

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE *Lippia sidoides* E *Croton zehntneri* SOBRE
NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua.

Fortaleza

2006

Universidade Estadual do Ceará
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Título: **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos**

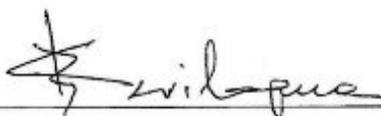
Autora: **Ana Lourdes Camurça Fernandes Vasconcelos**

Defesa em: 12/12/2006

Conceito obtido: satisfatório

Nota obtida: 10,0

Banca examinadora

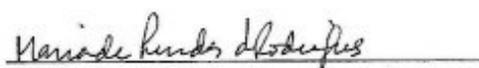


Prof. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua

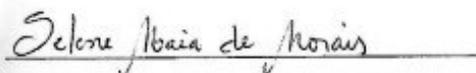
Orientadora



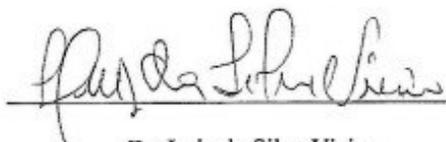
Prof. Dra. Solange Maria Gennari



Prof. Dra. Maria de Lurdes de A. Rodrigues



Prof. Dra. Selene Maia de Moraes



Dr. Luiz da Silva Vieira

Aos meus familiares,

Aos amigos conquistados,

Aos meus amores, meu marido e minhas filhas,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais e irmãos que possibilitaram minha formação acadêmica e me incentivaram a seguir meus estudos de pós-graduação.

À minha sogra pela ajuda e dedicação com minhas filhas durante minha ausência.

Ao meu amado marido cujo apoio tornou possível a conclusão deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará.

Aos funcionários do PPGCV, Adriana Maria Sales Albuquerque, Ana Cristina Sabóia Nascimento e Frederico Rocha Cavalcanti, e à ex-funcionária Alzenira de Andrade Ferreira por toda colaboração.

À Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua pela orientação e amizade.

À Profa. Dra. Selene Maia de Moraes por suas orientações e toda ajuda durante o doutorado e disponibilização do Laboratório de Química em Produtos Naturais.

Aos acadêmicos e bolsistas do Laboratório de Química em Produtos Naturais pela colaboração na extração dos óleos essenciais.

À EMBRAPA Caprinos e ao Laboratório de Parasitologia por permitir a execução de alguns experimentos para conclusão desta tese.

Ao Dr. Luiz da Silva Vieira pelo acolhimento e ajuda nos experimentos realizados na EMBRAPA, assim como pela participação e orientação nos trabalhos desta tese.

Aos técnicos Felipe Cavalcante Machado e Helena Araújo da Ponte, e aos bolsistas Adrine Maria do Carmo Navarro e Wladimir Rodrigues Aragão pela ajuda e desprendimento durante a execução dos testes nas instalações da EMBRAPA.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, Dra. Lúcia de Fátima e Dra. Fátima pela participação em bancas e colaboração em trabalhos científicos.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias, pela colaboração e amizade, e em especial aos amigos Cícero Temístocles Costa Coutinho, Michelline do Vale Maciel, Iara Tércia Freitas Macedo, Lorena Mayana Beserra Oliveira, Roberta Braga da Rocha e Rafaella Albuquerque e Silva, companheiros do grupo de estudos com plantas medicinais.

Ao biotério da Universidade Estadual do Ceará, especialmente à Profa. Germana Paixão, diretora do biotério, por conceder animais, equipamentos e rações para os experimentos.

Ao CNPq e FUNCAP por participaram com o suporte financeiro para a realização desta tese.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Croton zehntneri* (OECz) e *Lippia sidoides* (OELs). O efeito dos óleos essenciais e de seus principais constituintes, anetol e timol, foram determinados através de testes *in vitro*, de inibição da eclosão de ovos e do desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*. No teste pré-clínico, OECz e OELs foram administrados à camundongos naturalmente infectados por nematóides para determinar os efeitos destes óleos na redução da carga parasitária. O teste de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) e o teste controlado foram realizados sobre ovinos naturalmente infectados com nematóides gastrintestinais. Os óleos essenciais e seus principais constituintes apresentaram eficácia acima de 90% nas concentrações de 1,25 e 10 mg kg⁻¹ contra ovos e larvas de *H. contortus*. A eficácia do OECz e OELs na dose de 800 mg kg⁻¹ foi de 11,6 % e 46,3 %, respectivamente, e a do OELs nas doses de 1200 e 1600 mg kg⁻¹ foi de 57,6% e 68,9%, respectivamente, sobre nematóides de camundongos. No FECRT, a eficácia de 230 e 283 mg kg⁻¹ do OELs e de 200 µg de ivermectina foi de 30%, 54% e 39,6%, respectivamente, no 14º dia pós-tratamento. No teste controlado, a eficácia de 283 mg kg⁻¹ de OELs e de ivermectina foi de 56,9% e 34,4%, respectivamente, contra *Haemonchus* spp, e 39,3% e 63,6% contra *Trichostrongylus* spp, respectivamente. O OELs apresentou atividade superior ao OECz contra nematóides de camundongos e superior à ivermectina contra nematóides gastrintestinais de ovinos.

Palavras-chave: anti-helmíntico, *Haemonchus*, fitoterapia; óleos essenciais; nematóide; ovino.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the anthelmintic activity of *Croton zehntneri* (EOCz) and *Lippia sidoides* (EOLs) essential oils. The effects of the essential oils and their main constituents, anethole and thymol, were determined through *in vitro* tests of the egg hatching and larval development inhibition of *Haemonchus contortus*. On the pre-clinical test, OECz and OELs were administered to mice naturally infected with nematodes to determine the effects of these oils on worm burden. The fecal egg reduction count test (FERCT) and the controlled test were realized with sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. The essential oils and their main constituents presented efficacy up to 90% at 1.25 and 10 mg kg⁻¹ concentration against egg and larvae of *H. contortus*. The efficacy of EOCz and EOLs at 800 mg kg⁻¹ dosage was 11.6% and 46.3%, respectively, and the efficacy of EOLs at 1200 and 1600 mg kg⁻¹ dosages were 57.6% and 68.9%, respectively, against mice nematodes. In FERCT, 230 and 283 mg kg⁻¹ of OELs and 200 µg ivermectin efficacy were 30%, 54% and 39.6%, respectively, at 14th day after post-treatment. In controlled test, the efficacy of 283 mg kg⁻¹ of EOLs and ivermectin were 56.9% and 34.4%, respectively, against *Haemonchus* spp, and 39.3% and 63.6% against *Trichostrongylus* spp, respectively. The EOLs presented anthelmintic activity superior to EOCz against nematodes from mice and superior to ivermectin against sheep gastrointestinal nematodes.

Keywords: anthelmintic; *Haemonchus*, phytotherapy; essential oils; nematodes; sheep.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh = Acetilcolina

AFA = Álcool + Formol + Ácido acético

BZD = Benzimidazóis

CE50 = Concentração efetiva para inibir 50%

CIP = Controle Integrado de Parasitos

DMSO = Dimetilsulfóxido

EP = Erro Padrão

FECRT = Teste de redução na contagem de ovos nas fezes

FDA = Food and Drugs Administration

GABA = Gamma-aminobutyric acid (Ácido Gama-aminobutírico)

L1 = Larva de 1º estágio

L2 = Larva de 2º estágio

L3 = Larva de 3º estágio

LEV = Levamisol

OECz = Óleo Essencial de *Croton zehntneri*

OELs = Óleo Essencial de *Lippia sidoides*

OPG = Ovo Por Grama de Fezes

PADETEC = Parque de Desenvolvimento Tecnológico

TBZ = Tiabendazol

TME = Taxa Metabólica Específica

USA = United States of America

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de <i>C. zehntneri</i> e <i>L. sidoides</i>	51
Tabela 2. Percentagem média de eficácia \pm ep dos óleos essenciais de <i>C. zehntneri</i> e <i>L. sidoides</i> , anetol, timol e tiabendazol sobre a eclosão de ovos de <i>H. contortus</i>	52
Tabela 3. Percentagem média de eficácia \pm ep dos óleos essenciais de <i>C. zehntneri</i> e <i>L. sidoides</i> , anetol, timol e ivermectina sobre o desenvolvimento de larvas de <i>H. contortus</i>	53
Tabela 4. Concentração efetiva 50 dos óleos essenciais de <i>C. zehntneri</i> e <i>L. sidoides</i> , e de anetol e timol contra ovos e larvas de <i>H. contortus</i>	54
Tabela 5. Percentagem média de eficácia \pm ep dos óleos essenciais de <i>L. sidoides</i> e <i>C. zehntneri</i> sobre a carga parasitária de camundongos	54
Tabela 6. Percentagem média de eficácia \pm ep do óleo essencial de <i>L. sidoides</i> e ivermectina, baseada na redução da contagem de ovos nas fezes de ovinos.....	57
Tabela 7. Gêneros de nematóides gastrintestinais identificados em coproculturas de ovinos antes do teste de redução da contagem de ovos nas fezes.....	57
Tabela 8. Percentagem média de eficácia \pm ep do óleo essencial de <i>L. sidoides</i> e ivermectina e percentagem média de parasitos no grupo controle negativo no teste controlado com ovinos.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia de <i>Croton zehntneri</i>	36
Figura 2. Fotografia de <i>Lippia sidoides</i>	37
Figura 3. Fotografia do processo de extração de óleo essencial de plantas	41
Figura 4. Fotomicrografia de <i>Syphacia obvelata</i>, nematóide de camundongo.....	55
Figura 5. Fotomicrografia de <i>Aspicularis tetraptera</i>, nematóide de camundongo.....	56

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Artigo intitulado “Validação de plantas medicinais” publicado na Revista Brasileira de Plantas Medicinai.....	83
Anexo II. Artigo submetido ao periódico Veterinary Parasitology intitulado “Anthelmintic activity of <i>Croton zehntneri</i> and <i>Lippia sidoides</i> essential oils”.....	94

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ANEXOS	11
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
INFECCÕES POR NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS.....	16
ANTI-HELMÍNTICOS.....	18
PLANTAS MEDICINAIS E A PESQUISA CIENTÍFICA.....	23
Seleção e identificação de plantas medicinais.....	24
Estudos de validação de plantas com atividade anti-helmíntica.....	25
Testes de eficácia <i>in vitro</i>.....	25
Ensaio <i>in vitro</i> com <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	26
Ensaio <i>in vitro</i> com parasitos adultos.....	26
Teste com larvas de nematóides.....	27
Teste de inibição de eclosão de ovos.....	28
Testes de eficácia e segurança <i>in vivo</i>.....	29
Testes pré-clínicos de eficácia.....	29
Testes toxicológicos.....	30
Testes clínicos de eficácia.....	31
Teste de redução da contagem de ovos nas fezes	32
Teste controlado.....	33
<i>Croton zehntneri</i> e <i>Lippia sidoides</i>.....	35

JUSTIFICATIVA.....	38
HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	39
OBJETIVO GERAL.....	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
1. Coleta da planta.....	41
2. Obtenção de óleo essencial.....	41
3. Análise química dos óleos essenciais.....	42
4. Preparação do material para ser testado.....	42
5. Ovinos portadores e livres de infecção monoespecífica por <i>Haemonchus contortus</i> ...	43
6. Testes <i>in vitro</i>	44
6.1. Teste de inibição da eclosão de ovos.....	44
6.2. Teste de inibição de desenvolvimento larvar.....	45
7. Avaliação de atividade anti-helmíntica em camundongos.....	46
8. Avaliação da atividade anti-helmíntica do óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> sobre ovinos.....	47
8.1. Teste de atividade anti-helmíntica através de FECRT.....	47
8.2. Teste controlado.....	48
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÕES.....	63
PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

INTRODUÇÃO

A produção de ovinos e caprinos tem sido estimulada no Brasil na tentativa de garantir à população uma fonte de renda, além de fornecer carne e leite, fontes protéicas, que passam a fazer parte da dieta desta população. Entretanto, o parasitismo por nematóides gastrintestinais tem se apresentado como uma das principais causas de perdas econômicas para os produtores de pequenos ruminantes no Brasil e em outras partes do mundo (Girão *et al.*, 1992; Pinheiro *et al.*, 2000; Coop & Kyriazakis, 2001).

As perdas econômicas decorrentes da infecção por nematóides gastrintestinais são: redução na produtividade e no peso, além de altas mortalidades nos rebanhos de ovinos e caprinos na estação chuvosa (Pinheiro *et al.*, 2000; Githigia *et al.*, 2001). O controle vem sendo realizado através do uso de anti-helmínticos sintéticos, entretanto, este procedimento apresenta alguns problemas como altos custos, resíduos nos alimentos (Waller *et al.*, 1995; Herd, 1995), risco de contaminação ambiental (Hammond *et al.*, 1997), e o desenvolvimento de populações de nematóides resistentes a todas as classes de anti-helmínticos (Echevarria *et al.*, 1996; Vieira e Cavalcante, 1999; Melo *et al.*, 2003; Schnyder *et al.*, 2005; Sissay *et al.*, 2006). Por essas razões, a busca por alternativas para o controle dos nematóides gastrintestinais é de grande importância (Köhler, 2001).

Dentre as muitas alternativas que vêm sendo pesquisadas para o controle das helmintoses, podemos citar o estudo com plantas medicinais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 25% dos medicamentos modernos são oriundos de plantas que inicialmente eram usadas na medicina popular (WHO, 2003) e que entre 60 a 90% da população dos países não industrializados recorrem a plantas medicinais para solucionar seus problemas de saúde (Addae-Mensah, 2006). Além disto, a aceitação do mercado consumidor por alimentos orgânicos ou naturais e o aumento do consumo destes produtos têm reforçado o interesse pela busca de alternativas não químicas para o controle das diversas doenças em animais de produção (FASon line 2003).

Plantas tidas como medicinais foram investigadas quanto às suas propriedades contra vírus, bactérias, fungos e parasitos. Algumas plantas medicinais foram testadas quanto às suas propriedades anti-helmínticas com o objetivo de controlar endo e ectoparasitos em todo o mundo. Diversas pesquisas vêm sendo realizadas visando validar o uso de plantas popularmente conhecidas como medicinais, ou seja, é necessária a avaliação científica destas plantas a fim de assegurar a eficácia e a segurança da administração destas plantas ou de seus derivados em organismos vivos.

REVISÃO DE LITERATURA

1. INFECÇÕES POR NEMATÓIDES

Segundo dados do IBGE (2005), o rebanho brasileiro de ovinos foi de 15.057.838 e o rebanho caprino foi de 10.046.888 no ano de 2004. Neste mesmo período, o nordeste concentrou quase 93% do rebanho caprino brasileiro e o Ceará contava com quase 10% deste rebanho. Com relação ao rebanho ovino, o Ceará no ano de 2004 contou com 12% do rebanho nacional. Estes dados mostram a importância desta atividade para a balança econômica do Brasil e do Ceará.

Além de representar uma fonte de renda para a população do nordeste brasileiro, a produção de ovinos e caprinos fornece carne e leite para esta população e, portanto, a ovinocaprinocultura é uma atividade estimulada para melhorar as condições nutricionais de comunidades de baixa renda não só no Brasil, mas em vários países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Embora o nordeste seja o maior produtor de carne ovina e caprina no Brasil, o consumo de carnes ainda é superior à produção, sendo necessária a importação de carnes ovina e caprina para abastecimento nacional, indicando um mercado a ser conquistado através do aumento da produtividade dos nossos rebanhos.

No nordeste brasileiro, o principal fator apontado como causa de baixa produção de pequenos ruminantes é o estado sanitário dos animais associado à ausência ou ao uso inadequado de tecnologias (Vieira *et al.*, 1997). Em questionário aplicado em 127 propriedades no Ceará, Pinheiro *et al.* (2000) observaram que sintomas como anemia e edema de barbela foram relatados em 81,9% dos criatórios de caprinos. Vale ressaltar que tais sintomas são característicos das parasitoses causadas por nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos.

Infecções por nematóides gastrintestinais relatadas em pequenos ruminantes em vários países são incriminadas como causa de perdas da produção (Nginyi *et al.*, 2001; Githigia *et al.*, 2001; Gasbarre *et al.*, 2001; Papadopoulos *et al.*, 2003; Beriajaya e Coperman,

2006), além de alta mortalidade nos rebanhos durante a estação chuvosa (Girão *et al.*, 1992; Coop & Kyriazakis, 2001; Pinheiro *et al.*, 2000).

Haemonchus contortus é o nematóide gastrintestinal mais prevalente e mais patogênico de pequenos ruminantes em países de clima tropical (Soulsby, 1987). Este fato ocorre, também, na região nordestina do Brasil, onde a espécie *H. contortus* vem sendo relatada como a mais prevalente entre os nematóides gastrintestinais (Costa e Vieira, 1984; Charles *et al.*, 1989; Costa *et al.*, 1991; Arosemena *et al.*, 1999; Mattos *et al.*, 2005).

H. contortus, assim como outros nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes, possuem um ciclo evolutivo direto, apresentando uma fase parasitária e uma fase de vida livre meio (Vieira *et al.*, 1997). Resumidamente, os animais parasitados eliminam ovos nas fezes e as larvas de primeiro estágio eclodem no ambiente, se desenvolvem em larvas de segundo e terceiro estágio. As larvas de terceiro estágio são infectantes, e ao serem ingeridas no pasto passam por mais duas ecdises alcançando o estágio adulto. Após acasalamento as fêmeas eliminam ovos juntamente com as fezes (Soulsby, 1987).

Os principais impactos da infecção por *H. contortus* nos hospedeiros são anemia e perda progressiva de peso que podem causar danos à produtividade dos animais ou mortalidade em casos de altas infecções (Soulsby, 1987). Os mecanismos que envolvem as perdas na produtividade causadas por nematóides gastrintestinais incluem alterações no consumo de alimentos (Fox, 2006), na função gastrintestinal, no metabolismo protéico, energético e mineral, e na composição corpórea (Fox, 1993). Os custos com requerimentos extras protéicos e energéticos de ovinos Merinos infectados com nematóides foram avaliados em 6,5 g/dia para ovinos em manutenção e cerca de 9 g/dia para ovinos com ganho de 100 g/dia. O requerimento energético extra devido à infecção variou de 0,71 a 1,76 MJ/dia, dependendo do peso corporal e do ganho de peso. Os custos foram maiores em animais jovens, mostrando os efeitos prejudiciais de infecções por nematóides nestes animais (Liu *et al.*, 2005).

Atualmente, o controle de nematóides gastrintestinais é realizado através de estratégias de manejo, da utilização de animais geneticamente selecionados para resistência e uso de anti-helmínticos.

Diversas estratégias têm sido estudadas no sentido de promover métodos que auxiliem no controle dos nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Desta forma, o Controle Integrado de parasitos (CIP) é a adoção combinada de métodos que utilizam anti-helmínticos com métodos que não utilizam estes produtos e tem a finalidade de manter níveis aceitáveis de infecção em animais de produção. Este controle vem sendo cada vez mais difundido, e no sentido de melhorar a eficiência do CIP, a EMBRAPA/CNPC recomenda a adoção das seguintes medidas (Vieira, 2003): manejo de pastagem; aplicações de medidas de higiene que visem diminuir a contaminação dos animais, como limpeza e desinfecção das instalações, manutenção de fezes em locais distantes dos animais; separação dos animais por faixa etária; não introdução no rebanho de animais provenientes de outras propriedades sem que estes sejam vermifugados, e manutenção no aprisco por no mínimo 12 horas após a vermifugação.

2. ANTI-HELMÍNTICOS

Devido à sua natureza macroscópica, os nematóides estão provavelmente entre os primeiros organismos infecciosos para os quais medidas de intervenção terapêuticas foram criadas. A medicina veterinária contava apenas com medicamentos naturais para o controle de nematóides até o meio do século 20, quando químicos sintéticos foram lançados no mercado proporcionando maior eficácia e confiabilidade nos resultados (Reinemeyer e Courtney 2001).

Após a segunda guerra mundial, com o surgimento dos primeiros antibióticos e o maior desenvolvimento da indústria farmacêutica, a descoberta de muitas drogas e componentes ativos contra os agentes causadores de doenças, contribuiu para um grande avanço no controle de diversas enfermidades. Durante anos, a pesquisa científica esteve envolvida com a procura de novas moléculas capazes de controlar ou combater parasitos ou agentes causadores de doenças e, por conseguinte, a utilização de drogas cada vez mais potentes foi tornando-se uma prática comum na medicina humana e veterinária (Reinemeyer e Courtney, 2001).

A fenotiazina foi a primeira droga a ser utilizada no controle dos nematóides, tendo surgido após 1930, e somente na década de 50 foi lançado o composto tiabendazol, primeiro anti-helmíntico do grupo dos benzimidazóis (Urquhart *et al.*, 1996; Reinemeyer e Courtney, 2001). Os imidotiazóis e as tetrahidropirimidinas surgiram após 1966. Os organosfosforados eram usados como pesticidas e somente após 1966, passaram a ser utilizados como anti-helmínticos. As últimas drogas a serem descobertas contra nematóides foram as lactonas macrocíclicas representadas pelas avermectinas e milbemicinas (Reinemeyer e Courtney, 2001).

BENZIMIDAZÓIS

A introdução do tiabendazol no início dos anos 50 marcou o início da era moderna dos anti-helmínticos de largo espectro, seguros e eficazes contra uma ampla variedade de nematóides parasitos e de administração versátil. O TBZ foi extensivamente usado em uma ampla variedade de hospedeiros (ovinos, bovinos, caprinos, suínos, cavalos, aves e humanos). O TBZ pode ser administrado em uma única dose terapêutica ou profilaticamente em doses menores na alimentação por períodos mais longos. Além do amplo espectro de ação, tem propriedade ovicida e larvicida (Reinemeyer e Courtney, 2001).

Baseado no sucesso do TBZ, programas extensivos foram lançados para modificá-los e desenvolver drogas estruturalmente relacionadas com propriedades melhoradas. De centenas de compostos sintetizados, os selecionados para desenvolvimento posterior com base especialmente na segurança e eficácia incluem: albendazol, cambendazol, fenbendazol, flubendazole, mebendazole, oxfendazole, oxibendazole, parbendazole e tiofanato (Reinemeyer e Courtney, 2001).

Os BZD atuam primariamente ligando-se à sub-unidade de β -tubulina impedindo a sua polimerização nos microtúbulos que são unidades estruturais essenciais de muitas organelas, necessárias para numerosos processos celulares, incluindo mitose, codificação de proteínas e metabolismo energético (Martin *et al.*, 1998; Köhler, 2001; Ross, 1997). Os mamíferos, também, contam com a tubulina para o metabolismo celular, porém os BZD têm uma maior afinidade pela tubulina dos nematóides em condições normais de temperatura

corpórea dos mamíferos. Isto explica a sua ação seletiva em animais domésticos (Rang *et al.*, 1996).

As propriedades ovicida e larvicida dos BZD têm levado ao desenvolvimento de ensaios *in vitro* de eclosão de ovos para detecção de populações de nematóides que sejam resistentes aos compostos BZD. Nestes ensaios, ovos de nematóides resistentes são capazes de desenvolver-se e eclodir na presença de altas concentrações de BZD solúveis (Reinemeyer e Courtney, 2001).

IMIDOTIAZÓIS

Um dos principais representantes deste grupo é o levamisol, uma droga nematodocida com variável espectro de atividade em numerosos hospedeiros (ovinos, bovinos, suínos, cavalos, galinhas, cães). O LEV atua sobre estágios adultos de nematóides gastrintestinais de ruminantes. É aprovado e comercializado nos USA somente para uso em bovinos, ovinos e suínos. A maior vantagem do LEV é sua eficácia contra nematóides parasitos de pulmões e trato gastrintestinal, e suas vias opcionais de administração (Urquhart *et al.*, 1996; Reinemeyer e Courtney, 2001).

O LEV é comercializado sob duas formas: sal de hidrocloreto ou sal fosfato. O LEV hidrocloreto é um composto cristalino branco, altamente solúvel em água. Esta solubilidade facilita a formulação de solução injetável e dosificação estável, sendo formulado para administração oral, intra-ruminal, parenteral, *pour-on*, cápsulas de liberação lenta ou como aditivo na ração (Lanusse, 1996). Embora possa existir absorção através do epitélio ruminal, o principal local de absorção do levamisol é o trato gastrintestinal superior (Lanusse, 1996). A absorção e excreção do LEV são rápidas, após a administração oral, sendo 40% excretado na urina em 12 horas (Lanusse, 1996; Rang *et al.*, 1996).

O LEV é um agente bloqueador neuromuscular despolarizante tanto em nematóides como nos hospedeiros e apresentam uma margem estreita de segurança em relação a compostos de outros grupos (Urquhart *et al.*, 1996). O hidrocloreto de LEV é um agonista

colinérgico direto que paralisa nematóides pela sustentação da contração muscular, ou seja, provoca uma paralisia espástica nos nematóides (Martin *et al.*, 1998; Köhler, 2001).

TETRAIDROPIRIMIDINAS: PIRANTEL

O pirantel foi introduzido como anti-helmíntico de amplo espectro em 1966, inicialmente para uso contra nematóides do trato gastrointestinal parasitos de ovinos, e subsequentemente foi desenvolvido para uso em bovinos, suínos, cavalos, cães e gatos. Foi aprovado pelo FDA para todas as espécies acima exceto para bovinos.

O pirantel é um derivado do imidotiazol e é preparado para uso comercial como sal de tartarato ou pamoato. O pirantel formado com sal de pamoato é hidrossolúvel e de baixa absorção gastrointestinal em ruminantes. Tanto o pirantel como o morantel são fármacos muito polares, de baixa absorção gastrointestinal em ruminantes, e são eliminados sem modificações metabólicas através das fezes (Lanusse, 1996; Martin *et al.*, 1997; Reinemeyer e Courtney, 2001).

Os efeitos do pirantel no hospedeiro são similares aos efeitos do LEV. O pirantel é um agente despolarizante bloqueador neuromuscular em nematóides e hospedeiros vertebrados (Range *et al.*, 1996; Rayes *et al.*, 2001; Köhler, 2001). A droga produz paralisia dos parasitos causando contratura da musculatura similar à ação da ACh. Pirantel e morantel são 100 vezes mais potentes que a ACh embora mais lentos no início da contração. O efeito da ACh é facilmente reversível, porém não do pirantel e morantel (Reinemeyer e Courtney, 2001).

O pirantel e o morantel são fármacos de baixa absorção gastrointestinal em ruminantes e elevada eliminação fecal, principalmente na forma não modificada (Lanusse, 1996; Reinemeyer e Courtney, 2001).

AVERMECTINAS/MILBEMICINAS

Os compostos deste grupo são derivados macrocíclicos da lactona que são produtos da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermitilis*. Os fármacos deste grupo são conhecidos como endectocidas e são divididos em duas famílias: avermectinas e milbemicinas (Shoop *et al.*, 1995; Lanusse, 1996; Reinemeyer e Courtney, 2001). Os compostos endectocidas são fármacos antiparasitários de amplo espectro eficientes contra nematóides e artrópodes (Lanusse, 1996). Estes compostos são drogas antiparasitárias extremamente potentes, demonstrando ter excelente atividade, em doses muito baixas, contra uma ampla variedade de nematóides (Shoop *et al.*, 1995). Algumas drogas deste grupo podem permanecer ativas durante no mínimo duas semanas após a administração graças à persistência no tecido adiposo corpóreo. Afetam os canais de cloro, independentemente do GABA, resultando em paralisia e eventual morte do parasito (Martin *et al.*, 1997; Köhler, 2001; Rang *et al.*, 1996; Forrester *et al.*, 2004).

Durante a última metade do século, as drogas nematocidas têm passado por rápida expansão e melhoramentos. Esta classe de drogas deixou de ser uma coleção de compostos relativamente inseguros com eficácia modesta contra espectro limitado de parasitos. Compostos anti-nematóides modernos com o passar dos tempos constituíram um arsenal com um amplo índice terapêutico, eficácias que se aproximam de 100% e excelente atividade se administrado oralmente, parenteralmente ou topicamente. Além disto, muitos compostos passaram a oferecer proteção persistente de re-infecção por várias semanas após tratamento, e alguns não apresentam período de suspensão para o consumo após tratamento (Reinemeyer e Courtney, 2001). Entretanto, apesar da engenharia molecular ter avançado obtendo recursos que podem ser utilizados para diagnósticos mais precisos e a indústria farmacêutica contar com drogas verdadeiramente notáveis que exibem excelente padrão de desenvolvimento farmacêutico, este grupo profilático ou terapêutico necessita de uma diversidade química maior.

As drogas usadas contra nematóides disponíveis para muitos hospedeiros pertencem a somente poucas classes químicas. Desta forma, o número de alternativas terapêuticas e profiláticas é limitado e a resistência anti-helmíntica tem sido descrita como o

maior desafio para o controle de parasitos neste milênio (Reinemeyer e Courtney, 2001; Prichard, 1994). O desenvolvimento de populações de nematóides resistentes a anti-helmínticos tem sido descrito desde os anos 60 e foi, inicialmente, relacionado aos compostos benzimidazóis. Desde então, relatos sobre resistência anti-helmíntica têm sido descritos em vários países e a todas as classes de produtos sintéticos disponíveis comercialmente (Donald *et al.*, 1980; Gill *et al.*, 1998; Le Jambre *et al.*, 1999; Schnyder *et al.*, 2005; Sissay *et al.*, 2006). No Brasil, especificamente no nordeste brasileiro, a resistência a anti-helmínticos vem sendo relatada à ivermectina, levamisóis e benzimidazóis (Echevarria *et al.*, 1991; Echevarria *et al.*, 1996; Melo *et al.*, 1998 e 2003; Vieira e Cavalcante, 1999).

Os compostos anti-helmínticos devem ser respeitados como recursos preciosos para serem usados frugalmente e estrategicamente, porque o uso excessivo de qualquer ferramenta pode torná-la fraca ou sem efeito. É importante salientar que, para a indústria farmacêutica, a busca por novas moléculas anti-helmínticas que venham a colaborar com o rodízio com as atuais drogas é um processo difícil, oneroso e uma possibilidade considerada remota nos próximos anos (Hennessy, 1997), portanto a pesquisa de formas alternativas para o controle das nematodioses gastrintestinais torna-se imprescindível.

3. PLANTAS MEDICINAIS

O contexto social moderno, as necessidades do mercado farmacêutico e o reconhecimento que pesquisas com plantas medicinais usadas na medicina popular representam uma abordagem compatível com o desenvolvimento de novas drogas levaram a um aumento do número de publicações neste campo, em virtude do reconhecimento da importância desta área de estudo por parte das instituições privadas ou governamentais (Rates, 2001).

A utilização de plantas no tratamento de diversas enfermidades infecciosas ou não, é uma prática que foi bastante usada por nossos antepassados, principalmente em épocas de inexistência de produtos farmacêuticos mais avançados. O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto é a civilização humana e, por um longo tempo, produtos minerais, de plantas e animais foram as principais fontes de drogas (Rates, 2001).

Entretanto, a total aceitação de drogas derivadas de plantas e a utilização da fitoterapia na medicina científica só ocorrerão se estes produtos cumprirem os mesmos critérios de eficácia, segurança e controle de qualidade que os produtos sintéticos (Rates, 2001), ou seja, os produtos derivados de plantas devem ter eficácia avaliada e confirmada, assim como deve ser garantida que sua administração a organismos vivos ocorra sem riscos para sua saúde.

SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

A primeira etapa no processo de validação científica é a seleção de plantas feita através de levantamento de literatura ou diretamente nas comunidades que fazem uso popular destas plantas, por meio da aplicação de questionários ou entrevistas. Nesta pesquisa, todos os dados referentes à utilização das plantas devem ser considerados, tais como forma de preparo, dose, forma e frequência de administração, etc.

Após a escolha da planta medicinal a ser estudada, é feito um levantamento dos dados botânicos da espécie de planta. Este levantamento inclui identificação botânica e dados sobre o uso popular, ou seja, parte da planta a ser utilizada, forma de administração, dosagens, tempo de tratamento, etc. As informações sobre o uso popular das plantas podem ser obtidas através de fontes de pesquisas ou diretamente nas comunidades que fazem uso de plantas medicinais.

Um problema muito comum na pesquisa de atividade medicinal é que mesmo simples extratos ou outros produtos derivados de plantas podem conter uma mistura de vários compostos que estão sujeitos à variação de concentração de acordo com mudanças ambientais (Taylor *et al.*, 2001). Com relação a este aspecto o óleo essencial de *C. zehntneri* coletado em Viçosa do Ceará foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, apresentando 82,55% de anetol e 3,52% de estragol, sendo portanto denominado variedade anetol (Luciano e Morais, 2000). Em outros relatos, Sousa *et al.* (2005) e Siqueira *et al.* (2006) avaliaram diferentes amostras do óleo essencial de *C. zehntneri* obtido a partir de

partes aéreas coletadas na região de Viçosa do Ceará, e as amostras apresentaram 73,6% e 42,09% de anetol; e 2,52% e 45,95% de estragol, respectivamente. Recente estudo sobre os efeitos larvicidas dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *L. sidoides* e *Syzigium aromaticum* sobre larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* revelou que seus principais constituintes foram cineol (24,3%), timol (43,5%) e eugenol (80,8%), respectivamente (Costa *et al.*, 2005). Entretanto, a atividade do óleo essencial de *L. sidoides* sobre larvas de *A. aegypti*, apresentou 73,1% de timol (Furtado *et al.*, 2005). Silva *et al.* (1999) demonstraram que a composição química do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* pode variar de acordo com o horário de coleta da planta, e as maiores concentrações de eugenol foram obtidas às 11 e 13 horas do dia e as menores concentrações nos horários de 8 horas e 17 horas. Esta informação é de fundamental importância, e pode contribuir com o processo de coleta e padronização da extração de óleo essencial da planta.

ESTUDOS DE VALIDAÇÃO DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA

Estudos de validação envolvem testes que determinam a eficácia contra os agentes causadores da enfermidade a ser combatida e a segurança de administração para a espécie a ser tratada. Nesta fase, são realizados os testes farmacológicos pré-clínicos e clínicos. Os testes pré-clínicos são realizados *in vitro* e em animais de laboratório com o objetivo de avaliar a eficácia desejada e determinar a toxicidade do produto em estudo. Os testes clínicos realizados na espécie alvo possibilitam a determinação final de eficácia e toxicidade da planta ou produto a ser utilizado.

TESTES DE EFICÁCIA *in vitro*

A maior parte dos campos da quimioterapia possui sistemas de testes *in vitro* que permitem prever com acurácia as concentrações ideais das drogas para obtenção da eficácia *in vivo*. Por exemplo, através da sobrevivência de bactérias em culturas expostas às drogas é possível determinar a concentração necessária em tecidos ou sangue para o sucesso terapêutico. Como os nematóides são o alvo primário para as drogas anti-helmínticas, a maior

parte das tentativas têm sido feitas sobre estas formas. Assim sendo, os sistemas primários desenvolvidos incluem as culturas do nematóide de vida livre *Caenorhabditis elegans* e os estágios larvares e ovos de nematóides (Geary *et al.*, 1999).

Os testes *in vitro* servem como uma indicação inicial da atividade que está sendo pesquisada, e quando utilizados em uma triagem de extratos de plantas, permitem selecionar aqueles que apresentam melhores resultados, diminuindo gastos, evitando perda de tempo e uso indiscriminado de animais de experimentação.

ENSAIOS *in vitro* COM *Caenorhabditis elegans*

Aparentemente é fácil detectar os efeitos de drogas nas culturas de *C. elegans*, através do monitoramento do comportamento, sobrevivência e/ou reprodução. As drogas que reduzem a motilidade ou sobrevivência, tais como levamisol e a classe das lactonas macrocíclicas podem ser detectadas nestas culturas em baixas concentrações (McGraw *et al.*, 2005). No entanto, as correlações não são universais. Morantel e pirantel que possuem modo de ação similar ao levamisol nos receptores da acetilcolina (Martin *et al.*, 1997) são 50 a 100 vezes menos potentes do que o levamisol, respectivamente, contra *C. elegans* (Simpkin & Coles, 1981). Este sistema quase sempre pode ser usado para manipular anti-helmínticos conhecidos, mas é pouco adequado para caracterizar o potencial de novos compostos com mecanismos de ação desconhecidos (Geary *et al.*, 1999)

ENSAIOS *in vitro* COM PARASITOS ADULTOS

Os nematóides parasitos não podem ser desenvolvidos em culturas contínuas desde a oviposição até o estágio adulto. A possibilidade de cultivar parasitos no laboratório fora do hospedeiro seria de enorme utilidade para os estudos de biologia básica destes organismos e para os efeitos de drogas, logo a ausência de um sistema de cultura adequado é o maior impedimento para estas pesquisas. Como o estágio adulto é o principal alvo dos anti-

helmínticos o ideal seria determinar o potencial das drogas sobre estas formas. Nos sistemas disponíveis atualmente para manutenção de adultos em cultura, após o isolamento do hospedeiro, a viabilidade decresce inevitavelmente, complicando a interpretação dos testes de toxicidade de drogas (Geary *et al.*, 1999)

TESTES REALIZADOS COM LARVAS DE NEMATÓIDES

Vários ensaios anti-helmínticos foram desenvolvidos para larvas de nematóides parasitos, sendo o teste de desenvolvimento larvar o mais amplamente utilizado, possui numerosas variações. A origem deste teste está no conhecimento de que pequenas concentrações de anti-helmínticos de amplo espectro afetam a eclosão, desenvolvimento ou motilidade de nematóides (Taylor *et al.*, 2002; Coles *et al.*, 2006). Usando esta abordagem, a técnica de paralisia ou motilidade larvar foi desenvolvida para detectar a resistência ao levamisol e morantel (Martin & Le Jambre, 1979). Neste ensaio, larvas infectantes são incubadas por 24 horas em diluições em série com a substância a ser testada. Após este tempo a percentagem de larvas paralisadas ou imóveis é determinada para cada concentração. Apesar da facilidade de execução, o teste de motilidade larvar pode ser subjetivo e existe a possibilidade de gerar erros de avaliação, pois a larva pode apresentar-se imóvel ou em movimento em diferentes momentos da leitura. Outra técnica que pode ser utilizada para triagem de plantas com atividade anti-helmíntica é a técnica de desenvolvimento larvar elaborada por Hubert & Kerboeuf (1992). Esta técnica foi desenvolvida para detecção de nematóides resistentes e utiliza um meio de cultura para a obtenção de larvas infectantes a partir de ovos recuperados nas fezes. A técnica de Roberts & O'Sullivan (1950) foi elaborada com a finalidade de identificar em nível de gênero as larvas infectantes de nematóides gastrintestinais, como teste complementar ao OPG. Uma modificação desta técnica permite a realização do teste de desenvolvimento larvar simplificada. Assim sendo ovos recuperados de animais infectados são colocados para incubação em fezes de animais livres de nematóides. Após 48 h de incubação, adicionam-se os extratos a serem testados e após sete dias, é feita a contagem das larvas. Os resultados são comparados a grupos não tratados e tratados com droga padrão.

Em estudo realizado com larvas de *H. contortus*, Batista *et al.* (1999) demonstraram que os extratos aquosos de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* apresentaram ação paralisante sobre este parasito. Enquanto, Assis *et al.* (2003) utilizaram o desenvolvimento larvar para testar o extrato acetato de etila de *S. anthelmia* que inibiu 81,2% das larvas de *H. contortus* e *Annona senegalensis* inibiu 92,2% do desenvolvimento de larvas de *H. contortus* (Alawa *et al.*, 2003). A técnica de desenvolvimento larvar descrita por Roberts & O'Sullivan (1950) foi utilizada para avaliar os efeitos de diferentes extratos de *Melia azedarach* sobre larvas de *H. contortus*, e os melhores resultados foram obtidos com o extrato etanólico das folhas (Maciel *et al.*, 2006).

TESTE DE INIBIÇÃO DE ECLOSÃO DE OVOS

Este teste é realizado com ovos de nematóides coletados a partir de fezes de animais portadores de infecções experimentais ou naturais. No caso de infecções experimentais, deseja-se conhecer a atividade de um produto contra um parasito específico ou contra infecções mistas. Este teste foi desenvolvido para avaliação da resistência anti-helmíntica em nematóides gastrintestinais (Coles *et al.*, 1992) e, atualmente, é amplamente utilizado para avaliação do potencial anti-helmíntico de plantas. O tiabendazol é usado no teste de eclosão de ovos para levantamentos, porém outros benzimidazóis podem ser usados como propostas de pesquisas (Coles *et al.*, 1992), entretanto, os benzimidazóis são pouco solúveis o que dificulta o seu uso.

A coleta de fezes para o teste é realizada diretamente do reto do animal para que não ocorra contaminação por nematóides de vida livre. Os ovos nas fezes embrionam rapidamente e, no máximo, 48 horas após a coleta, o seu desenvolvimento e eclosão podem ser observados ao microscópio. Os ovos recuperados de animais infectados são colocados em placas ou tubos para incubação. Adicionam-se os extratos ou frações da planta a ser avaliada em diferentes concentrações, e após incubação é feita a contagem de larvas eclodidas e ovos. Os resultados são comparados com o grupo controle negativo. A adição de uma substância aos ovos recentemente coletados permite avaliar seu efeito sobre as mitoses (Coles *et al.*, 1992). Neste teste, podem ser utilizados controles positivos, com drogas padrão, para comparar o percentual de eficácia do produto natural em relação ao sintético.

Recentes triagens realizadas com plantas do nordeste têm demonstrado que algumas plantas têm potencial para uso como anti-helmíntico. Menezes *et al.* (1992) avaliaram o efeito de quatro leguminosas sobre fezes de animais infectados experimentalmente, observando que *Dioclea grandiflora* e *Canavalia brasiliensis* inibiram 87,4 e 95,7% do desenvolvimento das larvas infectantes de *H. contortus*. Os extratos aquosos de *S. anthelmia* e *M. charantia* inibiram o desenvolvimento de ovos de *H. contortus* (Batista *et al.*, 1999). O óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e seu principal constituinte, eugenol, inibiram 100% da eclosão de ovos de *H. contortus* na concentração de 0,5% (Pessoa *et al.*, 2002). A comparação entre os extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico de *S. anthelmia* demonstrou que o extrato acetato de etila apresentou os melhores resultados inibindo 100% da eclosão de ovos de *H. contortus* na concentração de 50 mg mL⁻¹ (Assis *et al.*, 2003). A avaliação dos efeitos de *Vernonia amygdalina* e *Annona senegalensis* sobre ovos de *H. contortus* demonstrou que somente *A. senegalensis* demonstrou inibição da eclosão de ovos em 88,5% (Alawa *et al.*, 2003). Os efeitos de diferentes extratos de *M. azedarach* sobre ovos de *H. contortus* demonstraram que os melhores resultados foram obtidos com o extrato etanólico das sementes (Maciel *et al.*, 2006).

TESTES DE EFICÁCIA E DE SEGURANÇA *in vivo*

Somente após a obtenção de resultados promissores com os testes *in vitro*, passa-se aos testes *in vivo* que podem utilizar inicialmente animais de laboratório e, em seguida, os testes toxicológicos. Depois desta primeira etapa, podem ser realizados os testes com animais que representem a espécie alvo para a indicação terapêutica.

TESTES PRÉ-CLÍNICOS DE EFICÁCIA

São denominados pré-clínicos, os testes de eficácia com animais de laboratório. Os testes pré-clínicos para determinação de eficácia anti-helmíntica de um produto natural são realizados em animais infectados experimentalmente ou com infecção natural. Os resultados dos grupos tratados são comparados, percentualmente, com os resultados obtidos em grupos

não tratados e em grupos tratados com drogas sintéticas. Animais de laboratório têm sido de grande ajuda para testar plantas com propriedades medicinais. Camundongos e ratos albergando parasitos intestinais são usados em ensaios preliminares para determinar atividade anti-helmíntica de produtos. Os nematóides de maior ocorrência em infecções de camundongos mantidos em laboratórios no Brasil foram *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera* (Bressan *et al.*, 1997; Bazzano *et al.*, 2002; Scaini *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005).

Amorim *et al.* (1987) testaram o efeito de nove plantas em camundongos infectados com os nematóides do intestino grosso, *S. obvelata* e *A. tetraptera*, e o melhor resultado foi obtido com *Tynnanthus fasciculatus* que apresentou eficácia de 57,2%. Por outro lado, *Ficus insipida* e *Ficus carica* não demonstraram eficácia na redução da carga parasitária sobre os mesmos nematóides (Amorim *et al.*, 1999). O suco e o infuso de *Chenopodium ambrosioides* apresentaram eficácia abaixo de 20% na eliminação de *A. tetraptera* e *S. obvelata* em camundongos (Borba e Amorim, 2004). Da mesma forma o extrato aquoso de *Albizia anthelmintica* administrado a camundongos infectados com *Heligmosomoides polygyrus*, parasito do intestino delgado, não produziu efeitos significantes na contagem de ovos ou na carga parasitária dos animais (Githiori *et al.*, 2003).

TESTES TOXICOLÓGICOS

A toxicologia experimental desenvolve estudos para elucidação dos mecanismos de ação dos agentes tóxicos sobre sistemas biológicos e a avaliação dos efeitos decorrentes dessa ação (Oga e Siqueira, 2003). Os estudos toxicológicos, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos decorrentes da exposição a determinadas substâncias (Barros & Davino, 2003).

A avaliação toxicológica de produtos em organismos vivos pode envolver a avaliação dos efeitos obtidos após 24 horas da administração (toxicidade aguda) ou após administrações em doses repetidas (toxicidade sub-crônica e crônica). Outros estudos como toxicidade reprodutiva, estudos de efeitos neurotóxicos e/ou teratogênicos e estudos de efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos podem fazer parte de uma avaliação mais detalhada dos

efeitos da administração de fitoterápicos em animais. No Brasil, a resolução 1/78 (D.O. 17/10/78) do Conselho Nacional de Saúde estabelece os seguintes tipos de ensaios de toxicidade: aguda, sub-aguda (sub-crônica), crônica, teratologia, embriotoxicidade e estudos especiais, carcinogênicos, mutagênicos e neurotóxicos.

Após determinação de eficácia *in vitro* do extrato acetato de etila de *S. anthelmia* sobre ovos e larvas de *H. contortus*, este extrato foi selecionado para estudo toxicológico em animais de laboratório. O extrato acetato de etila de *S. anthelmia* apresentou DL50 de 345,9 mg kg⁻¹ por via oral em camundongos (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2004) e não demonstrou toxicidade sistêmica significativa em administrações orais durante 30 e 60 dias em ratos (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2005). Fontenelle (2005) avaliou a toxicidade aguda dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *C. zehntneri* verificando que estes óleos administrados por via oral não apresentaram qualquer toxicidade até 3 g kg⁻¹. Assim sendo, a determinação da toxicidade auxilia na escolha das doses a serem usadas nos testes *in vivo*, portanto são de fundamental importância na validação de plantas medicinais.

TESTES CLÍNICOS DE EFICÁCIA

Os testes de eficácia com a espécie alvo devem ser os últimos testes a serem realizados numa pesquisa sobre atividade de plantas medicinais. Alguns testes foram desenvolvidos para avaliar a resistência aos anti-helmínticos disponíveis no mercado e vêm sendo utilizados para determinar a eficácia de drogas contra nematóides.

A atividade anti-helmíntica de produtos em pequenos ruminantes pode ser avaliada pelo teste de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) conforme recomendado por Coles *et al.* (1992) ou pelo teste controlado como recomendado por Wood *et al.* (1995).

TESTE DE REDUÇÃO DA CONTAGEM DE OVOS NAS FEZES

O FECRT fornece uma estimativa da eficácia anti-helmíntica de uma substância através da comparação da contagem de ovos eliminados nas fezes antes e após o tratamento (Coles *et al.*, 1992).

Os procedimentos e exigências para realização do FERCT foram descritos por Coles *et al.* (1992) e serão citados a seguir:

1. Usar animais jovens, 3-6 meses de idade, ou animais mais velhos com contagem de opg acima de 150 e sem tratamento num período prévio de 8 a 12 semanas.
2. Os animais devem ser distribuídos aleatoriamente ou pelo OPG nos grupos de tratamento e controle negativo.
3. Os animais do grupo controle positivo devem ser tratados com anti-helmíntico conforme recomendação do fabricante.
4. Os animais dos grupos de tratamento devem, também, receber a dose dos produtos a serem testados conforme peso corporal.
5. Amostras de fezes devem ser coletadas diretamente do reto do animal e levadas ao laboratório para contagem de ovos nas fezes utilizando o método de McMaster modificado e, se possível, para realização de larvacultura para identificação do gênero dos nematóides.
6. A coleta das fezes para análise deve ser feita, no mínimo, até 10 a 14 dias após tratamento.

Com relação ao número de animais nos grupos experimentais, Coles *et al.* (1992) recomenda 15 animais por grupo, entretanto Vercruysse *et al.* (2001) relataram que, em casos de pesquisa, o experimento pode contar com no mínimo seis animais por grupo.

Para análise dos dados, calcula-se a média aritmética, percentagem de redução e intervalo de confiança de 95%. Para Coles *et al.* (1992), a média aritmética é preferível à média geométrica porque é mais fácil de calcular, fornece uma melhor estimativa da postura de ovos dos parasitos, e é uma medida mais conservadora da eficácia anti-helmíntica.

A percentagem de redução pode ser calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução} = 100 (1 - \text{Média de T} / \text{Média de C})$$

Onde, T é o grupo tratado e C é o grupo controle.

A análise estatística do estudo é um procedimento de dois estágios. As recomendações para aprovação de produtos anti-helmínticos são baseadas nas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle e tratado, e no cálculo da percentagem de eficácia de 90% ou mais (Vercruysse *et al.*, 2001) ou 95% (Coles *et al.*, 1992).

Várias plantas ou extratos obtiveram bons resultados na redução do OPG, como o extrato aquoso de *Albizia anthelmintica* que obteve redução de 70% (Githiori *et al.*, 2003); o extrato aquoso bruto de *Artemisia brevifolia* reduziu em 67,2% a contagem de ovos nas fezes (Iqbal *et al.*, 2004); os efeitos de medicamentos anti-helmínticos preparados com as plantas *Myrsine africana*, *A. anthelmintica* e *Hilderbrandia sepalosa* produziram eficácia de 77%, 89,8% e 90%, respectivamente (Gathuma *et al.*, 2004); o extrato etanólico de *Khaya senegalensis* reduziu em 88% a contagem de ovos nas fezes de ovinos (Ademola *et al.*, 2004); a atividade anti-helmíntica de *Calotropis procera* avaliada em ovinos diminuiu 88,4% a contagem de ovos nas fezes (Iqbal *et al.*, 2005); sementes de *Butea monosperma* obtiveram eficácia de 78,4% através da contagem dos ovos por grama de fezes (Iqbal *et al.*, 2006a); o extrato aquoso do rizoma de *Zingiber officinale* exibiu um decréscimo de 66,6% no OPG (Iqbal *et al.*, 2006b).

TESTE CONTROLADO

Em relação ao FECRT, o teste controlado é um teste mais dispendioso em termos de requerimentos de mão-de-obra e de animais (Taylor *et al.*, 2002), porém é mais confiável, sendo recomendado para triagens de titulações de doses ou de confirmação de dose (Wood *et al.*, 1995). A determinação da eficácia anti-helmíntica no teste controlado é feita comparando-se as cargas parasitárias nos grupos tratados em relação ao grupo não tratado (Wood *et al.*, 1995). Com relação ao teste controlado a “World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.)” preconiza as recomendações e procedimentos abaixo (Wood *et al.*, 1995):

1. A afirmação de eficácia de um produto deve ser expressa contra cada gênero/espécie (larva/adulto) como: altamente eficaz (acima de 98%), eficaz (90-98%), moderadamente eficaz (80-89%) ou insuficientemente ativo (menos de 80%);

2. As doses devem ser baseadas no peso corporal;
3. O conhecimento do modo de ação de um produto não é um requerimento exigido para registro. Entretanto pode ser útil para estabelecer se o produto poderá ser eficaz contra populações resistentes de parasitos;
4. A distribuição dos animais nos grupos deve ser feita ao acaso, entretanto quando usadas infecções naturalmente adquiridas, uma maior uniformidade pode ser atingida se a contagem de ovos nas fezes ou larvas de parasitos for usada como critério de infecção;
5. Com relação ao procedimento de tratamento, um fator essencial é garantir que cada animal receba uma dose adequada, portanto os seguintes procedimentos visam minimizar erros experimentais:
 - horário de tratamento: dispensar tempo adequado para os tratamentos, evitando pressa;
 - identificação do animal antes do início de cada tratamento;
 - calibragem do equipamento de dosificação dos animais;
 - a pesagem dos animais deve ser feita no máximo dois dias antes dos tratamentos e não no dia dos tratamentos para evitar confusão com muitas tarefas;
 - o cálculo das doses dos tratamentos deve ser feito baseado no peso corporal dos animais, e deve ser feito antes da hora do tratamento;
 - checagem cautelosa da identificação dos animais antes dos tratamentos para evitar erros de administração;
 - observações pós-tratamentos devem ser feitas por pelo menos 4 h, e depois diariamente para detectar possíveis efeitos adversos.

O intervalo entre os tratamentos e o procedimento das necropsias varia em função da farmacocinética e/ou persistência, e para produtos orais que atingem níveis terapêuticos rapidamente e/ou possuem pouca ou nenhuma atividade persistente, a necropsia deve ser feita 4 a 7 dias após o tratamento contra nematóides adultos (Wood *et al.*, 1995). Quando a necropsia de todos os animais não pode ser completada em 1 dia, réplica ou um número igual de animais de cada grupo de tratamento deve ser examinado, diariamente e tão rápido quanto possível, preferivelmente dentro de 3-4 dias (Wood *et al.*, 1995).

A eficácia dos tratamentos é expressa como a percentagem de eficácia (% E) da dose contra uma determinada espécie de parasito (S) em um único grupo de tratamento (T)

quando comparado com o controle não tratado (C), dado pela seguinte fórmula (Wood *et al.*, 1995):

$$(\% E) = \frac{\text{Média de S em C} - \text{Média de S em T}}{\text{Média de S em C}} \times 100$$

No teste controlado, a média geométrica deve ser usada uma vez que representa com maior exatidão a distribuição da população de nematóides dentro de um grupo de animais e fornece uma indicação mais precisa do grau de eficácia do produto analisado (Wood *et al.*, 1995).

Com relação à análise estatística, para animais com infecções naturalmente adquiridas, a análise não-paramétrica pode ser mais apropriada uma vez que as populações estão normalmente distorcidas. O nível de significância, comumente aceito, é aquele em que a significância ocorre com $P < 0,05$ (Wood *et al.*, 1995).

Tendo em vista a laboriosidade do teste controlado em pequenos ruminantes e a necessidade de sacrificar muitos animais, em geral é a última etapa realizada na avaliação de substâncias com atividade anti-helmíntica. Logo, poucos são os autores que empregaram esta técnica na pesquisa de fitoterápicos.

Croton zehntneri* e *Lippia sidoides

Entre as muitas plantas que vêm sendo testadas, *Croton zehntneri* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae) e *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) são usadas na medicina popular do Brasil para tratar distúrbios gastrintestinais (Craveiro *et al.*, 1977).

C. zehntneri (figura 1) é um arbusto de porte variável, com folhas simples e pilosas, folhas bem pequenas, em espigas terminais, e fruto do tipo cápsula de deiscência explosiva, abrindo-se em três partes e atirando longe as sementes oleagenosas, que são manchadas e medem cerca de 3 mm de comprimento (Lorenzi & Matos, 2002). É originária do Brasil e cresce de forma silvestre nas áreas da caatinga desde o nordeste até Minas Gerais, sendo planta nativa da ecorregião do Complexo Ibiapaba-Araripe, Ceará, sendo conhecida

popularmente como canela-de-cunhã, canelinha e canela-do-mato (Matos, 2002). O óleo essencial de *C. zehntneri* apresentou efeitos estimulantes no sistema nervoso central (Bernadi *et al.*, 1991), e exerceu efeitos diferentes em uma variedade de preparações do músculo liso (Coelho-de-Souza *et al.*, 1998). Em recentes estudos, *C. zehntneri* coletado em Viçosa do Ceará foi analisado por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, apresentando 82,55%, 73,6% e 42,09% de anetol e 3,52%, 2,52% e 45,95% de estragol, respectivamente (Luciano e Moraes, 2000; Sousa *et al.*, 2005; e Siqueira *et al.*, 2006).



Figura 1. *Croton zehntneri* (Fonte: Lorenzi & Matos, 2002.)

L. sidoides é um arbusto caducifólio, ereto, muito ramificado e quabradiço, próprio da vegetação do semi-árido nordestino, comum na caatinga entre Mossoró-RN e Tabuleiro do Norte-Ce (Matos, 2002; Lorenzi & Matos, 2002). Apresenta folhas aromáticas e picantes, opostas, simples e pecioladas; flores pequenas, esbranquiçadas, reunidas em espigas de eixo curto nas axilas das folhas; e frutos extremamente pequenos e produzem sementes muito pequenas que raramente germinam (Matos, 2002; Lorenzi & Matos, 2002) (Figura 2). Contém até 6% de óleo essencial muito rico em timol (Matos *et al.*, 2004). Após sua introdução nos programas de fitoterapia em atenção primária de saúde, passou a ser cultivada em vários

estados do Brasil (Lorenzi & Matos, 2002; Matos *et al.*, 2004). *L. sidoides* é conhecida popularmente como alecrim-pimenta, alecrim-bravo, estrepa-cavalo e alecrim-grande e seu uso popular é relatado para tratar infecções da boca e garganta, como espasmódico e estomáquico (Matos, 2002; Lorenzi & Matos, 2002; Barraca, 2006). *L. sidoides* demonstrou *in vitro* ser eficaz contra *Clostridium perfringens*, *Serratia* sp., *Staphylococcus aureus* *Salmonella* sp (Aguiar *et al.*, 1984; Bara e Vanetti, 1998), *Leishmania* spp (Façanha *et al.*, 1995), *Aedes aegypti* (Furtado *et al.* 2005). Girão *et al.* (2003) demonstraram que um creme dental preparado com óleo essencial de *L. sidoides* reduziu significativamente os escores clínicos do aspecto gengival quando aplicado em cães com gengivite.



Figura 2. *Lippia sidoides* (Fonte: Lorenzi & Matos, 2002.)

JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de populações de nematóides resistentes a todas as classes de anti-helmínticos de amplo espectro é uma realidade disseminada em grande parte dos rebanhos de pequenos ruminantes do Brasil e principalmente do Nordeste brasileiro. Os custos da pesquisa e desenvolvimento de uma nova droga para ser usada em animais para o consumo do homem é de aproximadamente 100 a 200 milhões de dólares e este trabalho leva pelo menos 10 anos. Ademais é necessário tornar o controle de nematóides gastrintestinais menos dispendioso de modo que esteja ao alcance de todos os pequenos produtores. Tendo em vista a grande demanda atual do mercado consumidor cada vez mais exigente pelos chamados produtos “orgânicos”, ou seja, produtos derivados de animais que não foram tratados com produtos químicos sintéticos, a pesquisa de fitoterápicos com atividade anti-helmíntica a partir da rica flora brasileira é uma alternativa viável e economicamente importante para solucionar tais problemas.

HIPÓTESE CIENTÍFICA

Os óleos essenciais de *L. sidoides* e *C. zehntneri* possuem atividade contra nematóides gastrintestinais de ovinos.

OBJETIVO GERAL

Aprimorar o controle de nematóides gastrintestinais de ovinos através da utilização de fitoterápicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a composição química dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *C. zehntneri*;
2. Avaliar a eficácia dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *C. zehntneri* e dos seus principais constituintes, anetol e timol, contra ovos e larvas de *H. contortus*;
3. Avaliar a eficácia anti-helmíntica do óleo essencial que obtiver o melhor resultado nos testes anteriores sobre nematóides gastrintestinais de ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. COLETA DA PLANTA

As partes aéreas de *C. zehntneri* foram coletadas em Viçosa, estado do Ceará, Brasil, entre os meses de janeiro e março de 2004. As amostras de *C. zehntneri* foram identificadas no herbário Prisco Bezerra onde um voucher espécie foi depositado com exsicata de número 33614.

2. OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As partes aéreas de *C. zehntneri* foram colocadas em ambiente fresco e sob a proteção dos raios solares, para secagem. Após secagem foi determinado o peso da planta utilizada para posterior determinação do rendimento em óleo. Um vidro Marriot contendo as folhas secas foi conectado na parte inferior a um erlemeyer e uma panela sob pressão, permitindo a passagem do vapor de água através do material e, conseqüentemente, o arraste do óleo junto com o vapor (Figura 3). Na parte superior, o vidro de Marriot foi conectado a um condensador para separação da água e óleo. O óleo coletado foi colocado em erlemeyer onde adicionou-se sulfato anidro até que ocorresse a separação da água restante. Finalmente, a mistura foi colocada em funil de separação para coleta do óleo.



Figura 3: Extração de óleo essencial de *Croton zehntneri*

O cálculo do rendimento do óleo foi feito da seguinte forma:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Quantidade de óleo obtida na extração}}{\text{Quantidade de planta pesada antes da extração}} \times 100$$

O óleo essencial de *Lippia sidoides* foi adquirido da empresa de produtos naturais, PRONAT, que cultiva a planta e obtém o óleo essencial por arraste a vapor conforme procedimento descrito acima.

3. ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A composição química dos óleos essenciais usados neste estudo foi determinada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa no PADETEC da Universidade Federal do Ceará. Os óleos essenciais foram analisados usando um instrumento da Hewlett-Packard modelo 5971 GC/MS sob as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida Dimethylpolysiloxane DB-1 (30 m x 0.25 mm); gás de arraste: He (1 mL/min); temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 200 °C; temperatura da coluna: 35-180 °C a 4 °C/min e depois 180-25 °C at 10 °C/min; espectro de massa: por impacto eletrônico a 70 e V. A identificação dos constituintes foi feita por procura em biblioteca de espectros de massa do computador, tempos de retenção e comparação visual dos espectros de massa obtidos com os publicados na literatura (Alencar, 1984; Adams, 1989).

4. PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA OS TESTES

Anetol e timol, os principais constituintes de *C. zehntneri* e *L. sidoides*, respectivamente, foram adquiridos da empresa Sigma[®]. Duas soluções-mãe foram preparadas, uma solução com 64% de anetol e outra solução com 60% de timol, diluídos em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%.

Os óleos essenciais e as soluções-mãe foram diluídos em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% e 0,5% de DMSO a fim de serem usados nos testes de eclosão de ovos

e de desenvolvimento larvar com concentrações finais equivalentes a 0,031; 0,062; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Para os testes *in vivo*, os óleos essenciais foram diluídos em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% e 0,5% de DMSO com o objetivo de obter soluções com concentrações finais de 50 e 60% dos óleos essenciais para administração aos animais conforme a dose e peso.

Nos testes *in vitro* foram testadas duas amostras de óleo essencial de *Croton zehntneri* denominadas CC1 e CC12 por apresentarem diferentes concentrações de anetol na análise química. Nos testes *in vivo*, foi usada somente a amostra CC12.

5. OVINOS PORTADORES E LIVRES DE INFECÇÕES MONOESPECÍFICAS POR *H. contortus*

Todos os procedimentos realizados em animais foram submetidos e aprovados pelo Conselho de Ética da Universidade Estadual do Ceará.

Dois ovinos foram tratados com três anti-helmínticos de diferentes princípios ativos, oxfendazol, levamisol e ivermectina, com intervalos de dois dias entre as vermifugações. O oxfendazol foi administrado na dose de 5 mg kg^{-1} , correspondente ao dobro da dose recomendada pelos fabricantes no Brasil, e o levamisol e ivermectina nas doses 5 mg kg^{-1} e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, de acordo com as recomendações dos fabricantes. Estes animais foram acompanhados com exames de fezes pela técnica de McMaster (Ueno & Gonçalves, 1998) durante 14 dias até que o número de ovos eliminados nas fezes fosse zero. Caso o OPG continuasse positivo, o tratamento era repetido. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas alimentados com feno e ração. Estes animais considerados livres de nematóides gastrintestinais foram assim mantidos como doadores de fezes para os testes *in vitro* de desenvolvimento larvar, respeitando o período residual de ação dos produtos usados.

Os ovinos foram inoculados com 5.000 larvas infectantes obtidas de coproculturas com predominância do nematóide *H. contortus*. O estabelecimento da infecção foi acompanhado por exame de fezes semanal. Após 45 dias, os animais foram necropsiados e as fêmeas de *H. contortus* foram coletadas do abomaso. As fêmeas foram então finamente maceradas a fim de liberar os ovos do útero. Em seguida, adicionaram-se fezes dos animais livres de nematóides gastrintestinais que serviram de meio para desenvolvimento das larvas. Após sete dias de incubação as larvas foram recuperadas (Roberts & O'Sullivan, 1950) e as L3 de *H. contortus* obtidas foram administradas em dois ovinos para o estabelecimento de infecção monoespecífica por *H. contortus*. Da mesma forma que os animais livres de nematóides, estes dois ovinos foram mantidos em gaiolas metabólicas. A partir das fezes destes animais foram obtidos ovos de *H. contortus* para os testes *in vitro*.

6. TESTES *in vitro*

6.1 TESTE DE ECLOSÃO DE OVOS

Para realização do teste de eclosão de ovos, foi realizada a recuperação de ovos de *H. contortus* de acordo com técnica de Hubert & Kerboeuf (1992). Fezes coletadas de ovinos portadores de infecção monoespecífica de *H. contortus* foram lavadas sob água corrente e pressão em tamis com espaçamento entre malhas de 0,150 mm, 0,100 mm, 0,036 mm e 0,020 mm. Os ovos ficaram retidos no último tamis foram acondicionados em tubos tipo Falcon e levados a centrifugação por 7000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado completando-se com solução saturada de açúcar, e uma nova centrifugação foi realizada. Após a segunda centrifugação, o material foi passado para o tamis com espaçamento entre malhas de 0,020 mm para retirada dos resíduos de açúcar. Em seguida, a solução contendo os ovos foi colocada em cálice graduado para estimativa de número de ovos por mL de solução.

O teste de eclosão de ovos foi realizado conforme descrito por Coles *et al.* (1992). Resumidamente, uma suspensão de 250 µL contendo aproximadamente 100 ovos frescos,

recuperados de fezes dos ovinos portadores de infecção monoespecífica de *H. contortus*, foi distribuída em tubos de vidro e incubados com o mesmo volume das soluções contendo os óleos essenciais, anetol e timol em diferentes concentrações. Neste teste foram usadas as seguintes concentrações dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *C. zehntneri* e seus principais constituintes, anetol e timol: 0,031; 0,062; 1,25; 2,5 e 5 mg mL⁻¹. Os ovos foram incubados por 48 horas a temperatura ambiente. Após este período, uma gota de lugol foi adicionada a cada tubo com o objetivo de parar a eclosão das larvas. Todos os ovos e larvas eclodidas foram contados ao microscópio. Este teste foi realizado com um controle negativo utilizando água destilada e o controle positivo com tiabendazol (0,02 mg mL⁻¹). O teste de eclosão de ovos foi realizado com três repetições contendo cinco réplicas para cada tratamento e controle. Somente água foi utilizada no controle negativo, pois o diluente DMSO na concentração utilizada não possui efeito sobre ovos ou larvas (Assis *et al.*, 2003).

6.2. TESTE DE DESENVOLVIMENTO LARVAR

O teste de desenvolvimento larvar foi realizado conforme método descrito por Roberts & O'Sullivan (1950) modificado. Foram coletadas 2g de fezes de ovino livre de infecção por nematóide gastrointestinal e dispostas em copos de vidro. Em seguida, adicionou-se uma suspensão contendo aproximadamente 100 a 200 L1 recuperadas de fezes de ovino portador de infecção monoespecífica de *H. contortus*. Esta coprocultura foi incubada durante seis dias com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *C. zehntneri* e *L. sidoides*, anetol e timol em uma incubadora a uma temperatura de 28 °C. Neste teste foram usadas as seguintes concentrações dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *C. zehntneri*, anetol e timol: 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 mg mL⁻¹. Após seis dias, os copos foram preenchidos por água e virados sobre placa de Petri. Três horas após a água na placa de Petri foi coletada, e após deixar em repouso, o sobrenadante foi descartado e o restante que ficou no tubo foi analisado. Este teste foi realizado com o controle negativo utilizando água destilada e o controle positivo com ivermectina na concentração de 0,008 µg mL⁻¹, com três repetições e cinco réplicas por tratamento.

7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA EM CAMUNDONGOS

Foram utilizadas 64 fêmeas de camundongos albinos Swiss alojadas em caixas padrões de polipropileno (40 x 34 x 17 cm³) mantidas em sala com ventilação natural. A troca da raspa das caixas foi suspensa com objetivo de contribuir com o desenvolvimento da infecção por nematóides intestinais. Os animais recebiam ração e água *ad libitum*.

Semanalmente, fezes foram coletadas das caixas para realização de exame pelo método de Willis (Ueno & Gonçalves, 1998) para determinação do estabelecimento da infecção por *S. obvelata* e *A. tetraptera*.

Inicialmente, foi realizado um experimento com 32 camundongos que foram distribuídos em quatro grupos (n = 8), ao acaso, e receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1: apenas água (controle negativo);

Grupo 2: 0,56 mg kg⁻¹ de febendazol;

Grupo 3: 800 mg kg⁻¹ do óleo essencial de *L. sidoides*

Grupo 4: 800 mg kg⁻¹ do óleo essencial de *C. zehntneri*.

O tratamento foi realizado através de gavagem por cânula esofageana. Os camundongos dos grupos 1, 3 e 4 foram tratados durante três dias, e os do grupo 2 foram tratados durante cinco dias conforme recomendações do fabricante.

De acordo com os resultados obtidos, foi realizado outro experimento para testar doses maiores do óleo essencial que apresentou melhor eficácia no teste com camundongos. Portanto, o mesmo protocolo foi usado em 32 camundongos com o objetivo de testar duas concentrações diferentes do óleo essencial de *L. sidoides*, no segundo experimento. Os animais receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1: apenas água (controle negativo);

Grupo 2: 0,56 mg kg⁻¹ de febendazol;

Grupo 3: 1200 mg kg⁻¹ de óleo essencial de *L. sidoides*;

Grupo 4: 1600 mg kg⁻¹ de óleo essencial de *L. sidoides*.

Nos dois experimentos, sete dias após tratamento, todos os camundongos foram eutanaziados e necropsiados para recuperação dos parasitos. Os intestinos dos camundongos foram retirados e colocados em placas de Petri contendo solução fisiológica para abertura. Os intestinos e seu conteúdo foram examinados sob um estereoscópio. O material coletado foi colocado em recipientes de vidro com solução quente de AFA. Após fixação, os parasitos foram contados e identificados ao microscópio.

8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. sidoides* SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

8.1. TESTE DE REDUÇÃO DA CONTAGEM DE OVOS NAS FEZES (FECRT)

Este experimento foi realizado na Fazenda Santa Rita de propriedade da EMBRAPA/CAPRINOS localizada em Sobral, 3,50S de latitude e 40,20W de longitude, Ceará, região semi-árida do nordeste brasileiro, nos meses de novembro de 2005 a janeiro de 2006, período em que há pouca ou nenhuma disponibilidade de larvas na pastagem (Arosemena *et al.*, 1998). Os ovinos foram colocados em aprisco com fornecimento de concentrado e feno conforme peso dos animais e água *ad libitum*.

Quarenta e quatro ovinos machos deslanados com peso médio de 19,3 kg foram alojados em um cercado na Fazenda Santa Rita. Amostras de fezes foram coletadas de todos os animais para determinação do nível de infecção por nematóides gastrintestinais através da contagem de ovos por grama de fezes usando o método de Gordon e Whitlock modificado (Ueno & Gonçalves, 1998).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de acordo com o resultado do OPG com o objetivo de obter grupos aproximadamente uniformes, e identificados por brinco na orelha sendo que os grupos receberam colar de diferentes cores para distinguir os tratamentos.

A dosificação dos animais foi feita por via oral de acordo com o peso vivo individual, e as doses foram calculadas com base em estudo anterior realizado em camundongos, e a extrapolação de dose foi feita através de cálculo alométrico (Felippe, 2005). Assim sendo, para determinação da dose a ser usada nos ovinos foram realizados três cálculos:

a) cálculo da taxa metabólica específica do camundongo e do ovino ($TME = K (\text{Peso}^{0,25})$), onde K é uma constante específica para diferentes grupos de animais, e no caso de mamíferos placentários $K = 70$.

b) cálculo do fator dose do camundongo (dose usada no camundongo/TME do camundongo)

c) cálculo da dose para ovino (TME do ovino x fator dose do camundongo).

As doses de 1200 mg kg^{-1} e 1600 mg kg^{-1} de peso vivo de óleo essencial de *L. sidoides* usadas em camundongos foram transformadas através do cálculo alométrico em 230 e 283 mg kg^{-1} de peso vivo de óleo essencial de *L. sidoides* para serem usadas em ovinos. Os ovinos receberam quatro tratamentos distintos conforme descrito abaixo:

Grupo 1: sem tratamento (controle negativo);

Grupo 2: ivermectina na dose de $0,08 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso vivo, acordo com a recomendação do fabricante (controle positivo)

Grupo 3: 230 mg kg^{-1} de óleo essencial de *L. sidoides*;

Grupo 4: 283 mg kg^{-1} de óleo essencial de *L. sidoides*.

Amostras de fezes de cada ovino foram coletadas diretamente do reto antes dos tratamentos e nos dias 7, 14 e 21 pós-tratamento para contagem do OPG pela técnica de McMaster (Ueno & Gonçalves, 1998). Nas mesmas datas, foram feitas coproculturas para identificação genérica dos nematóides gastrintestinais.

8.2. TESTE CONTROLADO

Este experimento foi realizado na mesma fazenda Santa Rita, de propriedade da EMBRAPA/CAPRINOS no mês de fevereiro de 2006. Neste período, a pluviosidade total na cidade de Sobral foi de 198 mm e os ovinos deslanados machos foram alojados em piquetes com capim irrigado.

Participaram do experimento 21 ovinos machos deslanados com peso médio de 25,2 kg e naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais. Os ovinos foram distribuídos em três grupos de acordo com o OPG com objetivo de obter grupos uniformes, e identificados por brinco na orelha e diferentes grupos receberam colares de diferentes cores para diferenciar os grupos de tratamentos. Os ovinos foram distribuídos nos seguintes grupos (n = 7):

G1: não tratados (controle negativo);

G2: 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de ivermectina;

G3: 283 mg kg^{-1} de óleo essencial de *L. sidoides*.

O tratamento com óleo essencial foi realizado por administração oral durante cinco dias consecutivos, e os animais do controle positivo foram tratados com ivermectina em dose única conforme recomendação do fabricante.

Sete dias após tratamento (Wood *et al.*, 1995), todos os ovinos foram eutanasiados e submetidos à necropsia para determinação da carga parasitária. Os tratos gastrintestinais dos ovinos foram separados por ligaduras duplas no abomaso, intestino delgado e intestino grosso. O conteúdo do abomaso e do intestino delgado foram coletados e colocados em peneiras com aberturas entre malhas de 67 mm (230 malhas/polegada) e o intestino grosso em peneiras com 177 mm de abertura (80 malhas/polegada) e lavados em jato lento de água corrente. Após a completa lavagem, o material foi colocado em recipientes graduados de 250 mL e conservados em líquido de Railliet até a contagem dos parasitos. Amostras de 20% dos conteúdos foram separadas e colocadas em placas de Petri sob estereomicroscópio para separação, contagem e identificação dos parasitos de acordo com as características morfológicas (Ueno e Gonçalves, 1998). Quando necessário, os parasitos eram colocados em lâminas com uma gota de lactofenol para clareamento e identificação no microscópio. Os parasitos foram separados por sexo e gênero e foram estocados em recipiente de vidro com álcool a 70%.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos testes *in vitro*, os resultados foram expressos como percentagem de eficácia da inibição da eclosão de ovos e do desenvolvimento larvar de *H. contortus*. Os resultados foram analisados usando ANOVA e teste de Tukey com nível de significância de 5% usando o software STATISTIC 7.

No teste de eclosão de ovos, a eficácia de cada tratamento foi determinada com base no percentual de eclosão calculado usando-se a seguinte fórmula: $(n^\circ \text{ de larvas eclodidas} / n^\circ \text{ de larvas eclodidas} + n^\circ \text{ de ovos}) \times 100$.

No teste de desenvolvimento larvar, a eficácia foi calculada com base no percentual de redução no número de L3 recuperadas em relação ao controle negativo.

A concentração efetiva 50 (CE50), ou seja, a concentração capaz de inibir 50% da eclosão de ovos ou do desenvolvimento larvar foi calculada usando o programa estatístico SPSS 8.0 para Windows.

Nos testes de contagem de ovos nas fezes e controlado em ovinos, assim como no teste com camundongos, a eficácia de cada tratamento foi baseada na percentagem de redução do OPG ou da carga parasitária (Coles *et al.*, 1992; Wood *et al.*, 1995). Os resultados foram analisados usando ANOVA e Kruskal-Wallis, um método não-paramétrico de avaliação de dados.

RESULTADOS

Os principais constituintes dos óleos essenciais de *C. zehntneri* e *L. sidoides* estão apresentados na tabela 1. As diferentes amostras do óleo essencial de *C. zehntneri*, CC1 e CC12, apresentaram variações nas concentrações de anetol e estragol.

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de *C. zehntneri* e *L. sidoides*.

<i>Croton. zehntneri</i> (amostra CC1)		<i>Croton zehntneri</i> (amostra CC12)		<i>Lippia sidoides</i>	
Composto	%	Composto	%	Composto	%
Anetol	39,34	Anetol	63,88	α -tujeno	1,48
Estragol	14,95	Estragol	21,84	α -pineno	0,51
Anisaldeído	20,17	δ -elemeno	0,35	Mirceno	5,43
Anisil acetato	14,47	β -elemeno	0,38	α -terpineno	1,43
Cariofileno (E)	0,39	Germacrene D	1,53	Cymeno para	9,08
Aromadendreno	0,43	Germacrene B	5,07	Limoneno	1,01
p-metoxiacetofenono	0,57	α -cis-bergamopteno	0,33	β -ocimeno	0,27
2-metoxiacetofenono	0,31	Aromadendreno allo	0,31	γ -terpineno	3,83
Ledol	0,26	Cariofileno (E)	1,77	Linalool	0,28
Espatulenol	0,24	Espatulenol	1,02	Tymol, metil eter	1,79
Farnesol trans	0,23	Myrceno	0,84	Timol	59,65
Cineol	0,58	Cineol	0,52	α -Copaeno	0,66
Cânfora	0,25	n.i.	2,16	Cariofilleno (E)	10,60
α -Terpineol	0,24			Aromadendreno	0,53
n.i.	7,57			α -Humuleno	0,56
				Dihydroaromadendreno	0,91
				α -Murolene	0,45
				δ -Cadinene	0,35
				Caryofillene oxide	0,72
				n.i.	0,46

n.i. = não identificado; *C. zehntneri* CC1 e *C. zehntneri* CC12: amostras coletadas em diferentes períodos.

A extração de óleo das partes aéreas de *C. zehntneri* apresentou um rendimento de 3,15%.

A percentagem média de eficácia nos testes de eclosão de ovos e de desenvolvimento larvar, usando diferentes concentrações dos óleos essenciais de *C. zehntneri* e *L. sidoides*, anetol e timol estão dispostos na tabela 2 e 3. O efeito inibitório do óleo essencial de *L. sidoides* na eclosão de ovos na concentração de 0,62 mg mL⁻¹ foi de 94,84 ± 2.3, similar ao tiabendazol (0,02 mg mL⁻¹). Entretanto, a atividade ovicida das amostras de *C. zehntneri* (CC1 e CC12) e o anetol foram de 58%, 12,2% e 26,6% na mesma concentração.

Tabela 2. Percentagem média de eficácia ± ep dos óleos essenciais de *C. zehntneri* (amostras CC1 e CC12) e *L. sidoides*, anetol, timol, e tiabendazol sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*

Concentração (mg mL ⁻¹)	Óleos essenciais e seus constituintes				
	<i>C. zehntneri</i>		<i>L. sidoides</i>	Anetol	Timol
	CC1	CC12			
0.31	6,8 ± 0,7aA	9,2 ± 0,7aAB	18,8 ± 2,1cB	6,7 ± 0,5aA	9,9 ± 1,4aAB
0.62	58,0 ± 2,1cC	12,2 ± 0,6aB	94,9 ± 0,6bA	26,6 ± 4,9cB	93,6 ± 0,9cA
1.25	99,9 ± 0,1bA	99,9 ± 0,1bA	100 ± 0,0bA	99,9 ± 0,1bA	98,2 ± 0,9bA
2.5	99,9 ± 0,1bA	100 ± 0,0bA	100 ± 0,0bA	99,9 ± 0,1bA	99,9 ± 0,1bA
5.0	100 ± 0,0bA	100 ± 0,0bA	100 ± 0,0bA	100 ± 0,0bA	99,8 ± 0,2bA
Água	2,48 ± 0,6a	2,48 ± 0,6a	2,48 ± 0,6a	2,48 ± 0,6a	2,48 ± 0,6a
TBZ (0,02)	99,5 ± 0,3b	99,5 ± 0,3b	99,5 ± 0,3b	99,5 ± 0,3b	99,5 ± 0,3b

Letras minúsculas indicam resultados diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas indicam resultados diferentes na mesma linha (P > 0,05).

Tabela 3. Percentagem média de eficácia \pm ep dos óleos essenciais de *C. zehntneri* (amostras CC1 e CC12) e *L. sidoides*, de seus principais constituintes, anetol e timol, e ivermectina (IVM) sobre o desenvolvimento de larvas de *H. contortus*.

Concentração (mg mL ⁻¹)	Óleos essenciais e seus constituintes				
	<i>C. zehntneri</i>		<i>L. sidoides</i>	Anetol	Timol
	CC1	CC12			
1,25	69,6 \pm 6,4Ab	55,8 \pm 8,3Ab	24,9 \pm 14,7Aa	35,8 \pm 9,5Aa	33,0 \pm 7,7Aa
2,5	72,9 \pm 7,9Ab	73,3 \pm 10,3Ab	40,5 \pm 11,6Aa	52,1 \pm 7,8Aa	54,8 \pm 12,3BAb
5,0	86,2 \pm 3,4Ab	81,5 \pm 5,1Ab	64,1 \pm 16,5Ab	87,7 \pm 2,6Ab	73,9 \pm 9,0Ab
10,0	92,1 \pm 2,8Ab	99,2 \pm 0,5Ab	90,2 \pm 3,4Ab	96,7 \pm 1,1Ab	99,2 \pm 0,5Ab
20,0	96,2 \pm 1,8Ab	98,6 \pm 0,8Ab	94,5 \pm 3,1Ab	100 \pm 0,0Ab	99,7 \pm 0,2Ab
Água	0,0 \pm 15,4a	0,0 \pm 15,4a	0,0 \pm 15,4a	0,0 \pm 15,4a	0,0 \pm 15,4a
IVM (8,10 ⁻⁵)	95,2 \pm 1,4b	95,2 \pm 3,1b	95,2 \pm 3,1b	95,2 \pm 3,1b	95,2 \pm 3,1b

Letras maiúsculas comparam resultados na mesma linha e letras minúsculas comparam resultados na mesma coluna.

Não ocorreram diferenças estatísticas nas diferentes concentrações entre os tratamentos no teste de inibição do desenvolvimento larvar. O óleo essencial de *C. zehntneri* foi eficiente na inibição de desenvolvimento larvar em menores concentrações que o óleo essencial de *L. sidoides*, e as concentrações efetivas 50 (CE50) de CC1 e CC12 foram menores do que a CE50 do óleo essencial de *L. sidoides*.

No teste de eclosão de ovos, a atividade dos óleos essenciais de *C. zehntneri* e *L. sidoides* foram estatisticamente semelhantes em todas as concentrações, entretanto a CE50 do óleo essencial de *L. sidoides* foi 0,40 μ L mL⁻¹ enquanto a CE50 da amostra CC1 foi 0,55 μ L mL⁻¹ e a da amostra CC12 foi 0,74 μ L mL⁻¹ (tabela 4).

Tabela 4. Concentração efetiva 50 (CE50) dos óleos essenciais de *Croton zehntneri* (CC1 e CC12) e *Lippia sidoides*, e do anetol e timol sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento larvar de *H. contortus*.

Tratamentos	CE 50 ovicida (mg mL ⁻¹)	CE50 larvicida (mg mL ⁻¹)
Óleo essencial de <i>C. zehntneri</i> (CC1)	0,55	1,17
Óleo essencial de <i>C. zehntneri</i> (CC12)	0,74	1,37
Óleo essencial de <i>L. sidoides</i>	0,40	2,97
Anetol	0,69	2,11
Timol	0,55	2,49

Os óleos essenciais e seus principais constituintes apresentaram efeitos inibitórios dose-dependente sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*.

Os efeitos dos óleos essenciais sobre nematóides de camundongos estão dispostos na tabela 5, e estão expressos como percentagem de eficácia.

Tabela 5. Percentagem média de eficácia \pm ep dos óleos essenciais de *L. sidoides* e *C. zehntneri* sobre a carga parasitária de camundongos

Tratamentos (mg kg ⁻¹)	Eficácia	Tratamento (mg kg ⁻¹)	Eficácia
* <i>C. zehntneri</i> (800)	11,64 \pm 35,00 ^{AB}	<i>L. sidoides</i> (1200)	57,62 \pm 19,40 ^B
<i>L. sidoides</i> (800)	46,29 \pm 11,22 ^{AB}	<i>L. sidoides</i> (1600)	68,94 \pm 15,15 ^B
Controle Negativo	0,0 \pm 26,94 ^A	Controle negativo	0,00 \pm 15,70 ^A
Febendazol (0,56)	99,37 \pm 0,41 ^B	Febendazol (0,56)	100,00 \pm 0,00 ^B

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna (P < 0,05)

* amostra CC12 do óleo essencial de *C. zehntneri*. Controle negativo: água.

Os parasitos identificados nos camundongos foram *A. tetraptera* e *S. obvelata* (figuras 2 e 3).

A eficácia de 800 mg kg^{-1} de óleo essencial de *L. sidoides* e *C. zehntneri* contra *A. tetraptera* e *S. obvelata* foi de 46,29% e 11,64%, respectivamente, enquanto a eficácia do fenbendazol foi de $99,37\% \pm 0,41$. As doses de 1200 e 1600 mg kg^{-1} do óleo essencial de *L. sidoides* obtiveram eficácia de 57,62 e 68,94% na redução da carga parasitária, respectivamente.

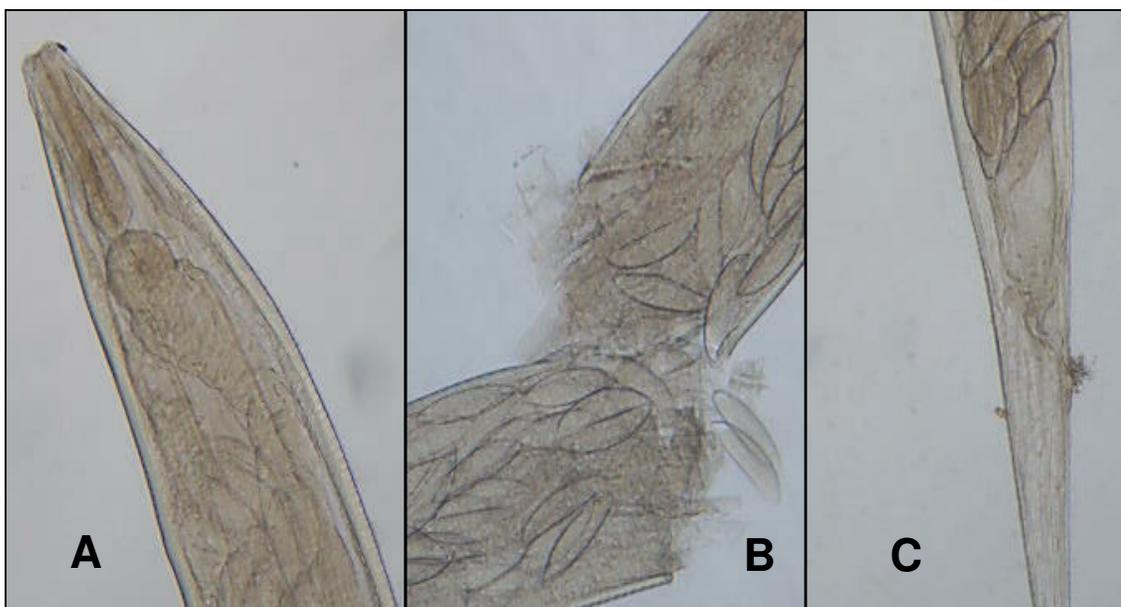


Figura 4. *Syphacia obvelata*, nematóide recuperado de camundongos no teste de eficácia com os óleos essenciais de *C. zehntneri* e *L. sidoides*. A: extremidade anterior; B: parte central rompida com liberação de ovos; C: extremidade posterior (Aumento de 10x).

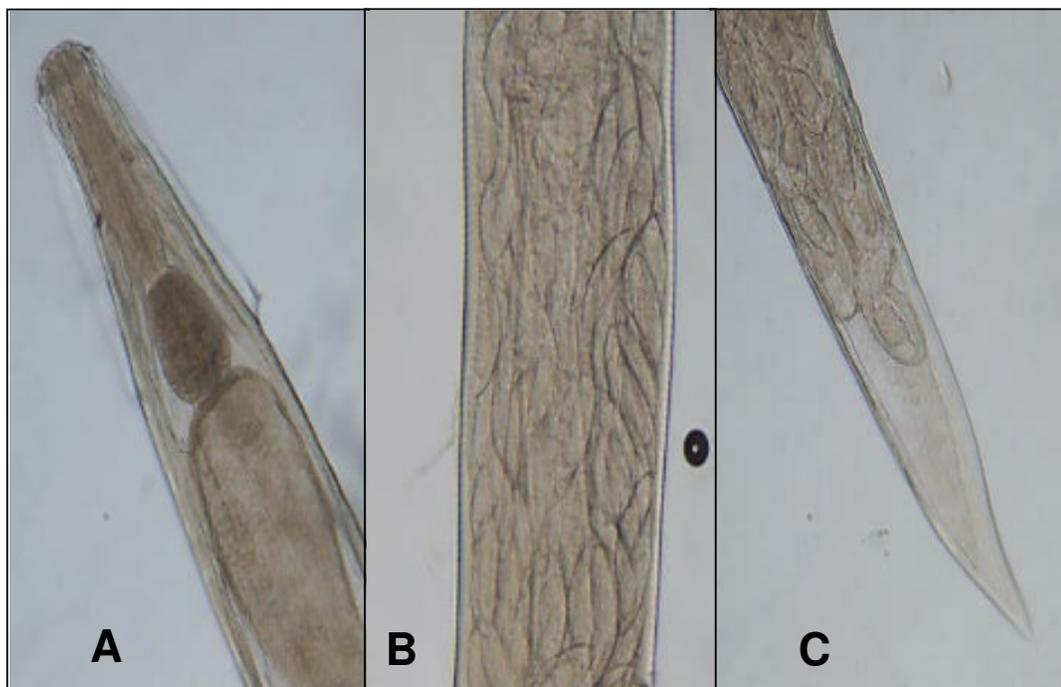


Figura 5. *Aspicularis tetraptera*, nematóide recuperado de camundongos no teste de eficácia com os óleos essenciais de *C. zehntneri* e *L. sidoides*. A: extremidade anterior; B: parte central de fêmea com ovos; C: extremidade posterior (Aumento de 10x).

A eficácia de 230 e 283 mg kg⁻¹ do óleo essencial de *L. sidoides* medida através do testes de redução da contagem de ovos nas fezes variou de 38% para 30% e de 45% para 54% com 7 e 14 dias pós-tratamento, respectivamente. A eficácia da ivermectina na dose de 0,2 µg kg⁻¹ variou de 40,2% a 39,6% após 7 e 14 dias do tratamento (tabela 6).

Tabela 6. Percentagem média de eficácia \pm ep de óleo essencial de *L. sidoides* (OELs) e ivermectina (IVM) baseada na redução da contagem de ovos nas fezes dos ovinos.

Dias após tratamento	Tratamentos		
	230 mg kg ⁻¹ de OELs	283 mg kg ⁻¹ de OELs	200 µg kg ⁻¹ de IVM
7	38,0 \pm 10,7	45,9 \pm 10,2	40,2 \pm 10,9
14	30,0 \pm 11,0	54,0 \pm 10,5	39,6 \pm 11,9
21	29,8 \pm 10,8	22,9 \pm 7,9	27,5 \pm 11,3

Os resultados não diferiram estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

Os resultados das coproculturas estão dispostos na tabela 7. O nematóide mais prevalente foi *Haemonchus* spp representando mais de 90% das larvas identificadas.

Tabela 7. Gêneros de nematóides gastrintestisnais identificados em coprocultura de ovinos naturalmente infectados antes do teste de redução da contagem de ovos nas fezes

Nematóides	Tratamento			
	230 mg kg ⁻¹ OELs	283 mg kg ⁻¹ OELs	200 µg kg ⁻¹ IVM	Controle
<i>Haemonchus</i> spp	96%	95,7%	98%	96,7%
<i>Trichostrongylus</i> spp	4%	4,3%	2%	3,3%

IVM = ivermectina; controle = ovinos não tratados.

Na tabela 8, estão apresentadas as percentagens de eficácia do óleo essencial de *L. sidoides* e ivermectina e a percentagem de parasitos identificados no grupo não-tratado no teste controlado. Os ovinos tratados com 283 mg kg⁻¹ do óleo essencial de *L. sidoides* apresentaram 56,9% de redução de *Haemonchus* spp e a ivermectina reduziu 34,4%. Entretanto, estes resultados quando analisados não foram estatisticamente diferentes. Com

relação a *Trichostrongylus* spp, ovinos tratados com o óleo essencial de *L. sidoides* tiveram uma redução da carga parasitária de 39,3% e a eficácia da ivermectina foi de 63,6%.

Tabela 8. Percentagem média da eficácia \pm ep de óleo essencial de *L. sidoides* (OELs) e ivermectina (IVM) e percentagem média de parasitos no grupo controle negativo no teste controlado com ovinos.

Nematóides	283 mg kg ⁻¹ OELs	200 µg kg ⁻¹ de IVM	Controle
<i>Haemonchus</i> spp	56,9 \pm 10,7	34,4 \pm 10,3	16,930 (37,9%)
<i>Trichostrongylus</i> spp	39,3 \pm 11,7	63,6 \pm 10,2	27,715 (62,1%)
Total	43,7 \pm 11,8	50,3 \pm 8,7	44,645 (100%)

Os resultados não diferiram estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

Haemonchus spp foi o parasito mais prevalente (97%) seguido de *Trichostrongylus* spp (3%) no teste de redução da contagem de ovos nas fezes, enquanto no teste controlado nos animais não tratados o gênero *Haemonchus* representou 37,9% e *Trichostrongylus* 62,1% da carga parasitária dos animais.

DISCUSSÃO

A composição do óleo essencial de *C. zehntneri* usado neste estudo foi diferente daquela apresentada por Luciano & Moraes (2000). As partes aéreas de *C. zehntneri* foram coletadas na mesma região, porém em diferentes épocas do ano. Sousa *et al.* (2005) e Siqueira *et al.* (2006) avaliaram diferentes amostras do óleo essencial de *C. zehntneri* de partes aéreas coletadas na mesma região do presente trabalho, e as amostras apresentaram 73,6% e 42,09% de anetol; e 2,52% e 45,95% de estragol, respectivamente.

O efeito inibitório da solução de anetol e das amostras CC1 e CC12 do óleo essencial de *C. zehntneri* sobre a eclosão de ovos de *H. contortus* foram estatisticamente similares em todas as concentrações testadas, exceto na concentração de 0,62 mg mL⁻¹ na qual a amostra CC1 apresentou melhor eficácia. A amostra CC1 apresentou 39,35% de anetol comparado a 63,88% da amostra CC12 e a solução de anetol, 64%. Logo, o anetol provavelmente não é a única substância com atividade ovicida no óleo essencial de *C. zehntneri*.

Em outros relatos, o óleo essencial de *C. zehntneri* exerceu efeitos modulatórios diferenciados em vários músculos de porquinho da Índia (Coelho-de-Sousa *et al.*, 1998). Albuquerque *et al.* (1995) relataram que o óleo essencial de *C. zehntneri* e o anetol bloquearam contrações musculares provocadas por estimulações nervosas e reduziram a resposta do músculo reto de sapos à acetilcolina. De acordo com estas informações, o óleo essencial de *C. zehntneri* e o anetol podem ter locais de ação na fibra muscular, e isto pode explicar suas propriedades anti-helmínticas, uma vez que vários anti-helmínticos têm local de ação nas fibras musculares. Estudos são necessários para determinar o mecanismo de ação ovicida e larvicida do óleo essencial de *L. sidoides* e timol.

Os resultados do teste de desenvolvimento larvar apresentaram uma grande variabilidade e os efeitos dos óleos essenciais, anetol e timol, não apresentaram diferenças estatísticas entre si ou entre as concentrações testadas. Contudo, este teste foi usado com sucesso para demonstrar a atividade larvicida de extratos de plantas (Assis *et al.*, 2003; Costa,

2004; Maciel *et al.*, 2006). Na tabela 3, o desvio padrão obtido é muito maior nas menores concentrações, 1,25 e 2,5 mg mL⁻¹. Como no teste *in vitro* o efeito depende do contato direto da substância com a larva, é possível que menores quantidades dos produtos testados não tenham tido um contato uniforme com as larvas em desenvolvimento.

O timol, principal constituinte do óleo essencial de *L. sidoides*, apresentou atividade ovicida e larvicida contra *H. contortus* e é a provável substância ativa. Carvalho *et al.* (2003) relataram atividade larvicida do óleo essencial de *L. sidoides* e apontaram o timol como substância ativa.

Outras plantas testadas quanto à atividade larvicida, *D. grandiflora* e *C. brasiliensis* produziram eficácia de 87,4 e 95,7% na dose de 30 mg por grama de fezes (Menezes *et al.*, 1992). O extrato acetato de etila de *S. anthelmia* na concentração de 50 mg mL⁻¹ inibiu 81% do desenvolvimento larvar de *H. contortus* (Assis *et al.*, 2003). Os resultados obtidos nos testes *in vitro* do presente estudo foram melhores do que aqueles utilizando outras plantas ou extratos em maiores concentrações.

Testes com animais de laboratório têm sido usados na triagem para validar atividades medicinais de plantas. Os testes *in vitro* são úteis na triagem de substâncias com atividade anti-helmíntica e precedem os testes *in vivo* com as espécies alvo da indicação clínica (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2005). O próximo passo para avaliação da atividade anti-helmíntica é a realização de testes toxicológicos que definem a DL50 em animais de laboratório. Fontenelle (2005) avaliou a toxicidade aguda dos óleos essenciais de *C. zehntneri* e *L. sidoides*, e estes óleos não apresentaram efeitos tóxicos na dose de até 3 g kg⁻¹.

Em camundongos, os efeitos dos ensaios anti-helmínticos foram dose-dependente e o melhor resultado obtido foi uma redução de quase 70% na carga parasitária dos animais. Estudos realizados em camundongos naturalmente infectados com *S. obvelata* e *A. tetraptera*, nematóides parasitos do intestino grosso e *H. polygyrus*, parasito do intestino delgado obtiveram eficácia de 50% para *T. fasciculatus* e não houve eficácia para *A. anthelmintica* (Amorim *et al.*, 1987; Githiori *et al.*, 2003).

O teste de redução na contagem de ovos nas fezes de ovinos infectados com *H. contortus* foi utilizado para avaliar a atividade anti-helmíntica de extratos de plantas como *A. anthelmintica* (Githiori *et al.*, 2003), *A. brevifolia* (Iqbal *et al.*, 2004), *M. africana*, *A. anthelmintica*, *H. sepalosa* (Gathuma *et al.*, 2004) e *K. senegalensis* (Ademola *et al.*, 2004) que apresentaram redução de OPG de 70%, 67,2%, de 77%, 89,8%, 90% e 88% respectivamente, todos superiores aos obtidos com o óleo essencial de *L. sidoides*. No entanto no presente trabalho, a redução do opg promovido pela ação da ivermectina foi de apenas 39,6%. De acordo com Coles *et al.* (1992), a resistência está presente se a percentagem de redução da contagem de ovos for menor que 95%. Logo, a população de nematóides dos ovinos utilizados no FECRT é resistente à ivermectina, um fato comum no Brasil (Padilha *et al.*, 1995; Vieira & Cavalcante, 1999; Melo *et al.*, 2003). A utilização do óleo essencial de *L. sidoides* seria justificada mesmo com eficácia inferior a 95%, em situações onde os fármacos sintéticos não fossem recomendados como em criações orgânicas, animais em fase de produção leiteira, ou quando o custo fosse compensatório.

Neste estudo, ocorreu uma grande variação entre as contagens de ovos nas fezes de ovinos que foi consistente com os resultados obtidos por Stear *et al.* (2006), reforçando a sugestão de Coles *et al.* (1992) de que o teste controlado deve ser realizado para confirmação de dose na espécie alvo.

Existem poucos estudos com plantas medicinais e suas propriedades anti-helmínticas envolvendo o teste controlado, porque este é um teste oneroso e indicado para uso nos estágios finais de triagens com plantas que tenham demonstrado efeitos em estudos preliminares como estudos *in vitro*, toxicológicos e com animais de laboratório (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2005). Nove plantas nativas do Ceará (*Allium sativum* L., *Carica papaya*, *Musa acuminata*, *Carnavalia brasiliensis*, *Momordica charantia*, *Anona squamosa*, *Menta* sp., *Chenopodium ambrosioides* e *Hymenaea courbaril*), o óleo essencial de *C. ambrosioides* e *A. indica* foram testadas em ovinos portadores de infecções naturais por nematóides gastrintestinais sem alcançar eficácia na redução da carga parasitária (Vieira *et al.*, 1999; Ketzis *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2006).

A eficácia obtida em camundongos, aproximadamente 70% e o baixo custo do óleo essencial de *L. sidoides* incentivaram os testes em ovinos. Porém, o modelo de avaliação de atividade anti-helmíntica de plantas utilizando camundongos apresenta a desvantagem de que os nematóides dos camundongos têm como habitat o intestino grosso diferindo do alvo a ser atingido, nematóides do trato gastrointestinal de pequenos ruminantes. A relação localização do parasito e local de absorção do anti-helmíntico determina a maior ou menor eficácia do fármaco (Hennessy, 1999). Outra hipótese para explicar as diferenças na eficácia obtida sobre nematóides de camundongos e ovinos é a possibilidade do mecanismo de distribuição e biotransformação deste óleo ser diferente nas duas espécies principalmente em se tratando da comparação entre monogástricos e poligástricos. Entretanto, o teste de eficácia contra nematóides de camundongos auxilia na extrapolação de doses a serem usadas em ovinos e caprinos.

A pesquisa científica com plantas envolve várias etapas desde a seleção até a obtenção do produto final para o consumidor, estima-se que somente 5 entre 10.000 produtos venham a ter sua atividade comprovada e cheguem ao consumidor (Rates, 2001). Portanto, a busca por novas alternativas nem sempre é rápida e não deve ser desmotivada.

CONCLUSÕES

O desempenho do óleo essencial de *L. sidoides* foi superior ao de *C. zehntneri* nos testes *in vitro* sobre ovos e larvas de *H. contortus* e *in vivo* sobre nematóides intestinais de camundongos.

A eficácia do óleo essencial de *L. sidoides* obtida sobre *H. contortus* parasito gastrintestinal de ovinos foi de 56,9%, inferior àquela recomendada para anti-helmínticos comerciais, 95%. Entretanto, a população de nematóides em ovinos, neste estudo, demonstrou ser resistente à ivermectina. Assim sendo o uso alternativo de plantas pode ser uma ferramenta que aliada a outros métodos permita o controle eficiente de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo indicam dois caminhos: o primeiro é a pesquisa envolvendo absorção e distribuição do óleo essencial de *L. sidoides* em pequenos ruminantes para verificar a possibilidade de outras formulações que possam melhorar a atividade deste óleo, e a segunda opção seria modificar a forma de administração e dosagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic Press, London, p. 456, 1989.

ADDAE-MENSAH, I. Plant biodiversity, herbal medicine, intellectual property rights and industrially developing countries: socio-economic, ethical and legal implications. Disponível em <http://www.crvp.org/book/series02/II-5/charpter-vii.htm> acesso em 26/10/2006.

ADEMOLA, I. O., FAGBEMI, B. O., IDOWU, S. O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, v. 122, p. 151-164, 2004.

AGUIAR, L. M. B. A., MATOS, F.J. A., MOURA, V. R. A. Atividade antibiótica de plantas da flora nordestina. **Ciência e Cultura**, v. 36, p. 547, 1984.

ALAWA, C. B. I., ADAMU, A. M., GEFU, J. O., AJANUSI, O. J., ABDU, P. A., CHIEZEY, N. P., ALAWA, J. N., BOWMAN, D. D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vermonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 73-81, 2003.

ALBUQUERQUE, A. A. C., SORENSON, A. L., LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 41-49, 1995.

ALENCAR, W. J., CRAVEIRO, A. A., MATOS, F. J. A. Kovats indices as preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, v. 47, p. 890-892, 1984.

AMORIM, A., BORBA, H. R., SILVA, W. J. Ação anti-helmíntica de plantas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 68, p. 64-70, 1987.

AMORIM, A., BORBA, H. R., CARUATA, J. P. P., LOPES, D., KAPLAN, M. A. C. Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, p. 255-258, 1999.

AROSEMENA, N. A. E., BEVILAQUA, C. M. L., MELO, A. C. F. L., GIRÃO, M. D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 150, p. 873-876, 1999.

ASSIS, L. M., BEVILAQUA, C. M. L., MORAIS, S.M., VIEIRA, L. S., COSTA, C. T. C., SOUZA, J. A. L. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 43-9, 2003.

BARA, M. T. F., VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 7-8, p. 21-34, 1998.

BARRACA, S. A. Manejo e produção de plantas medicinais e aromáticas. **Net**, ESALQ/USO. Piracicaba, 1999. Disponível em <<http://www.ciagri.usp.br/planmedi/alecrim-pimenta.html>> acesso em 18/03/06.

BARROS, S. B. de M., DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª ed. São Paulo, Atheneu Editora, p. 57-67, 2003.

BATISTA, L. M., BEVILAQUA, C. M. L., MORAIS, S. M., VIEIRA, L. S. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. **Ciência Animal**, v. 9, p. 67-73, 1999.

BAZZANO, T., RESTEL, T. I., PINTO, R.M., GOMES, D. C. Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. **Memórias do Instituto Oswald Cruz**, v. 97, p. 847-853, 2002.

- BERIAJAYA., COPERMAN, D. B. *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in pen-trials with Javanese thin tail sheep and Kacang cross Etawah goats. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 315-323, 2006.
- BERNARDI, M. M., SOUZA-SPINOSA, H., BATATINHA, M. J. M., GIORGI, R. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, p. 285-287, 1991.
- BORBA, H. R., AMORIM, A. Ação anti-helmíntica de plantas XIV. Avaliação da atividade de extratos aquosos de *Chenopodium ambrosioides* L. (Erva-de-Santa-Maria) em camundongos naturalmente infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 133-136, 2004.
- BRESSAN, M.C.R.V., CALGARO, G.A., ALEXANDRE, S.R., MARQUES, T. Prevalence of ecto and endoparasites in mice and rats reared in animal houses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, p. 142-146, 1997.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., NASCIMENTO, N. R. F., SOUSA, C. M., MELO, L. M., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L, ROCHA, M. F. G. Neuromuscular effects and acute toxicity of an ethyl acetate extract of *Spigelia anthelmia* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 257-261, 2004.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., MORAIS, S. M., SANTOS, L. F. L., ROCHA, M. F. G., BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, p. 97-106, 2005.
- CARVALHO, A. F., MELO, V. M., CRAVEIRO, A. A., MACHADO, M. I., BANTIM, M. B., RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 569-571, 2003.
- CHARLES, T. P. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in Pernambuco state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 30, p. 335-343. 1989.

- CLARK, C. J., TURTON, J. A. Estimating roundworm burdens and group sizes in anthelmintic trial with sheep and cattle. **Experimental Parasitology**, v. 34, p. 69-75, 1973.
- COELHO-DE-SOUSA, A. N., CRIDDLE, D. N., LEAL-CARDOSO, J. H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 189-194, 1998.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M., GEERTS, S., KLEI, T. R., TAYLOR, M. A., WALLER, P. J. World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.
- COLES, G. C.; JACKSON, F., POMROY, W. E., PRICHARD, R. K., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., SILVESTRE, A., TAYLOR, M. A., VERCRUYSSSE, J. Review: The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136 , p. 167-185, 2006.
- COSTA, C. T. C. **Atividade anti-helmíntica da *Azadirachta indica* A. Juss sobre nematóides gastrintestinais de ovinos.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará 2004.
- COSTA, C. T. C., BEVILAQUA, C. M. L., MACIEL, M. V., CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., MORAIS, S. M., MONTEIRO, M. V. B., FARIAS, V. M., DA SILVA, M.V., SOUZA, M. M. C. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 306-310, 2006.
- COSTA, J. G. M., RODRIGUES, F. F. G., ANGÉLICO, E. C., SILVA, M. R., MOTA, M. L., SANTOS, N. K. A., CARDOSO, A. L. H., LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos

óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, p. 304-309, 2005.

COSTA, C. A. F.; VIEIRA, L. S. **Controle de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos no estado do Ceará**. EMBRAPA-CNPC, Sobral, Comunicado Técnico, n. 13, 6p. 1984.

COSTA, C. A. F.; VIEIRA, L. S., BERNE, M. E. A., Influência das instalações de pernoite, do tipo de pastagem e da suplementação volumosa sobre o parasitismo por nematódeos em caprinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 521-533, 1991.

COOP, R. L., KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 325-330, 2001.

CRAVEIRO, A. A., ALENCAR, J. W., MATOS, F. J. A. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. **Journal of Chemical Education**, v. 53, p. 652, 1976.

CRAVEIRO A. A., FERNANDES A. G., ANDRADE C. H. S., MATOS F. J. A., ALENCAR, J. W. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. **Ciência e Cultura**, v. 29, p. 445 (Abstract), 1977.

DONALD, A. D., WALLER, P. J., DOBSON, R. J., AXELSEN, A. The effect of selection with levamisole on benzimidazole resistance in *Ostertagia* spp. of sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 10, p. 381-389, 1980.

ECHEVARRIA, F. A. M., ARMOUR, J., DUNCAN, J. L. Efficacy of some anthelmintics on an ivermectin-resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 39, p. 279-284, 1991.

ECHEVARRIA, F., BORBA, M. F. S., PINHEIRO, A. C., WALLER, P. J., HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, p. 199-206, 1996.

FAÇANHA, M. C. C., CAVALCANTE, I. F., TEIXEIRA, M. J., MATOS, F. J. A., SOUSA, A. Q., POMPEU, M. M. L. Terapia da Leishmaniose experimental com constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras, X REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DA SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, São Paulo, 1995. **Anais da X Reunião Anual da Federação da Sociedade de Biologia Experimental**, São Paulo, 1995, p. 270-270.

FASonline. Implications of U.S. and global organic dairy, livestock and poultry production for international trade. Disponível em internet, acesso em 09/10/2006 < <http://www.fas.usda.gov/dlp2/highlights/2000/organics/globproduction.html>> 2003.

FELIPPE, P. A. N. 2005. Sistema alométrico ou cálculo de dosagem por taxa metabólica do animal. Disponível em <<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/calculo.doc>> acesso em outubro de 2005.

FONTENELLE, R. O. S. **Avaliação do potencial antifúngico de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro frente a diferentes cepas de dermatófitos e leveduras**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2005. 102 p.

FORRESTER, S. G., BEECH, R. N., PRICHARD, R. K. Agonist enhancement of macrocyclic lactone activity at a glutamate-gated chloride channel subunit from *Haemonchus contortus*. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, p. 1019-1024, 2004.

FOX, M.T. Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 46, p. 143-158, 1997.

- FOX, M.T. Pathophysiology of infection with gastrointestinal nematodes in domestic ruminants: recent developments. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 285-308, 1997.
- FOX, M.T., REYNOLDS, G.W., SCOTT, I., SIMCOCK, D.C., SIMPSON, H.V. Vagal and splanchnic afferent nerves are not essential for anorexia associated with abomasal parasitism in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 287-295, 2006.
- FURTADO, R. F., DE LIMA, M. G. A., ANDRADE NETO, M., BEZERRA, J. N. S., SILVA, M. G. V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 843-847, 2005.
- GASBARRE, L.C., STOUT, W.L., LEIGHTON, E.A. Gastrointestinal nematodes of cattle in the northeastern US: results of a producer survey. **Veterinary Parasitology**, v. 101, p. 29-44, 2001.
- GATHUMA, J. M., MBARIA, J. M., WANYAMA, J., KABURIA, H. F. A., MPOKE, L., MWANGI, J. N., SAMBURU AND TURKANA HEALERS. Efficacy of *Myrsine africana*, *Albizia anthelmintica* and *Hilderbrandtia sepalosa* herbal remedies against mixed natural sheep helminthosis in Samburu district, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 7-12, 2004.
- GEARY, T. G., SANGSTER, N. C., THOMPSON, D. P. Frontier in anthelmintic pharmacology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 275-295, 1999.
- GILL, J.H., KERR, C. A., SHOOP, W. L., LACEY, E. Evidence of multiple mechanisms of avermectin resistance in *Haemonchus contortus*-comparison of selection protocols. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 783-789, 1998.
- GIRÃO, E. S.; MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrintestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. **Ciência Rural**, v. 22, p. 197-202. 1992.

GIRÃO, V. C. C., NUNES-PINHEIRO, D. C. S., MORAIS, S. M., SEQUEIRA, J. L., GIOSO, M. A. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 95-102, 2003.

GITHIGIA, S. M., THAMSBORG, S. M., MUNYUA, W. K., MAINGI, N. Impact of gastrointestinal helminths on production in goats in Kenya. **Small Ruminant Research**, v. 42, p. 21-29, 2001.

GITHIORI, J. B., HÖGLUND, J., WALLER, P. J., BAKER, R. L. The anthelmintic efficacy of the plant, *Albizia anthelmintica*, against the nematode parasites *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. **Veterinary Parasitology**, v. 116, p. 23-34, 2003.

HAMMOND, J. A., FIELDING, D. BISHOP, S.C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communication**, v. 21, p. 213-28, 1997.

HENNESSY, D. R. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 367-390, 1997.

HERD, P.R. Equine parasite control keeping up with evolution. **Veterinary Medicine**, v. 90, p. 447-80, 1995.

HUBERT, J., KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v. 130, p. 442-446, 1992.

IBGE, 2005. Comunicação Social de 06 de dezembro de 2005. Disponível na internet <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?id_noticia=499> acesso em 08 de outubro de 2006.

IQBAL, Z., LATEEF, M., ASHRAF, M., JABBAR, A. Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 265-268, 2004.

- IQBAL, Z., LATEEF, M., ASHRAF, M., JABBAR, A. MUHAMMAD, G., KHAN, M.N., Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) flowers in sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 256-261, 2005.
- IQBAL, Z., LATEEF, M., JABBAR, A., GHAYUR, M. M., GILANI, A. H. *In vivo* anthelmintic activity of *Butea monosperma* against Trichostrongylid nematodes in sheep. **Fitoterapia**, v. 77, p. 137-140, 2006a.
- IQBAL, Z., LATEEF, M., AKHTAR, M. S., GHAYUR, M. M., GILANI, A. H. *In vivo* anthelmintic activity of ginger against gastrointestinal nematodes of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 285-287, 2006b.
- KETZIS, J. K., TAYLOR, A., BOWMAN, D. D., BROWN, D. L., WARNICK, L. D., ERB. H. N. *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. **Small Ruminant Research**, v. 44, p. 196-200, 2002.
- KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 336-345, 2001.
- LANUSSE, C.E. Farmacología dos compostos anti-helmínticos. In: PADILHA, T. **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996, p. 1-52.
- LE JAMBRE, L. F., DOBSON, R. J., LENANE, I. J., BARNES, E. H. Selection for anthelmintic resistance by macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1101-1111, 1999.
- LIU, S. M., SMITH, T. L., KARLSSON, L. J. E., PALMER, D. G., BESIER, R. B. The costs for protein and energy requirements by nematode infection and resistance in Merino sheep. **Livestock Production Science**, v. 97, p. 131-139, 2005.

- LORENZI, H., MATOS, F. J. A., **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Computação gráfica Gomes, O. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.
- LUCIANO, J. H. S., MORAIS, S. M. Estudo químico dos óleos essenciais do *Croton zehneri* de Viçosa (CE) e do *Zanthoxylum syncarpum* de Fortaleza (CE). In: 23a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. **Anais**, Poços de Caldas, 2000. v. 2. p. PN 003.
- MACIEL, M. V., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L., CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., COSTA, C. T. C., CASTRO, C. M. S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 98-104, 2006.
- MARTIN, P. J., LE JAMBRE, L. F. Larval paralysis as an *in vitro* assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. **Veterinary Research**, v. 3, p. 159-164, 1979.
- MARTIN, R. J., ROBERTSON, A. P., BJORN, H. Target sites of anthelmintics. **Parasitology**, 114, S111-S124, 1997.
- MARTIN, R. J., MURRAY, I., ROBERTSON, A. P., BJORN, H., SANGSTER, N. Anthelmintics and ion-channels: after a puncture, use a patch. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 849-862, 1998.
- MATOS, F. J. de A. **Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades.** 4ª ed. rev. Ampliada, Fortaleza, Ceará, Brasil. Editora UFC, 2002, 267p.
- MATOS, F. J. de A., SOUSA, M. P., MATOS, M. E. O., MACHADO, M. I. L., CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais Brasileiras.** 2ª ed., Fortaleza, Ceará, Brasil. Editora UFC, 2004, 448p.

MATTOS, M. J. T., OLIVEIRA, C. M. B., LUSTOSA, A., LACERDA, L. A., TERRA, S. Influência do parasitismo por nematódeos sobre o perfil hematológico de caprinos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 133-135, 2005.

McGAW, L. J., VAN DER MERWE, D., ELOFF, J. N. *In vitro* anthelmintic, antibacterial and cytotoxic effects of extracts from plants used in South African ethnoveterinary medicine. **The Veterinary Journal**, *in press*, doi: 1.116/j.205.09.004

McLEOD, R. S. Costs of major parasites to the Australian livestock industries. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 1363-1367, 1995.

MENEZES, R. C. A. A., VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R., CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T. A., MOREIRA, R. A. Estudos preliminares *in vitro* da atividade ovicida de folhas e sementes de quatro leguminosas sobre *Haemonchus contortus* de caprinos. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 15, p. 121-127, 1992.

MELO, A. C. F. L., BEVILAQUA, C. M. L., SELAIVE, A. V., GIRÃO, M. D. Resistência a anti-helmínticos em nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de Pentecoste, estado do Ceará. **Ciência Rural**, v. 8, p. 7-11, 1998.

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

NGINYI, J. M., DUNCAN, J. L., MELLOR, D. J., STEAR, M. J., WANYANGU, S. W., BAIN, R. K., GATONGI, P. M. Epidemiology of parasitic gastrointestinal nematode infections of ruminants on smallholder farms in central Kenya. **Research in Veterinary Science**, v. 70, p. 33-39, 2001.

OGA, S., SIQUIERA, M.E.P.B. Introdução à toxicologia. In: Oga, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª ed. São Paulo, Atheneu Editora, p. 1-7, 2003.

- PADILHA, T. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de ovinos deslanados no semi-árido Pernambucano. **Ciência Rural**, v. 25, p. 437-442, 1995.
- PAPADOPOULOS, E., ARSENO, G., SOTIRAKI, S., DELIGIANNIS, C., LAINAS, T., ZYGOYANNIS, D. The epizootiology of gastrointestinal nematode parasites in Greek dairy breeds of sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 47, p. 193-202, 2003.
- PESSOA, L. M., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L., LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 59-63, 2002.
- PINHEIRO, R. R., GOUVEIA, A. M. G., ALVES, F. S. F., HADDAD, J. P. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 534-543, 2000.
- PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 54, p. 259-268, 1994.
- RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. Anthelmintics drugs. In: **Pharmacology**. Churchill Livingstone, 3ª ed., 1996.
- RATES, S. M. K.. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RAYES, D., De ROSA, M. J., SPITZMAUL, G., BOUZAT, C. The anthelmintic pyrantel acts as a low efficacious agonist and na open-channel blocker of mammalian acetylcholine receptors. **Neuropharmacology**, v. 41, p. 238-245, 2001.
- REINEMEYER, R., COURTNEY, H. Antinematodal drugs. In: Adams, H. R. (Ed.) **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Iowa State University Press / Ames, Iowa State, U.S.A. pp. 947-979, 2001.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, p. 99-102, 1950.

- ROSS, M. H. The role of drugs in the control of parasitic nematode infections: must we do without? **Parasitology**, v.114, p. 137-144, 1997.
- SCAINI, C. J., TEIXEIRA, M. F., TRAVERSI, M. DO C., RHEINGANTZ, M. G. T., SIGNORINI, V. M. Helmintos de ratos wistar de diferentes faixas etárias criados em Biotério convencional. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 70, p. 265-268, 2003.
- SCHNYDER, M., TORGERSON, P. R., SCHÖNMANN, M., KOHLER, L., HERTZBERG, H. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p. 285-290, 2005.
- SHOOP, W. L., MROZIK, H., FISHER, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary Parasitology**, v. 50, p. 139-156, 1995.
- SILVA, S. L., ALVES, C. C., BORBA, H. R., CARVALHO, M. G., BONFIM, T. C. Evaluation of the anthelmintic activity of extratcts from *Luxemburgia octandra* St. Hill. in mice naturally with *Aspicularis tetraptera* and *Vampirolepis nana*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, p. 106-108, 2005.
- SILVA, M. G. V., CRAVEIRO, A. A., MATOS, F. J. A., MACHADO, M. I. L., ALENCAR, J. W. Chemical variation during daytime of constituents of the essencial oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, p. 32-34, 1999.
- SIMPKIN, K. G., COLES, G. C. The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 31, p. 66-69, 1981.
- SIQUEIRA, R. J. B. de, MAGALHÃES, P. J. C., LEAL-CARDOSO, J. H., DUARTE, G. P., LAHLOU, S. Cardiovascular effects of the essential oil form *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Science**, v. 78, p. 2365-2372, 2006.

SISSAY, M. M., ASEFA, A., UGGLA, A., WALLER, P. J. Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: exploration of *refugia* to restore anthelmintic efficacy. **Veterinary Parasitology**, v. 135, p. 337-346, 2006.

SOUSA, E. M. B. D., MARTÍNEZ, J., CHIAVONE-FILHO, O., ROSA, P. T. V., DOMINGOS, T., MEIRELES, M. A. M. Extraction of volatile oil from *Croton zehntneri* Pax et Hoff with pressurized CO₂: solubility, composition and kinetics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 325-333, 2005.

SOULSBY, E. J. L. **Paratilogía y enfermedades parasitarias**. 7^a ed. Nueva editorial Interamericana, México, D. F., 1987, 825p.

STEAR, M. J., ABUAGOB, O., BENOTHMAN, M., BISHOP, S. C., INNOCENT, G., KERR, A., MITCHELL, S. Variation among faecal egg counts following natural nematode infection in Scottish Blackface lambs. **Parasitology**, v. 132, p. 1-6, 2006.

TAYLOR, J. L. S., RABE, T., MCGAW, L. J., JÄGER, A.K., VAN STADEN, J. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. **Plant Growth regulation**, v. 34, p. 23-37, 2001.

TAYLOR, M.A., HUNT, K. R., GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 183-194, 2002.

THOMAZ-SOCCOL, V., SOUZA, F.P., SOTOMAIOR, C., CASTRO, E. A., MILEZEWSKI, V., MOCELIN, G., SILVA, M. C. P. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian archives of biology and technology**, v. 47, p. 41-47, 2004.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4^a ed., JIICA. Tokyo, Japan. 143 pp., 1998.

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

VERCRUYSSSE, J., HOLDSWORTH, P., LETONJA, T., BARTH, D., CONDER, G., HAMAMOTO, K., OKANO, K. International harmonization of anthelmintic efficacy guidelines (part 1). **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 171-193, 2001.

VIEIRA, L. S. Alternativas para o controle da verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes. **Circular Técnica 29 on line** ISSN 0100-9915. EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003.

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

VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R., PEREIRA, M. F., DANTAS, L. B., XIMENES, L. J. F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North-east Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 150, p. 447-452, 1999.

VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R., XIMENES, L. J. F. **Epidemiologia e Controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do nordeste**. EMBRAPA/CNPC, Ministério da agricultura e do abastecimento, Sobral, Ceará, 1997, 50p.

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

WHO. Traditional medicine. Fact sheet nº 134, May 2003 acesso internet <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/print.html>> acesso em 21/10/2006.

WOOD, I. B., AMARAL, N. K., BAIRDEN, K., DUNCAN, J. L., KASSAI, T., MALONE, J. B., JR., PANKAVICH, J. A., REINECKE, R. K., SLOCOMBE, O., TAYLOR, S. M.,

VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, v. 58, p. 181-213, 1995.

ANEXOS

ANEXO I

Anexo I. Artigo intitulado “Validação de plantas medicinais” publicado na Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis”

ANEXO II

Anexo II. Artigo submetido ao periódico *Veterinary Parasitology* intitulado “Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils”