration of the leaves. In the *in vitro* experiment, the aqueous extract of the leaves with tannin presented 97.2% efficacy at the concentration of 168 mg / ml. Without the tannin, this efficacy was 100% at the concentration of 5 mg / ml. The ethanolic extract with tannin was effective at all concentrations. However with tannin, the efficacy was 93%, at the concentration of 10 mg / ml. The extract of ethyl acetate with tannin had efficacy above 90% from the concentration of 84.3 mg / ml. Without tannin, from the 5 mg / ml concentration, the efficacy was greater than 90%. In the inhibition test of larval development, the efficacy was above 97% at all concentrations. In the *in vivo* experiment no efficacy was observed in leaves administration, but an increase in body weight gain was observed over time. No physiological changes were observed in blood parameters after 15 days of administration of *A. crassiflora*, indicating that the plant metabolites did not promote inhibition of hematopoiesis. It is concluded that *A.*

crassiflora presents great potential in the control of helminthosis in sheep, then new tests of toxicity, by other routes and in animal species of interest, besides *in vivo* tests with different forms of preparation are necessary to be indicated as an alternative in the treatment of gastrointestinal helminthes.

Key words: Sheep, anthelmintic, plant extracts, coproculture, Cerrado, Blood parameters, hemoncosis.

Introdução

As infecções por helmintos gastrintestinais causam prejuízos à pecuária e podem inviabilizar a criação de pequenos ruminantes infectados com populações multirresistentes aos anti-helmínticos (Minho, 2006). *Haemonchus contortus*, um dos principais nematódeos de ovinos, promove anemia hemorrágica, edema submandibular, com altas taxas de mortalidade em cordeiros jovens e ovelhas no periparto (Minho, 2006, Bastos et al., 2017). A hemoncosose reduz o ganho de peso e a produção de carne, lã e leite e ocasionam perdas financeiras significativas para os produtores de ovinos (Miller et al., 2012; Besier, 2014).

A maioria dos anti-helmínticos disponíveis no mercado foi desenvolvida a partir da década de 1960 e são essenciais no controle da verminose (Amarante, Sales, 2007). Contudo, a resistência a esses compostos tem sido detectada para nematódeos de ruminantes em diferentes continentes (Raza et al., 2016, Ramos et al., 2016, Bastos et al., 2017).

A constante utilização de anti-helmínticos de forma inadequada favorece a seleção de parasitas resistentes, inviabilizando a criação dos animais (Ramos et al., 2016). A utilização de plantas com efeito anti-helmíntico tem representado alternativa promissora para o controle desses nematódeos, o que tem estimulado pesquisas em abordagens alternativas, incluindo a fitoterapia (Githiori et al., 2006). O bioma Cerrado ocupa boa parte do Brasil Central. Dentre as espécies típicas desse Bioma, *Annona crassiflora* Mart (Annonaceae), popularmente conhecida como “panã”, “araticum” é uma das espécies vegetais com ampla utilização pela população humana em consequência do valor alimentício dos frutos (Silva et al., 2001). O gênero *Annona* têm demonstrado atividade nematicida contra os nematódeos *Haemonchus* sp., *Bursaphelenchus* sp. e *Meloidogyne* sp., indicando potencial para o controle alternativo desses parasitos (Ferreira et al., 2013). Em um estudo avaliou-se o efeito do extrato aquoso (7,1 mg/ml) das cascas de *Annona senegalensis* Pers. sobre *H. contortus* e observou-se redução significativa de 85% na eclodibilidade de larvas (Alawaet et al., 2003). Em outra pesquisa constatou-se que extrato aquoso da folha de *Annona muricata* 50% inibiu a eclodibilidade desse nematódeo em 84,91% e esse efeito foi dose dependente. Os autores também constaram redução da motilidade de larvas L3 na concentração de 25% (Ferreira et al., 2013).

Entretanto, não se conhece o efeito de extratos de *Annona crassiflora* sobre esse nematódeo. Nesta pesquisa foram avaliados os efeitos das folhas dessa espécie vegetal sobre a eclodibilidade e desenvolvimento larval de *H. contortus*. Para identificar os principais componentes com ação anti-helmíntica, extratos das folhas foram caracterizados e os efeitos na inibição da eclodibilidade foram avaliados após a remoção de taninos. Analisou-se também a eficácia *in vivo* na redução de ovos do nematódeo em fezes e o ganho de peso e parâmetros sanguíneos de ovinos tratados com a folha da planta.

Material e Métodos

Material vegetal

De oito espécimes de *A. crassiflora* adultas com aproximadamente 5 metros de altura foram coletadas folhas em março de 2016 no município de Montes Claros/MG/Brasil (S 16°54'11.4 W 43°52'02.9"). A espécie foi identificada de acordo com características morfológicas e amostras foram depositadas no herbário da Universidade Estadual de Montes Claros, com número de voucher 3475. As amostras foram minuciosamente vistoriadas visualmente e os materiais com lesões ou deteriorações foram descartados. As folhas foram desidratadas em estufa com circulação forçada de ar (TE 394/4, Tecnal Equipamentos Científicos Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), à 40°C ± 5 até atingirem peso constante. Posteriormente, foram moídas e armazenadas em pacotes de papel livres da incidência de luz (Morais-Costa et al., 2015).

Preparo dos extratos

Para o preparo do extrato aquoso (EA), 10g de folhas desidratadas e trituradas foram adicionadas a 50 mL de água destilada estéril. Esse material foi incubado em banho-maria a 40°C, por 60 minutos. Para os extratos etanólico e acetato de etila, 100g de folhas desidratadas e trituradas foram acondicionadas em dois recipientes de vidro âmbar acrescentando 1000 mL de álcool ou de acetato de etila. Os frascos foram vedados e conservados em local escuro em temperatura ambiente durante sete dias. Os extratos foram filtrados, em funil com algodão e gaze e desidratados em estufa de circulação forçada de ar a 40°C até atingirem peso constante para remoção dos solventes. Posteriormente, foram raspados e acondicionados em local fresco, livre da incidência de luz e conservados a 4°C (Morais-Costa et al., 2015). Subamostras foram submetidas à determinação de matéria seca para cálculo das concentrações a serem testadas.

Para obtenção de extratos sem tanino, 1 g do material seco foi dissolvido em 13 mL de água quente à 90° C. Após resfriado em temperatura ambiente foi adicionado 0,2µl de NaCl a 10%. Posteriormente foi filtrado em filtro de bukner com bomba a vácuo. Centrifugou-se 1 mL do filtrado a 1800×g por seis minutos com solução de 4mL de gelatina

a 1%. Os sobrenadantes foram usados para avaliar os extratos sem tanino. Para a comparação dos efeitos anti-helmínticos dos extratos com e sem tanino, ambos os extratos foram padronizados a 150 mg/mL.

Determinação dos metabólitos secundários

A separação dos metabólitos secundários foi realizada por *High-performance liquid chromatography*(HPLC). As análises foram realizadas em equipamento Merck-Hitachi (Alemanha) composto de bomba L-6200A, injetor automático AS-2000A, detector UV-VIS L-4250 e integrador D-2500. Utilizou-se coluna de ODS (250 x 4,0 mm d.i., 5 mm, Merck, Alemanha) fluxo de 1,0 mL/min, temperatura de 40°C, procedendo-se a eluição com gradiente linear de H₂O (A) e CH₃CN (B): 0 min 90% A, 10% B; 60 min 10% A, 90% B, seguido de 5 min de eluição isocrática. A detecção foi realizada no UV a 220 nm. Foram utilizados solventes grau HPLC (Merck, Alemanha) e a remoção do ar foi realizada por sonificação (Valadares et al., 2003).

Para as análises, as amostras foram dissolvidas em metanol grau HPLC, para concentrações de 10 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente, para extratos e frações, sendo as soluções centrifugadas a 10.000 rpm, durante 10 min, previamente à injeção. Aliquotas dessas soluções (5µL) foram injetadas de modo automático (Valadares et al., 2003).

O teor total de proantocianidinas (tanino condensado) foi quantificado nos extratos após solvólise catalizada por ácido com *n*- BuOH/HCl 37% (95:5), segundo metodologia previamente descrita (Hiemann et al., 1986). Após a reação com *n*-BuOH/HCl 37% (95:5), procedeu-se à leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 540 nm, sendo os valores expressos em porcentagem de cloreto de cianidina. Os resultados corresponderam à média de três determinações, seguidos dos desvios-padrão.

Inibição da eclodibilidade

Todos os procedimentos foram desempenhados de acordo com os princípios da experimentação animal aprovados com o protocolo 275/2013 do Comitê de ética de uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Foi utilizada a metodologia modificada do teste de inibição da eclodibilidade para determinar a eficácia anti-helmíntica, proposto pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP), segundo Coles et al. (1992). Os ovos foram recuperados por meio da metodologia adaptada de Bizimnyera et al. (2006). As fezes foram coletadas, maceradas, homogeneizadas, lavadas e filtradas em tamis de 106, 53 e 20 µm. Posteriormente, os ovos foram coletados da segunda e terceira tamis e distribuídos em tubos Falcon de 14 mL e centrifugados a 2.000 rpm por seis minutos.

O sobrenadante foi descartado e completaram-se os tubos Falcon com solução hipersaturada para a ressuspensão do sedimento. Centrifugou-se novamente e o

sobrenadante foi lavado na peneira de 20 µm, com água estéril até a retirada total da solução salina. A mistura de ovos e água estéril foi armazenada em Béquer, até o momento de utilização. Os extratos foram diluídos em água purificada estéril para a obtenção das concentrações a serem testadas.

Em placas de microdiluição, foram adicionados 100 µL da mistura das concentrações 337,0; 168,5; 84,3; 42,1; 21,6 com tanino e 10,0; 5,0; 2,5; 1,3 e 0,6 mg/mL dos extratos sem tanino. Foram utilizados 100 µL de fosfato de lavamisol a 0,6 mg/mL como controle positivo e água estéril como controle negativo.

As placas, cobertas com filme plástico foram incubadas em estufa BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 28°C por 72h. Após esse período, foram adicionados 100 µL de formaldeído 10% (v/v). Foram armazenadas sob refrigeração a aproximadamente 4°C, para evitar a proliferação de fungos.

As análises foram procedidas em microscópio óptico com objetiva de 10x. Quantificou-se os ovos blastomerados, larvados e as larvas de primeiro estágio (L1). Os experimentos foram realizados com cinco repetições por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado. A eficácia média de inibição da eclodibilidade foi calculada por meio da fórmula adaptada de Coles et al. (1992):

$$\% \text{ Eficácia} = 100 \times [1 - (L1 / \text{número inicial de ovos})].$$

No teste de inibição da eclodibilidade, o número de L1 e de ovos não eclodidos observados por parcela foi convertido em valores relativos ao número médio de ovos iniciais. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Duncan. A análise de regressão probit foi usada para estimar as concentrações suficientes para inibir 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) das eclosões das larvas. As análises foram processadas no pacote estatístico SAEG 9.1., considerando-se 5% de significância.

Inibição do desenvolvimento larval (IDL)

Foi utilizada a técnica adaptada de coprocultura quantitativa segundo Borges (2003), modificada por Nery et al. (2010), utilizando-se 2g de fezes para cada coprocultura (COP). O grupo controle não tratado, foi utilizada água destilada estéril e no grupo tratado foi adicionado 2 ml de solução de fosfato de levamisol (0,3 mg/g). As folhas desidratadas foram avaliadas nas concentrações finais de 83,3 a 333,3 mg (ms)/g de COP.

Cada COP foi acrescida de 2g de vermiculita e 2 ml de água destilada estéril. As coproculturas foram umedecidas por sete dias com água purificada. Após o período de incubação, foi adicionada água estéril até a borda de cada copo. Os cultivos foram cobertos com placa de petri, virados bruscamente, e adicionou-se 10 mL de água estéril à placa para as larvas migrarem para fora dos recipientes. Após três horas, as larvas foram coletadas e armazenadas em tubos de ensaio contendo 1 mL de formol 10% sob refrigeração a 4°C até a contagem. Para visualização das larvas foi utilizado o microscópio óptico na objetiva de 10x, utilizando-se câmara de Sedgewick (Nery et al., 2010). O número total de larvas

observado foi dividido por dois e o resultado expresso em larvas desenvolvidas por grama de fezes (LDPG). Para determinar a porcentagem de eficácia na inibição do desenvolvimento larval, foi utilizada a fórmula adaptada de Borges (2003):

$$\% \text{ Eficácia} = 100 - [(LDPG \text{ do grupo tratado} / LDPG \text{ do grupo controle negativo}) \times 100]$$

Os dados referentes aos valores de LGDP foram previamente transformados em Log (x + 10) e submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan. A análise de regressão *probit* foi empregada para estimar a CL₅₀ e CL₉₀. As análises foram processadas no pacote estatístico SAEG 9.1., considerando-se 5% de significância

Teste *in vivo* de redução de ovos em fezes

Foram avaliados 16 cordeiros mestiços Santa Inês machos e fêmeas, em iguais proporções, com 4 e 5 meses de idade e média de peso corporal (pc) de 25 kg com OPG=0. Esses animais, foram infectados com aproximadamente 800 larvas infectantes (L3) de *H. contortus* por 10 kg pc. A eficácia anti-helmíntica e a foi determinada com o teste de redução de ovos nas fezes de acordo com a adaptação proposta por Coles et al., (1992).

Os animais foram separados em dois grupos de oito animais cada, considerando a média de ovos por grama de fezes (OPG), peso e sexo, para formação de grupos homogêneos. Um grupo foi tratado com 2,75 mg (ms)/kg pc de folhas de *A. crassiflora* diariamente, em três dias consecutivos. O outro grupo não foi tratado. O experimento foi realizado na manhã, após 12 horas de jejum dos animais. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram confinados em baias com piso de areia e alimentados com concentrado, de acordo com a massa corporal com 200g/dia, premix mineral, silagem de sorgo e água à vontade. Os animais foram monitorados quanto a sinais clínicos e pesados na parte da manhã antes da alimentação no dia do tratamento e nos dias sete e 14 pós-tratamento. O ganho de peso médio dos grupos foi comparado pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%.

O OPG foi avaliado em dois períodos, com intervalos semanais. Em cada período foi realizado uma média de três dias (Nogueira et al., 2012, Morais-Costa et al., 2015). A contagem de ovos foi avaliada nos dois dias anteriores ao tratamento e no dia do tratamento, com a média utilizada para padronizar os grupos de cordeiros. Posteriormente, a média OPG foi calculado nos dias 7, 8 e 9 (segundo período) e dias 14, 15 e 16 (terceiro período).

A média de OPG foi obtida individualmente para todos os cordeiros com a técnica de Mc Master modificada com duas repetições por animal e com a sensibilidade de detecção de 25 ovos por grama de fezes (Gordon; Whitlock 1939). Amostras de todas as coletas foram utilizadas para realização de coprocultura para identificação do gênero do nematódeo e confirmação da monoinfecção pelo nematódeo (Ueno; Gonçalves, 1998).

O experimento foi conduzido em delineamento em parcelas subdivididas (representadas pelos dois grupos de animais e as subparcelas representadas pelos períodos). Os dados de OPG foram transformados para $\log_{10} (x + 10)$, submetidos à análise de variância e as médias comparadas com testes de Duncan ao nível de significância de 5%. A fórmula adaptada de Coles et al., (1992) foi empregada para determinar o percentual de redução de ovos nas fezes:

$$\text{Eficácia\%} = 100 \times (1 - \text{média OPG grupo tratado} / \text{média OPG grupo controle}).$$

Análises sanguíneas

A primeira coleta de sangue ocorreu com os animais recém-desmamados, com aproximadamente quatro meses de idade e livres de nematódeos gastrointestinais. A segunda coleta ocorreu 45 dias após a primeira, com os animais infectados e com haemonchoses agudas. Após essa coleta os animais foram tratados com as folhas de *A. crassiflora*, como relatado anteriormente. A terceira coleta ocorreu 15 dias após a segunda, com os animais com aproximadamente 6 meses de idade. O sangue foi coletado por meio de punção da veia jugular após assepsia com iodo-PVP I a 1%, utilizando-se tubos plásticos providos de vácuo. O procedimento foi realizado no período da manhã antes do oferecimento da dieta, obedecendo ao jejum alimentar de 12 horas.

Os tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram destinados para análises dos hemogramas em equipamento de contagem eletrônica (BC 2.800 Vet, Mindray Medical International LTDA, China) em laboratório terceirizado. O experimento foi conduzido em delineamento em parcelas subdivididas e as médias foram comparadas por teste de médias, a 5% de probabilidade utilizando o pacote estatístico SAEG 9.1.

Resultados

Metabólitos secundários de folha de *Annona crassiflora*

Os cromatogramas registrados por HPLC-DAD mostraram similaridade nos perfis dos EA, EE e AE, com predomínio de picos correspondentes a compostos polares, com espectro UV compatível com polifenóis (Fig. 1 A, B e C). Os dois picos principais verificados indicaram tempos de retenção de 6,980 e 7,731; 6,484 e 7,704 e 9,644 e 36,323 min para EA, EE e AE, respectivamente. Os dados dos espectros de UV foram compatíveis com flavonoides (λ 279,3 e 278,1 nm para EA e EE, respectivamente, e λ 279,3 e 212,0 nm para AE). As concentrações de taninos dos extratos aquoso, etanólico e acetato de etila foram, respectivamente, 6,93; 12,05 e 0,64%.

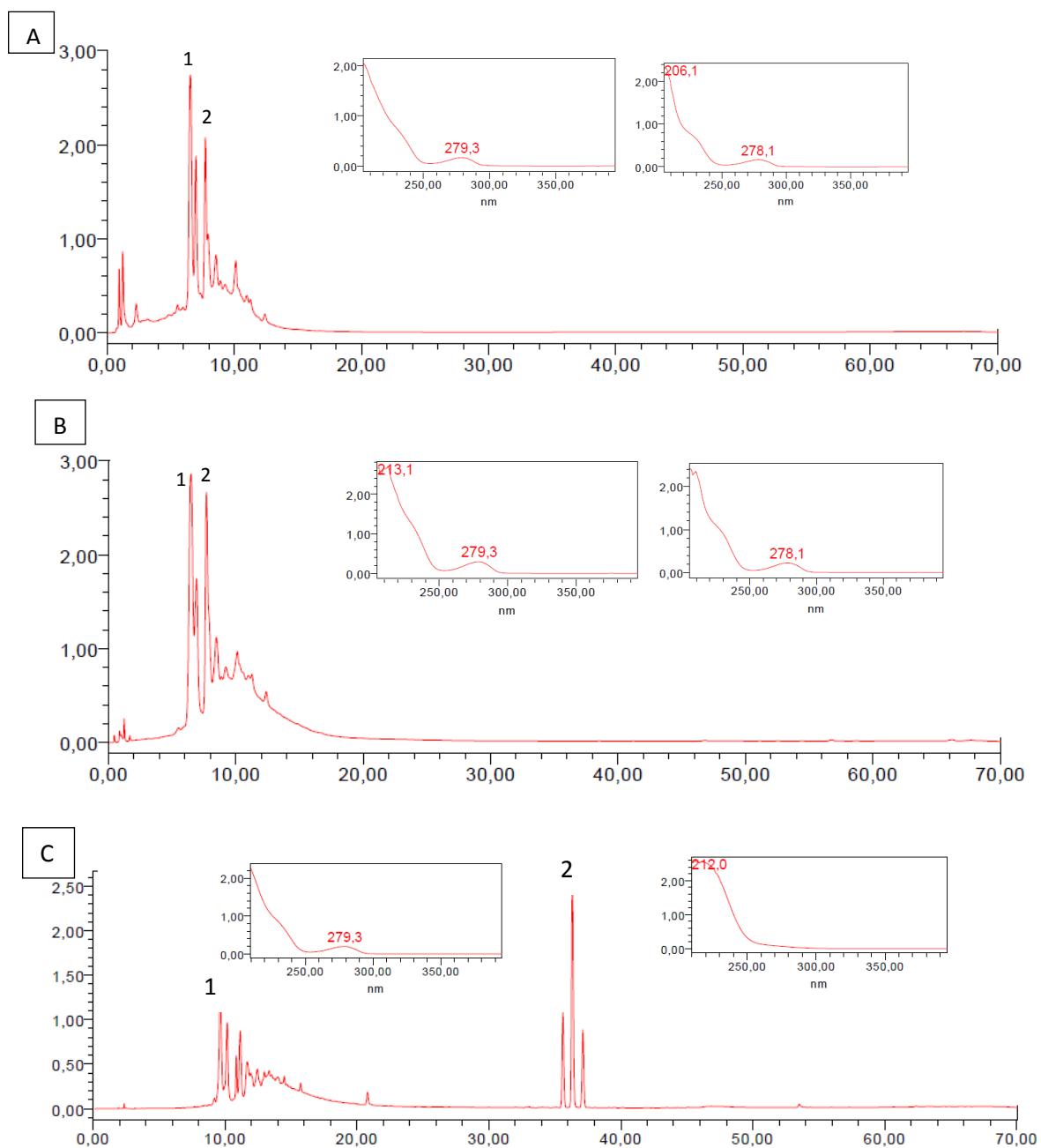


Fig. 1 – Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, características do espectro de UV de flavonoides (picos 1 e 2) e seus respectivos tempo de retenção (TR). A - extrato aquoso (TR = 6,980 e 7,731 min), B - extrato etanólico (TR = 6,484 e 7,704 min) e C - extrato acetato de etila (TR = 9,644 e 36,323) das folhas de *Annona crassiflora*.

Inibição da eclodibilidade

Para o extrato aquoso com e sem tanino, concentrações iguais ou superiores a 10,53 e 2,5 mg/mL, respectivamente, apresentaram médias de larvas eclodidas significativamente menores que aquela observada no controle com água estéril (Tabela 1). As CLs 50 e 90 foram, respectivamente, 17,99 e 85,48 mg/mL para o extrato com tanino e respectivamente, 2,7 e 4,27 mg/ml para o extrato sem tanino.

Para os extratos etanólico e acetato de etila, com e sem tanino, concentrações iguais ou superiores a 21,6 e 1,3 mg/mL, respectivamente, apresentaram médias de larvas eclodidas significativamente menores que aquelas observadas nos controles com água estéril (Tabela 2 e 3). Para o extrato etanólico com tanino, as CLs 50 e 90 foram 0,037 e 8,95 mg/mL, respectivamente, e para esse extrato sem tanino essas concentrações foram estimadas em 2,7 e 7,98 mg/ml, respectivamente. As CLs 50 e 90, foram 12,5 e 81,83 mg/mL, respectivamente, para o extrato acetato de etila com tanino e respectivamente, 1,95 e 4,84 mg/mL para esses extrato sem tanino.

Tabela 1: Valores médios de ovos blastomerados, ovos larvados e larvas de *Haemonchus contortus* tratados com extrato aquoso com e sem tanino de folhas de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)

Tratamentos (mg/mL)	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas	Ovos + Larvas	Eficácia (%)
Com tanino					
168,5	21,2 ^c	4,2 ^{cde}	2,0 ^f	27,4	97,2
84,3	33,2 ^b	2,2 ^{ef}	9,5 ^e	45,0	86,6
42,1	36,8 ^b	2,5 ^{de}	12,5 ^e	51,8	82,6
21,0	25,3 ^c	6,0 ^c	35,7 ^d	67,0	49,6
10,53	12,8 ^d	4,0 ^{cde}	46,5 ^c	63,3	34,5
Sem tanino					
10,0	3,5 ^e	44,0 ^b	0,0 ^f	47,5	100,0
5,0	2,5 ^e	55,2 ^a	0,0 ^f	57,7	100,0
2,5	1,2 ^e	2,0 ^{ef}	49,5 ^c	52,7	30,3
1,3	0,7 ^e	5,3 ^{cd}	67,0 ^b	73,0	5,6
0,6	1,0 ^e	3,0 ^{de}	73,2 ^a	77,2	---
Levamisol (0,6 mg/kg)	85,0 ^a	0,0 ^f	0,0 ^f	85,0	100,0
Água estéril	0 ^e	0 ^f	71,0 ^a	71,0	---
CV (%)	23,1	18,2	9,8		

Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Duncan (P<0,05).

% Eficácia = 100 x [1 – (L1 / número inicial de ovos)].

CV = Coeficiente de variação.

Tabela 2: Valores médios de ovos blastomerados, ovos larvados e larvas de *Haemonchus contortus* tratados com extrato etanólico com e sem tanino de folhas de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)

Tratamentos (mg/mL)	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas	Ovos + Larvas	Eficácia (%)
Com tanino					
337,0	22,4 ^c	0,8 ^e	0,8 ^d	24,0	98,7
168,5	31,8 ^b	4,0 ^d	1,5 ^d	37,3	97,4
84,3	3,5 ^e	4,0 ^d	2,5 ^d	10,0	95,7
42,1	3,3 ^e	4,5 ^{cd}	3,0 ^d	10,8	94,8
21,6	3,3 ^e	3,5 ^d	3,8 ^d	10,6	93,5
Sem tanino					
10,0	11,5 ^c	37,8 ^a	4,0 ^d	53,3	93,1
5,0	3,0 ^e	6,3 ^c	11,8 ^d	21,1	79,8
2,5	1,0 [†]	1,0 ^e	29,0 ^c	31,0	40,5
1,3	0,0 [†]	0,0 ^e	44,5 ^b	44,5	23,3
0,6	0,0 ^d	0,0 ^e	56,5 ^a	56,5	2,5
Fosf. de levamisol (0,6 mg/kg)	50,3 ^a	0,0 ^e	0,0 ^d	50,3	100
Água estéril	0 [†]	0 ^e	58,0 ^a	58,0	---
CV (%)	10,5	16,2	15,7		

Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas. Teste Duncan (P<0,05).

% Eficácia = 100 x [1 – (L1 / número médio de larvas)].

CV = Coeficiente de variação.

Tabela 3: Valores médios de ovos blastomerados, ovos larvados e larvas de *Haemonchus contortus* tratados com extrato de acetato de etila com e sem tanino de folhas de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)

Tratamentos (mg/mL)	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas	Ovos + Larvas	Eficácia (%)
Com tanino					
337,0	0 ^e	0 ^{ef}	0 ^e	0	100,00
168,5	0 ^e	0 ^{ef}	1,6 ^e	1,6	95,43
84,3	5,8 ^b	0,8 ^{ef}	3,0 ^e	9,6	91,43
42,1	1,8 ^d	1,8 ^d	9,6 ^d	13,2	72,57
21,0	3,4 ^c	3,4 ^c	10,8 ^{cd}	17,6	69,14
Sem tanino					
10,0	2,0 ^d	10,2 ^b	0,6 ^e	12,8	98,28
5,0	1,8 ^d	1,4 ^{de}	2,6 ^e	5,8	92,57
2,5	2,4 ^{cd}	1,4 ^{de}	13,0 ^c	16,8	62,85
1,3	2,8 ^{cd}	0,4 ^{def}	2,6 ^b	5,8	25,71
0,6	2,0 ^d	1,0 ^{def}	33,4 ^a	36,4	4,57
Fosf. de levamisol (0,6 mg/kg)	13,8 ^a	22,0 ^a	0 ^e	35,8	100,00
Água estéril	0 ^e	0 [†]	35,0 ^a	35,0	---
CV (%)	32,84	28,60	18,93		

Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas. Teste Duncan (P<0,05).

% Eficácia = 100 x [1 – (L1 / número inicial de ovos)].

CV = Coeficiente de variação.

Inibição do desenvolvimento larval

No teste de inibição de desenvolvimento das larvas em coproculturas, o tratamento com folhas desidratadas de *A. crassiflora* resultou em números médios de larvas infectantes significativamente menores do que os observados para o controle da água destilada ($P < 0,05$). A eficácia anti-helmíntica aumentou com a concentração da folha (Tabela 4) e as CL_{50} e CL_{90} estimadas foram 24,10 e 69,14 mg/g, respectivamente.

Tabela 4: Valores médios de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* para diferentes concentrações da folha desidratada de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) em coproculturas quantitativas

Tratamento (mg/g)	LDGF*	Eficácia (%)
333,3	12,00 ^d	99,72
250,0	10,00 ^d	99,76
166,6	38,00 ^c	99,12
83,3	90,00 ^b	97,91
Água estéril	4325 ^a	---
Levamisol (0,025 mg/g)	0,00 ^d	100,00

* LDGF: Número de larvas infectantes (L3) desenvolvidas por grama de fezes.

Diferentes letras nas colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Duncan com $P < 0,05$.

Eficácia: % Eficácia = $100 \times (1 - \text{LDGF do grupo tratado} / \text{LDGF do grupo controle não tratado})$.

Coeficiente de variação = 15,0 %

Teste *in vivo*

Os ovinos inicialmente apresentaram média OPG de 1167 ± 45 . Após o tratamento com as folhas de *A. crassiflora* não foi constatada redução do OPG em comparação com o grupo não tratado. Dessa forma, para o tratamento com as folhas dessa planta não foi observada eficácia anti-helmíntica na dose e frequência avaliadas. Para ambos os grupos avaliados verificou-se redução significativa da média do OPG na segunda semana de análise, com média de $648,85 \pm 29,91$ (Tabela 5).

Tabela 5: Efeitos da administração das folhas desidratadas de *Annona crassiflora* Mart. (2,75g/kg PC) na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de ovinos infectados com *Haemonchus contortus*

Tratamentos	Período inicial	Primeira semana OPG g ⁻¹	Segunda semana OPG g ⁻¹
Controle	1273,60 ^a	1123,30 ^a	627,7 ^b
<i>A. crassiflora</i>	1061,30 ^a	1406,70 ^a	670,0 ^b

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas. Teste Duncan (P<0,05).

Eficácia: % Eficácia = 100 × (1- LDGF do grupo tratado / LDGF do grupo controle não tratado. Coeficiente de variação = 10,8%

Após a terceira semana de tratamento, ambos os grupos apresentaram ganho de peso maior em comparação aos demais períodos avaliados (P<0,05). Os animais tratados com *A. crassiflora* não apresentaram alterações de comportamento, edema submandibular, fraqueza ou perda de apetite durante o experimento (Tabela 6).

Tabela 6: Efeitos da administração de folha de *Annona crassiflora* Mart. (2,75g/kg PC) sobre o peso corporal e ganho de peso (GP) em kg para ovinos infectados com *Haemonchus contortus*

Grupos	Início	Primeira semana		Segunda semana		Terceira semana	
	Peso	Peso	GP	Peso	GP	Peso	GP
<i>A. crassiflora</i>	26,91	26,85	-0,06 ^b	26,59	-0,26 ^b	28,72	2,13 ^a
Controle	25,22	24,45	-0,70 ^b	24,58	0,13 ^b	25,63	1,05 ^a

Letras diferentes nas linhas indicam diferenças significativas com o teste Duncan (P<0,05).

Coeficiente de variação do peso e GP foram respectivamente 30,64 e 32,93%

Parâmetros sanguíneos

As médias de contagem de eritrócitos, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e a concentração de hemoglobina corpuscular apresentaram diferença significativa em função dos períodos (P<0,05), mas não foram influenciadas pelo tratamento (Tabela 7). No terceiro período, foram verificadas concentrações de neutrófilos segmentados superiores aos demais períodos analisados (Tabela 8, P<0,05).

Tabela 7: Valores médios para eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular, volume corpuscular médio e amplitude de distribuição de eritrócitos e plaquetas de ovinos com haemoncose tratados com folhas de *Annona crassiflora* e animais não tratados

Tratamento	Dia 0	Dia 21	Dia 42	Referência	CV (%)
Eritrócito ($\times 10^9/\mu\text{L}$)					
Controle	5,82	6,02	15,31		
<i>A. crassiflora</i>	5,69	5,69	14,77	9 a 15	13,06
Média	5,75 ^B	5,8 ^B	15,04 ^A		
Hemoglobina g/dL					
Controle	14,38	15,08	15,12		
<i>A. crassiflora</i>	14,63	14,93	14,63	9 a 15	5,94
Hematócrito%*					
Controle	41,73	43,73	44,98		
<i>A. crassiflora</i>	31,45	43,00	42,65	27a 45	17,66
Média	36,58 ^B	43,36 ^A	43,81 ^A		
Volume corpuscular médio VCM fL*					
Controle	71,64	73,45	29,39		
<i>A. crassiflora</i>	75,66	77,91	30,14	28 a 40	12,34
Média	73,65 ^A	75,68 ^A	29,76 ^B		
Hemoglobina corpuscular média HCM (pg)*					
Controle	24,68	25,45	9,88		
<i>A. crassiflora</i>	25,99	27,06	9,96	8 a 12	12,85
Média	25,33 ^A	26,25 ^A	9,92 ^B		
Concentração de hemoglobina corpuscular CHCM g/dL*					
Controle	34,44	34,65	33,66		
<i>A. crassiflora</i>	34,32	34,84	33,04	31 a 34	3,37
Média	34,38 ^A	34,74 ^A	33,34 ^B		
Amplitude de distribuição de eritrócitos – RDW %					
Controle	17,15	16,55	16,42		
<i>A. crassiflora</i>	16,70	16,93	16,48	*	4,029
Plaquetas /mm ³					
Controle	276500	435500	435166,7		
<i>A. crassiflora</i>	352250	531000	527666,7	*	1,83

Letras distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os períodos pelo teste de Duncan a 5% de significância

* Não encontrado na literatura

** Médias comparadas pelo teste de Scott-Knot a 5% de significância.

Tabela 8: Valores médios para leucócitos, bastonetes, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos de ovinos com hemoncose tratados com extrato aquoso de *Annona crassiflora* e animais não tratados

Tratamento	Dia 0	Dia 45	Dia 60	Referência	CV(%)
Leucócitos /mm ³					
Controle	8950	8883,33	9666,67	4.000 a 12.000	1,9
<i>A. crassiflora</i>	7900	10416,67	10366,67		
Neutrófilos /mm ³					
Controle	5878,75	6004,50	6870,83	3000 a	2,11
<i>A. crassiflora</i>	5144,50	6792,83	6969,50	1500/mm ³	
Neutrófilos bastonetes/mm ³					
Controle	1	1	1	0 a 300/mm ³	150,59
<i>A. crassiflora</i>	1	3	1		
Neutrófilos segmentados /mm ^{3**}					
Controle	35001	35642	40815		
<i>A. crassiflora</i>	30586,5	39511	41433	3000 a	2,07
Média	32793,75 ^B	37576,5 ^B	41124 ^A	11500/mm ³	
Eosinófilos /mm ³					
Controle	354,50	340,50	247,17		
<i>A. crassiflora</i>	270,75	286,67	287,0	100 a 1259/mm ³	47,0
Linfócitos					
Controle	2448,25	2251,66	2229,33		
<i>A. crassiflora</i>	2201,75	2926,17	2835,67	2000 a 9000/m ³	2,84
Monócitos /mm ³					
Controle	268,5	286,0	319,17		
<i>A. crassiflora</i>	283,0	411,0	274,50	0 a 750	1,83

Letras distintas nas linhas indicam diferenças significativas entre os períodos pelo teste de Duncan a 5% de significância.

Médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

Observou-se correlação negativa de Pearson (anexo) entre as médias de OPGe a diferença entre os tamanhos das hemácias (RDW) (-0,43, $P < 0,05$); o peso corporal e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (-0,53, $P < 0,05$); e do peso corporal e concentração de monócito (-0,72, $P < 0,01$). Constataram-se correlações positivas entre as médias de OPG e o valor plaquetas (0,55, $P < 0,01$); peso corporal e concentração de hemoglobina (0,51, $P < 0,05$); e peso corporal e hematócrito (0,58, $P < 0,01$).

Discussão

Impactos negativos têm sido relatados na produtividade de ovinos infectados com esse nematódeo, elevando o custo da produção em diferentes regiões de criação (Miller et al., 2012). A pesquisa por alternativas de controles para redução da utilização de anti-helmínticos convencionais tem sido constante em diferentes continentes, visando potencializar o controle de populações multirresistentes desse parasito. Nesta pesquisa os extratos de *A. crassiflora*, espécie comum no Cerrado, foram efetivos para inibir a eclodibilidade e o desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus*. A análise com HPLC revelou presença de flavonoides no extrato aquoso, etanólico e de acetato de etila de *A. crassiflora*, que foram efetivos na inibição *in vitro* da eclodibilidade, mesmo após a remoção dos taninos.

Para os três extratos avaliados, com ou sem a presença de taninos, verificou-se eficácias superiores a 90% nas maiores concentrações avaliadas, o que sugere a presença de outros metabólitos efetivos para inibir a embriogênese e eclosão de larvas do nematódeo. Os extratos avaliados com a presença de taninos apresentaram diferenças quanto as eficácias de inibição, sendo o extrato etanólico o mais efetivo com CL_{90} de apenas 8,96 mg/mL. Entretanto, com a remoção dos taninos, o extrato aquoso foi mais eficaz apresentando CL_{90} de 4,27 mg/mL. Para ambos os extratos avaliados, após a remoção de taninos constatou-se redução das CL_{90} , indicando que outros metabólitos possam ser efetivos na inibição da eclodibilidade. Os resultados observados nesta pesquisa podem sugerir que os flavonoides evidenciados nos cromatogramas seriam os principais metabólitos responsáveis pelo efeito anti-helmíntico na redução da eclodibilidade.

De forma semelhante, pesquisa tem indicado que os flavonoides podem interferir nas atividades enzimáticas e nos processos metabólicos dos nematódeos (Kerboeuf et al., 2008), justificando os resultados observados neste estudo. Em estudo da família Annonaceae, os compostos fenólicos de maior ocorrência foram os flavonoides O-glicosídeos de apigenina, kaempferol, quercetina e luteolina, utilizando procedimentos padrão de espectrometria de UV/Vis (Santos e Salatino, 2000, Simões e Schenkel, 2004)

Em contraste a esses estudos, a pesquisa com o extrato aquoso de *Lantana camara* 10 mg/mL demonstrou que a inibição da eclosão foi atribuída exclusivamente à ação dos taninos. Após a remoção deste metabólito o efeito inibitório não foi evidenciado (Macedo et al., 2012).

Outras espécies do Cerrado demonstraram eficácia anti-helmíntica. O extrato aquoso do pequi (*Caryocar brasiliensis*), a 15 mg/mL promoveu 91,8% de inibição da eclodibilidade (Nogueira et al., 2014). Extratos aquoso e etanólico de *Piptadenia viridiflora* promoveram 90% de inibição de eclosão de larvas de *H. contortus* nas concentrações 2,4 e 2,1 mg/mL respectivamente (Morais-Costa et al. 2015).

Outras pesquisas com espécies do gênero *Annona*, têm-se demonstrado menores eficácias que aquelas observadas para os extratos de *A. crassiflora*. O extrato metanólico de *Annona squamosa* L. a 6,25 mg/mL demonstrou 77,4% de eficácia de IE (Kamaraj and Rahuman, 2011). Ferreira et al. (2013) relataram 84% de eficácia na IE utilizando-se o extrato aquoso de folhas de *Annona muricata* na diluição final de 50%.

Em outro estudo, o efeito anti-helmíntico de extratos hidro-alcoólicos de *Lysilomalatisiliquum*, *Laguncularia racemosa*, *Rizophora mangle*, *Avicennia germinans*, e *Theobro macacao* promoveram efetiva IE de larvas. Os taninos de *L. racemosa* foram considerados os principais responsáveis por esse efeito. Entretanto, esses metabólitos não foram os principais agentes anti-helmínticos dos extratos de *L. latisiliquum*, *A. germinanse* *T. cacao*. Os autores sugeriram a interação entre taninos e outros metabólitos secundários na inibição da eclosão de larvas (Vargas-Magaña et al., 2014).

Para inibição do desenvolvimento larval, a CL 90 do pó das folhas de *A. crassiflora* foi 69,14 mg/g, o que evidencia eficácia anti-helmíntica em condições naturais de avaliação, uma vez que esse material foi avaliado juntamente com as fezes, onde naturalmente ocorre a eclosão e o desenvolvimento larval dos nematódeos gastrintestinais. O extrato aquoso da casca de *C. brasiliensis* a 200mg/g inibiu o desenvolvimento de larvas de *H. contortus* em 94,8% na coprocultura quantitativa e testes fitoquímicos indicaram a presença de catequinas, esteroides, flavonoides, saponinas, xantinas e taninos (Nogueira et al., 2014). Morais-Costa et al. (2015) em outro estudo com plantas do Cerrado, as folhas secas de *Casearia sylvestrise* *Paullinia* sp. apresentaram alta proporção de taninos (7,4 e 6,4%), entretanto com baixo índice de inibição de desenvolvimento larval a 333g/g (46,6 e 71,6%, respectivamente), comparado com testes com as folhas de *Piptadenia viridiflora* (86,5%) e *Ximenia americana* (99,8%), que apresentam baixas concentrações de taninos condensados (0,2 e 0,3, respectivamente).

Neste estudo, a administração de folhas secas de *A. crassiflora* na dose 2,75g (ms) /kg durante três dias aos animais não apresentaram eficácia na redução do OPG. Essas diferenças entre os resultados *in vitro* e *in vivo* com os tratamentos com plantas foram previamente relatados (Peneluc et al., 2009; Nogueira et al., 2014) e poderiam ser associados à bioavaliação dos compostos da planta em diferentes segmentos do trato gastrointestinal do ruminante (Athanasiadou et al., 2000; Eguale et al., 2006). Essa menor eficácia *in vivo* poderia também ser justificada pela presença de cutícula mais resistente aos componentes ativos da planta dos nematódeos na fase adulta, associada à atuação da microbiota autóctone do rúmen, que poderia reduzir a atividade dos metabólitos (Nogueira et al., 2014).

A redução significativa das médias do OPG observada na segunda semana poderia ser relacionada à melhoria da resposta imune ao parasita, observada para os animais com o aumento da idade (Ciarlini et al., 2002). O ganho de peso observado nos borregos tratados com folhas secas de *A. crassiflora* foi semelhante ao grupo controle. O ganho de peso foi significativamente maior para o último período avaliado e foi correlacionado à redução de OPG nesse período.

Não foram observadas alterações fisiológicas em parâmetros do sangue após 15 dias da administração de *A. crassiflora*. O hematócrito médio foi > 35% para todos os cordeiros tratados com folhas de *A. crassiflora* e segundo Jain (1993), está dentro da normalidade.

Hematócrito e contagem de eritrócitos (Jain, 1993) são bons indicadores de anemia e representam parâmetros importantes para a avaliação da infecção por nematódeos hematófagos (Macedo et al., 2012). Ovinos alimentados com folhas de *A. crassiflora* apresentaram valores dentro dos padrões de referência duas semanas após o tratamento, o que indica que os metabólitos da planta não promoveram inibição da hematopoiese.

Em hemonchoses aguda, a anemia é caracterizada pela progressiva e rápida diminuição na contagem dos eritrócitos (Harvey, 2012) e valores de hematócrito abaixo de 15% são concomitantes com fraqueza e indicam um mau prognóstico (Bowman, 2010). Neste estudo os cordeiros apresentaram anemia com baixas concentrações de hemácias antes do tratamento em decorrência de espoliação ocasionada pelo nematódeo e ou por redução da hematopoiese. Isto pode ser comprovado ao observar a diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM), do volume corpuscular médio (VCM) e da concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM), que eram altas no início. Constatou-se, porém número normal de eritrócitos duas semanas após o tratamento (Tabela 7), sugerindo redução da espoliação sanguínea por melhor tolerância dos animais parasitismo, o que foi evidenciado pela correção negativa com a média do OPG, que reduziu significativamente neste período (Tabela 5). Observou-se que a proporção de neutrófilos segmentados (Tabela 8) aumentou no terceiro período, o que poderia indicar recuperação do processo inflamatório na mucosa do abomaso promovida pelo nematódeo (Naoum, 2006).

Conclusão

Folhas de *A. crassiflora* promoveram redução da eclodibilidade e desenvolvimento larval de *H. contortus*. Análises fitoquímicas dos extratos indicaram a presença de flavonoides. Extratos aquoso e etanólico que apresentaram altas proporções de proantocianidinas, após a remoção dos taninos demonstraram alta eficácia anti-helmíntica *in vitro*. Entretanto, a administração de folhas secas de *A. crassiflora* na dose 2,75g (ms) /kg durante três dias aos animais não reduziu eficácia na redução do OPG em relação ao grupo controle.

Agradecimentos

Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento tecnológico (CNPq), apoio financeiro e bolsas de estudo fornecidas pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG), Laboratório de Bromatologia (UFMG/ICA), Fitoquímica (UFMG/Farmácia), Ecologia Vegetal (Unimontes) e Labonorte (Laboratório de Patologia Clínica).

Declaração de conflitos de interesses

Os autores deste manuscrito não tem nenhuma relação financeira ou pessoal com indivíduos ou organizações que poderiam influenciar o conteúdo do artigo. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com os princípios da experimentação animal aprovado no 275/2013 protocolo do Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

Referências:

- Alawa, C.B.I.; Adamu, A.M.; J.O.; Gefu, Ajanusi O.J.; Abdu P.A.; Chiezey N.P. and Alawa, J.N.; Bowman, D.D., 2003. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Veterinary Parasitology* 1, 2, 73–81.
- Almeida, S.P. De, Silva, J.A. and Ribeiro, J. F., 1987. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá. Planaltina : EMBRAPA-CPAC, 83p. (Documentos, 26).
- Amarante, A.F.T. and Amarante, M.R.V., 2003. Breeding sheep for resistance to nematode infections. *Journal of Animal and Veterinary*. 3, 147-161.
- Amarante, A.F.T. and Sales, R. DE O., 2007. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 1, 14-36.
- Ataíde, H.S. and Cansi, E.R., 2013. Occurrence of parasitic diseases in sheep and goats in the District Federal, Brazil, during 2003 to 2009. *Arquivo Instituto Biológico*, 3.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis I., Jackson, F. and Coop R.L., 2000. Effects of short term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Record*. 146, 728-732.

- Barreiro, E.J. and Bolzani, V.S., 2009. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*. 3,679-688.
- Bastos, G. A.; Fonseca, L. D., Ferreira, A.V.P.; Costa, M.A.M.S.; Silva, M.L.F.; Vasconcelos, V.O. Sousa, R. M. and Duarte, E. R. 2017. Helminthiasis characterization and anthelmintic efficacy for ewes and lambs raised in tropical semiarid region. *Tropical Animal Health and Production*, 49, 937-943.
- Besier, R.B., Playford, M.C., Smith, A.N., Love, S., Kluver, P. and Bailey, J.N., 2014. Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009-2012). *Australian Veterinary Journal*. 92, 464-471.
- Bizimenyera, E.S., Githiori, J.B., Eloff, J.N. and Swan, G.E., 2006. *In vitro* activity of *Peltophoru mafrianum* Sond. (Fabacea) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*. 142,336-343.
- Borges, C.C.L., 2003. Atividade in vitro de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de Nematodeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). *Parasitologia Latinoamericana*. 58,142 -147.
- Bowman, D. D., 2010 *Georgis – Parasitologia Veterinária*. Elsevier. Rio de Janeiro, RJ.
- Cezar, A.S., Catto and J.B.; Bianchin, I., 2008. Alternative control of the gastrointestinal nematodes of the ruminants: actuality and perspectives. *Ciência Rural*. 38, 2083-2091.
- Cezar, A.S., Ribas, H.O., Plvoto, F.L., Sangioni and L.A, Vogel, F.S.F., 2011. Combination of drugs as an alternative to control multi-resistant gastrointestinal nematodes in sheep. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 31, 151-157.
- Ciarlini, P.C.; Ciarlini, L.D.R.P.; Alencar, N.X.; Hohayagawa, A. and Rodrigues, C.F.C., 2002. Metabolismo oxidativo de neutrófilos em ovelhas naturalmente infectadas por nematódeos gastrintestinais e correlação entre nível sérico de cortisol e carga parasitária,. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 54, 242-247.

- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., S. Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A. and Waller, P.J., 1992. World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 44, 35–44.
- Duarte, E.R.; Silva, R.B.; Vasconcelos, V.O.; Nogueira, F. A. and Oliveira, N. J. F., 2012. Diagnóstico do controle e perfil de sensibilidade de nematoides de ovinos ao albendazole ao levamisol no norte de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2, 147-152.
- Eguale, T.; Getachew, T.; Giday, M. and Mekonnen, Y., 2006. *In vitro* anthelmintic activities of four Ethiopian medicinal plants against *Haemonchus contortus*. *Pharmacology online*. 3, 153-65.
- Ferreira, L.E., Castro, P.M.N., Chagas, A.C.S., França, S.C. and Beleboni, R.O., 2013. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep, . *Experimental Parasitology*. 143, 327-332.
- Forbes, A.B., Cutler K.L and Rice B.J., 2002. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season, 2002. *Veterinary Parasitology*. 104, 339-344.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J. and Mantecón, A. R., 2004 Review. Tannins and ruminant nutrition Tannins : structure and chemical, 2, 191–202. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2, 191-202.
- Geary, T.G., 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitology* 11, 530-532.
- Githiori, J.B., Hoglund, J. and Waller, P.J., 2005. Ethnoveterinary plants preparations as livestock dewormers: practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for the future. *Animal Health Research Reviews* 6, 91-103.
- Gordon, H. McL and Whitlock, A.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. *Journal Council Scientific Industry Research Australia*. 12, 50-52.

- Harvey, J. W., 2012. Veterinary hematology: a diagnostic guide and color atlas. St. Louis, MO: Saunders/Elsevier, 384.
- Hennessy D.R., ALI D.N. and Sillince J., 1995. The effect of a short-term reduction in feed on the pharmacokinetics and efficacy of albendazole in sheep. Australian Veterinary Journal 72, 29–30.
- Hiermann, A.; Kartnig, T. H. and Azzam, S.M. 1986. Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung der Procyanidine. In Crataegus. Science Pharmacology., Wien, 54, 331-337.
- Jain, N.C. Schalm's, 1993. Veterinary Hematology, (Lea & Febiger, Philadelphia)
- Kamaraj C. and Rahumann, A.A., 2011. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extract against *Haemonchus contortus*. Research in Veterinary Science. 91, 400-404.
- Kerboeuf, D., Riou, M. and Guégnard, F., 2008. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. Mini-Reviews Medicinal Chemistry. 8, 116–128.
- Lange, K. C., Olcott, D. D., Miller, J. E., Mosjidis, J. A., Terrill, T. H., Burke, J. M. and Kearney, M. T.. Effect of sericea lespedeza (*lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *haemonchus contortus* infections in lambs, 2006. Veterinary Parasitology, 141, 273–278.
- Macedo, I. T. F., Bevilaqua, C. M. L.; Oliveira, L. M. B., Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Morais, S. M., Machado, L. K. A. and Ribeiro, W. L. C.. 2012. *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae, Veterinary Parasitology, 190, 504-509.
- Marley, C. L., Cook, R., Barrett, J., Keatinge, R. and Lampkin, N. H., 2003. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. Veterinary Parasitology, 112, 147-55.
- Miller, C.M., T.S. Waghorn, D.M. Leathwick, P.M. Candy, A-M. B. Oliver, and WATSON, T.G. 2012. The production cost of anthelmintic resistance in lambs, Veterinary Parasitology, 186, 376–381.

- Minho, A. P., Bueno, I. C. S., Genari, S. M. and Abdalla, A. L., 2006. Efeitos dos taninos condensados sobre *Haemonchus contortus* em ovinos experimentalmente infectados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINARIA, Ribeirão Preto, 2006, (Ribeirão Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária), 260
- Molento, M. B., Tasca, C., Gallo, A. Ferreira, M., Bononi, R. and Stecca, E., 2004. Método famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes, Ciência Rural, Santa Maria ,34, 1139-1145.
- Morais-Costa F, Soares A.C., Bastos G.A., Nunes Y.R., Geraseev L.C., Braga F.C., DOS Santos Lima W. and Duarte E.R., 2015. Plants of the Cerrado naturally selected by grazing sheep may have potential for inhibiting development of *Haemonchus contortus* larva, Tropical Animal Health Production. 47, 1321-1328.
- Morin, M.P., 2015. *Annona crassiflora* in Lista De Espécies Da Flora Do Brasil. Jardim Botânico Do Rio de Janeiro, Available: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/geral/ExibeFiguraFSIUC/ExibeFiguraFSIUC.do?idFigura=3210649>> Acesso em 30 nov. 2016.
- Mota, M.A., Campos, A.K. and Araújo, J.V., 2003. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. Pesquisa Veterinária Brasileira. 23, 93-100.
- Mwamachi D.M., Audho J.O., Thorpe W. and Baker R.L., 1995.Evidence for multiple anthelmintic resistance in sheep and goats reared under the same management in coastal Kenya, Veterinary Parasitology 60, 303-313.
- Naoum, P.C. and Naoum, F.A. Interpretação laboratorial do hemogramaDisponível em :<http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/Artigos_cientificos/Interphemo.pdf> Acesso em 14/01/2017
- Nery, P. S., Nogueira, F. A., Martins, E. R. and Duarte, E. R., 2010. Effects of *Anacardiumhumile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. VeterinaryParasitology, 171, 361–364.

- Nogueira F.A., Silva P.N., Morais-Costa F., Faria, N.J., Martins. E.R. and Duarte E. R., 2014. Efficacy of aqueous extracts of *Genipa americana* L. (Rubiaceae) in inhibiting larval development and eclosion of gastrointestinal nematodes of sheep. *Journal of Applied Animal Research*, 42, 1– 5.
- Peneluc, T., Domingues, L. F., Almeida, G. N., Ayres, M. C. C., Moreira, E. L. T., Cruz, A. C. F. and Bittencourt, T. C. B. S. C. 2009. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxyl umrhoifolium* Lam. (Rutaceae), *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18, 43-48.
- Ramos, F., Portella, L.P., Rodrigues, F.S., Reginato, C.Z., Póter, L., Cezar, A.S., Sangioni, L.A., Vogel, F.S.F., 2016. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of beef cattle in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 6, 93-101.
- Raza A., Kopp S.R., Bagnall N.H., Jabbar A. and Kotze A.C., 2016. Effects of *in vitro* exposure to ivermectin and levamisole on the expression patterns of ABC transporters in *Haemonchus contortus* larvae. *International Journal Parasitology and Drugs Drug Resistance*, 6, 103–15.
- Santos, D.Y.A.C. and Salatino, M.L.F., 2000. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, 55, 567 – 573.
- Sargison N.D., Jackson F., Bartley D.J., Wilson D.J., Stenhouse L.J. and Penny C.D.. 2007. Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Veterinary Parasitology*, 145, 65-76,
- Shoop W.L., Mrozik H. and Fisher M.H., 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*. 59, 139-156.
- Silva, D.B.; Silva, J.A.; Junqueira, N.T.V. and Andrade, L.R.M., 2001. *Frutas do Cerrado*. EMBRAPA/Cerrados. Planaltina, DF,
- Silva, D.F.A.P., Pinto and M. Santos, T.C., 2004. Aspectos macroscópicos e vascularização da placenta e do cordão umbilical de bovinos da raça Nelore, 2004. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 28, 259-267.
- Simões C.M.O., Schenkel E.P., Gosmann G., Mello J.C.P., Mentz L.A. and Petrovick P.R., 2004. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*, (UFRGS, Florianópolis)

- Sotomaior, C.S., Carli, L.M., Tangleica, L., Kaiber, B.K. and Souza, F.P.. 2007. Identificação de ovinos e caprinos resistentes e susceptíveis a helmintos gastrintestinais. *Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais*, 5, 397–412.
- Traversa D., Paoletti B., Otranto D. and Miller J., 2007. First report of multiple drug resistance in trichostrongyles affecting sheep under field conditions in Italy. *ParasitologyResearch*, 101,1713-1716.
- Valladares, G.S., Pereira, M. G. and Anjos, L.H.C. 2003. Adsorção de fósforo em solos de argila de atividade baixa, *Bragantia*, 62, 111-118.
- Vargas-Magaña J.J., Torres-Acosta J.F., Aguilar-Caballero,A.J., Sandoval-Castro C.A., Hoste H. and Chan-Pérez J.A., 2014, Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Parasitology*, 206, 322-7.
- Ueno H., Araujo F. R., Borges C.C.L and D'Álmeida V.A., 1997. Coprocultura quantitativa para larvas de Strongyloidea em nematódeos gastrintestinais de caprinos. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária, p. 19.
- Yoshihara, E.Minho, A. P.Cardim, S. T., Tabacow, V. B. D. and Yamamura, M. H., 2012 Efeito anti-helmintico de taninos no controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos. CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA. São Luis. Parasitologia veterinária, bem estar e produção animal: anais. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 17, 101.
- Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J. and Yong, J.. 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants,. *Free RadicalBiology and Medicine*. 9, 19–23.

ANEXO

Correlações significativas de Pearson para as variáveis: OPG, peso, RDW, plaquetas, hemoglobina, hematócrito, CHCM e monócitos de ovinos tratados com folhas de *Annona crassiflora*.

Variável	Variável	Correlação	Significância
OPG	RDW	-0,43	0,04
OPG	plaqueta	0,55	0,01
Peso	hemoglobina	0,51	0,05
Peso	hematócrito	0,58	0,02
Peso	CHCM	-0,53	0,04
Peso	monócito	-0,72	0,00

OPG – Ovos por grama de fezes

RDW - Amplitude de distribuição de eritrócitos

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular