

LEYDIANA DUARTE FONSECA

**POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO DE *Caryocar brasiliense* CAMBESS
(CARYOCARACEAE) NO CONTROLE DE NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES**

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

Área de concentração: Agroecologia

Orientador: **Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte**

Montes Claros

2012

F676p
2013

Fonseca, Leydiana Duarte.

Potencial anti-helmíntico de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) no controle de nematódeos gastrintestinais de ruminantes / Leydiana Duarte Fonseca. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2013.

92 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Orientador: Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Ricardo Nascimento Araújo, Viviane Oliveira Vasconcelos, Ernane Ronie Martins, Eduardo Robson Duarte.

Inclui bibliografia: f. 78-91.

1. Ruminantes. 2. Helmintosos Gastrintestinais. 3. Parasitologia animal - Pequi. I. Duarte, Eduardo Robson. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 576.89

Elaborada pela BIBLIOTECA COMUNITÁRIA DO ICA/UFMG

LEYDIANA DUARTE FONSECA

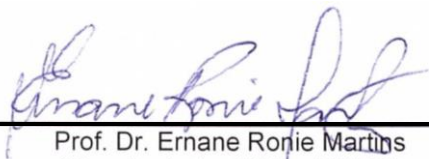
POTENCIAL ANTI-HELMÍNTICO DE *Caryocar brasiliense* CAMBESS
(CARYOCARACEAE) NO CONTROLE DE NEMATÓDEOS
GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES



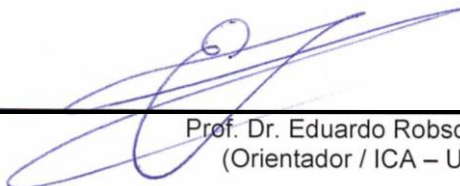
Prof. Dr. Ricardo Nascimento Araújo
(ICB – UFMG)



Dra. Viviane Oliveira Vasconcelos
(Pós-doutoranda / ICA – UFMG)



Prof. Dr. Ernane Romie Martins
(Co-orientador / ICA – UFMG)



Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte
(Orientador / ICA – UFMG)

Aprovada em 18 de dezembro de 2012.

Montes Claros

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma etapa concluída. Agradeço a experiência adquirida com cada erro, pois tenho certeza de que nada foi por acaso e em vão.

Ao professor Eduardo Robson Duarte, a orientação, a oportunidade e a amizade.

Ao Daniel, o apoio, o companheirismo e o amor!

Aos meus pais, a minha formação, não apenas profissional, mas também como pessoa, e por sempre me apoiarem na busca por meus objetivos.

Aos meus irmãos, Luciana e Miquelan, e a meu cunhado, Wagner, o incentivo e por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço aos meus avós Baltazar, Izabel e Maria, o exemplo de vida, de perseverança, de simplicidade e de força!

Aos meus amigos Adriano, Franciellen, Gabriela, Isabela, Marco Aurélio, Maria Alice, Maria Luiza, Thallyta e Viviane. Vocês fizeram com que cada momento fosse especial. Cada um com sua personalidade me fez entender a célebre frase de Shakespeare: *“Amigos são a família que Deus nos permitiu escolher.”* Vocês estarão eternamente em meu coração! Se concluí esta etapa com êxito, foi graças à colaboração de cada um!

À professora Neide Judith Faria de Oliveira e ao professor Ernane Ronie Martins, as coorientações e aos demais professores do mestrado pelos ensinamentos pontuais e essenciais.

À Universidade Federal de Minas (UFMG) e à coordenação da Pós-graduação em Ciências Agrárias.

Ao professor Ricardo Nascimento Araújo a disponibilidade em avaliar esta pesquisa.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Agrárias (ICA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) a bolsa de estudos concedida durante o mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento!

RESUMO

Um dos grandes obstáculos para a criação de ruminantes são as helmintoses gastrintestinais, que causam grandes perdas na produtividade. Ainda, a resistência aos fármacos convencionais dificulta o combate desses nematódeos. A busca por novas formas de controle se tornou uma necessidade, sendo que a fitoterapia se destacou como uma das alternativas. O pequizeiro, nativo do Cerrado, possui ampla utilização na medicina popular e a ação anti-helmíntica foi relatada para ovinos. Assim, objetivou-se avaliar o potencial anti-helmíntico do pequizeiro no controle das helmintoses gastrintestinais em ruminantes sob diferentes formas de preparo, bem como a sua toxicidade. Realizaram-se testes de inibição de desenvolvimento larval (IDL) e da inibição da eclodibilidade (IE), para a determinação da eficácia de pós brutos e de extratos aquosos das cascas do fruto e das folhas. Avaliou-se, ainda, a toxicidade aguda dos extratos aquosos das cascas do fruto e das folhas, por via intraperitoneal, em camundongos fêmeas e machos. O extrato aquoso da casca do fruto apresentou eficácias superiores a 90% na IE de nematódeos de bovinos, em todas as concentrações testadas, sendo mais efetivo que o extrato aquoso das folhas, cuja maior eficácia foi de 89,15%. O extrato das folhas também apresentou eficácia moderada na IE de *Haemonchus contortus* de ovinos (89,31%). Na IDL, apresentou eficácia superior a 95% para as duas maiores concentrações. Os pós brutos da casca do fruto e das folhas apresentaram-se altamente efetivos na IDL de *H. contortus* de ovinos. Os extratos aquosos das cascas do fruto e das folhas apresentaram-se muito tóxicos, por via intraperitoneal, em camundongos de ambos os sexos. Conclui-se que *C. brasiliense* apresenta grande potencial no controle da verminose em ruminantes, sendo necessários 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: Controle. Fitoterapia. Nematódeos gastrintestinais. Pequi. Ruminantes. Toxicidade.

ABSTRACT

One of the major obstacles for the creation of ruminants is the gastrointestinal helminthiasis that causes large yield losses. Further, resistance to the drugs complicates the conventional combat of these nematodes. The search for new forms of control has become a necessity, and the phytotherapy stood out as one of the alternatives. The *pequi*, native of *Cerrado*, has wide use in folk medicine and anthelmintic action was reported for sheep. Thus it was objectified to evaluate the potential anthelmintic of the *pequi* in the control of gastrointestinal helminthiasis in ruminants under different preparation methods, as well as its toxicity. Tests were conducted inhibition of larval development (ILD) and inhibition of hatchability (IH) for determining the efficacy of raw powders and aqueous extracts of bark and leaves of fruit. We evaluated addition, the acute toxicity of aqueous extracts of bark and leaves of fruit intraperitoneally in mice females and males. The aqueous extract of the bark of the fruit efficiencies above 90% in IE nematodes of cattle in all concentrations tested, being more effective than the aqueous extract of the leaves, whose effectiveness was greater than 89.15%. The leaf extract also showed moderate efficacy in IH *Haemonchus contortus* in sheep (89.31%). In ILD showed an efficacy of over 95% for the two highest concentrations. The powders of raw fruit rind and leaves were highly effective in ILD *H. contortus* of sheep. The aqueous extracts of bark and leaves of fruit had become very toxic intraperitoneally into mice of both sexes. It is concluded that *C. brasiliense* holds great potential to control gastrointestinal nematodes in ruminants, requiring new tests of toxicity by other routes and animal species of interest, and in vivo tests with different preparation methods, to be listed as an alternative in the treatment of gastrointestinal helminthiasis.

Keywords: Control. Phytotherapy. Gastrointestinal Nematodes. *Pequi*. Ruminants. Toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AI – Água para injetáveis
- AVA – Ação em vermes adultos
- CL – Concentração letal
- COP – Coprocultura
- D – Decocção
- DL – Dose letal
- EA – Extrato aquoso
- EAC – Extrato acetônico
- EAE – Extrato em acetato de etila
- EAF – Extrato aquoso das folhas
- ED – Extrato diclorometânico
- EE – Extrato etanólico
- EH – Extrato hexânico
- EHA – Extrato hidroalcoólico
- EM – Extrato metanólico
- IAL – Inibição da alimentação larval
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IDL – Inibição do desenvolvimento larval
- IE – Inibição da eclodibilidade
- L1 – Larvas de primeiro estágio
- LDPG – Larvas desenvolvidas por grama de fezes
- OPG – Ovos por grama de fezes
- p – Probabilidade
- PC – Peso corporal
- SAEG – Sistema para Análises Estatísticas
- USDA – United States Department of Agriculture

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 – Referencial Teórico

- Quadro 1 –** Espécies vegetais avaliadas em diferentes países com eficácia anti-helmíntica superior a 90% em experimentos *in vitro* 25
- Figura 1 –** *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) 29

CAPÍTULO 2 – Extratos aquosos de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) na inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos

- Figura 1 –** Ovos de trichostrongylídeos de bovinos (Objetiva de 10x) 41
- Figura 2 –** Larvas de primeiro estágio (L1) de trichostrongylídeos de bovinos (Objetiva de 10x) 41
- Gráfico 1 –** Probabilidade de eclosão de larvas de trichostrongylídeos de bovinos, em função da concentração do extrato aquoso das cascas dos frutos de *Caryocar brasiliense* 43
- Gráfico 2 –** Probabilidade de eclosão de larvas de trichostrongylídeos de bovinos, em função da concentração do extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense* 43

CAPÍTULO 3 – Atividade anti-helmíntica *in vitro* de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) contra *Haemonchus contortus*

- Gráfico 1 –** Probabilidade de sobrevivência de larvas de *Haemonchus contortus* de ovinos, em função da concentração do pó bruto das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense* 58

Gráfico 2 –	Probabilidade de sobrevivência de larvas de <i>Haemonchus contortus</i> de ovinos, em função da concentração do pó bruto das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i>	58
Gráfico 3 –	Probabilidade de sobrevivência de larvas de <i>Haemonchus contortus</i> de ovinos, em função da concentração do extrato aquoso das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i>	58
Figura 1 –	Ovos de <i>Haemonchus contortus</i> provenientes de ovinos (Objetiva de 10X)	60
Figura 2 –	Larvas de primeiro estágio (L1) de <i>Haemonchus contortus</i> provenientes de ovinos (Objetiva de 10X)	60
Figura 3 –	Larvas de primeiro estágio (L1) de <i>Haemonchus contortus</i> provenientes de ovinos (Objetiva de 10X)	61
Gráfico 4 –	Probabilidade de eclosão de larvas de <i>Haemonchus contortus</i> de ovinos, em função da concentração do extrato aquoso das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i>	61

CAPÍTULO 4 – Toxicidade aguda de extratos aquosos de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) em camundongos

Gráfico 1 –	Dose letal mediana do extrato aquoso das cascas dos frutos de <i>Caryocar brasiliense</i> administrado por via intraperitoneal a camundongos	74
Gráfico 2 –	Dose letal mediana do extrato aquoso das folhas de <i>Caryocar brasiliense</i> administrado por via intraperitoneal a camundongos	74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – Extratos aquosos de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) na inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos

- 1 – Inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos submetidos a tratamentos com diferentes concentrações do extrato aquoso das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense* 40

CAPÍTULO 3 – Atividade anti-helmíntica *in vitro* de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) contra *Haemonchus contortus*

- 1 – Média de larvas de *Haemonchus contortus* por grama de fezes em coproculturas tratadas com pó bruto das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense*, ivermectina, água purificada estéril e suas respectivas eficácias na inibição do desenvolvimento larval após três e sete dias 55
- 2 – Média de larvas de *Haemonchus contortus* por grama de fezes em coproculturas tratadas com pó bruto das folhas de *Caryocar brasiliense*, ivermectina, água purificada estéril e suas respectivas eficácias na inibição do desenvolvimento larval após três e sete dias 56
- 3 – Média de larvas de *Haemonchus contortus* por grama de fezes em coproculturas tratadas com extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense*, ivermectina, água purificada estéril e suas respectivas eficácias na inibição do desenvolvimento larval após três e sete dias 57
- 4 – Eficácias do extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense* e fosfato de levamisol, na inibição da eclodibilidade de *Haemonchus contortus* 59

CAPÍTULO 4 – Toxicidade aguda de extratos aquosos de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae) em camundongos

- 1 – Período de ocorrência de mortalidade após aplicação, mortalidade em número absoluto e relativo, em função das diferentes doses do extrato aquoso das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense* Camb. em camundongos fêmeas e machos 72
- 2 – Período de ocorrência de mortalidade após aplicação, mortalidade em número absoluto e relativo, em função das diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. em camundongos fêmeas e machos 73

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 – Referencial Teórico	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Pecuária bovina	15
2.2	Pecuária ovina	16
2.3	Helmintoses gastrintestinais	17
2.3.1	Controle das helmintoses gastrintestinais	19
2.3.2	Resistência aos anti-helmínticos convencionais	21
2.3.3	Alternativas fitoterápicas para controle de nematódeos em ruminantes	24
2.4	<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess (Caryocaraceae)	28
3	OBJETIVO GERAL	32
	CAPÍTULO 2 – Extratos aquosos de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess (Caryocaraceae) na inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos	33
	RESUMO	33
	ABSTRACT	34
1	INTRODUÇÃO	35
2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1	Seleção das amostras vegetais	36
2.2	Obtenção dos extratos aquosos	36
2.3	Coleta de fezes e exames parasitológicos	37
2.4	Recuperação de ovos de nematódeos gastrintestinais	37

2.5	Inibição da eclodibilidade	37
2.6	Identificação dos gêneros de nematódeos	38
2.7	Determinação do teor total de proantocianidinas	38
2.8	Análises estatísticas	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4	CONCLUSÃO	46
	CAPÍTULO 3 – Atividade anti-helmíntica <i>in vitro</i> de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess (<i>Caryocaraceae</i>) contra <i>Haemonchus contortus</i>	47
	RESUMO	47
	ABSTRACT	48
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1	Seleção das amostras vegetais	50
2.2	Obtenção do pó bruto e do extrato aquoso	50
2.3	Coleta de fezes e exames parasitológicos	50
2.4	Inibição do desenvolvimento larval	51
2.5	Inibição da eclodibilidade	52
2.6	Determinação do teor total de proantocianidinas	53
2.7	Análises estatísticas	54
3	RESULTADOS	54
3.1	Inibição do desenvolvimento larval	54
3.2	Inibição da eclodibilidade	59
3.3	Determinação do teor total de proantocianidinas	62

4	DISCUSSÃO	62
5	CONCLUSÃO	65
	CAPÍTULO 4 – Toxicidade aguda de extratos aquosos de <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess (Caryocaraceae) em camundongos	66
	RESUMO	66
	ABSTRACT	67
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1	Seleção das amostras vegetais	69
2.2	Obtenção dos extratos aquosos	70
2.3	Teste de toxicidade aguda por via intraperitoneal	70
2.4	Análise estatística	71
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXO A	92

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 1980, a pecuária bovina se desenvolveu no país de forma admirável, principalmente devido à inserção da tecnologia no setor (CARRER *et al.*, 2007). Atualmente, possui o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo, com mais de 212 milhões de cabeças (IBGE, 2011). O Brasil também apresenta grande potencial para a ovinocultura. O elevado potencial produtivo desses animais e a expansão do mercado consumidor têm estimulado a realização de pesquisas, com a finalidade de aumentar a produtividade (PIRES *et al.*, 2000).

Entretanto a pecuária bovina e ovina tem enfrentado diversos problemas que promovem queda na produção, como flutuações estacionais, disponibilidade e qualidade dos alimentos, deficiência mineral, manejo inadequado e elevada incidência das helmintoses gastrintestinais, que têm ocasionado grandes perdas econômicas (BIANCHIN; CATTO, 2008; BIZIMENYERA *et al.*, 2006).

Para solucionar ou amenizar os prejuízos causados pelos nematódeos gastrintestinais, ao longo dos anos, utilizaram-se anti-helmínticos, com distintas constituições químicas. O pouco conhecimento por parte dos produtores e trabalhadores rurais sobre a epidemiologia das helmintoses, bem como as interações parasita/hospedeiro, com o passar do tempo, fizeram com que os tratamentos com esses produtos sintéticos fossem realizados de forma inadequada com uso intensivo, com subdosagens, diagnósticos equivocados e ausência de rotatividade entre as bases farmacológicas (SOUZA *et al.*, 2008).

A associação entre essas ações promoveu a seleção de populações de nematódeos resistentes aos fármacos, ocorrendo, em determinados casos, resistência múltipla a diferentes bases farmacológicas (MEJÍA *et al.*, 2003). Além do favorecimento à resistência anti-helmíntica, outros problemas indiretos gerados, em decorrência do uso intensivo das bases sintéticas, são os resíduos desses compostos nos produtos de origem animal e a toxicidade aos ecossistemas (GRAMINHA *et al.*, 2001).

Pesquisas com fitoterápicos têm demonstrado eficácia comprovada no controle de diversos parasitas. Conforme Krychak-Furtado (2006), a fitoterapia contribui com o aumento dos lucros da criação, por reduzir o uso e, conseqüentemente, os custos com quimioterápicos convencionais, além de estender a vida útil dos produtos químicos disponíveis no mercado. Além disso, essa prática tem ganhado destaque, em função do aumento significativo da demanda dos consumidores por produtos de qualidade garantida, obtidos de forma sustentável e sem danos ao ambiente.

O pequi, *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae), árvore nativa de regiões de cerrado e com ampla distribuição no norte de Minas Gerais, possui fruto comestível, o pequi, cuja casca formada pelo epicarpo e mesocarpo externo representa cerca de 76,7% do peso do fruto (VERA *et al.*; 2005). Na comercialização do pequi, a casca constitui um resíduo que se acumula no ambiente durante os períodos de safra (COUTO, 2007). Esse componente, bem como as folhas possuem propriedades medicinais comprovadas como ação antibacteriana, moluscicida, antifúngica e nematocida (BEZERRA *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2012a; PASSOS *et al.*, 2002; PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006).

Assim, as cascas do fruto durante o período de safra e as folhas durante todo o ano podem apresentar-se com grande potencial para utilização na produção de ruminantes como anti-helmíntico natural, em complementação aos fármacos convencionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pecuária bovina

Apesar da crise econômica da década de 1980, o destaque da agropecuária que se iniciou a partir de meados da década de 1970 prosseguiu como um dos setores de maior crescimento na economia brasileira. A partir desse período e, principalmente, na década de 1990, a inovação tecnológica e a reestruturação das relações de comércio exterior, dentre outros fatores, modificaram as formas de concorrência, o que, em conjunto, promove o desenvolvimento do setor (CARRER *et al.*, 2007).

Atualmente, o Brasil possui um efetivo bovino com aproximadamente 212,8 milhões de cabeças (IBGE, 2011), considerado o segundo maior rebanho bovino do mundo, perdendo apenas para Índia, cujo rebanho se caracteriza por não ser comercial (USDA, 2012). Além disso, também é o segundo maior produtor de carne bovina e exportador, atrás dos Estados Unidos da América e da Índia, respectivamente (USDA, 2011). O Brasil ainda apresenta o terceiro maior rebanho de vacas em lactação e é o sexto maior produtor de leite (USDA, 2011).

Ferraz e Eler (2010) admitem que apenas o segmento da pecuária de corte é responsável por mais de sete milhões de empregos e, ao considerar toda a cadeia, proporciona faturamento de aproximadamente US\$50 bilhões/ano. Quanto à pecuária leiteira, a cadeia agroindustrial do leite encontra-se em todo o território nacional e é de grande relevância na geração de empregos e de tributos, bem como na fixação de mão de obra rural, no suprimento de alimentos e na geração de renda (PAULA *et al.*, 2005).

A pecuária bovina é um dos elos da cadeia produtiva nacional que consolida a integração econômica entre diferentes setores (CARRER *et al.*, 2007). Entretanto, para aumentar a competitividade da carne bovina nos mercados interno e externo são essenciais a melhoria da qualidade, a agregação de valor ao produto e a diversificação, sem perda de rentabilidade (CORRÊA *et al.*, 2005).

Apesar do crescimento da pecuária, observado ao longo dos anos, como consequência dos avanços tecnológicos e de manejo, esse setor enfrenta diversos problemas que promovem queda na produção, como flutuações estacionais, disponibilidade e qualidade dos alimentos, deficiência mineral, manejo inadequado e elevada ocorrência de doenças e de parasitos (BIANCHIN; CATTO, 2008).

2.2 Pecuária ovina

A produção de ovinos vem se destacando nas diferentes regiões do planeta (VELOSO *et al.*, 2004) e tem sido considerada uma das atividades mais lucrativas da pecuária, por promover rápido retorno do capital investido (MOREIRA *et al.*, 2006). No Brasil, a expansão da ovinocultura tem sido

acompanhada pelo aprimoramento da qualidade genética dos rebanhos e pela tecnificação e visão empresarial da atividade, fatores fundamentais para o crescimento da ovinocultura no país (NOGUEIRA; NOGUEIRA JUNIOR, 2005).

Inicialmente, a criação de ovinos no Brasil se concentrou na região Sul, mais especificamente no estado do Rio Grande do Sul, onde o principal objetivo era a produção de lã. Contudo, no início da década de 1990, o mercado da lã entrou em crise e, simultaneamente, ocorreu a expansão do mercado para a ovinocultura de corte (BORGES, 2007). O Sul deixou de ser o polo da ovinocultura e o Nordeste assumiu essa posição, onde predominam animais de pelagem curta para a produção de carne (BORGES, 2007; CAMURÇA-VASCONCELOS, 2006). Atualmente o rebanho ovino nacional possui mais de 17,6 milhões de cabeças, sendo que 57,24% concentram-se na região Nordeste e 28% na região Sul do país (IBGE, 2011).

Essa atividade possui grande relevância social por figurar-se como fonte de renda para a agropecuária familiar e melhorar as condições nutricionais, fornecendo carne e leite com proteínas de alto valor nutricional a populações de países em desenvolvimento. Nos criatórios dessas regiões, há o predomínio do sistema extensivo de criação, com pouco incremento tecnológico (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2006).

Contudo o desenvolvimento amplo da ovinocultura depende, diretamente, da adoção de manejo nutricional adequado, da ambiência das instalações, de condições climáticas, de seleção genética, de escriturações zootécnicas e, principalmente, de práticas profiláticas ou de controle para garantir a saúde dos rebanhos (SIMPLÍCIO; SIMPLÍCIO, 2006).

2.3 Helmintoses gastrintestinais

A ocorrência das helmintoses gastrintestinais é um dos grandes obstáculos para o desenvolvimento pleno da criação de ruminantes em todo o mundo, principalmente nas regiões de clima tropical, cujas condições favorecem o desenvolvimento e a persistência desses nematódeos e os prejuízos econômicos são mais expressivos (COLGRAVE *et al.*, 2008; MILLER *et al.*, 2011; RAZA *et al.* 2007; VIEIRA, 2008). Atualmente, é

considerado o maior entrave para a produção de pequenos ruminantes e uma das maiores restrições para o crescimento da criação de ruminantes a pasto (BASSETO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011).

As perdas na produtividade ocasionadas por verminoses gastrintestinais são relacionadas à redução do ganho de peso, da produção leiteira e do desempenho reprodutivo dos animais. Ocorre alta mortalidade, principalmente para animais mais jovens e matrizes ovinas e caprinas, no periparto (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). Ainda, alguns animais infectados, aparentemente saudáveis, não conseguem atingir o potencial máximo de produtividade, aumentando os custos da produção, além de serem potenciais reservatórios (GIROTTO *et al.*, 2008).

Esses parasitas são pertencentes à Ordem Strongylida, à Família Trichostrongylidae (FORTES, 2004). Os principais nematódeos gastrintestinais que acometem bovinos são: *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus axei*, *Haemonchus placei*, *Cooperia oncophora*, *C. pectinata*, *C. punctata*, *Oesophagostomum radiatum* e *O. venulosum* (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011). Em ovinos, as principais espécies descritas são: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus colubriformis* (COLGRAVE *et al.*, 2008). A espécie *T. colubriformis* aparece em segundo lugar, em ordem de importância, podendo provocar lesões na mucosa intestinal, com exsudação de proteínas séricas, quadros de anorexia, diarreia e edema submandibular (AMARANTE; SALES, 2007).

O *Haemonchus contortus* é considerado o nematódeo mais patogênico para pequenos ruminantes. O verme adulto parasita o abomaso e, por ser hematófago, em elevado grau de infecção, remove até 10% do sangue do hospedeiro por dia, o que pode levar ao óbito (AMARANTE; SALES, 2007; COLGRAVE *et al.*, 2008). Assim, a haemoncose é caracterizada por anemia hemorrágica aguda e hipoproteinemia. O abomaso apresenta edema da mucosa, submucosa e serosa, com escamação das células epiteliais e ulceração (SANTA ROSA, 1996).

O principal sinal é a palidez da pele e mucosas, seguido de coloração escura das fezes (melena) e alterações do velo, com perda de lã. A fase aguda da haemoncose caracteriza-se por anemia moderada, gastroenterite catarral, desidratação, retardo de desenvolvimento e crescimento, diarreia líquida ou pastosa e pelos arrepiados e sem brilho. Na fase crônica, observa-se edema submandibular, diminuição significativa na produção de leite e carne, emagrecimento, anemia acentuada e morte (SANTA ROSA, 1996).

O ciclo evolutivo dessas espécies de nematódeos é, geralmente, semelhante. As fêmeas liberam ovos com as fezes do hospedeiro, que desenvolvem no ambiente e, em três dias, eclodem as larvas do primeiro estágio (L1), que, após duas mudas, passam à forma infectante, que será ingerida no pastejo (FORTES, 2004). Uma vez no organismo, as larvas infectantes atingem o estágio adulto no trato gastrointestinal, reiniciando o ciclo (RUAS; BERNE, 2001).

As larvas infectantes migram para as lâminas d'água que se formam sobre o solo e a vegetação, contaminando as pastagens (FORTES, 2004). Assim, esses parasitas tendem a ser recorrentes em animais submetidos, continuamente, ao pastejo (MEHLHORN *et al.*, 2011). Gazda *et al.* (2012) constataram, para ovinos criados em pastagens, que a elevada carga animal por unidade de área contribui para a contaminação constante das gramíneas, com conseqüente infecção dos animais.

A patogenia das helmintoses varia conforme a intensidade da infecção, o tipo de injúria que provocam e a reação dos tecidos do hospedeiro. É influenciada diretamente pela idade, pela espécie e pela raça do animal, sendo os mais jovens mais suscetíveis às verminoses e os ovinos e caprinos mais vulneráveis que os bovinos. Frequentemente, ocorrem infecções mistas de nematódeos com diferentes graus de patogenicidade (RUAS; BERNE, 2001).

2.3.1 Controle das helmintoses gastrintestinais

A fim de solucionar ou amenizar os prejuízos causados por nematódeos gastrintestinais, ao longo dos anos, tem sido difundido, na produção animal, o uso de anti-helmínticos, com distintas bases químicas

(CONDI *et al.*, 2009). Atualmente, há três grupos de anti-helmínticos de amplo espectro, que são os benzimidazóis (como sulfóxido de albendazol), os agonistas nicotínicos (imidazotiazóis e hidropirimidinas) e as lactonas macrocíclicas (avermectinas) (COLES *et al.*, 2006; STEAR *et al.*, 2007). Dois outros grupos de espectro restrito têm sido utilizados para o controle de *H. contortus* em ovinos, que são as salicilanilidas e os nitrofenóis, sendo que, em alguns países, os organofosforados ainda são comercializados (COLES *et al.*, 2006).

O conhecimento da epidemiologia das helmintoses, bem como as interações parasita/hospedeiro são essenciais à adoção de métodos de controle efetivo (ARAÚJO *et al.*, 2006). O controle estratégico, por exemplo, depende dessas informações para identificar as épocas críticas de contaminação para indicar as vermifugações, sendo necessária adoção de tratamentos táticos em determinadas regiões, em função das variações climáticas (SAUERESSIG, 2001).

De acordo com Almeida *et al.* (2007), muitos estudos têm buscado alternativas de controle para complementar o uso dos anti-helmínticos sintéticos. Dentre essas soluções, diferentes técnicas de manejo têm sido adotadas (RUAS; BERNE, 2001). Como parte do ciclo biológico desses parasitas ocorre nas pastagens (CÉZAR *et al.*, 2008), 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).

Cézar *et al.* (2008) reportam que o pastejo rotacionado é uma das estratégias de manejo que pode interromper o ciclo dos parasitas. Entretanto é necessário 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 descontaminação prévia das pastagens, adotando o diferimento de áreas, também pode ser utilizada, principalmente para introduzir os animais mais suscetíveis (AMARANTE, 2004).

Outra estratégia de manejo utilizada trata-se da alternância de categorias e/ou de espécies de hospedeiros no pastejo. Animais adultos tendem a apresentar melhor imunidade às verminoses que os jovens, eliminando fezes em grande volume, mas com OPG baixo, o que diminui a quantidade de larvas nas pastagens (COLES, 2002). De acordo com Amarante (2004), a alternância com outras espécies auxilia 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.

2.3.2 Resistência dos nematódeos aos anti-helmínticos convencionais

O controle com a utilização dos vermífugos químicos tem sido realizado ao longo dos anos, sem conhecimento da epidemiologia e das interações parasita e hospedeiro, o que interfere na população parasitária ambiental e, por consequência, na infecção dos rebanhos (ARAÚJO *et al.*, 2006). A carência de informações promoveu tratamentos indiscriminados com esses produtos sintéticos, com uso intensivo, utilizando subdosagens e com diagnósticos equivocados, com baixa rotatividade entre as bases anti-helmínticas (SOUZA *et al.*, 2008).

A associação entre essas ações promoveu rápida seleção de populações de nematódeos resistentes aos fármacos, ocorrendo, em determinados casos, resistência múltipla a diferentes bases farmacológicas (MEJÍA *et al.*, 2003). Além disso, diversos nematódeos possuem características genéticas que favorecem o desenvolvimento da resistência aos anti-helmínticos, dentre as quais, podem ser citadas rápidas taxas na evolução da sequência de nucleotídeos e grande população efetiva, o que permite elevada diversidade genética (BLOUIN *et al.*, 1995). Dessa forma, além de apresentarem potencial genético para responder contra os fármacos químicos, possuem meios de assegurar a disseminação dos genes da resistência (KAPLAN, 2004).

Nos últimos 20 anos tem se observado um aumento expressivo na manifestação de resistência dos nematódeos gastrintestinais às principais classes de anti-helmínticos nas criações de ovinos de muitos países (TAYLOR *et al.*, 2009). Na Austrália, Le Jambre *et al.* (2005) fizeram o primeiro relato de um isolado de *Trichostrongylus colubriformis* resistente à moxidectina. Sarginson *et al.* (2007) observaram, em quatro rebanhos analisados na Escócia, resistência às bases dos três grupos de anti-helmínticos de amplo espectro. Na França, Palcy *et al.* (2010) fizeram o primeiro relato de resistência de *Trichostrongylus axei* ao febendazol.

No Brasil, os relatos de resistência em rebanhos ovinos também são frequentes. Em Santa Catarina, Rosalinsk-Moraes *et al.* (2007) verificaram resistência à ivermectina, em 100% dos rebanhos da região da Associação dos Municípios do Alto Irani, oeste do estado, e resistência à moxidectina, em 66,7% dos rebanhos. Buzzulini *et al.* (2007) também encontraram resistência à moxidectina em um rebanho em Jaboticabal, São Paulo. Falbo *et al.* (2009) registraram, pela primeira vez, a ocorrência de resistência de *H. contortus* ao closantel em cordeiros, na área central do Paraná.

No estado do Mato Grosso do Sul, Sczesny-Moraes *et al.* (2010) detectaram resistência dos gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum* às bases farmacológicas albendazol, ivermectina, levamisole, triclorfon, moxidectina, closantel e à associação entre albendazol, ivermectina e levamisol, em maior ou menor intensidade, sendo o gênero *Haemonchus* o mais resistente. Esses autores reportaram também um caso de resistência múltipla nesse estado. Resistência ao albendazol também foi observada por Duarte *et al.* (2012) em rebanhos ovinos no norte de Minas Gerais; além disso, os gêneros de maior ocorrência foram *Haemonchus* e *Trichostrongylus*, constatando que as larvas de *Haemonchus* foram as mais prevalentes, mesmo após o tratamento dos animais.

Até 2004, poucos relatos de resistência de nematódeos em bovinos às bases farmacológicas eram descritos (KAPLAN, 2004). Entretanto, nos últimos anos, esses relatos têm aumentado significativamente em muitos países, para diferentes espécies de nematódeos sobre todas as bases farmacológicas existentes (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011).

Em rebanhos de bovinos do Pampa Úmido da Argentina, Fiel *et al.* (2001) detectaram resistência de *Trichostrongylus* spp. à avermectina e à milbemicina. Anziani *et al.* (2004), por sua vez, relataram o primeiro caso de resistência simultânea às avermectinas e aos benzimidazóis para *Haemonchus* spp. em bovinos, também na Argentina.

Gasbarre *et al.* (2009) descreveram o primeiro relato de resistência a anti-helmínticos nos Estados Unidos, ao detectarem isolados de *Haemonchus contortus* resistentes à ivermectina, à moxidectina, à doramectina, à eprinomectina e ao albendazol e de *H. placei* e *Cooperia* sp. resistentes às avermectinas testadas. Na Austrália, Lyndal-Murphy *et al.* (2010) reportaram o primeiro caso de resistência às lactonas macrolíticas para *Cooperia* spp. e *Haemonchus placei*, provenientes de bovinos.

A ocorrência de nematódeos resistentes aos fármacos convencionais também tem sido descrita em rebanhos bovinos brasileiros. No estado de São Paulo, Soutelo *et al.* (2007) registraram a presença de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. resistentes ao albendazol, ao levamisol e, principalmente, à ivermectina. Ainda em São Paulo, Condi *et al.* (2009) encontraram as espécies *Cooperia punctata*, *C. pectinata*, *Oesophagostomum radiatum* e *Trichuris* spp. com resistência à moxidectina. Souza *et al.* (2008) detectaram, no Planalto Catarinense, *Haemonchus* sp. e *Cooperia* sp. como os principais gêneros com resistência à ivermectina; os gêneros *Ostertagia*, *Cooperia* e *Trichostrongylus*, ao fosfato de levamisol e *Cooperia* sp., ao sulfóxido de albendazol.

O aparecimento constante de populações de nematódeos resistentes aos medicamentos convencionais evidencia que a estratégia de controle químico tem se tornado ineficaz (AMARANTE; AMARANTE, 2003). Dessa forma, a busca por outros métodos de controle, com a finalidade de superar essa resistência e manter o controle efetivo dos parasitas nos rebanhos tem se tornado de grande importância (MOLENTO; PRICHARD, 2001).

2.3.3 Alternativas fitoterápicas para controle de nematódeos em ruminantes

A fitoterapia, que consiste no tratamento por meio da utilização de plantas, 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).

Contudo, por ser uma alternativa sustentável ao uso de quimioterápicos, o interesse em propriedades antiparasitárias nos extratos de plantas tem aumentado (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).

No QUADRO 1, estão descritas mais de 20 espécies vegetais que foram avaliadas em diversos países, nos últimos três anos para detecção do potencial anti-helmíntico *in vitro*, com eficácias superiores a 90%.

QUADRO 1

Espécies vegetais avaliadas em diferentes países com eficácia anti-helmíntica superior a 90% em experimentos *in vitro*

(Continua)

Espécie vegetal	Nome popular	Parte utilizada	Forma de utilização	Teste	Referência
<i>Acanthus montanus</i>	Justícia de espinho	Folhas	EA	IEO / IDL	Adamu <i>et al.</i> (2010)
<i>Agave sisalana</i>	Sisal	Folhas	EA	IEO / IDL / IAL / AVA	Silveira <i>et al.</i> (2012)
<i>Alpinia zerumbet</i>	Colônia	Parte aérea	D	IEO / IDL	Macedo <i>et al.</i> (2012)
<i>Anacardium humile</i>	Cajuzinho do mato	Folhas	EA / EE	IDL	Nery <i>et al.</i> (2010)
<i>Andrographis paniculata</i>	...	Folhas	EM	IEO	Kamaraj <i>et al.</i> (2011)
<i>Anisomeles malabarica</i>	...	Folhas	EAE / EM	IEO	Kamaraj <i>et al.</i> (2011)
<i>Annona squamosa</i>	Fruta do conde	Casca	EAE / EAC / EM	IEO	Kamaraj <i>et al.</i> (2011)
		Folhas	EAE / EM	IEO / IDL	Kamaraj e Rahuman (2011)
<i>Catharanthus roseus</i>	Vinca	Folhas	EAE / EAC / EM	IEO / IDL	Kamaraj <i>et al.</i> (2010)
<i>Combretum molle</i>	...	Folhas	EAC	IEO / IDL	Ademola <i>et al.</i> (2010)

QUADRO 1

Espécies vegetais avaliadas em diferentes países com eficácia anti-helmíntica superior a 90% em experimentos *in vitro*

(Continua)

Espécie vegetal	Nome popular	Parte utilizada	Forma de utilização	Teste	Referência
<i>Datura metel</i>	...	Folha	EM	IEO	Kamaraj <i>et al.</i> (2011)
<i>Eclipta prostrata</i>	Erva-botão	Folhas	EAE / EM	IEO	Kamaraj e Rahuman (2011)
<i>Lantana câmara</i>	Cambará	Parte aérea	D	IDL	Macedo <i>et al.</i> (2012)
<i>Lippia sidoides</i>	Alecrim pimenta	Folhas	EHA	IEO	Souza <i>et al.</i> (2010)
<i>Mangifera indicavar.</i> Ubá	Manga	Frutos	EA	IDL	Nery <i>et al.</i> (2012)
<i>Melia azedarach</i>	Cinamomo	Folhas / sementes	EA / EHA	IEO / IDL	Kamaraj <i>et al.</i> (2010)
		Frutos	EH	IDL	Cala <i>et al.</i> (2012)
<i>Mentha villosa</i>	Hortelã-comum	Folhas	EAE / EAC / EM	IEO / IDL	Kamaraj <i>et al.</i> (2010)
<i>Musa paradisíaca</i>	Banana	Folhas	EM / EA	IEO / AVA	Hussain <i>et al.</i> (2011)
<i>Musa sp.</i>	Banana	Folhas /coração / pseudocaule	EA	IDL	Oliveira <i>et al.</i> (2010)

QUADRO 1

Espécies vegetais avaliadas em diferentes países com eficácia anti-helmíntica superior a 90% em experimentos *in vitro*

(Conclusão)

Espécie vegetal	Nome popular	Parte utilizada	Forma de utilização	Teste	Referência
<i>Phytolacca icosandra</i>	Espinafre da guyana	Folhas	EA / ED / EH	IE	Hernández-Villegas <i>et al.</i> (2011)
<i>Prosopis juliflora</i>	Algaroba	Frutos	EM	IEO / IDL	Batatinha <i>et al.</i> (2011)
<i>Solanum torvum</i>	Jurubeba	Sementes	EAE / EA / EM	IEO	Kamaraj <i>et al.</i> (2011)
		Folhas	EAE / EAC / EM	IEO / IDL	Kamaraj e Rahuman (2011)
<i>Tagetes minuta</i>	Chinchila	Parte aérea	D	IEO / IDL	Macedo <i>et al.</i> (2012)
<i>Terminalia chebula</i>	Haritaki	Parte aérea	D	IEO / IDL	Macedo <i>et al.</i> (2012)
<i>Trichilia clausenii</i>	Catiguá	Sementes	EAC / EM	IEO / IDL	Kamaraj e Rahuman (2011)

Notas: EA: extrato aquoso; D: decocção; EE: extrato etanólico; EM: extrato metanólico; EAE: extrato em acetato de etila; EAC: extrato acetônico; EHA: extrato hidroalcoólico; EH: extrato hexânico; ED: extrato diclorometânico; IEO: inibição da eclodibilidade ovos; IDL: inibição de desenvolvimento larval; IAL: inibição da alimentação larval; AVA: ação em vermes adultos.

Fonte: Da autora.

Apesar da grande variabilidade de plantas com relatos de atividade anti-helmíntica, poucos compostos bioativos promotores dessa ação nematicida já foram identificados (GHISALBERTI, 2002). Dentre esses, estão os taninos, que, apesar do efeito anti-nutricional, podem exercer ação anti-helmíntica direta, por interferir no ciclo natural desses parasitas (KETZIS *et al.*, 2006). Estudos realizados com taninos condensados demonstraram a eficácia sobre *Trichostrongylus colubriformes* e *Haemonchus contortus*, ao serem administrados por via oral em ovinos (BUTTER *et al.*, 2000; MAX *et al.*, 2005).

Ao avaliarem os efeitos do extrato de *Onobrychis viciifolia*, planta rica em taninos sobre os nematódeos do abomaso de pequenos ruminantes, Brunet *et al.* (2008) constataram que o extrato reduziu, significativamente, a capacidade de penetração dos nematódeos *Haemonchus contortus* e *Teladorsagia circumcincta* na mucosa digestiva e, ao adicionarem polivinil polipirrolidona, um inibidor de taninos, as alterações nos nematódeos foram minimizadas.

Ademola *et al.* (2009) avaliaram o efeito das frações oriundas da biosseparação do extrato etanólico da casca de *Khaya senegalensis* (Deser.) A. Juss e concluíram que a atividade anti-helmíntica dessa planta pode estar relacionada ao sinergismo entre os seus vários metabólicos secundários, dentre os quais, foram identificados: taninos, taninos condensados, saponinas, flavonoides, alcaloides e terpenoides.

2.4 *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae)

A família Caryocaraceae, encontrada no neotrópico, apresenta dois gêneros: *Anthodiscas* e *Caryocar*. Os representantes do gênero *Anthodiscas*, cerca de dez espécies, possuem folhas opostas e a ocorrência é registrada desde Santa Catarina, região Sul do Brasil, à Costa Rica, América Central. O gênero *Caryocar* (folhas alternas) possui aproximadamente 16 espécies, das quais uma ocorre na Costa Rica, 11 na Região Amazônica, duas no Nordeste brasileiro, uma no sul da Bahia e do estado do Rio de Janeiro e uma de ocorrência em todo o bioma Cerrado, a espécie *Caryocar brasiliense* Cambess (KERR *et al.* 2007; CARVALHO, 2009).

Caryocar brasiliense Cambess é uma planta arbórea nativa de regiões de cerrado, com ampla distribuição nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (MAIA *et al.*, 2008). O nome popular dessa espécie vegetal pode variar conforme a região de ocorrência, sendo os mais comuns: pequi, piqui, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequiá-pedra, pequerim, suari e piquiá (SANTOS *et al.*, 2004). A frutificação é anual, ocorrendo o período de safra de setembro a fevereiro, sendo que, no estado de Minas Gerais, o período de floração vai de setembro a novembro e a frutificação, de novembro a fevereiro (CARVALHO, 2009; VERA *et al.*, 2005) (FIG. 1).

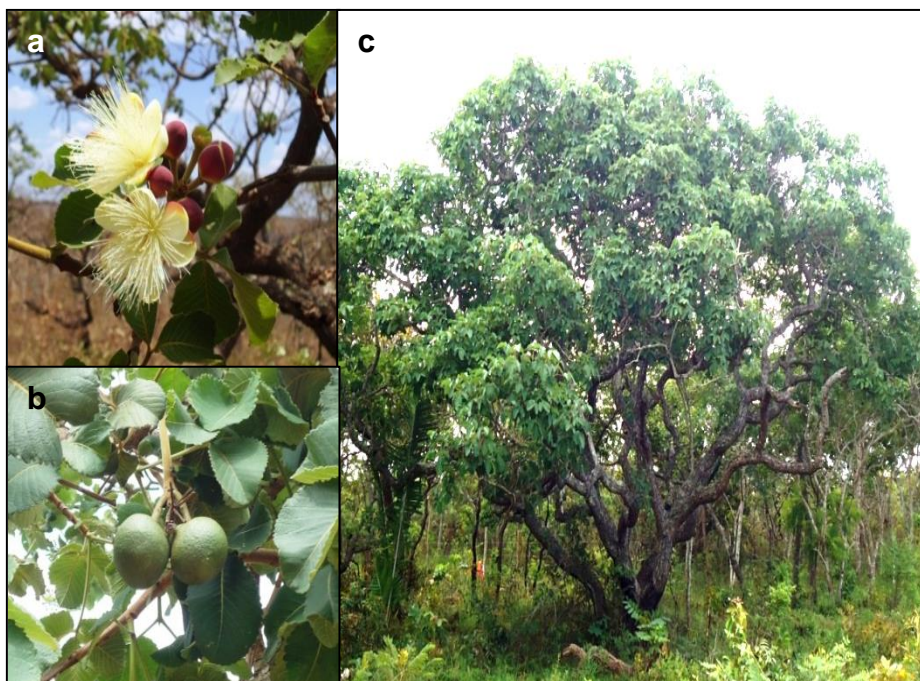


FIGURA 1 – *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae)

- a) Flor do pequizeiro
- b) Fruto do pequizeiro (pequi)
- c) Pequizeiro

Fonte: Da autora.

Em 2001, o pequizeiro foi eleito “Árvore Símbolo do Estado de Minas Gerais”, em concurso realizado pelo Instituto Estadual de Floresta – MG (SANTOS *et al.*, 2004). Além disso, a Portaria Federal 54, de 05 de março de 1987, do antigo Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), atual Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), impede o seu corte e a comercialização de sua madeira em todo o território nacional (SILVA NETO; COSTA, 2010).

O pequizeiro possui grande importância socioeconômica, uma vez que os frutos são explorados de forma extrativista por populações que se inserem no bioma do Cerrado, constituindo fonte de alimentação e de renda. É amplamente utilizado na culinária, na agroindústria, na fabricação de cosméticos e na medicina popular (BELO, 2009).

Com base no uso terapêutico popular do pequi, diversas pesquisas têm sido realizadas para a identificação das propriedades medicinais. Martins *et al.* (2009) constataram a atividade do extrato aquoso das folhas do pequi a 5 e 20% no controle de *Aspergillus flavus*, fitopatógeno presente nas sementes do pequi. A ação antifúngica também foi identificada por Passos *et al.* (2002), ao avaliarem o extrato bruto etanólico das folhas, os óleos fixos da semente e da amêndoa e a cera da superfície epicular das folhas no controle da levedura *Cryptococcus neoformans*, causador da criptococose, uma micose oportunista de humanos.

Bezerra *et al.* (2002) descreveram a atividade moluscicida do extrato etanólico da casca do caule e das folhas de pequi contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário da esquistossomose na concentração de 100 ppm. O extrato hidroetanólico das folhas, segundo Paula-Júnior *et al.* (2006), apresenta ação leishmanicida e antibacteriana.

O extrato etanólico da casca do fruto também demonstrou efeito antioxidante, conforme pesquisas realizadas por Roesler *et al.* (2008). Ação anti-inflamatória e possíveis efeitos hipotensivos do óleo da polpa do pequi foram identificados por Miranda-Vilela *et al.* (2009).

Nogueira *et al.* (2012a) avaliaram a atividade do extrato aquoso da casca do fruto de *Caryocar brasiliense* no controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos, obtendo eficácias máximas de 91,8% (7,5 mg.ml⁻¹)

e 98,4% (15 mg.ml^{-1}), na inibição da eclodibilidade de larvas e mínima de 99% na menor concentração (40 mg.ml^{-1}), na inibição do desenvolvimento larval. Em análises fitoquímicas do extrato, esses autores verificaram a presença de saponinas, de taninos totais, de taninos catequéticos, de catequinas, de esteroides, de flavonoides e de xantonas, podendo ser a atuação sinérgica desses metabólitos responsável pelo efeito anti-helmíntico.

Dentre os principais compostos identificados em diversas partes do pequizeiro (folhas, casca do caule, casca do fruto, etc.) foram detectados compostos fenólicos (flavonoides, taninos hidrolisáveis, taninos condensados), saponinas e terpenos (BEZERRA *et al.*, 2002; PASSOS *et al.*, 2002; PAULA JÚNIOR *et al.*, 2006).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial anti-helmíntico do pequizeiro no controle das helmintoses gastrintestinais de ruminantes e sua toxicidade por via intraperitoneal.

CAPÍTULO 2 – EXTRATOS AQUOSOS DE *Caryocar brasiliense* CAMBESS (CARYOCARACEAE) NA INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE BOVINOS

RESUMO

O pequizeiro, planta nativa do Cerrado, possui ampla utilização na medicina popular e recentes estudos têm demonstrado potencial anti-helmíntico para nematódeos de ovinos. Assim, objetivou-se avaliar a eficácia *in vitro* dos extratos aquosos da casca do fruto e das folhas do pequizeiro na inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos. Promoveram-se a filtração, a flutuação e a sedimentação, para a obtenção de ovos de nematódeos. As concentrações 15,00; 7,50; 3,75 e 1,88 mg.mℓ⁻¹ foram avaliadas para ambos os extratos. Solução de levamisol (15 mg.mℓ⁻¹) e água purificada estéril consistiram nos controles positivo e negativo, respectivamente. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições. Calcularam-se as eficácias e os dados de contagem foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas com o teste de Duncan (5%). Com a análise de regressão *probit*, determinou-se a concentração letal para inibição de 90% da eclodibilidade (CL₉₀). Todas as concentrações do extrato aquoso das cascas do fruto apresentaram eficácia acima de 90% e as três mais elevadas não se diferiram do controle positivo. A maior eficácia observada para o extrato das folhas foi 89,15%, na concentração de 15,00 mg.mℓ⁻¹. As CL₉₀ foram 1,70 e 15,88 mg.mℓ⁻¹ para o extrato das cascas do fruto e das folhas do pequizeiro, respectivamente. Os resultados demonstram que os extratos avaliados apresentam grande potencial na inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos.

Palavras-chave: Controle alternativo. Extratos vegetais. Helmintoses gastrintestinais. Pecuária bovina. Pequizeiro.

CHAPTER 2 - AQUEOUS EXTRACTS FROM *Caryocar brasiliense* CAMBESS (CARYOCARACEAE) IN INHIBITION OF HATCHABILITY OF GASTROINTESTINAL NEMATODES CATTLE

ABSTRACT

The *pequizeiro*, native plant from Cerrado, has wide use in folk medicine and recent studies have shown potential anthelmintic of the nematodes of sheep. Thus it was objectified to evaluate the in vitro efficacy of aqueous extracts of the fruit peel and leaves *pequizeiro* in inhibition of the hatchability of gastrointestinal nematodes of cattle. Promoted by filtration, flotation and sedimentation, for obtaining nematode eggs. The concentrations 15,00; 7,50; 3,75 and 1,88 mg.mℓ⁻¹ were evaluated for both extracts. Solution of levamisole (15 mg.mℓ⁻¹) and sterile purified water consisted in positive and negative controls, respectively. The experiment was a completely randomized design with eight replications. They were calculated efficiencies and count data were subjected to analysis of variance and means compared with Duncan test (5%). With the probit regression analysis, we determined the lethal concentration for 90% inhibition of hatching (LC₉₀). All concentrations of the aqueous extract of the fruit peels showed efficacy above 90% and the three highest not differ from the control positive. The greater efficacy observed for the extract of the leaves was 89.15% at the concentration of 15,00 mg.mℓ⁻¹. The CL₉₀ were 1.70 and 15.88 mg.mℓ⁻¹ for the extract from the bark of the fruit and leaves of *pequizeiro* respectively. The results showed that the extracts have great potential assessed in hatchability inhibition of gastrointestinal nematodes of cattle.

Keywords: Alternative control. Vegetal extracts. Helminthiasis gastrointestinal. Cattle raising. *Pequizeiro*.

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência das verminoses gastrintestinais é um dos grandes problemas enfrentados na pecuária bovina de corte e leiteira em diversas regiões no mundo. Ocasionalmente reduzem o ganho de peso, o crescimento, o desempenho e a produtividade dos rebanhos (ARAÚJO *et al.*, 2004). Além disso, demandam elevados custos com tratamentos profilático e curativo (MOTA *et al.*, 2003). Assim, o somatório desses prejuízos gera grandes perdas econômicas para o setor.

Os anti-helmínticos sintéticos têm sido administrados inadequadamente, de forma frequente e sem aguardar o período recomendado entre tratamentos, o que seleciona populações de nematódeos resistentes (RANGEL *et al.*, 2005). O uso abusivo dos fármacos também eleva os custos da produção e provoca danos ambientais, por causa da toxicidade, além de acumular resíduos nos produtos de origem animal.

A sociedade atual tem exigido, cada vez mais, produtos saudáveis e ambientalmente sustentáveis. Dessa forma, a bovinocultura precisa se adequar às exigências do consumidor, adaptando o modo de produção. Nesse sentido, torna-se de grande relevância a busca por novos métodos de controle das verminoses.

Controles alternativos e complementares têm sido pesquisados para amenizar os impactos causados pelas helmintoses gastrintestinais. A utilização de extratos vegetais no controle de doenças de animais e humanos tem sido difundida durante séculos (ALMEIDA *et al.*, 2007).

O pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Cambess) é uma planta arbórea nativa do Cerrado e de grande importância socioeconômica para as regiões de ocorrência, representando fonte de renda e de alimento. Diferentes partes da árvore apresentam potencial medicinal comprovado, como a ação antifúngica, moluscicida (PASSOS *et al.*, 2002), leishmanicida e antibacteriana (PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006). Em função das potencialidades do pequiheiro como anti-helmíntico, objetivou-se avaliar a eficácia dos extratos aquosos das cascas do fruto e das folhas na inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado na cidade de Montes Claros – MG.

2.1 Seleção das amostras vegetais

As cascas do fruto (epicarpo e mesocarpo externo) e as folhas do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess) foram coletadas em regiões de Cerrado do norte de Minas Gerais. As amostras foram identificadas e armazenadas em exsiccata nº 338, no Herbário Montes Claros, localizado na Universidade Estadual de Montes Claros.

Após a coleta, as amostras vegetais foram selecionadas, eliminando-se materiais com lesões ou deteriorados. Posteriormente, foram lavadas e sanitizadas, com solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 2% (v/v), por 15 minutos (SILVA; GALLO, 2003).

2.2 Obtenção dos extratos aquosos

As cascas picadas e folhas selecionadas foram desidratadas em estufa com circulação de ar forçada a 40°C ±5, por aproximadamente 72h. Posteriormente, foram trituradas em moinho de facas, identificadas e armazenadas em freezer a -4° C.

Os extratos aquosos foram obtidos por decocção (KRYCHAK-FURTADO, 2006; NERY *et al.*, 2010). O material seco e moído foi submerso em água purificada estéril, homogeneizado e incubado em banho-maria a 60°C, durante 60 minutos. Em seguida, filtrou-se a quente em funil com gaze e algodão, colocou-se o filtrado em placas de *petri* e novamente foi desidratado em estufa, com circulação forçada de ar, a 40°C ±5 até obtenção de peso constante, consistindo do extrato aquoso bruto. Subamostras desses extratos foram submetidas à determinação de matéria seca, a 105°C, para cálculo das concentrações a serem testadas (CUNNIF, 1995).

2.3 Coleta de fezes e exames parasitológicos

Para a realização dos testes *in vitro*, foram coletadas amostras de fezes diretamente da ampola retal de três bezerros mestiços (Nelore x Holandês), com idade entre quatro e cinco meses, naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais. Um *pool* das amostras fecais foi imediatamente encaminhado ao Laboratório de Parasitologia Animal. A quantificação de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada pela metodologia descrita por Ueno e Gonçalves (1998), onde se acrescentaram 58 ml de solução hipersaturada de cloreto de sódio a dois gramas de fezes para flutuação dos ovos, que foram contados em câmara de Mc-Master, com o auxílio de microscópio óptico na objetiva de 10x, obtendo-se OPG médio de 1250.

2.4 Recuperação de ovos de nematódeos gastrintestinais

Os ovos foram recuperados, realizando-se a metodologia adaptada de Bizimnyera *et al.* (2006). As fezes coletadas foram maceradas, homogeneizadas, lavadas e filtradas em tamis, com malhas contendo poros de um mm, 106, 53 e 20 μm . Posteriormente, os ovos coletados da última peneira foram distribuídos em tubos de 14 ml e centrifugados a 2000 rpm por seis minutos. O sobrenadante foi descartado e completaram-se os tubos com solução salina hipersaturada para a ressuspensão do sedimento. Centrifugou-se novamente e o sobrenadante foi lavado na peneira de 20 μm , com água purificada até a retirada total da solução salina. A solução de ovos foi armazenada em Béquer e a concentração de ovos, estimada em microscópio óptico, correspondeu a 150 ovos em 150 μl de água purificada.

2.5 Inibição da eclodibilidade

Para avaliar a eficácia do extrato aquoso das cascas do fruto e das folhas do pequizeiro, foi utilizada a metodologia adaptada de Coles *et al.* (1992). Ambos os extratos foram diluídos em água purificada estéril para a obtenção das concentrações a serem testadas.

Em placas de microdiluição, foram adicionados 150 μl de solução, com aproximadamente 150 ovos e 150 μl das diluições dos extratos, obtendo-se as concentrações finais 15,00; 7,50; 3,75 e 1,88 $\text{mg.m}\ell^{-1}$. Foram utilizados 150 μl de fosfato de levamisol (Protall VP®, Vallée, Minas Gerais, Brasil), na concentração de 15 $\text{mg.m}\ell^{-1}$ como controle positivo e 150 μl de água purificada estéril como controle negativo. As placas foram homogeneizadas, cobertas com filme plástico e incubadas em estufa BOD a 28°C por 72h. Após esse período, foram adicionados 100 μl de formaldeído 10% (v/v) e as placas foram armazenadas sob refrigeração a aproximadamente 4°C, para posterior contagem.

Procederam-se às análises em microscópio óptico na objetiva de 10x, quantificando-se os ovos blastomerados, os ovos larvados e as larvas de 1º estágio (L1). O experimento foi realizado com oito repetições por tratamento, em um delineamento inteiramente casualizado.

2.6 Identificação dos gêneros de nematódeos

Para a identificação dos gêneros de nematódeos presentes, foram realizadas coproculturas quantitativas para a obtenção de larvas infectantes (UENO; GONÇALVES, 1998). Foram confeccionadas lâminas coradas com lugol e os gêneros, diferenciados, utilizando-se a chave de Keith (1953), após a visualização em microscopia óptica com objetiva de 40x.

2.7 Determinação do teor total de proantocianidinas

Quantificou-se o teor total de taninos condensados (proantocianidinas) nos extratos aquosos da casca do fruto e das folhas de *Caryocar brasiliense*, conforme metodologia descrita por Hiermann *et al.* (1986), onde se utilizou solvólise catalisada por ácido com *n*-BuOH/HCl 37% (95:5). A leitura da absorbância das soluções foi realizada a 540 nm, sendo os valores expressos como cloreto de cianidina. Para os resultados, obteve-se a média de três determinações, seguida do desvio-padrão.

2.8 Análises estatísticas

A eficácia média de inibição da eclodibilidade foi calculada com a seguinte fórmula, adaptada de Coles *et al.* (1992):

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

O número de L1 e de ovos não eclodidos observados por parcela foi convertido em valores relativos ao número inicial de ovos. Foram realizadas a análise de variância e a comparação das médias, com o teste de Duncan a 5% de probabilidade. Com a análise de regressão *probit* do pacote estatístico SAEG® 9.1 (2007), foram determinadas as concentrações dos extratos capazes de inibir 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) a eclodibilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi constatada infecção mista nas amostras de fezes utilizadas e os principais gêneros de nematódeos identificados foram *Trichostrongylus* (37,75%), *Cooperia* (28,57%), *Haemonchus* (24,50%), *Bunostomum* (6,12%), *Oesophagostomum* (3,06%). Esses dados corroboram a descrição de Sutherland e Leathwick (2011), que indicam as espécies *Trichostrongylus axei*, *Haemonchus placei*, *Cooperia oncophora*, *C. pectinata*, *C. punctata*, *Oesophagostomum radiatum* e *O. venulosum* como os nematódeos mais prevalentes para bovinos.

O extrato aquoso das cascas do fruto e das folhas do pequiheiro apresentou eficácias elevadas na inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos. Contudo as eficácias verificadas para as concentrações do extrato das cascas do fruto foram superiores àquela observada para a maior concentração do extrato das folhas, indicando melhor ação anti-helmíntica (TAB. 1).

TABELA 1

Inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos submetidos a tratamentos com diferentes concentrações do extrato aquoso das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense*

Extrato aquoso	Concentração (mg.mℓ ⁻¹)	Média OB ± DP	Média OL ± DP	Média L1 ± DP	Eficácia (%)
Casca do fruto	15,00	5,9 ± 2,7b	141,0 ± 12,8 a	0,3 ± 0,5 a	99,81
	7,50	5,0 ± 2,1 b	139,0 ± 16,7 a	0,5 ± 0,5 a	99,61
	3,75	6,9 ± 2,7 b	119,1 ± 17,6 ab	3,1 ± 3,4 a	97,87
	1,88	16,9 ± 33,8 b	101,8 ± 38,6 ab	11,3 ± 4,7 b	91,28
Folha	15,00	3,4 ± 1,9 b	99,4 ± 21,2 ab	14,0 ± 4,8 c	89,15
	7,50	5,3 ± 1,8 b	103,8 ± 13,3 ab	16,6 ± 2,4 c	87,11
	3,75	4,9 ± 3,0 b	84,6 ± 9,7 ab	19,8 ± 7,7 d	84,70
	1,88	5,8 ± 2,2 b	94,0 ± 26,9 b	28,8 ± 2,5 e	77,67
	CN	0,8 ± 1,0 b	0,0 ± 0,0 d	128,3 ± 18,9 f	..
	CP	84,4 ± 28,7 a	62,0 ± 33,7 c	0,3 ± 0,5 a	99,81
	CV (%)	106,24	16,47	15,47	

Notas: Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). OB: ovos blastomerados; OL: ovos larvados; L1: larvas de primeiro estágio; CN: controle negativo – água purificada; CP: controle positivo – levamisol (15 mg.mℓ⁻¹); CV: coeficiente de variação; DP: desvio padrão.

Fonte: Da autora.

A média de ovos blastomerados (FIG. 1A) para os tratamentos com os extratos não diferiu estatisticamente do controle negativo, evidenciando que ambos os extratos não foram eficazes na inibição do desenvolvimento embrionário. Contudo inibiram a eclosão das larvas, uma vez que se verificou média significativamente mais elevada de ovos larvados (FIG. 1B).

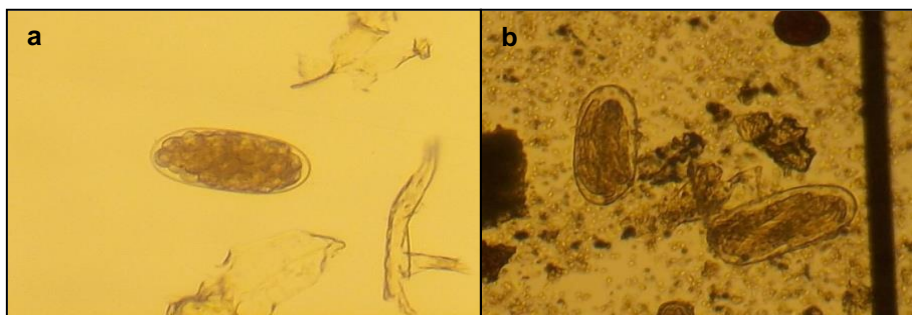


FIGURA 1 – Ovos de trichostrongylídeos de bovinos (Objetiva de 10x)

a) Ovo blastomero

b) Ovos larvados

Fonte: Da autora.

Para todos os tratamentos com os extratos do pequizeiro, a média de L1 eclodidas diferiu do controle com água purificada. As médias de L1 das três maiores concentrações do extrato aquoso das cascas do fruto foram estatisticamente semelhantes àquela observada para o controle positivo com o levamisol ($p < 0,05$). Para ambos os extratos, em todas as concentrações avaliadas, verificaram-se as larvas L1 deterioradas, evidenciadas na FIG. 2.



FIGURA 2 – Larvas de primeiro estágio (L1) de trichostrongylídeos de bovinos (Objetiva de 10x)

a) L1 degradada pela ação do extrato aquoso das cascas do fruto do pequizeiro

b) L1 degradada pela ação do extrato aquoso das folhas

c) L1 sem degradação (grupo controle negativo)

Fonte: Da autora.

A classificação do índice de eficácia, proposta pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, considera que um produto seja efetivo, ao promover acima de 90% de ação anti-helmíntica; moderadamente efetivo, entre 80 a 90%; pouco efetivo, entre 60 e 80% e não efetivo, em níveis abaixo de 60% (POWERS *et al.*, 1982). Dessa forma, os resultados demonstram que o extrato aquoso das cascas do fruto pequi apresentou elevada atividade anti-helmíntica para todas as concentrações avaliadas, enquanto o extrato das folhas, na concentração igual ou superior a 3,75 mg.mℓ⁻¹, apresentou eficácia moderada.

Resultados semelhantes foram descritos por Nogueira *et al.* (2012a), ao avaliarem o extrato aquoso das cascas do fruto pequi, na inibição da eclosão nematódeos gastrintestinais de ovinos. Esses autores obtiveram eficácias superiores a 90%, nas concentrações 15,0 e 7,5 mg.mℓ⁻¹. Entretanto, para as menores concentrações (3,75 e 1,88 mg.mℓ⁻¹), as eficácias foram, respectivamente, 49,2 e 4,9%, diferindo da presente pesquisa, que também registrou eficácias superiores a 90% para baixas concentrações. Esse contraste provavelmente decorre das diferentes espécies de nematódeos avaliadas, já que, no estudo citado, esses autores identificaram monoinfecção por *Haemonchus contortus*.

Para os dois extratos avaliados nesta pesquisa, houve aumento da porcentagem de inibição da eclosão, com elevação das concentrações, indicando resposta dose-dependente. As CL₅₀ e CL₉₀ foram, respectivamente, 0,37 e 1,70 mg.mℓ⁻¹, para o extrato aquoso das cascas do fruto (GRAF. 1) e 0,043 e 15,88 mg.mℓ⁻¹, para o extrato das folhas do pequizeiro (GRAF. 2).

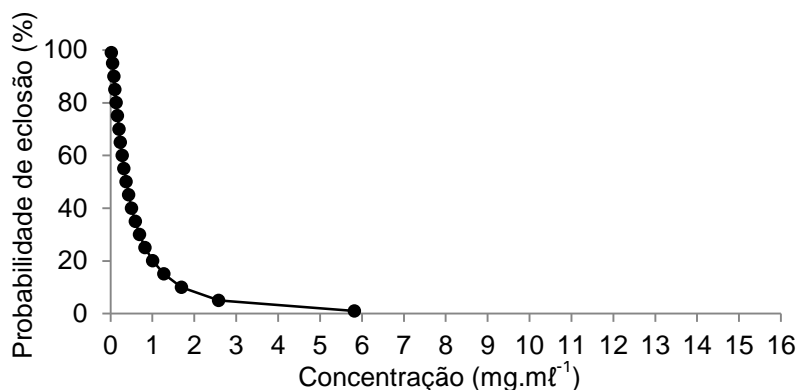


GRÁFICO 1 – Probabilidade de eclosão de larvas de trichostrongylídeos de bovinos, em função da concentração do extrato aquoso das cascas dos frutos de *Caryocar brasiliense*

Fonte: Da autora.

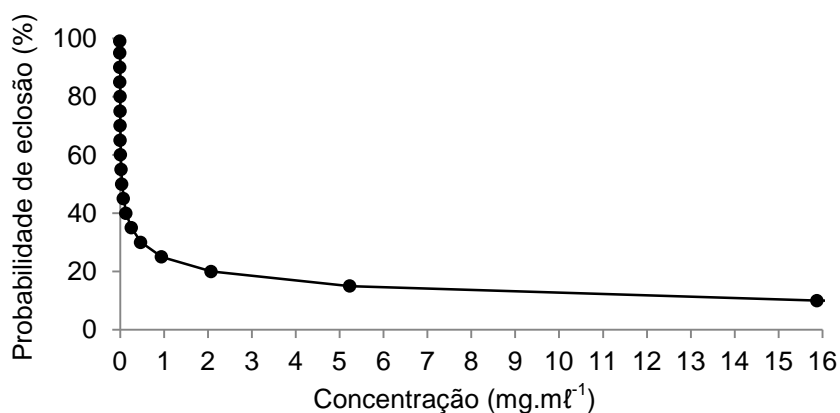


GRÁFICO 2 – Probabilidade de eclosão de larvas de trichostrongylídeos de bovinos, em função da concentração do extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense*

Fonte: Da autora.

Os resultados obtidos para as concentrações letais, com exceção da CL₉₀, para o extrato aquoso das folhas, são inferiores aos de Nogueira *et al.* (2012a), que obtiveram CL₅₀ e CL₉₀ de 3,81 e 7,35 mg.mℓ⁻¹, respectivamente, para o extrato aquoso das cascas do fruto do pequi na inibição da eclodibilidade de nematódeos de ovinos. Em outra pesquisa, Nogueira *et al.* (2012b) verificaram CL₅₀ e CL₉₀ de 0,19 e 0,84 mg.mℓ⁻¹, respectivamente,

para o extrato aquoso de *Musa* sp., na inibição da eclosão de larvas de nematódeos de ovinos. Para o extrato aquoso, de *Musa paradisiaca*, Hussain *et al.* (2011) obtiveram CL_{50} de $2,13 \text{ mg.mL}^{-1}$. Por sua vez, Kamaraj *et al.* (2010) observaram CL_{50} de $2,04 \text{ mg.mL}^{-1}$, para o extrato aquoso de *Melia azedarach* e $1,97 \text{ mg.mL}^{-1}$, para o extrato hidro-alcoólico, na inibição da eclodibilidade de nematódeos de ovinos.

A ação anti-helmíntica das plantas tem sido atribuída aos compostos secundários. Pesquisas identificaram efeito anti-helmíntico em substâncias bioativas, a partir de fontes de taninos condensados (GITHIORI *et al.*, 2006; MINHO *et al.* 2008). Na presente pesquisa, os teores de taninos condensados determinados no extrato aquoso das cascas do fruto do pequizeiro e das folhas foram, respectivamente, 0,27% ($\pm 0,03$) e 0,83% ($\pm 0,05$). Manolaraki *et al.* (2010) reportam ação anti-helmíntica dos frutos de alfarrobeira (*Ceratonia siliqua*) e das folhas de pera selvagem (*Pyrus spinosa*) e de oliveira (*Olea europaea* var. *koroneiki*), cujos teores de taninos condensados, expressos em leucocianidinas, foram 0,42% ($\pm 0,07$), 0,84% ($\pm 0,12$) e 0,08% ($\pm 0,05$), respectivamente e podem ser considerados similares e/ou inferiores aos encontrados nesta pesquisa.

Uma hipótese da ação indireta dos taninos condensados envolve a capacidade de se ligar às proteínas dietéticas, protegendo-as da degradação ruminal, promovendo aumento do fluxo de absorção de proteínas e aminoácidos no intestino delgado, o que favorece a resposta imune contra os nematódeos. Diretamente, podem interagir com as proteínas da cutícula do nematódeo, degradando-as (HOSTE *et al.*, 2006). Estudos recentes mostraram que, em contato com extratos de sanfeno (*Onobrychis viciifolia*), ricos em taninos condensados, larvas infectantes apresentaram alteração da hipoderme, vesículas no citoplasma e degeneração e ou morte das células musculares e intestinais (BRUNET *et al.*, 2011).

Hoste *et al.* (2006) admitem que em nematódeos de ovinos e caprinos, a atividade anti-helmíntica dos taninos condensados das plantas é bem descrita e que os efeitos são variáveis, em função das diferentes espécies de nematódeos gastrintestinais. Em bovinos, Novobilsky *et al.* (2011) avaliaram extratos com taninos condensados de três plantas: *Onobrychis viciifolia*,

Lotus pedunculatus e *L. corniculatus*, na inibição da alimentação larval (AL) e na eliminação da cutícula larval (ECL) de *Cooperia oncophora* e *Ostertagia ostertagi*. Esses autores constataram que os três extratos inibiram, significativamente, a AL e a ECL e concluíram que os taninos presentes nessas plantas atuaram contra esses nematódeos.

Além dos taninos, outros metabólitos secundários também podem apresentar ação anti-helmíntica. Barrau *et al.* (2005) pesquisaram extratos fracionados de *Onobrychis viciifolia*, na inibição da migração de larvas de terceiro estágio de *Haemonchus contortus* e constataram que, além dos taninos, os flavonóis glicosídeos também foram responsáveis por propriedade nematicida.

García *et al.* (2005) constataram que compostos polifenólicos, como flavonoides, cumarinas e fenois simples, presentes em *Molus alba*, apresentaram considerável atividade anti-helmíntica *in vitro* contra larvas infectantes dos gêneros *Trichostrongylus* e *Haemonchus* de bovinos. Ao avaliarem o efeito de frações da biosseparação do extrato etanólico da casca de *Khaya senegalensis*, Ademola *et al.* (2009) constataram que a atividade anti-helmíntica foi sinérgica entre os compostos secundários taninos totais e condensados, saponinas, flavonoides, alcaloides e terpenoides.

Os metabólitos identificados nas folhas do pequizeiro correspondem aos grupos dos taninos condensados, aos taninos hidrolisáveis, aos flavonoides e aos terpenoides (BEZERRA *et al.*, 2002; PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006) e às saponinas (PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006). No extrato aquoso da casca do fruto pequi, foi indicada a presença de taninos totais, de taninos catequéticos, de saponinas, de flavonoides, de catequinas, de esteroides e de xantonas (NOGUEIRA *et al.*, 2012a). No extrato etanólico da casca do fruto, identificaram-se compostos fenólicos, como tanino hidrolisável e ácido fenólico, além de flavonoides (ROESLER *et al.*, 2008).

Assim, é possível que o elevado potencial anti-helmíntico, verificado nesta pesquisa, decorra da associação entre os diversos metabólitos, e não apenas dos taninos condensados. Pois, apesar de apresentar baixos teores de taninos condensados, o extrato aquoso das cascas do fruto apresentou maior eficácia quando comparado ao extrato das folhas.

Os resultados desta pesquisa demonstram que o pequizeiro tem grande potencial para o controle alternativo das verminoses em bovinos. Contudo estudos da toxicidade e da eficácia *in vivo* nesses animais devem preconizar, de forma segura e eficiente, as indicações para a utilização dessa espécie vegetal no controle alternativo das helmintoses dos bovinos.

4 CONCLUSÃO

Os extratos aquosos das cascas do fruto e das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess, apesar de não inibirem o desenvolvimento embrionário, possuem ação inibitória da eclodibilidade de L1 de nematódeos gastrintestinais de bovinos. O extrato aquoso das cascas do fruto apresenta maior eficácia anti-helmíntica *in vitro* quando comparado ao extrato das folhas.

CAPÍTULO 3 – ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA *IN VITRO* DE *Caryocar brasiliense* CAMBESS (CARYOCARACEAE) PARA *Haemonchus contortus*

RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficácia *in vitro* dos pós das cascas dos frutos e das folhas e do extrato aquoso das folhas (EAF) de *Caryocar brasiliense*, na inibição do desenvolvimento larval (IDL) de *Haemonchus contortus*. Avaliou-se, também, a eficácia do EAF na inibição da eclodibilidade (IE) desse nematódeo. Para IDL, foi realizado o método adaptado de coprocultura quantitativa com três e sete dias de incubação e para cinco concentrações dos pós brutos das cascas do fruto e das folhas e para seis concentrações do EAF. Solução de ivermectina ($16 \mu\text{g.m}\ell^{-1}$) e água purificada estéril consistiram, respectivamente, dos controles positivo e negativo. Para avaliação da IE, foram comparadas quatro concentrações do EAF com a solução de fosfato de levamisol ($15 \text{mg.m}\ell^{-1}$) e água purificada estéril, que consistiram dos controles positivo e negativo, respectivamente. As concentrações iguais ou superiores a $66,67 \text{mg.g}^{-1}$ de coprocultura (COP) do pó das cascas e das folhas, após sete dias de incubação, apresentaram eficácias superiores a 90% na IDL, não diferindo estatisticamente do controle positivo ($p < 0,05$). As eficácias de concentrações iguais ou superiores a 50mg.g^{-1} de COP do EAF foram superiores a 90% após sete dias. As concentrações letais para inibir 90% (CL_{90}) da população de larvas foram: 53,60; 64,89 e 38,60 mg.g^{-1} de COP para o pó das cascas do fruto, pó das folhas e EAF, respectivamente. No teste de IE, a maior eficácia verificada foi 89,31% para a concentração de $15 \text{mg.m}\ell^{-1}$. Conclui-se que as cascas do fruto e as folhas de *C. brasiliense* apresentam potencial para serem utilizadas no controle alternativo de *Haemonchus contortus*, principal nematódeo de ovinos.

Palavras-chave: Desenvolvimento larval. Eclodibilidade. Nematódeos gastrintestinais. Pequizeiro. Verminose ovina.

CHAPTER 3 – *IN VITRO* ANTHELMINTIC ACTIVITY OF *Caryocar brasiliense* CAMBESS (CARYOCARACEAE) FOR *Haemonchus contortus*

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effectiveness in vitro efficacy of the powders of fruit shells and aqueous extract of the leaves (EAF) of *Caryocar brasiliense*, inhibition of larval development (IDL) of *Haemonchus contortus*. It was evaluated also effective in inhibiting the EAF hatchability (IE) of this nematode. For IDL was performed quantitative fecal culture method adapted from three and seven days of incubation and five concentrations of powders of crude bark and leaves of fruit and six concentrations of the EAF. Solution of ivermectin ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and sterile purified water consisted, respectively, of positive and negative controls. For evaluation of IE, four concentrations were compared with the EAF phosphate solution levamisole (15mg.mL^{-1}) and sterile purified water, consisting of negative and positive controls, respectively. The concentrations greater than or equal to 66.67mg.g^{-1} of coproculture (COP) of the bark powder and sheet, after seven days of incubation, showed efficiencies above 90% in IDL, not statistically different from the positive control ($p < 0, 05$). The efficacies concentrations greater than or equal to 50mg.g^{-1} of the EAF COP were greater than 90% after seven days. The lethal concentration to inhibit 90% (LC_{90}) in larvae population were 53.60, 64.89 and 38.60mg.g^{-1} , COP for the powder of the shells of the fruit, leaves and EAF dust, respectively. In the test IE, the greater effectiveness was found 89.31% for the concentration of 15mg.mL^{-1} . It is concluded that the shells of the fruit and leaves of *C. brasiliense* have potential for use in alternative control of *Haemonchus contortus*, main nematode of sheep.

Keywords: Larval development. Hatchability. Gastrointestinal nematode. *Pequizeiro*. Sheep worms.

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência das helmintoses gastrintestinais é uma das principais limitações para o desenvolvimento da ovinocultura em diferentes regiões do mundo. Por infectar animais de qualquer faixa etária ou sexo, os nematódeos gastrintestinais promovem elevadas perdas econômicas, em decorrência do menor crescimento, do ganho de peso, da queda na produção de leite e da baixa fertilidade. Em casos de elevadas infecções, altas taxas de mortalidade são verificadas (BIZIMENYERA *et al.*, 2006).

O *Haemonchus contortus* é o nematódeo mais patogênico para pequenos ruminantes. Os adultos parasitam o abomaso e, por serem hematófagos, podem remover até 10% do sangue do hospedeiro por dia (AMARANTE; SALES, 2007; COLGRAVE *et al.*, 2008).

A utilização dos anti-helmínticos com distintas constituições químicas, sem o conhecimento da epidemiologia dessas helmintoses, promoveu a seleção de populações resistentes, o que evidencia que essa estratégia de controle tem se tornado ineficaz (AMARANTE; AMARANTE, 2003).

Nos últimos 20 anos, tem-se observado resistência às principais classes de anti-helmínticos nas criações de ovinos de diferentes continentes (TAYLOR *et al.*, 2009). Dessa forma, é fundamental a busca de alternativas para superar a resistência anti-helmíntica e manter o controle efetivo desses nematódeos nos rebanhos ovinos (MOLENTO; PRICHARD, 2001).

Neste contexto, objetivou-se determinar a eficácia *in vitro* das cascas e folhas do pequiheiro, na inibição do desenvolvimento larval de *H. contortus* e verificar os efeitos do extrato aquoso das folhas na inibição da eclodibilidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado na cidade de Montes Claros, MG.

2.1 Seleção das amostras vegetais

As cascas do fruto (epicarpo e mesocarpo externo) e as folhas do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess) foram coletadas em regiões de Cerrado do norte de Minas Gerais. As amostras foram identificadas e armazenadas em exsicata nº 338, no Herbário Montes Claros, localizado na Universidade Estadual de Montes Claros.

Após a coleta, as amostras vegetais foram selecionadas, eliminando-se materiais com lesões ou deteriorados. Posteriormente, foram lavadas e sanitizadas, com solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 2% (v/v), por 15 minutos (SILVA; GALLO, 2003).

2.2 Obtenção do pó bruto e do extrato aquoso

As cascas picadas e folhas selecionadas foram desidratadas em estufa com circulação de ar forçada a 40°C ±5, por aproximadamente 72 horas. Posteriormente, para a obtenção dos pós, foram trituradas em moinho de facas, identificadas e armazenadas em freezer a -4°C, consistido dos pós brutos a serem avaliados.

O extrato aquoso a quente foi obtido por decocção, de acordo com o método adaptado de Krychak-Furtado (2006) e Nery *et al.* (2010). O pó das folhas foi submerso em água purificada estéril, homogeneizado e incubado em banho-maria a 60°C durante 60 minutos. Em seguida, filtrou-se a quente em funil com gaze e algodão, colocou-se o filtrado em placas de *petri* para desidratação em estufa com circulação forçada de ar a 40°C até a obtenção de peso constante. Subamostras desse extrato e dos pós foram submetidas à determinação de matéria seca, a 105°C, para cálculo das concentrações a serem testadas (CUNNIF, 1995).

2.3 Coleta de fezes e exames parasitológicos

Para realização dos testes *in vitro*, foram coletadas amostras de fezes diretamente da ampola retal de três borregos Santa Inês, com aproximadamente cinco meses de idade, com monoinfecção por *Haemonchus contortus*. As amostras fecais foram imediatamente

encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia Animal. A quantificação de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada pela metodologia descrita por Ueno e Gonçalves (1998), onde se acrescentaram 58 mL de solução hipersaturada de cloreto de sódio a dois gramas de fezes para flutuação dos ovos, que foram contados em câmara de Mc-Master, com o auxílio de microscópio óptico na objetiva de 10x. Posteriormente, novas coletas foram realizadas nos animais com contaminação superior a 800 OPG, para a realização dos testes anti-helmínticos.

2.4 Inibição do desenvolvimento larval

Para avaliar a eficácia dos pós brutos das cascas do fruto e das folhas e do extrato aquoso das folhas, na inibição do desenvolvimento larval, utilizou-se a metodologia adaptada de coprocultura quantitativa (BORGES, 2003; NERY *et al.*, 2010). Distribuíram-se 2 g de fezes homogeneizadas em copos descartáveis livres de contaminação parasitária. Como controle positivo, nos três experimentos, foram utilizados 2 mL de solução contendo o antiparasitário ivermectina (Ranger LA®, Vallée, Minas Gerais, Brasil), na concentração de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 2 mL de água purificada estéril como controle negativo.

Experimento I e II: foi utilizado o pó das cascas do fruto (I) e das folhas do pequi (II), nas concentrações: 166,67; 133,33; 100,00; 66,67; e 33,33 mg.g^{-1} de coprocultura (COP), com cinco e sete repetições, respectivamente. Em cada coprocultura, foram acrescentados 2 mL de água purificada estéril. Ambos os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos arranjos em esquema fatorial 2x7. Os fatores consistiram de período (três e sete dias de incubação) e de extratos (166,67; 133,33; 100,00; 66,67; 33,33 mg.g^{-1} de COP; controle negativo; controle positivo).

Experimento III: para avaliação da eficácia do extrato aquoso das folhas do pequi, o extrato foi diluído em água purificada estéril e utilizaram-se 2 mL para cada tratamento, obtendo-se as concentrações 66,67; 50,00; 33,33; 25,00; 16,67 e 8,33 mg.g^{-1} de COP. O experimento foi realizado

com sete repetições, em delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos arranjados em esquema fatorial 2x8. Os fatores consistiram de período (três e sete dias de incubação) e de extratos (66,67; 50; 33,33; 25; 16,67 e 8,33 mg.g⁻¹ de COP; controle negativo; controle positivo).

Nos três experimentos, após a adição dos tratamentos, as coproculturas foram mantidas à temperatura ambiente, por duas horas. Posteriormente, em cada amostra dos experimentos I e II, foi adicionada vermiculita, na quantidade para completar 2 g, somando-se ao pó da planta. Para o experimento III, foram adicionados 2 g de vermiculita. Após a homogeneização, incubaram-se os cultivos em estufa BOD à 28°C durante três e sete dias.

Após esses períodos de incubação, realizou-se a leitura das coprocultura, adicionando-se água destilada até a borda de cada copo. Os cultivos foram cobertos com a tampa de uma placa de *petri*, virados bruscamente e aproximadamente 20 ml de água purificada foram adicionados à placa, para as larvas migrarem para fora dos recipientes. Após duas 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.

As larvas foram visualizadas e quantificadas em microscópio óptico na objetiva de 10x, utilizando-se uma câmara de *Sedgewick*. O número total de larvas observado foi dividido por dois e o resultado, expresso em larvas desenvolvidas por grama de fezes (LDPG).

Para larvas infectantes provenientes das coproculturas de sete dias, foram confeccionadas lâminas coradas com lugol e o gênero *Haemonchus*, identificado, utilizando-se a chave de Keith (1953), após visualização em microscopia óptica com objetiva de 40x.

2.5 Inibição da eclodibilidade

Os ovos foram recuperados pela metodologia adaptada de Bizimenyera *et al.* (2006). As fezes coletadas foram maceradas, homogeneizadas, lavadas e filtradas em peneiras com tamis contendo poros de 1000, 106, 53 e 20 µm. Posteriormente, os ovos coletados da última peneira foram distribuídos em tubos de 14 ml e centrifugados a 2000 rpm por

seis minutos. O sobrenadante foi descartado e completaram-se os tubos com solução salina hipersaturada para a ressuspensão do sedimento, centrifugou-se novamente e o sobrenadante foi lavado na peneira de 20 μm , com água purificada até a retirada total da solução salina. A solução de ovos e água purificada foi armazenada em Béquer e padronizou-se a concentração aproximada de 100 ovos em 100 μl .

Para avaliar a eficácia do extrato aquoso das folhas do pequizeiro, foi utilizada a metodologia *in vitro*, para a detecção de resistência anti-helmíntica adaptada de Coles *et al.* (1992). O extrato foi diluído em água purificada estéril, para a obtenção das concentrações a serem testadas.

Em placas de microdiluição contendo 150 μl de solução, com aproximadamente 200 ovos, foram adicionados 150 μl das diluições do extrato aquoso das folhas, obtendo-se as concentrações finais: 15,00; 7,50; 3,75 e 1,88 mg de m^{-1} . Como controle positivo, foram adicionados 150 μl de fosfato de levamisol (Protall VP®, Vallée, Minas Gerais, Brasil) na concentração de 15 mg $\cdot\text{m}^{-1}$. Para o controle negativo, adicionaram-se 150 μl de água purificada. As placas foram homogeneizadas, cobertas com filme plástico e incubadas em estufa BOD a 28°C por 72h. Após esse período, foram adicionados 100 μl de formaldeído a 10% e as placas foram armazenadas sob refrigeração (4°C) para posterior contagem.

Para cada repetição, foram contados, em microscópio óptico na objetiva de 10x, ovos blastomerados, ovos larvados e larvas de 1º estágio (L1). O experimento foi realizado com oito repetições por tratamento, em um delineamento inteiramente casualizado.

2.6 Determinação do teor total de proantocianidinas

Quantificou-se o teor total de taninos condensados (proantocianidinas) nos extratos aquosos da casca do fruto e das folhas de *Caryocar brasiliense*, conforme metodologia descrita por Hiermann *et al.* (1986), onde se utilizou solvólise catalisada por ácido com *n*-BuOH/HCl 37% (95:5). A leitura da absorbância das soluções foi realizada a 540 nm, sendo os valores expressos como cloreto de cianidina. Para os resultados, obteve-se a média de três determinações, seguida do desvio-padrão.

2.7 Análises estatísticas

Para a determinação da porcentagem de eficácia na inibição do desenvolvimento larval, empregou-se a fórmula abaixo, adaptada de Borges (2003):

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

A eficácia média de inibição da eclodibilidade foi calculada pela fórmula adaptada de Coles *et al.* (1992):

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

Os dados referentes aos valores de LDPG foram previamente transformados em $\text{Log}(x + 10)$. 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 inicial em cada repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste Duncan até 5% de probabilidade. Com a análise de regressão *probit* do pacote estatístico SAEG® 9.1 (2007), foram determinadas as concentrações para inibir 50% (CL_{50}) e 90% (CL_{90}) do desenvolvimento larval, após sete dias de incubação, e da eclodibilidade.

3 RESULTADOS

3.1 Inibição do desenvolvimento larval

O pó bruto da casca do fruto do pequi apresentou elevadas eficácias para a inibição do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* para ambos os períodos avaliados. Após três dias, os metabólitos presentes poderiam ter inibido a eclosão e/ou degradado as L1. Nos dois períodos, as médias de larvas para as concentrações 166,67 e 133,33 e 100,00 mg.g^{-1} de coprocultura (COP) foram estatisticamente semelhantes àsquelas observadas para o controle com o anti-helmíntico comercial ($p < 0,05$). Somente para a concentração 33,37 mg.g^{-1} de COP, o LDGP para três dias de incubação foi significativamente inferior, quando comparado ao período de sete dias (TAB. 1).

TABELA 1

Média de larvas de *Haemonchus contortus* por grama de fezes em coproculturas tratadas com pó bruto das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense*, ivermectina, água purificada estéril e suas respectivas eficácias na inibição do desenvolvimento larval após três e sete dias

Concentração (mg.g ⁻¹ de coprocultura)	Três dias		Sete dias	
	Média LDPG ± DP	Eficácia (%)	Média LDGP ± DP	Eficácia (%)
166,67	0,0 ± 0,0 A a	100,0	0,0 ± 0,0 A a	100,0
133,37	0,0 ± 0,0 A a	100,0	0,0 ± 0,0 A a	100,0
100,00	1,0 ± 2,2 A a	99,5	10,0 ± 9,4 A b	97,4
66,67	8,0 ± 2,7 A ab	95,9	14,0 ± 19,5 A b	96,3
33,37	22,8 ± 24,3 A b	88,2	111,0 ± 49,2 B c	70,7
CN	193,0 ± 137,4 A c	..	379,0 ± 133,2 A d	..
CP	0,0 ± 0,0 A a	100,0	2,0 ± 2,7 A ab	99,5

Notas: Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Coeficiente de variação = 13,08%. LDPG: larvas desenvolvidas por grama de fezes; DP: desvio padrão; CN: controle negativo – água purificada estéril; CP: controle positivo – solução de ivermectina (16 $\mu\text{g.m}^{-1}$).

Fonte: Da autora.

O pó das folhas do pequi também apresentou relevante ação anti-helmíntica, na inibição do desenvolvimento larval. Contudo percebe-se que as três maiores concentrações apresentaram eficácias superiores para o período de sete dias, inferindo-se que os metabólitos presentes nas folhas são mais eficientes na inibição do desenvolvimento larval (TAB. 2).

TABELA 2

Média de larvas de *Haemonchus contortus* por grama de fezes em coproculturas tratadas com pó bruto das folhas de *Caryocar brasiliense*, ivermectina, água purificada estéril e suas respectivas eficácias na inibição do desenvolvimento larval após três e sete dias

Concentração (mg.g ⁻¹ de coprocultura)	Três dias		Sete dias	
	Média LDGP ± DP	Eficácia (%)	Média LDGP ± DP	Eficácia (%)
166,67	3,9 ± 4,2 B a	92,1	0,0 ± 0,0 A a	100,0
133,37	6,3 ± 3,8 B a	87,4	0,0 ± 0,0 A a	100,0
100,00	24,7 ± 14,5 B b	51,2	2,4 ± 2,9 A a	99,7
66,67	38,3 ± 34,2 A b	23,2	69,9 ± 49,5 A b	91,9
33,37	96,3 ± 40,5 A c	0,0	841,5 ± 208,9 B c	3,0
CN	49,9 ± 40,9 A b	..	867,4 ± 171,1 B c	..
CP	0,14 ± 0,2 A a	99,7	0,0 ± 0,0 A a	100,0

Notas: Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Coeficiente de variação = 10,84%. LDGP: larvas desenvolvidas por grama de fezes; DP: desvio padrão; CN: controle negativo – água purificada estéril; CP: controle positivo – solução de ivermectina (16 $\mu\text{g.m}^{-1}$).

Fonte: Da autora.

O extrato aquoso das folhas do pequizeiro apresentou maiores eficácias no período de sete dias, o que sugere melhor inibição do desenvolvimento larval do que na eclosão dos ovos ou degradação das L1. As eficácias nas concentrações 66,67 e 50,00mg.g⁻¹ de coprocultura foram superiores a 90% e não se diferiram do controle positivo no período de sete dias, quanto ao número de LDGP (TAB. 3).

TABELA 3

Média de larvas de *Haemonchus contortus* por grama de fezes em coproculturas tratadas com extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense*, ivermectina, água purificada estéril e suas respectivas eficácias na inibição do desenvolvimento larval após três e sete dias

Concentração (mg.g ⁻¹ de coprocultura)	Três dias		Sete dias	
	Média LDPG ± DP	Eficácia (%)	Média LDGP ± DP	Eficácia (%)
66,67	8,3 ± 5,8 A a	75,5	25,9 ± 19,2 B b	97,2
50,00	7,9 ± 8,9 A a	76,7	44,0 ± 34,6 B b	95,2
33,33	34,6 ± 18,2 A bc	0,0	151,3 ± 36,6 B c	83,6
25,00	52,3 ± 40,4 A c	0,0	192,0 ± 77,1 B c	79,2
16,67	25,9 ± 31,4 A ab	23,1	568,1 ± 124,9 B d	38,3
8,33	33,7 ± 14,6 A bc	0,9	924,0 ± 147,6 B e	0,0
CN	33,4 ± 28,3 A bc	..	920,9 ± 182,2 B e	..
CP	11,0 ± 13,1 B a	67,1	3,1 ± 4,3 A a	99,7

Notas: Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Coeficiente de variação = 10,48%. LDPG: larvas desenvolvidas por grama de fezes; DP: desvio padrão; CN: controle negativo – água purificada estéril; CP: controle positivo – solução de ivermectina (16 $\mu\text{g.m}\ell^{-1}$).

Fonte: Da autora.

As concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀, em mg.g⁻¹ de COP após sete dias de incubação foram, respectivamente: 23,30 e 53,16 para o pó bruto da casca dos frutos (GRAF. 1); 46,04 e 64,80, para o pó bruto das folhas (GRAF. 2) e 18,79 e 38,55, para o extrato aquoso das folhas (GRAF. 3).

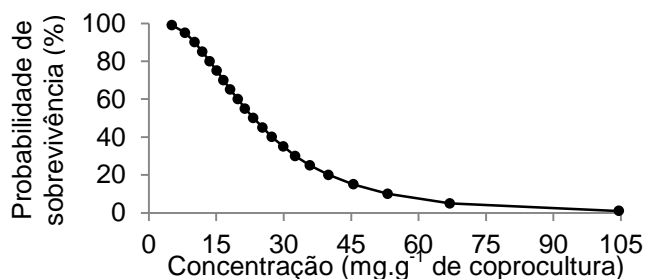


GRÁFICO 1 – Probabilidade de sobrevivência de larvas de *Haemonchus contortus* de ovinos, em função da concentração do pó bruto das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense*

Fonte: Da autora.

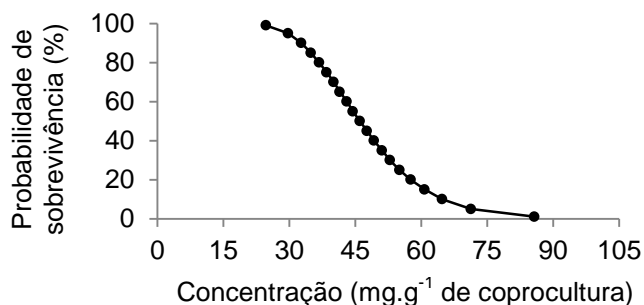


GRÁFICO 2 – Probabilidade de sobrevivência de larvas de *Haemonchus contortus* de ovinos, em função da concentração do pó bruto das folhas de *Caryocar brasiliense*

Fonte: Da autora.

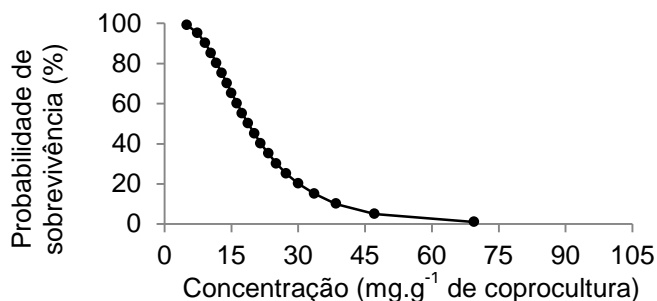


GRÁFICO 3 – Probabilidade de sobrevivência de larvas de *Haemonchus contortus* de ovinos, em função da concentração do extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense*

Fonte: Da autora.

3.2 Inibição da eclodibilidade

Observou-se resposta dose-dependente para o extrato aquoso das folhas do pequiheiro, na inibição da eclodibilidade de larvas, aumentando a eficácia, em função da concentração. Todas as concentrações testadas se diferiram estatisticamente do controle negativo, quanto à média de L1 (TAB. 4).

TABELA 4

Eficácias do extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense* e fosfato de levamisol, na inibição da eclodibilidade de *Haemonchus contortus*

Concentração (mg.mℓ ⁻¹)	Média OB ± DP	Média OL ± DP	Média L1 ± DP	Eficácia (%)
15,00	0,0 ± 0,0 b	173,7 ± 40,1 a	24,7 ± 11,2 b	89,31
7,50	1,0 ± 1,1 b	154,6 ± 23,5 b	40,9 ± 16,6 c	82,33
3,75	2,0 ± 2,0 b	63,4 ± 25,9 c	108,3 ± 50,4 d	53,19
1,88	4,0 ± 3,1 b	20,5 ± 13,0 e	192,5 ± 43,9 e	16,76
CN	2,0 ± 1,3 b	1,6 ± 3,5 f	231,3 ± 92,6 f	..
CP	169,0 ± 23,5 a	59,6 ± 16,9 d	0,0 ± 0,0 a	100,00
CV (%)	21,46	17,48	13,56	

Notas: Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem-se estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). DP: desvio padrão; CN: controle negativo – água purificada; CP: controle positivo – fosfato de levamisol (15mg.mℓ⁻¹); CV: coeficiente de variação; OB: ovos blastomerados; OL: ovos larvados; L1: larvas de primeiro estágio.

Fonte: Da autora.

A média de ovos blastomerados (FIG. 1A) foi estatisticamente semelhante ao controle negativo, demonstrando que o extrato não inibiu o desenvolvimento embrionário. Entretanto atuou de forma moderadamente eficaz na inibição da eclosão das larvas, já que houve elevadas médias de ovos larvados (FIG. 1B).

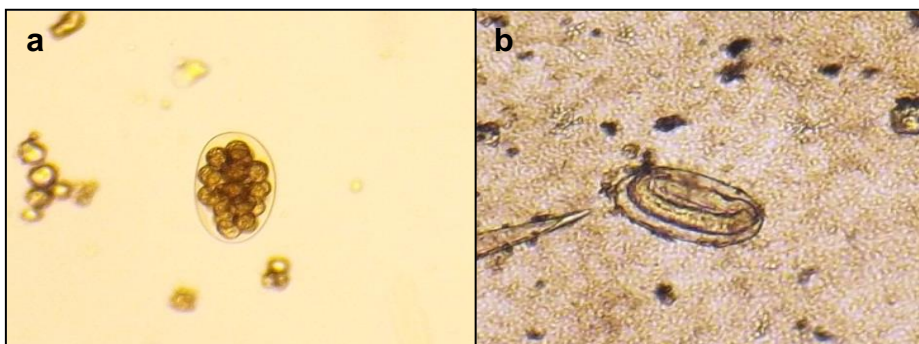


FIGURA 1 – Ovos de *Haemonchus contortus* provenientes de ovinos (Objetiva de 10X)

a) Ovo blastomerado

b) Ovo larvado

Fonte: Da autora.

As larvas L1 eclodidas apresentaram-se degradadas para todas as concentrações avaliadas do extrato aquoso das folhas do pequiheiro, como verificado na FIG. 2.



FIGURA 2 – Larvas de primeiro estágio (L1) de *Haemonchus contortus* provenientes de ovinos (Objetiva de 10X)

a) L1 degradada pela ação do extrato aquoso das folhas do pequiheiro

b) L1 sem degradação (grupo controle negativo)

Fonte: Da autora.

Para as concentrações 3,75 e 1,88 mg.mℓ⁻¹ além da degradação, observou-se larvas com deformação estrutural (FIG. 3). Essas observações sugerem que o extrato aquoso das folhas possivelmente atue com melhor eficácia nas larvas do que nos ovos do nematódeo.

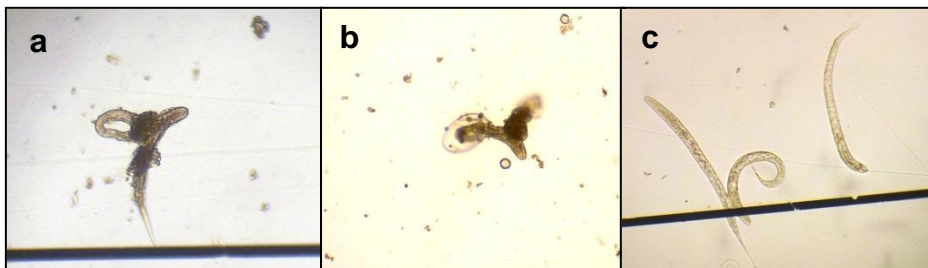


FIGURA 3 – Larvas de primeiro estágio (L1) de *Haemonchus contortus* provenientes de ovinos (Objetiva de 10X)

- a) e b) L1 deformadas pela ação do extrato aquoso das folhas do pequizeiro
- c) L1 sem deformação (grupo controle negativo)

Fonte: Da autora.

Na inibição da eclodibilidade as CL₅₀ e CL₉₀ do extrato aquoso das folhas do pequizeiro, foram 3,78 e 12,31 mg.mℓ⁻¹, respectivamente (GRAF. 4).

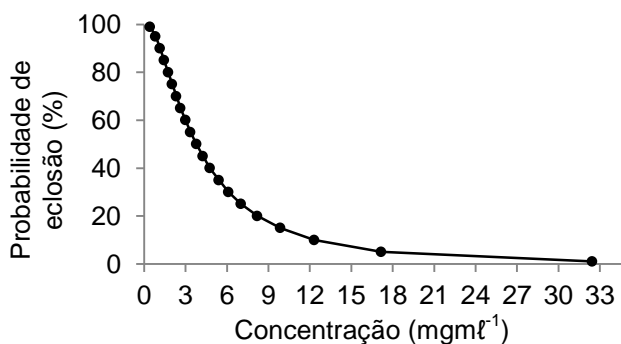


GRÁFICO 4 – Probabilidade de eclosão de larvas de *Haemonchus contortus* de ovinos, em função da concentração do extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense*

Fonte: Da autora.

3.3 Determinação do teor de proantocianidinas

O teor de taninos condensados, expresso como cloreto de cianidina, do extrato aquoso das cascas do fruto do pequizeiro foi 0,27% \pm 0,03, o que corresponde a 2,7 mg.g⁻¹ de extrato. No extrato aquoso das folhas, foi de 0,83% \pm 0,05, correspondendo a 8,3 mg.g⁻¹ de extrato.

4 DISCUSSÃO

De acordo com a classificação proposta pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, um produto é efetivo ao promover eficácia anti-helmíntica superior a 90%; moderadamente efetivo, entre 80 a 90%; pouco efetivo, entre 60 e 80% e não efetivo, em níveis abaixo de 60% (POWERS *et al.*, 1982). Assim, verifica-se que as quatro maiores concentrações testadas dos pós das cascas do fruto e das folhas do pequizeiro apresentaram potencial elevado para a inibição do desenvolvimento larval. Quanto ao extrato aquoso das folhas, as duas maiores concentrações também apresentaram eficácia superior a 90%.

Nogueira *et al.* (2012a) também constataram o potencial anti-helmíntico de *Caryocar brasiliense*. Esses autores reportaram eficácias superiores a 90%, para o extrato aquoso das cascas do fruto, nas concentrações 7,5 e 15 mg.mℓ⁻¹, na inibição da eclodibilidade de *Haemonchus contortus*, sendo a CL₉₀ de 7,35mg.mℓ⁻¹. Comparando a CL₉₀ verificada por esses autores com aquela observada nesta pesquisa, pode-se constatar que o extrato aquoso das cascas do fruto do pequizeiro apresentou melhor eficácia na inibição da eclodibilidade e no desenvolvimento larval do que o extrato aquoso das folhas.

Adamu *et al.* (2010) também encontraram resultados satisfatórios para o extrato aquoso das folhas de acanto (*Acanthus montanus*). Esses autores obtiveram médias de eficácias de 90,2 e 92,5%, para as concentrações de 100 e 200 mg.mℓ⁻¹, respectivamente, na inibição do desenvolvimento larval após quatro dias de avaliação, onde as larvas foram colocadas diretamente nos extratos. Para a inibição da eclodibilidade, as médias foram superiores a 91%, a partir da concentração de 25 mg.mℓ⁻¹.

Silveira *et al.* (2012) avaliaram o extrato aquoso de sisal (*Agave sisalana*) e verificaram eficácias superiores a 90% para concentrações acima de 15 mg.mℓ⁻¹, na inibição da eclodibilidade de *Haemonchus contortus*. As CL₅₀ e CL₉₅, foram, respectivamente, 6,90 e 24,79 mg.mℓ⁻¹. Na inibição do desenvolvimento larval, onde as larvas foram incubadas com o extrato, a eficácia de 91,8% foi detectada para a concentração de 0,06 mg.mℓ⁻¹.

Na literatura científica, são relatadas menores CL₉₀ para a inibição do desenvolvimento larval, comparadas àquelas observadas na presente pesquisa. Provavelmente, esse fato decorre da metodologia utilizada, sendo que os relatos anteriormente descritos testaram os extratos em contato direto com as larvas. Nesta pesquisa, a coprocultura quantitativa simulou o ambiente natural das larvas, que se desenvolvem no bolo fecal dos hospedeiros (NERY *et al.*, 2010).

Nas folhas do pequizeiro, foram identificados compostos secundários, como taninos condensados, taninos hidrolisáveis, flavonoides, terpenoides (BEZERRA *et al.*, 2002; PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006) e saponinas (PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006). No extrato aquoso da casca do fruto verificou-se presença de taninos totais e catequéticos, de saponinas, de flavonoides, de catequinas, de esteroides e de xantonas (NOGUEIRA *et al.*, 2012a).

Estudos têm reportado que os metabólitos secundários das plantas apresentam efeitos em ovos, larvas ou adultos de nematódeos gastrintestinais. Pesquisas recentes evidenciam a atividade anti-helmíntica de taninos (GITHIORI *et al.*, 2006; HOSTE *et al.*, 2006; KETZIS *et al.*, 2006; MINHO *et al.*, 2008; NOVOBILSKY *et al.*, 2011).

Os taninos condensados apresentaram eficácia sobre *Trichostrongylus colubriformes* e *Haemonchus contortus*, ao serem administrados por via oral em ovinos (BUTTER *et al.*, 2000; MAX *et al.*, 2005). Ao avaliarem os efeitos do extrato de *Onobrychis viciifolia*, planta rica em taninos sobre os nematódeos do abomaso de pequenos ruminantes, Brunet *et al.* (2008) constataram que o extrato reduziu, significativamente, a capacidade de penetração dos nematódeos *Haemonchus contortus* e *Teladorsagia circumcincta*, na mucosa digestiva e, ao adicionarem polivinilpolipirrolidona, um inibidor de taninos, as alterações nos nematódeos foram minimizadas.

A ação indireta dos taninos condensados envolve a capacidade de se ligar às proteínas dietéticas, protegendo-as da degradação ruminal, promovendo aumento do fluxo de absorção de aminoácidos no intestino delgado, o que favorece a resposta imune contra os nematódeos. Diretamente, podem interagir com as proteínas da cutícula do nematódeo, degradando-os (HOSTE *et al.*, 2006). Estudos recentes mostraram que, em contato com extratos de sanfeno (*Onobrychis viciifolia*), ricos em taninos condensados, larvas infectantes apresentaram alteração da hipoderme, vesículas no citoplasma e degeneração e ou morte das células musculares e intestinais (BRUNET *et al.*, 2011).

Os teores de taninos condensados verificados nesta pesquisa foram inferiores aos de outras plantas com potencial anti-helmíntico. Marie-Magdeleine *et al.* (2010) verificaram, para o extrato aquoso das folhas de mandioca (*Manihot esculenta*), 14,1% \pm 1,0 e 25,0% \pm 0,8, com os padrões com quebracho, comumente utilizado e com a própria mandioca, respectivamente. Esses autores afirmaram que a utilização de dois padrões diferentes mostrou limitação do método com o padrão quebracho, que subestimou o conteúdo de taninos condensados, o que ocorre em função das diversas possibilidades estruturais desse metabólito entre diferentes espécies vegetais. Novoblský *et al.* (2011) verificaram, para os extratos de *Onobrychis viciifolia*, *Lotus pedunculatus* e *Lotus corniculatus*, 12,5; 19,4 e 9,4% de taninos condensados, respectivamente.

Além dos taninos, estudos diversos têm comprovado a ação anti-helmíntica de outros compostos secundários que também estão presentes nos extratos da casca do fruto e das folhas do pequiheiro como as saponinas (ADEMOLA; ELOFF, 2010; EGUALE *et al.*, 2007) e flavonoides (BARRAU *et al.*, 2005). Como a composição fitoquímica das cascas do fruto e das folhas do pequiheiro se assemelha, é possível que as diferenças, quanto ao potencial anti-helmíntico decorram da proporção dos metabólitos em cada parte da planta.

Athanasiadou *et al.* (2007) admitem que a eficácia dos extratos vegetais pode variar com a biodisponibilidade dos compostos nos diferentes compartimentos do trato gastrointestinal do animal parasitado e também com

a especificidade do parasita. Isso reflete em resultados divergentes entre testes *in vitro* e *in vivo*. Assim, após a comprovação de ação anti-helmíntica *in vitro* das plantas, é necessária a avaliação da eficácia *in vivo*, para indicar a melhor forma de utilização no controle das verminoses, além de verificar a existência de efeitos prejudiciais com a realização de testes de toxicidade.

5 CONCLUSÃO

Os pós brutos das cascas do fruto e das folhas do pequiheiro apresentam eficácias elevadas, na inibição do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* de ovinos, em concentrações iguais ou superiores a 66,67 mg/g de coprocultura. O extrato aquoso das folhas apresenta eficácia elevada, na inibição do desenvolvimento larval e moderada, na inibição da eclodibilidade de ovos de *H. contortus*. Dessa forma, cascas do fruto e folhas de *C. brasiliense* apresentam potencial para o controle alternativo da haemonchose ovina.

CAPÍTULO 4 – TOXICIDADE AGUDA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Caryocar brasiliense* CAMBESS (CARYOCARACEAE) EM CAMUNDONGOS

RESUMO

Caryocar brasiliense Cambess (Caryocaraceae) é nativo do Cerrado e importante fonte de alimento e renda para a população desse bioma, além de possuir potencial medicinal. Entretanto os metabólitos ativos podem possuir ação tóxica. Assim, objetivou-se avaliar a toxicidade aguda dos extratos aquosos das cascas do fruto e das folhas do pequi em camundongos de ambos os sexos, por via intraperitoneal. Os extratos aquosos foram obtidos a quente, pelo método adaptado de decocção. Os extratos foram diluídos em água para injetáveis e filtrados em membrana milipore. As diluições 500,0; 250,0; 125,0 e 62,5 mg.kg⁻¹ de peso corporal foram utilizadas para o extrato das cascas do fruto e para o extrato das folhas 300,0; 150,0; 75,0; 37,5 e 18,75 mg.kg⁻¹ de peso corporal. Utilizaram-se quatro fêmeas e quatro machos por grupo, para o experimento de toxicidade das cascas do fruto e seis fêmeas e seis machos por grupo, para as folhas do pequi. Administrou-se água para injetáveis nos grupos controles de ambos experimentos. Os sinais clínicos e óbitos foram registrados até 14 dias após a administração. As DL₁₀ e DL₅₀ foram estimadas com análise de regressão *probit* e corresponderam, respectivamente, a 89,6 e 149,8 mg.kg⁻¹ de peso corporal, para o extrato das cascas do fruto. Para o extrato das folhas, as DL₁₀ e DL₅₀ foram 33,35 e 67,01 mg.kg⁻¹ de peso corporal, respectivamente. Conclui-se que os extratos aquosos avaliados são classificados como muito tóxicos quando administrados por via intraperitoneal em camundongos de ambos os sexos e que o extrato das folhas apresenta doses letais menores.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*. Mortalidade. *Mus musculus*. Pequi.
Via intraperitoneal.

CHAPTER 4 - ACUTE TOXICITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF *Caryocar brasiliense* CAMBESS (CARYOCARACEAE) IN MICE

ABSTRACT

Caryocar brasiliense Cambess (Caryocaraceae) is native from *Cerrado* and important source of food and income for the population of this biome, besides having medicinal potential. However, the active metabolites may have toxic effects. Thus, it was objectified to assess the acute toxicity of aqueous extracts of fruit peels and leaves *pequizeiro* in mice of both genders, by intraperitoneally route. The aqueous extracts were obtained by the hot, by the method adapted of decoction. The extracts were diluted in water for injection and filtered through Millipore membrane. Dilutions 500.0, 250.0, 125.0 and 62.5 mg.kg⁻¹ of body weight were used to extract from the bark of the fruit and the leaves extract 300.0, 150.0, 75, 0, 37.5 and 18.75 mg.kg⁻¹ of body weight. It was used four females and four males per group, for the experiment of toxicity of the fruit peels and six males and six females per group, for leaves *pequizeiro*. It was administered in water for injection control groups of both experiments. The clinical signs and deaths were recorded up to 14 days after administration. The LD₁₀ and LD₅₀ were estimated with analysis of probit regression and corresponded, respectively, to 89.6 and 149.8 mg.kg⁻¹ of body weight, for the extract the shells of the fruit. For the extract of leaves, DL₁₀ and DL₅₀ were 33.35 and 67.01 mg.kg⁻¹ of body weight, respectively. It is concluded that the aqueous extracts evaluated are classified as very toxic when administered intraperitoneally in mice of both genders and that the leaf extract presents smaller lethal doses.

Keywords: *Caryocar brasiliense*. Mortality. *Mus musculus*. Pequi. Intraperitoneal Route.

1 INTRODUÇÃO

Caryocar brasiliense Cambess (Caryocaraceae), árvore do Cerrado, possui ampla distribuição no Sudeste e Centro-Oeste do Brasil (MAIA *et al.*, 2008). O nome popular desse vegetal varia conforme a região de ocorrência, sendo os mais comuns: pequi, piqui, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequiá-pedra, pequerim, suari e piquiá (SANTOS *et al.*, 2004). A frutificação é anual entre os meses de setembro a fevereiro. Em Minas Gerais, a floração estende-se de setembro a novembro e a frutificação, de novembro a fevereiro (CARVALHO, 2009; VERA *et al.*, 2005).

O pequizeiro possui grande importância socioeconômica, uma vez que os frutos são explorados de forma extrativista por populações que se inserem no bioma Cerrado, constituindo em fonte de alimentação e de renda, e a planta como um todo, utilizada na agroindústria, na fabricação de cosméticos e na medicina popular (BELO, 2009).

Quanto ao uso terapêutico do pequizeiro, diversas pesquisas têm reportado o potencial alelopático, antifúngico, leishmanicida, bactericida, moluscicida, antioxidante, antiinflamatório e hipotensivo (BEZERRA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2009; MIRANDA-VILELA *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2008; PASSOS *et al.*, 2002; PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006; ROESLER *et al.*, 2008). Além disso, estudos anteriores comprovaram a ação anti-helmíntica do extrato aquoso das cascas do fruto contra nematódeos gastrintestinais de ovinos, demonstrando grande potencial no controle alternativo das verminoses em ruminantes (NOGUEIRA *et al.*, 2012a).

Kerr *et al.* (2007) reportam que as folhas do pequizeiro, nos estados de Minas Gerais e Goiás, são utilizadas na alimentação de rebanhos bovinos, caprinos, ovinos e, em algumas localidades, na alimentação de galináceos. Esse relato corrobora a possível utilização dessa espécie vegetal, uma vez que, a princípio, não estaria promovendo efeitos tóxicos na alimentação dos animais. Entretanto, para a segurança em sua utilização, são necessárias pesquisas acuradas para determinação de toxicidades aguda e crônica para os animais.

A atividade terapêutica das plantas está relacionada, principalmente, aos metabólitos secundários, destinados à proteção contra herbivoria no organismo vegetal (CHAGAS, 2004). Entretanto, além da capacidade de cura, podem ser potencialmente tóxicos, dependendo da dosagem e da forma de administração. Mesmo com a ampla utilização do fruto na alimentação humana, apenas uma pesquisa avaliou a toxicidade dessa espécie vegetal, indicando que o extrato hidroalcoólico do farelo da casca do fruto apresentou toxicidade em camundongos, por via intraperitoneal (ALMEIDA *et al.*, 2010).

Apesar de não terem sido verificados registros na literatura sobre a intoxicação de animais e seres humanos com a ingestão de qualquer parte de *C. brasiliense*, estudos para determinar a toxicidade são imprescindíveis, considerando as potencialidades na alimentação e medicinal. Dessa forma, objetivou-se avaliar a toxicidade aguda do extrato aquoso das cascas dos frutos e das folhas de pequi em camundongos fêmeas e machos, por via intraperitoneal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmacologia e Parasitologia Animal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado na cidade de Montes Claros, norte de Minas Gerais, Brasil.

2.1 Seleção do material vegetal

Na seleção do material vegetal, foram utilizadas cascas do fruto, compostas por epicarpo e por mesocarpo externo, e folhas do pequizeiro, coletadas em regiões de cerrado do norte de Minas Gerais. As amostras foram identificadas e armazenadas em exsicata nº 338, no Herbário Montes Claros, localizado na Universidade Estadual de Montes Claros.

Após a coleta, eliminaram-se as amostras lesionadas ou deterioradas e, posteriormente, procederam-se à lavagem e à sanitização com solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 2% (v/v), por 15 minutos (SILVA; GALLO, 2003).

2.2 Obtenção dos extratos aquosos

Para a produção dos extratos aquosos, as cascas dos frutos e folhas foram desidratadas em estufa, com circulação forçada de ar a 40°C até obter peso constante. Posteriormente, foram trituradas, identificadas e armazenadas em freezer a 4°C negativos. Esses materiais foram suspensos em água destilada estéril, homogeneizados e incubados em banho-maria a 60°C, durante 60 minutos. Procederam-se à filtração dos extratos aquosos em funil com algodão e à distribuição em placas de *Petri* para a desidratação em estufa, com circulação forçada de ar, a 40°C (KRYCHAK-FURTADO, 2006; NERY *et al.* 2010).

Os pós dos extratos aquosos obtidos foram diluídos em água para injetáveis (AI) e filtrados em membrana milipore de 22 µm, com o auxílio de bomba a vácuo, em capela de fluxo laminar, para evitar contaminação. A matéria seca de subamostras dos extratos diluídos e filtrados foi determinada em estufa a 105°C (CUNNIF, 1995).

2.3 Teste de toxicidade aguda por via intraperitoneal

Os procedimentos adotados nos testes de toxicidade aguda foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, conforme o registro 42/2008 (ANEXO A). Realizaram-se testes piloto com número reduzido de animais antes de cada experimento, para determinar as faixas de dosagens a serem avaliadas.

Para a avaliação da toxicidade aguda, utilizou-se metodologia adaptada de Tahraoui *et al.* (2010). Os experimentos dos dois extratos foram realizados em tempos diferentes, permitindo o melhor acompanhamento dos animais. Em ambos os experimentos, foram utilizados camundongos adultos jovens, com idade aproximada de sete semanas, albino (*Mus musculus*) da linhagem Swiss.

Inicialmente, realizou-se o teste de toxicidade aguda do extrato aquoso das cascas do fruto, por via intraperitoneal, nas doses 500,00; 250,00; 125,00 e 62,50 mg.kg⁻¹ de peso corporal (PC), comparando-se com o controle que recebeu 1 ml de AI. Foram utilizados quatro animais fêmeas, com média de peso de 43,20 g e quatro machos, com média de peso de 49,12 g, por grupo.

Posteriormente, procedeu-se ao teste de toxicidade do extrato aquoso das folhas de pequi, analisando-se as doses 300,00; 150,00; 75,00; 37,50 e 18,75 mg.kg⁻¹ PC. Foram utilizados seis camundongos fêmeas, com média de peso de 39,50 g, e seis machos, com média de peso de 44,82 g, para cada dosagem e controle, inoculado com 1 ml de AI.

Foi realizada aplicação em dose única, em função do peso individual e respeitando-se a capacidade de volume intraperitoneal. Os animais foram separados por tratamento e acondicionados em gaiolas plásticas com tampa de inox, forradas com maravalha. Durante todo período experimental, forneceram-se água e ração comercial (Labina®, Purina, São Paulo, Brasil) *ad libitum*.

O comportamento e a mortalidade foram observados nos tempos 5, 10, 30, 60 minutos, quatro e oito horas após a aplicação. Posteriormente, verificaram-se os mesmos parâmetros a cada 24 horas até o décimo quarto dia, quando os últimos sobreviventes e o controle foram eutanasiados (SILVA *et al.*, 2007).

2.4 Análise estatística

Para determinar as doses letais para 10% e 50% da população (DL₁₀ e DL₅₀), foi empregada a análise de regressão *probit* do programa estatístico SAEG® 9.1 (2007). As frequências de mortalidade de fêmeas e machos nos dois experimentos foram ainda submetidas ao teste Qui-quadrado, para observar diferenças entre os sexos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior dose do extrato aquoso das cascas do fruto do pequi provocou 100% de mortalidade nas fêmeas, enquanto, nos machos, 100% de mortalidade ocorreram nos grupos que receberam as duas maiores dosagens. Para ambos os sexos, os primeiros óbitos foram observados quatro horas após a aplicação (TAB. 1).

TABELA 1

Período de ocorrência de mortalidade após aplicação, mortalidade em número absoluto e relativo, em função das diferentes doses do extrato aquoso das cascas do fruto de *Caryocar brasiliense* Camb. em camundongos fêmeas e machos

Dose (mg.kg ⁻¹ de PC)	Camundongos fêmeas			Camundongos machos			
	Mortalidade			Mortalidade			
	Período	n	%	Período	n	%	
500,00	4 h	4	100	500,00	4 – 8 h	4	100
250,00	24 – 48 h	3	75	250,00	48 – 72 h	4	100
125,00	72 h	2	50	125,00	48 h	1	25
62,50	..	0	-	62,50	..	0	-

Notas: PC = peso corporal; h = horas; n = número absoluto; % = número relativo.

Fonte: Da autora.

O extrato aquoso das folhas do pequizeiro provocou 100% de mortalidade para as fêmeas, na maior dose, enquanto, nos machos, 100% de mortalidade ocorreram nas dosagens de 300 e 150 mg.kg⁻¹ PC, sendo que os primeiros óbitos foram registrados 24 horas após aplicação (TAB. 2).

TABELA 2

Período de ocorrência de mortalidade após aplicação, mortalidade em número absoluto e relativo, em função das diferentes doses do extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. em camundongos fêmeas e machos

Dose (mg.kg ⁻¹ de PC)	Camundongos fêmeas			Camundongos machos			
	Mortalidade			Mortalidade			
	Período	n	%	Período	n	%	
300,00	24 h	6	100	300,00	24 – 48 h	6	100
150,00	24 – 48 h	5	83,3	150,00	24 – 48 h	6	100
75,00	48 h	4	66,7	75,00	48 h – 6 d	3	50
37,50	96 h	2	33,3	37,50	..	0	-
18,75	..	0	-	18,75	..	0	-

Notas: PC = peso corporal; h = horas; d = dias; n = número absoluto; % = número relativo.

Fonte: Da autora.

Em ambos experimentos, não houve diferença significativa entre as frequências de mortalidade de fêmeas e machos. Nos dois experimentos, a resposta foi dose dependente, ocorrendo aumento da mortalidade, com elevação progressiva da concentração dos extratos. As DL₁₀ e DL₅₀ obtidas para o extrato aquoso das cascas do fruto do pequi foram, respectivamente, de 89,6 mg.kg⁻¹ PC (intervalo de confiança a 95% = 78,08 – 99,54 mg.kg⁻¹ PC) e 149,8 mg.kg⁻¹ PC (intervalo de confiança a 95% = 138,52 – 161,95 mg.kg⁻¹ PC) (GRAF. 1).

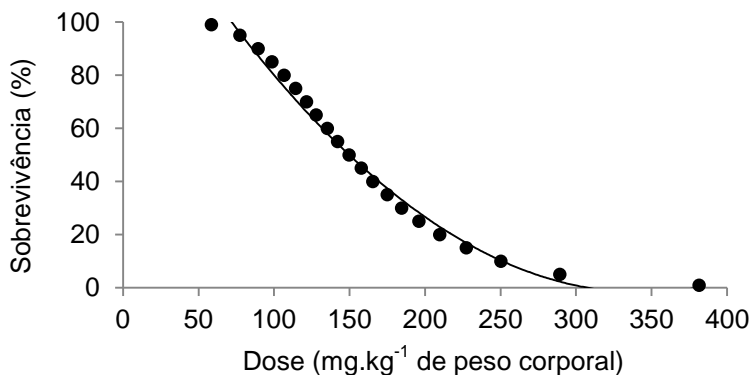


GRÁFICO 1 – Dose letal mediana do extrato aquoso das cascas dos frutos de *Caryocar brasiliense* administrado por via intraperitoneal a camundongos

Nota: Regressão polinomial da dose-resposta: $y = 0,0014x^2 - 0,947x + 160,99$; $R^2 = 0,9861$; $n = 4$

Fonte: Da autora.

Para o extrato aquoso das folhas, obtiveram-se, respectivamente, as DL_{10} e DL_{50} de $33,35 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PC}$ (intervalo de confiança a 95% = $28,5 - 37,78 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PC}$) e $67,01 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PC}$ (intervalo de confiança a 95% = $61,20 - 73,38 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PC}$) (GRAF. 2).

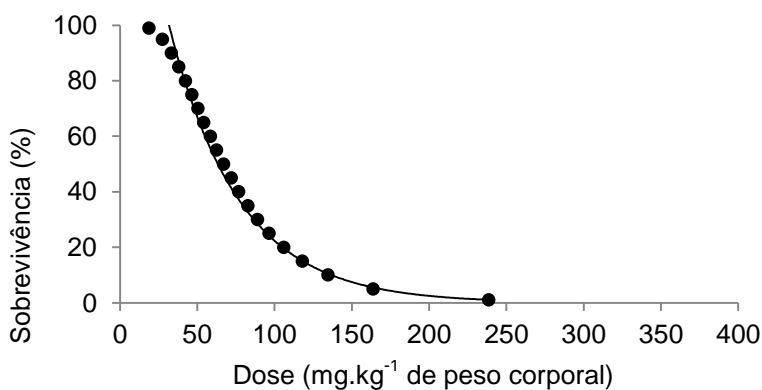


GRÁFICO 2 – Dose letal mediana do extrato aquoso das folhas de *Caryocar brasiliense* administrado por via intraperitoneal a camundongos

Nota: Regressão exponencial da dose-resposta: $y = 200,18e^{-0,022x}$; $R^2 = 0,9931$; $n = 6$.

Fonte: Da autora.

Segundo Schvartsman (1980), em uma escala crescente de toxicidade, o número 1 representa substâncias praticamente atóxicas, com DL_{50} superior a 15 g.kg^{-1} PC e 6, as supertóxicas, com DL_{50} inferior a 5 mg.kg^{-1} PC. Dessa forma, os extratos aquosos das cascas do fruto e das folhas de pequi apresentaram grau de toxicidade quatro para ambos os sexos, pois as DL_{50} situaram-se entre 50 a 500 mg.kg^{-1} PC, sendo classificados como muito tóxicos.

O comportamento dos camundongos observado nos experimentos foi semelhante entre fêmeas e machos. Logo após a aplicação, houve aumento da frequência respiratória e reação de fuga para todos os tratamentos, mesmo após cessarem esses sinais nos grupos controle. As doses de 500 e 250 mg.kg^{-1} PC do extrato aquoso das cascas do fruto e 300, 150 e 75 mg.kg^{-1} PC e folhas de pequi determinaram dificuldade de locomoção e incoordenação motora até o óbito. Aos 10 minutos após, os sintomas mais observados para essas dosagens foram dispneia e prostração.

Os grupos que foram tratados com as duas menores dosagens dos extratos da casca do fruto e das folhas do pequizeiro aboliram os sintomas totalmente entre duas e quatro horas após a inoculação, respectivamente. Os animais do grupo controle normalizaram o comportamento cinco minutos após a aplicação da água para injetáveis.

Quadros clínicos semelhantes foram registrados por Almeida *et al.* (2010), ao administrarem extrato hidroalcoólico do farelo da casca do fruto do pequi por via intraperitoneal em camundongos. Esses autores observaram que os efeitos foram de estimulantes a depressivos cinco minutos após a administração do extrato.

As fêmeas sobreviventes dos tratamentos com 250 mg.kg^{-1} PC do extrato da casca do fruto e 150 mg.kg^{-1} PC do extrato da folha recuperaram-se dos sintomas descritos anteriormente, respectivamente, três e quatro horas após a aplicação. Entretanto, os animais sobreviventes que receberam 75 mg.kg^{-1} PC do extrato das folhas apresentaram melhora clínica somente 24 horas após a inoculação.

Para ambos experimentos, foram observadas alterações comportamentais semelhantes. Possivelmente, porque a composição

fitoquímica da casca do fruto e das folhas seja próxima. Os bioativos já identificados nas folhas correspondem aos grupos dos taninos condensados, dos taninos hidrolisáveis, dos flavonoides e dos terpenoides (BEZERRA *et al.*, 2002; PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006) e das saponinas (PAULA-JÚNIOR *et al.*, 2006). Testes fitoquímicos qualitativos com a casca do fruto de pequi indicaram a presença de saponinas, de taninos totais, de taninos catequéticos, de flavonoides, de catequinas, de esteroides e de xantonas (NOGUEIRA *et al.*, 2012a). No extrato etanólico da casca do fruto, identificaram-se compostos fenólicos, como taninos hidrolisáveis e ácido fenólico, além de flavonoides (ROESLER *et al.*, 2008).

Os animais inoculados com 500 mg.kg⁻¹ PC do extrato aquoso das cascas do fruto apresentaram espasmos, movimentos de pedalagem e decúbito lateral ou abdominal antes do óbito. Entre os compostos secundários apresentados pela casca do fruto e folhas, as saponinas e os taninos podem provocar sintomas nervosos (FERREIRA *et al.*, 2009; HERVÁS *et al.*, 2003).

Ferreira *et al.* (2009) relataram, em bovinos intoxicados experimentalmente com favas de *Stryphnodendron fissuratum*, por via oral, a ocorrência dos mesmos sintomas, além de incoordenação motora, dispneia, taquipneia e respiração abdominal, associada às saponinas da planta, designadas como stryphnosídeos (HARAGUCHI *et al.*, 2006; YOKOSUKA *et al.*, 2008).

Em ovelhas, 3 g.kg⁻¹ PC da formulação comercial de tanino de quebracho (*Schinopisis balansae*), por via intraperitoneal, promoveram fraqueza e depressão física no quinto dia após a aplicação, observando-se decúbito, taquicardia e taquipneia no oitavo dia, possivelmente associados aos taninos (HERVÁS *et al.*, 2003).

As saponinas triterpênicas promovem a abertura de grandes canais de cálcio e potássio-dependentes nas membranas de neurônios e células musculares, provocando hiperpolarização e supressão da atividade elétrica (MCMANUS *et al.*, 1993). Alabdul Magid *et al.* (2006a, 2006b, 2006c) identificaram, aproximadamente, 35 saponinas triterpênicas em *Caryocar glabrum* e *C. villosum*, denominadas caryocarosídeos.

As saponinas ainda possuem atividade citotóxica, ao formarem complexos com o colesterol e esteroides da membrana celular, promovem a formação de poros e aumentam a permeabilidade, além de alterarem carboidratos da superfície celular, resultando em hemólise (GAUTHIER *et al.*, 2009). Alabdul Magid *et al.* (2006c) constataram que as saponinas bidesmosídicas de *Caryocar glabrum* são menos hemolíticas quando comparadas às monodesmosídicas, pois a ruptura aumenta com o maior número de unidades de carboidratos ligados na posição três do aglicona.

A toxicidade dos taninos pode ser direta ou indireta e relaciona-se à inibição enzimática, à indisponibilização de substratos e à ação nas membranas, pois possuem capacidade de se complexarem a proteínas, polissacarídeos e íons, como ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio e cálcio (OKONKWO *et al.*, 2010; SANTOS; MELO, 2004).

4 CONCLUSÃO

Os extratos aquosos das cascas do fruto e das folhas do pequiheiro são tóxicos, por via intraperitoneal, em camundongos fêmeas e machos, sendo que o extrato das folhas apresentou DL₅₀ mais baixa. Portanto, futuros estudos devem avaliar a toxicidade de *Caryocar brasiliense* por outras vias e para outras espécies de animais, considerando as possíveis diferenças nas composições fitoquímicas e nas concentrações dos compostos para diferentes partes dessa planta.

REFERÊNCIAS

ADAMU, M.; OSHADU, O. D.; OGBAJE, C. I. Anthelmintic efficacy of aqueous extract of *Acanthus montanus* leaf against strongylid nematodes of small ruminants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine**, Ilé-Ifé, v. 7, n. 4, p. 279-285, 2010.

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

ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Bioseparation and activity of *Khaya senegalensis* fractions against infective larvae of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 170–174, 2009.

ALABDUL MAGID, A.; VOUTQUENNE, L.; HARAKAT, D.; POUNY, I.; CARON, C.; MORETTI, C.; LAVAUD, C. Triterpenoid saponins from the fruits of *Caryocar villosum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 69, n. 6, p. 919-926, 2006a.

ALABDUL MAGID, A.; VOUTQUENNE, L.; MORETTI, C.; LONG, C.; LAVAUD, C. Triterpenoid saponins from the fruits of *Caryocar glabrum*. **Journal Natural Products**, Washington, v. 69, n. 2, p. 196-205, 2006b.

ALABDUL MAGID, A.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; RENIMEL, I.; HARAKAT, D.; MORETTI, C.; LAVAUD, C. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Caryocar villosum*. **Phytochemistry**, Londres, v. 67, n. 19, p. 2096-2102, 2006c.

ALMEIDA, A. C.; SOBRINHO, E. M.; PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R.; SANTOS, H. O.; BRANDI, I. V.; CANGUSSU, A. S.; COSTA, J. P. R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 200-203, 2010.

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 *Mentha piperita* L. e de *Chenopodium ambrosoides* L. sobre cultivos de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 16, n. 1, p. 57-59. 2007.

AMARANTE, A. F. T. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 13, supl. 1, p. 68-71, 2004.

AMARANTE, A. F. T.; SALES, R. O. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 1, n. 2, p. 91-113, 2007.

AMARANTE, A. F. T., AMARANTE, M. R. V. Breeding sheep for resistance to nematode infections. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Paquistão, v. 2, n. 3, p. 147-161, 2003.

ANZIANI, O. S.; SUAREZ, V.; GUGLIELMONE, A. A.; WARNKE, O.; GRANDE, H.; COLES, G. C. Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 303–306, 2004.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotryx Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 373-380, 2006.

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 *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 457-463, 2004.

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

BARRAU, E.; FABRE, N.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. **Parasitology**, Londres, v. 131, n. 4, p. 531-538, 2005.

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**, Jaboticabal, v. 18, n. 4, p. 63-68, 2009.

BATATINHA, M. J. M.; ALMEIDA, G. N.; DOMINGUES, L. F.; SIMAS, M. S.; BOTURA, M. B.; CRUZ, A. C. F. G.; ALMEIDA, M. A. O. Algaroba sobre culturas de larvas de nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, n. 3, p. 514-519, 2011.

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: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/pdf/1756-3305-1-29.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2012.

BELO, R. F. C. **Caracterização de genótipos de Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) pelo perfil cromatográfico de voláteis.** 2009. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; FERRI, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, Milão, v. 73, n. 5, p. 428-430, 2002.

BIANCHIN, I.; CATTO, J. B. Epidemiologia e alternativas de controle de helmintos em bovinos de corte na região Central do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 15., SEMINÁRIO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 2., 2008. Curitiba. **Anais...** Disponível em <<http://cniia.inta.gov.ar/helminto/Congreso%20Brasil%202008/EPIDEMIOLOGIA%20E%20ALTERNATIVAS%20DE%20CONTROLE%20DE%20HELMINTOS%20EM%20BOVINOS%20DE%20CORTE%20NA%20REGI%C3%83O%20CENTRAL%20DO%20BRASIL..pdf>>. Acesso em: 18 out. 2012.

BIZIMENYERA, E. S.; GITHIORI, J. B.; ELOFF, J. N.; SWAN, G. E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 142, n. 3-4, p. 336-343, 2006.

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

BORGES, C. C. L. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematoides gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). **Parasitología Latinoamericana**, Santiago, v. 58, n. 3-4, p. 142-147, 2003.

BORGES, F. A. **Ação reversora *in vitro* e *in vivo* do verapamil sobre a resistência de haemonchus contortus à ivermectina.** 2007. 84 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Departamento de Patologia Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

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**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2001.

BRUNET, S.; FOURQUAUX, I.; HOSTE, H. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) extract. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 60, n. 4, p. 419–424, 2011.

BRUNET, S.; JACKSON, F.; HOSTE, H. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. **International Journal for Parasitology**, Sydney, v. 38, n. 7, p. 783-790, 2008.

BUTTER, N. L., DAWSON, J. M., WAKELIN, D.; BUTTERY, P. J. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 134, n. 1, p. 89–99, 2000.

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**, Brasília, v. 42, n. 6, p. 891-895, 2007.

CALA, A. C.; CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; MATOS, A. P.; BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; SOUZA, F. A.; OLIVEIRA, G. P. *In vitro* anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. **Experimental Parasitology**, Nova York, v. 130, n. 2, p. 98-102, 2012.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**. 2006. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

CARRER, C. C.; CARDOSO, J. L.; AFERRI, G.; RIBEIRO, M. M. L. O. R.; OLIVEIRA, N. J. D. Alguns aspectos da política creditícia e o desenvolvimento da pecuária de corte no Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1455-1461, 2007.

CARVALHO, P. E. R. **Pequizeiro *Caryocar brasiliense***. Colombo, PR: EMBRAPA, 2009. 10p. (Comunicado técnico, 230).

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.; 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**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.

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

COLES, G. C. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? **Veterinary Research**, Paris, v. 33, n. 5, p. 481-489, 2002.

COLES, G. C., BAUER, C., BORGSTEEDE, F. H., GEERTS, S., KLEI, T. R., TAYLOR, M. A., WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) – methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 35–44, 1992.

COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCUIJSSE, J. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 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**, Washington, 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**, Amsterdam, 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).

COUTO, E. M. **Utilização da farinha de casca de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) na elaboração de pão de forma**. 2007. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16ed. Washington: AOAC, 1995. 2000p.

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**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 147-152, 2012.

EGUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FLEKE, A.; MAKONNEN, E. *Haemonchus contortus*: *in vitro* and *in vivo* anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. **Experimental in Parasitology**, Nova York, v. 116, n. 4, p. 340–345, 2007.

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**, Amsterdam, 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**, Goiânia, v. 10, n. 3, p. 926-930, 2009.

FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P. Parceria público x privada no desenvolvimento de pesquisa em melhoramento genético animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, supl. especial, p. 216-222, 2010.

FERREIRA, E. V.; BOABAID, F. M.; ARRUDA, L. P.; LEMOS, R. A. A.; SOUZA, M. A.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E. M. Intoxicação por *Stryphnodendron fissuratum* (Mimosoideae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 11, p. 951-957, 2009.

FIEL, C. A.; SAUMELL, C. A.; STEFFAN, P. E.; RODRIGUEZ, E. M. Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 211–217, 2001.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4. ed. São Paulo: Ícone, 2004. p. 282-296.

GARCÍA, D. E.; SOCA, M.; MEDINA, M. G. Acción anti-helmíntica de seis extractos de morera en la viabilidade de larvas infestantes (L3) de nemátodos gastrointestinales. **Pastos y Forrajes**, Matanzas, v. 28, n. 4, p. 319-328, 2005.

GASBARRE, L. C.; SMITH, L. L.; LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 166, n. 3-4, p. 281–285, 2009.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; GIRARD-LALANCETTE, K.; MSHVILDADZE, V.; PICHETTE, A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 2002-2008, 2009.

GAZDA, T. L.; PIAZZETTA, R. G.; DITTRICH, J. R.; MONTEIRO, A. L. G.; SOCCOL, V. T. Distribuição de larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos em pastagens de inverno. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 13, n. 1, p. 85-92, 2012.

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.

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://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL64.pdf>>. Acesso em: 04 out. 2012.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n. 1, p. 308-320, 2006.

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.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 213-228, 1997.

HARAGUCHI, M.; YOKOSUKA, A.; KAWAKAMI, S.; CHAVES, N. S. T.; BRUM, K. B.; RASPANTINI, P. C.; GÓRNIAC, S. L.; MIMAKI, Y. Nuevas saponinas aisladas de las vainas del *Stryphnodendron fissuratum*. **Labciencia**, Mannheim, v. 3, n. 1, p. 6-8, 2006.

HERNÁNDEZ-VILLEGAS, M. M.; BORGES-ARGÁEZ, R.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; MÉNDEZ-GONZALEZ, M.; CÁCERES-FARFANA, M. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 179, n. 1-3, p. 100-106, 2011.

HERVÁS, G.; PÉREZ, V.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R.; ALMAR, M. M.; FRUTOS, P. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 129, n. 1, p. 44-54, 2003.

HIERMANN, A.; KARTNIG, T. H.; AZZAM, S. Ein beitrage zur quantitativen bestimmung der procyanidine in *Crataegus*. **Science Pharmacology**, Wien, v. 54, n. 1, p. 331-337, 1986.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 253-261, 2006.

HUSSAIN, A., KHAN, M. N.; IQBAL, Z.; SAJID, M. S.; KHAN, M. K. Anthelmintic activity of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 179, n. 1-3, p. 92-99, 2011.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Pesquisa Pecuária Municipal 2011**. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf>. Acesso em: 22 out. 2012.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Research Veterinary Science**, London, v. 91, n. 3, p. 400-404, 2011.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A.; BAGAVAN, A.; MOHAMED, M. J.; ELANGO, G.; RAJAKUMAR, G.; ZAHIR, A. A.; SANTHOSHKUMAR, T.; MARIMUTHU, S. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Melia azedarach* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). **Parasitology Research**, Berlin, v. 106, n. 5, p. 1071-1077, 2010.

KAMARAJ, C.; RAHUMAN, A. A.; ELANGO, G.; BAGAVAN, A.; ZAHIR, A. A. Anthelmintic activity of botanical extracts against sheep gastrointestinal nematodes, *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 1, p. 37-45, 2011.

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

KEITH, R. K. The differentiation of infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, Sydney, v. 1, n. 2, p. 223-235, 1953.

KERR, W. E.; SILVA, F. R.; TCHUCARRAMAE, B. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 169-171, 2007.

KETZIS, J. K.; VERCRUYSSSE, J.; STROMBERG, B. E.; LARSEN, M.; ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J. G. M. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, n. 1, p. 321-335, 2006.

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.

LE JAMBRE, L. F.; GEOGHEGAN, J.; LYNDAL-MURPHY, M. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 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**, Nova York, v. 22, n. 1-2, p. 111-121, 2011.

LYNDAL-MURPHY, M.; ROGERS, D.; EHRLICH, W. K.; JAMES, P. J.; PEPPER, P. M. Reduced efficacy of macrocyclic lactone treatments in controlling gastrointestinal nematode infections of weaner dairy calves in subtropical eastern Australia. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 168, n. 1-2, p. 146–150, 2010.

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇAVASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; MACHADO, L. K. A.; RIBEIRO, W. L. C. *In vitro* activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa* and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 3-4, p. 504-509, 2012.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L. Aroma volatiles of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Journal of Food Composition and Analysis**, Amsterdam, v. 21, n. 7, p. 574–576, 2008.

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

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

MARTINS, C. P. S.; MOREIRA, T. M. B.; MAGALHÃES, H. M.; GOMES, J. G.; OLIVEIRA, N. C. C.; CARNEIRO, P. A. P.; LOPES, P. S. N.; SALES, N. L. P. Utilização de extrato da folha de pequi e termoterapia no controle de fitopatógenos das sementes de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 4, n. 2, p. 14-17, 2009.

MAX, R. A.; WAKELIN, D.; DAWSON, J.M.; KIMAMBO, A.E.; KASSUKU, A. A.; MTENGA, L. A.; CRAIGON, J.; BUTTERY, P. J. Effect of quebracho tannin on faecal egg counts and worm burdens of temperate sheep with challenge nematode infections. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 143, n. 6, p. 519–527, 2005.

MCMANUS, O. B.; HARRIS, G. H.; GIANGIACOMO, K. M.; FEIGENBAUM, P.; REUBEN, J. P.; ADDY, M. E.; BURKA, J. F.; KACZOROWSKI, G. J.; GARCIA, M. L. An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. **Biochemistry**, Washington, v. 32, n. 24, p. 6128-6133, 1993.

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.

MEHLHORN, H.; AL-QURAI SHY, S.; AL-RASHEID, K. A. S.; JATZLAU, A.; ABDEL-GHAFFAR, F. Addition of a combination of onion (*Allium cepa*) and coconut (*Cocos nucifera*) to food of sheep stops gastrointestinal helminthic infections. **Parasitology Research**, Berlin, v. 108, n. 4, p. 1041–1046, 2011.

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**, Amsterdam, v. 178, n. 3-4, p. 300-310, 2011.

MINHO, A. P.; BUENO, I. C. S.; GENNARI, S. M.; JACKSON, F.; ABDALLA, A. L. *In vitro* effect of condensed tannin extract from acacia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 17, n. 1, p. 144-148, 2008.

MIRANDA-VILELA, A. L.; AKIMOTO, A. K.; ALVES, P. C. Z.; PEREIRA, L. C. S.; GONÇALVES, C. A.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N.; GRISOLIA, C. K. Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant -Val9Ala. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 4, p. 1481-1495, 2009.

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**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 117-121, 2001.

MOREIRA, P. R. R.; SOUZA, W. M.; SOUZA, N. T. M.; CÔRREA, C. N. Estudo anatômico das valvas semilunares, aórtica e pulmonar no ovino (*Ovis aries* – Linnaeus, 1758). **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 80-85, 2006.

MOREIRA, P. F. S. D.; SOUZA, D. R.; TERRONES, M. G. H. Avaliação do potencial alelopático do extrato metanólico obtido das folhas de *Caryocarpus brasiliense* Camb. (pequi) na inibição do desenvolvimento da raiz em sementes de *Panicum maximum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 24, n. 3, p. 74-79, 2008.

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

NERY, P. S.; NOGUEIRA, F. A.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 171, n. 3-4, p. 361-364, 2010.

NERY, P. S.; NOGUEIRA, F. A.; OLIVEIRA, N. J. F.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Efficacy of extracts of immature mango on ovine gastrointestinal nematodes. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 6, p. 2467-2471, 2012.

NOGUEIRA, E. A.; NOGUEIRA JÚNIOR, S. **Ovinos e caprinos avançam em São Paulo**. São Paulo: Instituto de Economia Agrícola, Secretaria de Agricultura e abastecimento. 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=4136>>. Acesso em: 05 nov. 2012.

NOGUEIRA, F. A.; FONSECA, L. D.; SILVA, R. B.; FERREIRA, A. V. P.; NERY, P. S.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. *In vitro* and *in vivo* efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 1, p. 325-330, 2012a.

NOGUEIRA, F. A.; OLIVEIRA, L. N.; SILVA, R. B.; NERY, P. S.; VIRGÍNIO JÚNIOR, G. F.; GERASEEV, L. C.; DUARTE, E. R. Anthelmintic efficacy of banana crop residues on gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* tests. **Parasitology Research**, Berlin, v. 111, n. 1, p. 317-323, 2012b.

NOVOBILSKY, A.; MUELLER-HARVEY, I.; THAMSBORG, S. M. Condensed tannins act against cattle nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, n. 2-4, p. 213-220, 2011.

OKONKWO, T. J. N.; OKORIE, O.; OKONTA, J. M.; OKONKWO, C. J. Sub-chronic hepatotoxicity of *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) inner stem bark extract in rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Bombay, v. 72, n. 3, p. 353-357, 2010.

OLIVEIRA, L. N.; DUARTE, E. R.; NOGUEIRA, F. A.; SILVA, R. B.; FARIA FILHO, D. E.; GERASEEV, L. C. Eficácia de resíduos da bananicultura sobre a inibição do desenvolvimento larval em *Haemonchus* spp. provenientes de ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 488-490, 2010.

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**, Londres, v. 183, n. 1, p. 68-74, 2010.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 6, p. 623-627, 2002.

PAULA, E. B.; CASTRO, M. C. D.; MOTA, M. M. Uma análise da cadeia produtiva do leite no Brasil pós década de 90 sob a luz da teoria das vantagens comparativas e seus impactos na geração de emprego e renda. In: CONGRESSO DA SOBER, Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 43. Ribeirão Preto, 2005. **Anais...** Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/2/1046.pdf>>. Acesso em 30 out. 2012.

PAULA-JÚNIOR, W.; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 16, supl. 1, p. 625-630, 2006.

PIRES, C. C.; SILVA, L. F.; SCHLICK, F. E.; GUERRA, D. P.; BISCAINO, G.; CARNEIRO, R. M. Cria e terminação de cordeiros confinados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 875-880, 2000.

POWERS, K. G.; WOOD, I. B.; ECKERT, J.; GIBSON, T.; SMITH, H. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 265-284, 1982.

RANGEL, V. B.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R.; SANTOS JÚNIOR, E. J. Resistência de *Cooperia* spp. e *Haemonchus* spp. às avermectinas em bovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p. 186-190, 2005.

RAZA, M. A.; IQBAL, Z.; JABBAR, A.; YASEEN, M. Point prevalence of gastrointestinal helminthiasis in ruminants in southern Punjab, Pakistan. **Journal of Helminthology**, Londres, v. 81, n. 3, p. 323-328, 2007.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 711-717, 2008.

ROSALINSK-MORAES, F.; MORRETO, L. H.; BRESOLIN, W. S.; GABRIELLI, I.; KAUFER, 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**, Goiânia, 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, 2001. v. 2, cap. 1, p. 89-105.

SAEG. **Sistema para Análises Estatísticas**, Versão 9.1. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes - UFV, 2007.

SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1996. 220p.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; DOMBROSKI, J. L. D.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; SILVA, A. A. N. **Pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.): uma espécie promissora do cerrado brasileiro**. Lavras, MG: Editora UFLA, 2004. 29p. (Boletim agropecuário, 66).

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.); SCHENKE, E. P.; GOSMAN, G.; PALAZZO DE MELL, J. C.; MENT, L. A.; PETROVICK, P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 615-656.

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.

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

SCHVARTSMAN, S. **Produtos químicos de uso domiciliar – segurança e riscos toxicológicos**. São Paulo: Almed, 1980, 92p.

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**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 229-236, 2010.

SILVA NETO, S. P.; COSTA, C. J. **Importância econômica, social e ambiental do pequizeiro**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2010. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/279/>>. Acesso em: 06 abr. 2011.

SILVA, E. J. R.; GONCALVES, E. S.; AGUIAR, F.; EVENCIO, L. B.; LYRA, M. M. A.; COELHO, M. C. O. C.; FRAGA, M. C. C. A.; WANDERLEY, A. L. Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 21, n. 4, p. 332–336, 2007.

SILVA, M. C.; GALLO, C. R. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema Simplate. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 17, n. 107, p. 85-95, 2003.

SILVEIRA, R. X.; CHAGAS, A. C. S.; BOTURA, M. B.; BATATINHA, M. J. M.; KATIKI, L. M.; CARVALHO, C. O.; BEVILAQUA, C. M. L.; BRANCO, A.; MACHADO, E. A. A.; BORGES, S. L.; ALMEIDA, M. A. O. Action of sisal (*Agave sisalana*, Perrine) extract in the *in vitro* development of sheep and goat gastrointestinal nematodes. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 131, n. 2, p. 162–168, 2012.

SIMPLÍCIO, A. A.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: desafios e oportunidades. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 1, n. 39, p. 7-17, 2006.

SOUTELLO, R. G. V.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, n. 3-4, p. 360–364, 2007.

SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SCHELBAUER, C. A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1363-1367, 2008.

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 gastrintestinais (Trichostrongylidae). **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, Botucatu, 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**, Londres, v. 134, n. 2, p. 139-151, 2007.

SUTHERLAND, I. A.; LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 176-181, 2011.

TAHRAOUI, A.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSEI, B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaureum erythraea* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 132, n. 1, p. 48–55, 2010.

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**, Amsterdam, v. 86, n. 1-3, p. 67–70, 2009.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Salvador: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143p.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). **Livestock and Poultry: world markets and trade, october 2012**. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 22 out. 2012.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). **Production, supply and distribution online 2011**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>>. Acesso em: 22 out. 2012.

VELOSO, C. F. M.; HELDER, L.; KIMURA, E. A.; AZEVEDO, C. R.; ENOKI, D. R.; FRANÇA, L. D.; MCMANUS, C. M.; ARLETE DELL'PORTO, A. D.; SANTANA, A. P. Efeitos da suplementação protéica no controle da verminose e nas características de carcaça de ovinos Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 5, n. 3, p. 131-139, 2004.

VERA, R.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L.; CHAVES, L. J.; LEANDRO, W. M.; SOUZA, E. R. B. Caracterização física de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 71-79, 2005.

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

YOKOSUKA, A.; KAWAKAMI, S.; HARAGUCHI, M.; MIMAKI, Y. Stryphnosides AeF, six new triterpene glycosides from the pericarps of *Stryphnodendron fissuratum*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 64, n. 7, p. 1474-1481, 2008.

**ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 42/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Epidemiologia e controle alternativo da helmintose ovina no norte mineiro com extratos de plantas e de fungos: experimentos (in vivo)**", que tem como responsável(is) **Eduardo Robson Duarte**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 09/2008**.

Este certificado expira-se em **10/ 09/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 42/2008**, related to the project entitled "**Epidemiology and alternative control of ovine helminthosis in the north of Minas Gerais with extracts of plants and fungi**", under the supervisors of **Eduardo Robson Duarte**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 10, 2008**.

This certificate expires in **September 10, 2013**.

Belo Horizonte, 15 de Setembro de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br