

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Avaliação do potencial anti-helmíntico de *Origanum vulgare* e *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrointestinais de ruminantes**

**Luciana Laitano Dias de Castro**

Pelotas, 2014

**LUCIANA LAITANO DIAS DE CASTRO**

**Avaliação do potencial anti-helmíntico de *Origanum vulgare* e *Eugenia uniflora*  
em nematódeos gastrointestinais de ruminantes**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Veterinária da Universidade Federal  
de Pelotas, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em  
Ciências (área do conhecimento:  
Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Co-Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Elisabeth Aires Berne

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C355a

Dias de Castro, Luciana Laitano

Avaliação do potencial anti-helmíntico de *Origanum vulgare* e *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrointestinais de ruminantes / Luciana Laitano Dias de Castro. – 44f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Sanidade Animal. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2014. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite; co-orientador Maria Elisabeth Aires Berne.

1.Veterinária. 2.Parasitologia. 3.Anti-helmínticos. 4.Pitangueira. 5.Orégano. 6.Fitoterápicos. 7.*Haemonchus* spp. I.Leite, Fábio Pereira Leivas. II.Berne, Maria Elisabeth Aires. III.Título.

CDD: 636.089696

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Alessandro Pelegri Minho (Embrapa Pecuária Sul)

Prof. Dr. Carlos James Scaini (FURG)

Prof. Dr. Diego Moscarelli Pinto (UFPel)

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela - Suplente (UFPel)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (UFPel)

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer aos meus pais e minha irmã que sempre me apoiaram e tentaram compreender os momentos que me fiz ausente.

Ao Cahuê por toda força que me deu para sempre seguir em frente, mesmo sabendo que a estrada é longa.

Aos meus orientadores que, cada um de sua forma, me ajudaram e aconselharam, possibilitando a realização de muitos trabalhos.

Aos colegas de inúmeros laboratórios pelos quais eu estive presente, que sempre me ajudaram de uma maneira ou de outra.

A todos os professores que encontrei nesta jornada, que sempre me estimularam a ir atrás do conhecimento.

As amigas que eu fiz nestes dois anos de mestrado e que sei que serão para uma vida toda. Aos amigos antigos que sempre me apoiaram e ajudaram!

Aos Laboratórios de Preparo de Material da Parasitologia e da Microbiologia que sempre estavam dispostos a me ajudar e nunca deixaram faltar nada para realização dos trabalhos.

Aos Laboratórios que passei para a produção dos extratos, seja no departamento da Veterinária ou da Química.

## Resumo

DIAS DE CASTRO, Luciana Laitano. **Avaliação do potencial anti-helmíntico de *Origanum vulgare* e *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrointestinais de ruminantes.** 2014. 44f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O estudo avaliou a ação *in vitro* de extratos de *Origanum vulgare* sobre nematódeos gastrointestinais de bovinos e a ação *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Eugenia uniflora* em *Haemonchus contortus*, além de estimar a sua toxicidade em células VERO. Para as análises *in vitro* dos diferentes extratos hidroalcólicos e aquosos foi utilizada a técnica de inibição da eclodibilidade dos nematódeos gastrointestinais, os extratos de *Origanum vulgare* foram testados na concentração de 0,62 a 80 mg/mL e os de *Eugenia uniflora* de 1,25 a 40 mg/mL. Como controle foram utilizados anti-helmíntico comercial e água destilada. O efeito citotóxico dos extratos de *E. uniflora* foi mensurado através do ensaio de MTT (brometo tiazoli azul de tetrazólio) em células VERO. O teste *in vivo* foi realizado com ovinos naturalmente infectados que receberam 100 mg/Kg do extrato hidroalcólico por maceração de *E. uniflora*, por via oral, durante três dias consecutivos, sendo realizada coleta de fezes para estimar a redução do OPG. Os resultados dos testes demonstraram que os extratos de *O. vulgare* inibiram a eclodibilidade dos nematódeos gastrointestinais de bovinos com percentual de inibição variando de 8,8 a 100% e os extratos de *E. uniflora* inibiram a eclodibilidade de *H. contortus* com redução de 14,56 a 99,75%. Nas condições testadas, os extratos apresentaram citotoxicidade moderada a nula, com 100 a 51,23% de células viáveis. No teste *in vivo* não foi observado redução do OPG para o grupo tratado, apenas para o grupo controle positivo com anti-helmíntico. Os diferentes extratos de *O. vulgare* e *E. uniflora* possuem efeito *in vitro* na inibição da eclodibilidade de nematódeos de ruminantes, sendo a tintura e o extrato hidroalcólico de *O. vulgare* as formas mais promissoras para os nematódeos gastrointestinais de bovinos e os extratos hidroalcólicos de *E. uniflora* para de *H. contortus*.

Palavras-Chave: Pitangueira. Orégano. Fitoterápico. *Haemonchus* spp.

## Abstract

DIAS DE CASTRO, Luciana Laitano. **Avaliação do potencial anti-helmíntico de *Origanum vulgare* e *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrointestinais de ruminantes.** 2014. 44f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This study aimed to evaluate the *in vitro* effects of *Origanum vulgare* extracts on gastrointestinal nematode of cattle and the *in vitro* and *in vivo* action of *Eugenia uniflora* extracts in *Haemonchus contortus* as well as estimating its toxicity in VERO cells. For the *in vitro* analysis of different hydroalcoholic and aqueous extracts, the technique of inhibiting the hatchability of gastrointestinal nematodes eggs was applied; the *Origanum vulgare* and the *Eugenia uniflora* extracts were tested in the concentration of 0.62-80 mg/mL and 1.25-40 mg/mL, respectively. Commercial anthelmintics and distilled water were used as control treatments. The cytotoxic effect of *E. uniflora* extracts was measured by using MTT assay (thiazolyl blue tetrazolium bromide test) in VERO cells. The *in vivo* test was conducted with naturally infected sheep receiving 100 mg/kg of the hydroalcoholic extract by maceration of *E. uniflora* administered orally for three consecutive days; fecal collection was performed to estimate the reduction in EPG. Test results showed that the *O. vulgare* extracts inhibited egg hatch of cattle gastrointestinal nematodes at a percentage that varied from 8.8 to 100%. The extracts of *E. uniflora* also inhibited the hatchability of *H. contortus* eggs, with an action level ranging from 14.56 to 99.75%. The extracts have shown moderate to null cytotoxicity, ranging from 51.23 to 100% viable cells. It was not observed the reduction of the EPG for the treatment group in the *in vivo* test, only for the positive control group with anthelmintic. The different *O. vulgare* and *E. uniflora* extracts have proved to be effectual on the *in vitro* inhibition of the hatchability of nematodes eggs in ruminants, with *O. vulgare* dye and hydroalcoholic extract being the most promising methods for gastrointestinal nematodes control in cattle and hydroalcoholic extracts of *E. uniflora* for *H. contortus* eggs.

Keywords: Pitangueira. Oregano. Phytotherapeutic. *Haemonchus* spp.

## Lista de Figuras

|                 |                                                                                                                                                                                                                        |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Artigo 2</b> | <b>Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de extratos de <i>Eugenia uniflora</i> em nematódeos gastrintestinais de ovinos</b>                                                                                         |    |
| Figura 1        | Percentual médio de inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de ovinos ( $\pm$ desvio padrão) pelos extratos aquosos por decocção (EA/DEC) e por banho maria (EA/BM) de <i>Eugenia uniflora</i> ..... | 33 |



## Lista de Tabelas

|                 |                                                                                                                                                                                                                      |    |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Artigo 1</b> | <b><i>Origanum vulgare</i> (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle</b>                                                                                                                |    |
| Table 1         | Mean inhibition percentage $\pm$ standard deviation of gastrointestinal nematodes eggs hatch of cattle in different treatments and concentrations of <i>Origanum vulgare</i> extracts.....                           | 17 |
| <b>Artigo 2</b> | <b>Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de extratos de <i>Eugenia uniflora</i> em nematódeos gastrintestinais de ovinos</b>                                                                                       |    |
| Quadro 1        | Média percentual de células viáveis tratadas com extratos de <i>Eugenia uniflora</i> em diferentes concentrações.....                                                                                                | 32 |
| Quadro 2        | Percentual médio de inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de ovinos ( $\pm$ desvio padrão) pelos extratos hidroalcólicos de <i>Eugenia uniflora</i> .....                                        | 32 |
| Quadro 3        | Média da contagem do OPG $\pm$ desvio padrão dos grupos controle positivo (anti-helmíntico), tratamento (EHA/MA), controle negativo (Água) e porcentagem média de redução do OPG para o grupo controle positivo..... | 33 |

## Sumário

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução.....                                                                                                                          | 9  |
| 2. Objetivos.....                                                                                                                           | 12 |
| 3. Artigos.....                                                                                                                             | 13 |
| 3.1 Artigo 1 - <i>Origanum vulgare</i> (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle.....                          | 13 |
| 3.2 Artigo 2 - Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de extratos de <i>Eugenia uniflora</i> em nematódeos gastrintestinais de ovinos..... | 23 |
| 4. Conclusão Geral.....                                                                                                                     | 34 |
| 5. Referências.....                                                                                                                         | 35 |
| Anexo.....                                                                                                                                  | 43 |

## 1 INTRODUÇÃO

Analisando o Brasil como um país com enorme extensão territorial e clima favorável à produção de ovinos e bovinos, observa-se um alto potencial para tornar-se um importante produtor mundial dessas espécies, suprimindo necessidades no mercado para consumo interno e externo. Atualmente, possui o segundo maior rebanho bovino efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, das quais 90% são criadas em sistema extensivo de produção (ANUALPEC, 2011). Já o rebanho ovino possui uma população de 16,8 milhões de animais, estando aproximadamente 30% destes na Região Sul do país. O Rio Grande do Sul possui cerca de 4,09 milhões de ovinos, sendo estes criados quase que exclusivamente em pastagem nativa e em associação com bovinos (IBGE, 2013).

Dentre os principais problemas que acometem os rebanhos e que limitam consideravelmente o aproveitamento econômico destes animais estão às parasitoses (LIMA, 2004). Os nematódeos gastrintestinais, especificamente aqueles pertencentes a Família Trichostrongylidae são um dos principais responsáveis pelas perdas de produtividade e desempenho desses animais. Os parasitos do gênero *Haemonchus*, são encontrados no abomaso e ao se alimentarem através da hematofagia podem causar anemia, hipoproteinemia e perda de peso, podendo levar o animal a óbito em casos de haemoncose aguda (ZAJAC, 2006). No Brasil estão presentes as espécies *H. contortus*, *H. similis* e *H. placei* (AMARANTE et al., 2007), sendo *H. contortus* o principal parasito de ovinos e caprinos e *H. placei* dos bovinos (GONZALES & SANTIAGO, 1969).

O ciclo biológico de *Haemonchus* spp. pode ser descrito a partir do momento em que as fêmeas começam a oviposição no órgão de eleição e os ovos são eliminados para o ambiente. Na fase de vida livre ocorre eclosão das larvas a partir de 24 horas após a eliminação dos ovos junto às fezes, e o desenvolvimento da larva até o forma infectante (terceiro estágio, L3), este processo compreende uma série de etapas influenciadas pelas condições climáticas (SANTOS et al., 2012). Esses estádios chamados de pré-parasitários são responsáveis por aproximadamente 95% da população desses nematódeos. As condições ideais para

que ocorra a fase de vida livre no meio ambiente são temperatura entre 18 a 25°C e 80 a 100% de umidade (NARI & FIEL, 1993).

A ocorrência de chuvas estimula o desenvolvimento e a migração das L3 presentes nas fezes para a planta forrageira, e conseqüentemente, a infecção dos animais durante o hábito de pastejo (SILVA et al., 2008; SANTOS et al., 2012). Após a ingestão, junto à gramínea, as L3 sofrem duas mudas no trato gastrointestinal do hospedeiro, para larva de quarto estágio (L4) e larva de quinto estágio (L5), que se diferenciam em machos e fêmeas atingindo a fase adulta. As formas adultas são encontradas preferencialmente no abomaso e, após a cópula, uma fêmea do parasito *Haemonchus* spp. pode liberar junto às fezes aproximadamente 5000 ovos/dia (LE JAMBRE, 1995).

As perdas causadas pelas helmintoses gastrintestinais são determinadas pelos efeitos agudos da doença, que podem resultar na morte do animal. Além disso, efeitos de infecções prolongadas que levam a um desenvolvimento corporal lento, perda de peso, redução na produção de carne, leite e lã, além dos custos monetários para o controle da verminose, incluindo o valor da aquisição do fármaco e da mão-de-obra para a aplicação do medicamento (SPÓSITO FILHA et al., 2002; FURTADO, 2006). O controle destes parasitos é usualmente realizado com anti-helmínticos, visando reduzir os níveis de infecção dos animais e promover a descontaminação das pastagens (CHARLES et al., 1989).

Os primeiros relatos de nematódeos resistentes aos anti-helmínticos ocorreram na década de 1960 e, desde então, esse fenômeno deu origem a um estado de crise em alguns setores da atividade pecuária. Essa situação tornou-se grave, especialmente nas criações de pequenos ruminantes nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, onde ocorre resistência à maioria dos grupos de anti-helmínticos de amplo espectro (WALLER, 1997). Estudos realizados na região do MERCOSUL (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) demonstram alta prevalência de nematódeos de ovinos resistentes a vários princípios ativos, inclusive as lactonas macrocíclicas (FAO, 2003). Na Região Sul do Brasil este fato já foi detectado em ovinos dos três estados, Rio Grande do Sul (ECHEVARRIA et al., 1996), Santa Catarina (RAMOS et al., 2002) e Paraná (THOMAZ-SOCCOL et al., 2004).

Em ovinos e caprinos é frequente o relato de resistência dos nematódeos aos fármacos, porém, o mesmo não acontece com bovinos. Isso não significa que os parasitos dessa espécie sejam mais resistentes aos princípios ativos, e sim que a

frequência dos tratamentos seja menor (PAIVA et al., 2001). O primeiro relato em bovinos feito no Brasil foi em 1990 por Pinheiro & Echevarria, no Rio Grande do Sul. Em Santa Catarina, Souza et al. (2004) publicaram resultados parciais sobre a resistência de *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp. *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp. à diversos princípios ativos.

Frente a esta problemática, métodos de controle que minimizem a utilização de anti-helmínticos são uma necessidade urgente, por isso muitos estudos estão sendo desenvolvidos e mostrando resultados promissores. No controle biológico, espécies de fungos nematófagos, como *Duddingtonia flagrans*, são capazes de apreender larvas de nematódeos gastrintestinais, apresentando resultados positivos em estudos com ovinos e caprinos (SANTURIO et al., 2009). A utilização de bactérias nematicidas neste mesmo tipo de controle mostrou que *Bacillus* spp. possuem efeito larvicida nas fases de vida livre do *Haemonchus contortus* quando misturados as fezes de ovinos experimentalmente infectados (SINOTT et al., 2012).

Além do controle biológico, pesquisas verificaram que a suplementação proteica dos animais atua como fator benéfico para redução da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e consequentemente diminuição da contaminação da pastagem (HOUDIJK et al., 2005). Outra alternativa estudada seria o tratamento seletivo de animais infectados com *Haemonchus* spp. através do método FAMACHA, que identifica os animais que devem ser vermifugados sem o auxílio de procedimentos laboratoriais (VAN WYK et al., 2006). Uma variedade de plantas, reconhecidas popularmente como medicinais, também tem sido estudada com o objetivo de comprovar a atividade anti-helmíntica dos extratos vegetais (ATHANASIADOU & KYRIAZAKIS, 2004).

Dentre as novas e promissoras alternativas atualmente pesquisadas para o controle das helmintoses, a utilização de plantas é apontada como uma das mais relevantes em diferentes países (NERY et al., 2009). Além disso, a aceitação do mercado consumidor por alimentos orgânicos ou naturais e o aumento do consumo desses produtos têm reforçado o interesse pela busca de alternativas não convencionais para o controle das diversas doenças em animais de produção. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antiparasitário de *Origanum vulgare* e *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrintestinais de ruminantes.

## 2 OBJETIVOS

Geral:

Verificar a ação de *Origanum vulgare* e *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrintestinais de ruminantes.

Específicos:

Avaliar a ação *in vitro* de diferentes extratos de *Origanum vulgare* em ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos.

Verificar a ação *in vitro* de diferentes extratos de *Eugenia uniflora* em ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

Analisar a citotoxicidade dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Eugenia uniflora* em células VERO.

Avaliar a ação anti-helmíntica do extrato de *Eugenia uniflora* em ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais.

### **3 ARTIGO**

#### **3.1 Artigo 1**

##### ***Origanum vulgare* (Lamiaceae) OVICIDAL POTENTIAL ON GASTROINTESTINAL NEMATODES OF CATTLE**

Luciana Laitano Dias de Castro, Isabel Martins Madrid, Cíntia Lidianne Guidotti  
Aguiar, Leonardo Mortagua de Castro, Marlete Brum Cleff, Maria Elisabeth Aires  
Berne, Fábio Pereira Leivas Leite

Artigo publicado na Revista Ciência Animal Brasileira em Dezembro de 2013  
(v. 14, n. 4, p. 508-513)

## ***Origanum vulgare* (Lamiaceae) OVICIDAL POTENTIAL ON GASTROINTESTINAL NEMATODES OF CATTLE**

Protocolado em: 15 jan. 2013. Aceito em: 30 jul. 2013.

Luciana Laitano Dias de Castro<sup>1</sup>, Isabel Martins Madrid<sup>1</sup>, Cíntia Lidiane Guidotti Aguiar<sup>1</sup>, Leonardo Mortagua de Castro<sup>1</sup>, Marlete Brum Cleff<sup>2</sup>, Maria Elisabeth Aires Berne<sup>1</sup>, Fábio Pereira Leivas Leite<sup>3</sup>

1Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

2Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPEL, Pelotas, RS, Brasil

3Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPEL, Pelotas, RS, Brasil

### **Abstract**

Due to anthelmintic resistance in nematodes, several research studies have been developed seeking control alternatives to these parasites. This study evaluated the *in vitro* action of *Origanum vulgare* on gastrointestinal nematode eggs of cattle. In order to evaluate the ability to inhibit egg hatch, different dried leaf extracts of this plant were tested, such as dye, hydroalcoholic and aqueous extracts at concentrations varying from 0.62 to 80 mg/mL. Each assay was accompanied by control containing levamisole hydrochloride (0.2 mg/mL), distilled water and 70° GL grain alcohol at the same concentration of the extracts. Test results showed that the different *O. vulgare* extracts inhibited egg hatch of cattle gastrointestinal nematodes at a percentage that varied from 8.8 to 100%; dye and hydroalcoholic extract were the most promising inhibitors. In view of this ovicidal property, *O. vulgare* may be an important source of viable antiparasitic compounds for nematodiosis control in ruminants.

**Keywords** – phytotherapeutic; *Haemonchus* spp.; *in vitro*; oregano.

## **POTENCIAL OVICIDA DE *Origanum vulgare* (Lamiaceae) EM NEMATÓDEOS GASTROINTESTINAIS DE BOVINOS**

### **Resumo**

Em virtude da resistência dos nematódeos gastrintestinais aos antihelmínticos, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas buscando alternativas de controle para estas parasitoses. Nesse contexto, o estudo avaliou a ação *in vitro* de *Origanum vulgare* sobre ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos. Para avaliar a capacidade de inibição da eclodibilidade dos ovos, diferentes formas de extratos das folhas secas desta planta foram testadas como tintura, extrato hidroalcoólico e extrato aquoso nas concentrações de 0,62 a 80 mg/mL. Cada ensaio foi acompanhado de controle contendo cloridrato de levamisol (0,2 mg/mL), água destilada e álcool de cereais 70° GL nas mesmas concentrações dos produtos. Os resultados dos testes demonstraram que os diferentes extratos de *O. vulgare* inibiram a eclodibilidade dos ovos de nematódeos gastrintestinais de bovinos com percentual de inibição variando de 8,8 a 100%, sendo a tintura e o extrato hidroalcoólico as formas mais promissoras. Frente a esta propriedade ovicida, o *O. vulgare* pode representar uma importante fonte de compostos antiparasitários viáveis para o controle das nematodioses em ruminantes.

**Palavras-chave** – fitoterápico; *Haemonchus* spp.; *in vitro*; orégano.



## INTRODUCTION

Gastrointestinal helminthic diseases in ruminants are among the main problems that affect livestock in this raising system, greatly limiting the economic exploitation of these animals (COUMENDOUROS et al., 2003). The administration of anthelmintic drugs to these animals is the main control measure to prevent the economic losses caused by the parasites (MILLER & HOROHOV, 2006). However, the wide use of these drugs has contributed to the emergence of resistant nematodes, which is a worldwide problem (CHAGAS et al., 2011). In addition to this, there has been a great demand, both within the country and abroad, for animal products which are free from chemical residues; among the natural alternatives for ruminant gastrointestinal nematode control are medicinal plants, whose studies have shown promising results (ALMEIDA et al., 2007; MACEDO et al., 2009; KAMARAJ et al., 2011).

Until the emergence of synthetic products, most available drugs in the world originated from studies developed based on the popular culture, which makes the rich Brazilian biodiversity a vast field of research (BRASIL, 2011). The Lamiaceae family, in turn, includes the third largest number of species listed as having antiparasitic activity (FURTADO, 2006). Research developed with plants of this family, especially with *Origanum vulgare* essential oil, has demonstrated antiprotozoal activity against *Trypanosoma cruzi* (SANTORO et al., 2007) and *Eimeria tenella* (GIANNENAS et al., 2003). Several studies on helminths have also been done to evaluate *O. vulgare* essential oil action against phytopathogens (OKA et al., 2000; BARBOSA et al., 2010) and human intestinal parasites (FORCE et al., 2000). However, there are no studies testing the effect of the *O. vulgare* on gastrointestinal nematodes of cattle. So, the main goal of this study was to evaluate the in vitro action of different dried leaf extracts of *O. vulgare* on gastrointestinal nematode eggs of cattle.

## MATERIALS AND METHODS

*O. vulgare* dry leaves with quality and origin certification were obtained from a commercial distributor (Luar Sul<sup>®</sup>). Different forms of plant extracts, such as dye, hydroalcoholic and aqueous extracts, were prepared and tested.

The dye was prepared at a 0.1 g plant concentration per microliter of 70° GL grain alcohol (GA) as described by Schiedeck et al. (2008), and stir-macerated daily for a seven day period. After this period, the solution was filtered through a filter paper (n. 1 Whatman) to

eliminate solid residue; the initial volume was restored with 70° GL grain alcohol, and stored in an amber vial for later use. The solvent was extracted at 55 °C under 600 mm/Hg negative pressure using rotary evaporation (Q344M Quimis) to obtain the hydroalcoholic extract (HAE). Later, the initial volume was restored with sterile distilled water, and HAE was used soon afterwards.

To produce aqueous extract (AqE) a 10% solution was prepared from the infusion of the plant in water at 90 °C, kept in closed flasks for 10 minutes. Following, the samples were filtered through filter paper (n. 1 Whatman) to eliminate solid residues; the initial volume was restored with sterile distilled water and the solution was used immediately.

Eggs were obtained by collecting feces directly from the rectal ampulla of 120-day old Holstein cattle which presented a gastrointestinal nematode mixed infection. The animals were maintained without anthelmintic treatment for a 60 day period prior to collection; the count of eggs per gram of feces (EPG) was obtained by the GORDON & WHITLOCK (1939) technique for over 2000 eggs. An adapted version of the HUBERT & KERBOEUF (1992) technique was used for the recovery of eggs, when feces were macerated, diluted in distilled water and passed through four sieves in decreasing mesh opening order (1 mm, 105 µm, 55 µm, 25 µm). The eggs were recovered from the 25 µm sieve, diluted in distilled water and quantified from a 50 µL suspension aliquot three times.

The genera of the nematode larvae present in the feces were determined by the ROBERTS & O'SULLIVAN (1950) technique.

The egg hatch test was performed in 24-well microplates with six replicates, according to the technique proposed by COLES et al. (1992). Approximately 150 eggs were placed in each well and the extract was tested in eight successive log<sub>2</sub> concentrations of 80 to 0.62 mg/mL. As control, 0.2 mg/mL levamisole hydrochloride, sterile distilled water, and 70° GL grain alcohol (dye solvent) at the same concentrations as those of the extracts, were used.

The microplates were incubated in a BOD incubator at 28 °C at a relative humidity of 80% for 24 h for quantification of eggs and first stage larvae in an inverted microscope (Zeiss, Germany). Results were expressed as the sextuplicate mean percentage of hatchability inhibition, and the efficacy of each treatment in the egg hatch test was determined according to the equation described by CAMURÇA-VASCONCELOS et al. (2007): Hatchability inhibition percentage =  $[\text{number of larvae} / (\text{number of larvae} + \text{number of eggs})^{-1}]100$

The results were analyzed by ANOVA and means were compared by the Tukey test ( $P \leq 0.05$ ) by using the Statistix 9.0 software.

## RESULTS AND DISCUSSION

The different *O. vulgare* extracts inhibited egg hatch gastrointestinal nematodes of cattle, with an inhibition percentage ranging from 8.8 to 100% (Table 1). In addition, the sextuplicate results were homogeneous in all tests performed, showing a low standard deviation. The distilled water and anthelmintic controls showed an average percentage inhibition of 9.8% and 100%, respectively. The fecal culture result revealed the occurrence of the genera *Haemonchus* (83%), *Trichostrongylus* (16%) and *Oesophagostomum* (1%).

Table 1. Mean inhibition percentage  $\pm$  standard deviation of gastrointestinal nematodes eggs hatch of cattle in different treatments and concentrations of *Origanum vulgare* extracts.

| Concentrations<br>(mg/mL) | Extracts                      |                               |                                |                               |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
|                           | GA                            | Dye                           | HAE                            | AqE                           |
| 80                        | 100 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.0   | 100 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.0   | 96.7 <sup>Ba</sup> $\pm$ 1.51  | 49.8 <sup>Ca</sup> $\pm$ 2.24 |
| 40                        | 100 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.0   | 100 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.0   | 80 <sup>Bb</sup> $\pm$ 1.44    | 27.7 <sup>Cb</sup> $\pm$ 4.65 |
| 20                        | 95.8 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0.67 | 100 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.0   | 58.7 <sup>Cc</sup> $\pm$ 0.98  | 18.8 <sup>Dc</sup> $\pm$ 0.76 |
| 10                        | 27.1 <sup>Cc</sup> $\pm$ 1.74 | 95.6 <sup>Ab</sup> $\pm$ 1.11 | 41.6 <sup>Bd</sup> $\pm$ 3.25  | 15.7 <sup>Dc</sup> $\pm$ 0.72 |
| 5                         | 14.2 <sup>Bd</sup> $\pm$ 2.19 | 40.6 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.92 | 11.6 <sup>BCe</sup> $\pm$ 0.85 | 9.6 <sup>Cd</sup> $\pm$ 1.71  |
| 2.5                       | 14.2 <sup>Bd</sup> $\pm$ 0.42 | 41.4 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.93 | 11 <sup>Ce</sup> $\pm$ 0.86    | 9.5 <sup>Cd</sup> $\pm$ 2.57  |
| 1.25                      | 15.6 <sup>Bd</sup> $\pm$ 1.36 | 33.4 <sup>Ad</sup> $\pm$ 3.36 | 10.7 <sup>Ce</sup> $\pm$ 2.72  | 9.8 <sup>Cd</sup> $\pm$ 0.41  |
| 0.62                      | 11.5 <sup>Be</sup> $\pm$ 0.57 | 30.1 <sup>Ad</sup> $\pm$ 2.96 | 11.3 <sup>Be</sup> $\pm$ 1.64  | 8.8 <sup>Bd</sup> $\pm$ 3.25  |

GA – grain alcohol 70° GL; HAE - hydroalcoholic extract; AqE – aqueous extract.

Different capital letters, in the line, and different small letters, in the column, differ significantly from each other ( $p \leq 0.05$ ).

The hatchability inhibition values for the dye ranged from 100 to 30.1%; this extract showed good activity, showing similar results to anthelmintic control at the 80, 40 and 20 mg/mL concentrations ( $p > 0.05$ ). In the consecutive concentrations there was a statistically significant difference in inhibition percentages among the concentrations 10, 5 and 1.25 mg/mL, this effect was directly proportional to the concentration ( $p < 0.0001$ ). From the concentration of 10 mg/mL on, one can observe a significant difference between the GA and dye inhibition rates ( $p < 0.05$ ). This increase is explained by the active compounds present in the dye.

Grain alcohol (GA) also obtained results ranging from 100 to 11.5%, showing a significantly lower action than dye ( $p < 0.0001$ ) for the 20 mg/mL concentration, when dye

obtained a 100% inhibition rate and GA, 95.8%. At the 10 mg/mL concentration, dye action was 3.5 times higher than GA; for this concentration, the inhibition difference was on average 2.6 higher for the dye as compared to GA.

The average inhibition hatchability percentage of the *O. vulgare* hydroalcoholic extract at the 80 mg/mL concentration was 96.7%, only 3.3% lower than that of the anthelmintic control. A gradual decrease of ovicidal activity was found at consecutive concentrations, with statistical differences between concentrations until 5 mg/mL. Below this concentration, the average inhibition percentage remained lower than 11.6%, not showing statistical differences from consecutive concentrations and the distilled water control ( $p > 0.05$ ).

The results of the *O. vulgare* aqueous extract demonstrated egg hatch inhibition, although the average inhibition percentage was low, ranging from 49.8 to 8.8% at the concentrations tested. At the 80 mg/mL concentration, the aqueous extract revealed a 49.8% efficacy, showing a lower activity than that of the anthelmintic control ( $p < 0.0001$ ) and higher than that of the distilled water control ( $p < 0.0001$ ). When the 80 and 40 mg/mL concentrations were compared, a significant activity reduction to 27.7% was observed ( $p < 0.0001$ ). From the 5 mg/mL concentration, this effect remained lower than 10%, not showing a statistically significant difference from the distilled water control ( $p > 0.05$ ).

In vitro tests have been widely used in the screening of medicinal plants, offering advantages such as ease of application, low cost, speed, in addition to preventing the indiscriminate use of experimental animals (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). The results obtained in this study showed that *O. vulgare* presents a differentiated ovicidal effect on cattle nematodes. These differences are related to different factors, especially active principles extracted by using different techniques and solvents, as well as a variation in solubility of the active constituents in the solvent systems (ELOFF, 1998).

A range of active compounds, including terpenoids, flavanoids, tannins and carvacol, considered as a potential source of natural bioactive elements, are present in the aromatic plant *O. vulgare* (CLEFF et al., 2010). Several studies report that the presence of flavonoids and tannins is responsible for the anthelmintic activity (ATHNASIADOU et al., 2001; KERBOEUF et al., 2008). The presence of these various compounds in the leaf of *O. vulgare* could then be responsible for the anthelmintic activities of the extracts tested in this study.

Even though no studies have showed the action of *O. vulgare* extracts on nematode of cattle, some research studies evaluating the action of plants from the same family on other

parasites were found. GARDIANO et al. (2011), upon evaluating the anthelmintic potential of *O. vulgare* aqueous extract at a 100 mg/mL concentration on the phytonematode *Rotylenchulus reniformis* observed an egg count reduction of only 28%. This result was lower to that of this study, which obtained a 49.8% egg hatch inhibition at the 80 mg/mL concentration.

The dye and hydroalcoholic extract of *O. vulgare* showed similar activity to other plants of the same family. An example of this is the extract of the plant *Anisomeles malabarica* R. Br. which, at a 25 mg/mL concentration, inhibited the hatch of *H. contortus* eggs at 100, 93.8 and 83.2% when extracted with ethyl acetate, methanol and acetone solvents, respectively (KAMARAJ et al., 2011), while *Mentha piperita* extract at a 0.078 mg/mL concentration inhibited approximately 90% of *H. contortus* egg hatch (CARVALHO et al., 2012). *Mentha villosa* hydrolate, in turn, at concentrations ranging from 20 to 100%, inhibited egg hatch of gastrointestinal nematodes of cattle between 67 and 100%, which was a dose-dependent effect (NASCIMENTO et al., 2009). EGUALE et al. (2011) found 100% hatchability inhibition of *Haemonchus contortus* eggs when either the aqueous or hydroalcoholic extract of the plant *Leucas martinicensis* (Lamiaceae) at a 1 mg/mL concentration was used.

According to the Brazilian Pharmacopoeia Herbal Formulary, several dyes formulated with 70% alcohol which have anti-inflammatory, antiflatulent, antispasmodic, diuretic, antiseptic, expectorant, scabicide, and pediculicide action are recommended for internal and external use in humans (BRASIL, 2011). In this sense, a lower *O. vulgare* dye concentration (10 mg/mL) with ovicidal action may be used in helminthiasis because it contains 7% alcohol in its composition, but its action in vivo still needs to be tested.

The dye can be considered the most viable option for popular use insofar as this formulation involves a simple, easy to handle technique which does not require specific equipment, and the material can be stored for up to two years (SCHIEDECK et al., 2008). Besides, medicinal plant dyes have been widely used for the treatment of several diseases in popular medicine, as well as for phytopathogen control (SOUZA et al., 2004; SCHIEDECK et al., 2008).

## CONCLUSIONS

The different *O. vulgare* extracts used in this study showed anthelmintic activity on eggs of gastrointestinal nematodes of cattle; among them, dye and hydroalcoholic extract at

10 mg/mL and 80 mg/mL, respectively, showed the most promising results. However, further studies are necessary to evaluate their toxicity and active components, in addition to their *in vivo* anthelmintic potential.

## References

- ALMEIDA, M.A.O.; DOMINGUES, L.F.; ALMEIDA, G.N.; SIMAS, M.M.S.; BOTURA, M.B.; CRUZ, A.C.F.G.; SILVA, A.V.A.F.; MENEZES, T.P.; BATATINHA, M.J.M. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Mentha piperita* L. e de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre cultivos de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.16, n.1, p.57-59, 2007.
- ATHNASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R.L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.205–219, 2001.
- BARBOSA, P.; LIMA, A.S.; VIEIRA, P.; DIAS, L.S.; TINOCO, M.T.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; FIGUEIREDO, A.C.; MOTA, M. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Journal of Nematology**, v.42, n.1, p.8-16, 2010.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; MORAIS, S.M.; SANTOS, L.F.L.; ROCHA, M.F.G.; BEVILAQUA, C.M.L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.7, n.3, p.97-106, 2005.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v.148, n.3-4, p.288-294, 2007.
- CARVALHO, C.O.; CHAGAS, A.C.S.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; BRITO, L.G.; CHAVES, F.C.M.; STEPHAN, M.P.; BIZZO, H.R.; AMARANTE, A.F.T. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, v.183, p.260-268, 2012.
- CHAGAS, A.C.S.; NICIURA, S.C.M.; MOLENTO, M.B. Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. **Brasília: Embrapa Informação Tecnológica**, 2011. Disponível em: [http://livraria.sct.embrapa.br/liv\\_resumos/pdf/00061850.pdf](http://livraria.sct.embrapa.br/liv_resumos/pdf/00061850.pdf)
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; XAVIER, M.; SCHUCH, L.F.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A.; MELLO, J.R.B. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.1, p.116-123, 2010.
- 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, n.1-2, p.35-44, 1992.

COUMENDOUROS, K.; TANCREDI, I.P.; SCOTT, F.B.; MARTINS, I.V.F.; SANT'ANNA, F.B.; GRISI, L. Eficácia anti-helmíntica da eprinemectina no controle de nematoides gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.3, p.121-124, 2003.

EGUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAY, M. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, n.1, p.108-113, 2011.

ELOFF, J.N. Which extractant should be used for screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal Ethnopharmacology**, v.60, n.1, p.1-8, 1998.

FORCE, M.; SPARKS, W.S.; RONZIO, R.A. Inhibition of Enteric Parasites by Emulsified Oil of Oregano *in vivo*. **Phytotherapy Research**, v.14, n.3, p.213 -214, 2000.

FURTADO, S.K. Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo*. Tese, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2006. Disponível em: [http://www.oikos.ufpr.br/publicacoes/teses/01\\_Tese%20Silvana%20Furtado.pdf](http://www.oikos.ufpr.br/publicacoes/teses/01_Tese%20Silvana%20Furtado.pdf)

GARDIANO, C.G.; MURAMOTTO, S.P.; KRZYZANOWISKI, A.A.; ALMEIDA, W.P.; SAAB, O.J.G.A. Efeito de extratos aquosos de espécies vegetais sobre a multiplicação de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.4, p.553-556, 2011.

GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZAHARIADOU, M.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N.A.; SPAIS, A.B. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archives fur Tierernahrung**, p.57, n.2, p.99-106, 2003.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v.12, n.1, p.50-52, 1939.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D.A. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Research**, v.130, n.20, p.442-446, 1992.

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

KERBOEUF, D.; RIOU, M.; GUÉGNARD, F. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. **Mini-Reviews Medicinal Chemistry** v.8, p.116-128, 2008.

MACEDO, I.T.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; OLIVEIRA, L.M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.S.; OLIVEIRA, F.R.; QUEIROZ-JUNIOR, E.M.; PORTELA, B.G.; BARROS, R.S.; CHAGAS, A.C.S. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p.62-66, 2009.

MILLER, J.E.; HOROHOF, D.W. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. **Journal of Animal Science**, v.84, (suplem E), p.124-132, 2006.

NASCIMENTO, E.M.; FURLONG, J.; PIMENTA, D.S.; PRATA, M.C.A. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Hunds. (Lamiaceae) em nematoides gastrintestinais de bovinos. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p.817-824, 2009.

OKA, Y.; KOLTAI, H.; BAR-EYAL, M.; MOR, M.; SHARON, E.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. **Pest Management Science**, v.56, p.983-988, 2000.

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

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.; FREIRE, J.M.; SOARES, M.J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v.134, p.1649-1656, 2007.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; ELISABETSKY, R. Farmácias caseiras comunitárias do município de Maquiné (RS): uma avaliação etnofarmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.83-91, 2004.

SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G.A.P.; NACHTIGAL, G.F.; BAUER, M.V. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. **EMBRAPA – Comunicado Técnico**, v.190, Out, p.1-4, 2008. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/746473/1/comunicado190.pdf>



### **3.2 Artigo 2**

#### **Efeito *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrintestinais de ovinos**

Luciana Laitano Dias de Castro, Isabel Martins Madrid, Fernando Caetano de Oliveira, Plínio Aguiar de Oliveira, Leonardo Mortagua de Castro, Maria Elisabeth Aires Berne, Fábio Pereira Leivas Leite

Manuscrito será submetido a Pesquisa Veterinária Brasileira

## Efeito *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrintestinais de ovinos

Luciana L. Dias de Castro<sup>1\*</sup>, Isabel M. Madrid<sup>1</sup>, Fernando C. de Oliveira<sup>1</sup>, Plínio A. de Oliveira<sup>1</sup>, Leonardo M. de Castro<sup>1</sup>, Maria E. A. Berne<sup>1</sup>, Fábio P. L. Leite<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Dias de Castro L.L., Madrid I.M., Oliveira F.C., Oliveira P.A., Castro L.M., Berne, M.E.A. & Leite, F.P.L. 2014 [*In vitro and in vivo effect of Eugenia uniflora extracts on gastrointestinal nematode of sheep*] Efeito dos extratos de *Eugenia uniflora* em *Haemonchus contortus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, s/n, Capão do Leão, RS, 96010-900, Brasil. E-mail: lu.ldcastro@gmail.com.

Gastrointestinal parasites are among the major health problems of sheep farming. The main measure taken to control this infection is the use of anthelmintics, to which nematodes have multidrug resistance. This study evaluated the action *in vitro* and *in vivo* of various extracts of *Eugenia uniflora* on gastrointestinal nematode of sheep, and estimated its toxicity in eukaryotic cells. To evaluate the ability of inhibiting the hatchability of eggs, various forms of extracts of dried leaves of this plant were tested as aqueous and hydroalcoholic extracts in the concentrations from 40 to 1.25 mg/mL. Each test was accompanied by control containing thiabendazole (0.025 mg/mL) and distilled water. The cytotoxic effect of the extracts was measured using the MTT assay on VERO cells at concentrations from 4000 to 1.95 µg/mL. In the *in vivo* test, 100 mg/kg of the hydroalcoholic extract by maceration was administered orally for three consecutive days in sheep naturally infected and fecal collection was performed to estimate the reduction in EPG. The test results showed that the different extracts of *E. uniflora* inhibited hatchability of eggs of *Haemonchus contortus* with a percentage of inhibition ranging from 14.56 to 99.75%, being the hydroalcoholic extracts most effective than the aqueous. Extracts showed moderate to null cytotoxicity under the conditions tested, with a percentage of viable cells between 100 and 51.23%. It was not observed the reduction of the EPG for the treatment group in the *in vivo* test, only for the positive control group with anthelmintic. The extracts of *E. uniflora* proved promising with *in vitro* action against *H. contortus* and moderate to null cell toxicity, requiring studies that assess other concentrations and forms of *in vivo* administration.

INDEX TERMS: phytotherapeutic, *Haemonchus contortus*, sheep, pitangueira.

**RESUMO.-** Dentre os principais problemas sanitários da criação de ovinos estão as parasitoses gastrintestinais. A principal medida adotada para controlar esta infecção é a utilização de anti-helmínticos, aos quais os nematódeos apresentam multirresistência. Este estudo avaliou a ação *in vitro* e *in vivo* de diferentes extratos de *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrintestinais de ovinos, além de estimar a sua toxicidade em células eucarióticas. Para avaliar a capacidade de inibição da eclodibilidade dos ovos, diferentes formas de extratos das folhas secas desta planta foram testadas como extratos aquosos e hidroalcoólicos nas concentrações de 40 a 1,25 mg/mL. Cada ensaio foi acompanhado de controle contendo tiabendazol (0,025 mg/mL) e água destilada. O efeito citotóxico dos extratos foi mensurado através do ensaio de MTT em células VERO nas concentrações de 4000 a 1,95 µg/mL. No teste *in vivo* foi administrado 100 mg/kg, por via oral, do extrato hidroalcoólico por maceração por três dias consecutivos em ovinos naturalmente infectados e realizado coleta de fezes para estimar a redução do OPG. Os resultados dos testes demonstraram que os diferentes extratos de *E. uniflora* inibiram a eclodibilidade dos ovos de *Haemonchus contortus* com percentual de inibição variando de 14,56 a 99,75%, sendo os extratos hidroalcoólicos mais promissores que os aquosos. Nas condições testadas os extratos apresentaram citotoxicidade moderada a nula, com percentual de células viáveis entre 100 e 51,23%. No teste *in vivo* não foi observado redução do OPG para o grupo tratamento, apenas para o grupo controle positivo com anti-helmíntico. Os extratos de *E. uniflora* mostraram-se promissores com ação *in vitro* frente a *H. contortus* e toxicidade celular moderada a nula, necessitando estudos que avaliem outras concentrações e formas de administração *in vivo*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: fitoterápico, *Haemonchus contortus*, ovinos, pitangueira.

1 Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus universitário s/n, Caixa Postal 354, CEP 960101-900, Capão do Leão, RS, Brasil, \* Autor para correspondência: lu.ldcastro@gmail.com

2 Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus universitário s/n, CEP 960101-900, Capão do Leão, RS, Brasil.

## INTRODUÇÃO

As nematodioses gastrintestinais constituem um dos principais problemas sanitários na criação de pequenos ruminantes, tanto em países desenvolvidos, como nos em desenvolvimento (Perry & Randolph 1999). Essas parasitoses prejudicam a saúde dos animais por levar a perda de apetite, diarreia, anemia e, em casos severos, o óbito (Athanasiadou & Kyriazakis 2004). Distribuído mundialmente, *Haemonchus contortus* é considerado o principal nematódeo envolvido nessas infecções em termos de patogenicidade, prevalência e intensidade (Krecek & Waller 2006).

A principal medida de controle adotada para minimizar as perdas geradas pelos nematódeos é a utilização de anti-helmínticos, porém o uso abusivo e errôneo destes fármacos gerou o desenvolvimento de parasitos resistentes a essas drogas (Prichard 2001). Estudos afirmam que este problema se encontra em diferentes regiões do Brasil (Almeida et al. 2010) e também disseminado mundialmente (Wolstenholme et al., 2004; Melo et al. 2009). Portanto, medidas alternativas de controle são o principal foco de muitas pesquisas. A utilização de plantas com propriedades anti-helmínticas é considerada uma das alternativas mais promissoras para o controle dos nematódeos gastrintestinais (Gillian et al. 2004).

*Eugenia uniflora* (Myrtaceae) é uma árvore tropical e subtropical amplamente distribuída nos países sul-americanos, principalmente Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (Consolini & Sarubbio 2002). As suas folhas são utilizadas na medicina popular na forma de infusão para o tratamento de febre, reumatismo, distúrbios gástricos e hipertensão (Adebajo et al. 1989). Outros estudos relatam que a planta possui propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas e anti-helmíntica (Schapoval et al. 1994; Hassum et al. 2013). Estes benefícios são geralmente atribuídos aos metabólitos secundários presentes nas folhas, como terpenóides, flavanóides, taninos condensados e esteroides (Amorim et al. 2009).

Existem poucos estudos que relatem a ação anti-helmíntica dessa planta, assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* de diferentes extratos de *Eugenia uniflora* em nematódeos gastrintestinais de ovinos, além de estimar a sua toxicidade em células VERO.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Vegetal

Folhas frescas da planta *Eugenia uniflora* (pitangueira) foram coletadas na zona rural de Canguçu (Rio Grande do Sul, Brasil) em dezembro de 2012. *E. uniflora* foi identificada pela Prof.<sup>a</sup> Raquel Lüdtke e depositada no acervo do Herbário PEL, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, sob o número voucher 25.872. A planta foi desidratada em estufa com circulação de ar a 35 °C, por cerca de três dias. As folhas secas foram maceradas e estocadas em frascos fechados e protegidos da luz até o momento da produção dos extratos.

### Produção dos extratos vegetais

A partir das folhas secas da planta foram produzidos dois extratos aquosos e três hidroalcóolicos utilizando como solvente álcool de cereais 70º GL, sempre na concentração de 10%. Após a metodologia, todos os extratos foram liofilizados e armazenados a 20 °C negativos.

O extrato aquoso por decocção (EA/DEC) foi preparado a partir da ebulição da planta em água destilada a 100 °C em frasco fechado por 10 minutos. Após, a amostra foi filtrada para eliminação de resíduos sólidos e congelada a - 75 °C. Para produção do extrato aquoso em banho maria (EA/BM) a solução permaneceu sob agitação constante em frasco fechado imerso em óleo na temperatura de 65 °C por uma hora. Após este período, o material foi filtrado e o mesmo procedimento repetido por mais duas vezes com a mesma planta, as três partidas foram congeladas a - 75°C.

O extrato hidroalcólico em banho maria (EHA/BM) foi produzido através da mesma metodologia do EA/BM, porém antes do material ser congelado o solvente foi extraído em evaporador rotativo a 55 °C sob 600 mm/hg de pressão negativa. Para a produção do extrato hidroalcólico por ultrassom (EHA/US) a extração foi realizada em sonicador com frequência de 500 kHz e amplitude de 40% por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período o material permaneceu 24h sob refrigeração a 4 °C e posteriormente foi filtrado, o solvente evaporado e congelado a - 75 °C. O extrato hidroalcólico por maceração (EHA/MA) foi preparado a partir de uma tintura que permaneceu em maceração sob agitação diária por sete dias em temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi filtrada, o solvente extraído em evaporador rotativo e o extrato mantido - 75 °C.

#### Teste de Citotoxicidade

O efeito citotóxico dos extratos foi avaliado através do ensaio de MTT (brometo tiazoli azul de tetrazólio), descrito por Mosmann (1983) com modificações. Células VERO foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino 10%, em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Uma suspensão de células contendo  $2 \times 10^5$  cel/mL foi semeada em microplacas de 96 poços e incubada por 24h nas condições citadas acima. Posteriormente, 100 µL de cada extrato em 12 concentrações sucessivas de 4000 a 1,95 µg/mL foram adicionados à microplaca, a qual permaneceu por 48h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O teste foi acompanhado por controle de crescimento celular utilizando RPMI 1640 e cada concentração dos extratos foi testada em triplicata. Após este período, 50 µL de MTT (2,5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e incubado durante duas horas e trinta minutos, posteriormente foi removido e 50 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) foram acrescidos sob agitação durante cinco minutos para solubilizar os cristais de formazan formados pelas células viáveis que metabolizaram o MTT. A absorbância das amostras foi mensurada através de espectrofotômetro de microplaca em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos através do percentual de células viáveis relativa às células do controle (considerado como 100%).

#### Teste de Inibição da Eclodibilidade

Os ovos foram obtidos através da coleta de fezes diretamente da ampola retal de dois ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais (NGI). Os animais foram mantidos sem tratamento anti-helmíntico por no mínimo 60 dias antes da coleta e com a contagem de ovos por grama de fezes (OPG), realizada pela técnica de Gordon & Whitlock (1939), acima de 2000. Para a recuperação dos ovos foi utilizada a técnica de Hubert & Kerboeuf (1992) adaptada, sendo as fezes maceradas, diluídas em água destilada e passadas através de quatro tamises, dispostas em ordem decrescente de abertura de malha (1 mm, 105 µm, 55 µm, 25 µm). Os ovos foram recuperados do tamis de 25 µm, lavados através de centrifugações, diluídos em água destilada e quantificados em triplicata. O gênero das larvas dos nematódeos presentes nas fezes foi determinado através da técnica de coprocultura descrita por Roberts & O'Sullivan (1950).

O teste foi realizado em placa de microcultivo de 24 poços com quatro repetições, segundo a técnica de Coles et al. (1992). Em cada poço foi colocado aproximadamente 150 ovos e o extrato a ser testado em seis concentrações sucessivas de 40 a 1,25 mg/mL. Como controles foram utilizados tiabendazol na concentração de 0,025 mg/mL e água destilada estéril. As placas foram incubadas em estufa B.O.D a 28 °C com umidade relativa de 80% por 24h para a posterior quantificação de ovos e larvas de primeiro estágio em microscópio invertido. Os resultados foram expressos pela média percentual da inibição da eclodibilidade da quadruplicata, sendo a eficácia de cada tratamento no teste de eclosão determinada conforme a equação descrita por Camurça-Vasconcelos et al. (2007): % de inibição da eclodibilidade =  $[\text{número de larvas} / (\text{número de larvas} + \text{número de ovos})^{-1}]100$ .

### Avaliação da atividade *in vivo*

Foram utilizados 24 animais da raça corriedale com oito a 10 meses de idade de ambos os sexos, naturalmente infectados por NGI e divididos em grupos de oito animais cada. Os animais estavam no mínimo há 60 dias sem receber tratamento anti-helmíntico e foram distribuídos nos grupos conforme a carga parasitária estimada pela contagem de OPG. Durante o período experimental os animais permaneceram em pastagem nativa recebendo água *ad libitum*. O grupo controle positivo recebeu anti-helmíntico comercial (moxidectina, via subcutânea, 0,2 mg/kg) e o controle negativo água. Para o grupo tratamento, o extrato hidroalcóolico por maceração de *E. uniflora* (EHA/MA) na concentração de 100 mg/Kg foi administrado diariamente, por via oral, durante três dias consecutivos. Para avaliar a eficácia do tratamento foi realizada a coleta individual de fezes diretamente da ampola retal nos dias 0, 3, 7, 10 e 14 após o início do tratamento para a contagem de OPG e coprocultura. Para a determinação do percentual de redução do OPG, utilizou-se a fórmula descrita por Coles et al. (1992): % Redução =  $(1 - [\text{Dia pós tratamento/Dia zero}]100$ .

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA 3897).

### Análise Estatística

Os resultados dos testes de citotoxicidade, de inibição da eclodibilidade e do teste *in vivo* foram analisados utilizando ANOVA e as médias comparadas através do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), usando o software Statistix 9.0. Para a análise dos dados do teste *in vivo* os resultados foram normalizados através da transformação por  $\text{Log}_{10}$ .

## RESULTADOS

No teste de citotoxicidade os diferentes extratos testados apresentaram graus variáveis de toxicidade em células VERO de acordo com a concentração, sendo o aumento do efeito citotóxico diretamente proporcional ao aumento da concentração avaliada. Ao analisar os diferentes extratos dentro da mesma concentração observou-se que a ação tóxica não apresentou diferença acentuada na maioria das concentrações, sendo que para todos os extratos o percentual de células viáveis variou de 51,23 a 100% (Quadro 1).

No teste *in vitro* de inibição da eclodibilidade, os diferentes extratos de *E. uniflora* apresentaram ação anti-helmíntica sobre NGI de ovinos com percentual médio de inibição entre 14,56 e 76,04% para os extratos aquosos (Figura 1) e de 20,35 a 99,75% para os hidroalcóolicos (Quadro 2). Na maior concentração testada (40 mg/mL) verificou-se diferença estatística na atividade ovicida entre os extratos aquosos e hidroalcóolicos, os quais apresentaram uma média de 99% de inibição da eclodibilidade ( $p \leq 0,05$ ). Os controles com água destilada e anti-helmíntico demonstraram inibição de 8,91 e 98,58%, respectivamente. O resultado das coproculturas revelou a presença dos gêneros *Haemonchus* (97%) e *Trichostrongylus* (3%).

Os valores de inibição do extrato aquoso por decocção variaram de 22,04 a 76,04%, sendo que a partir da concentração de 5 mg/mL esta atividade permaneceu abaixo de 30%. O extrato aquoso por banho maria demonstrou menor atividade anti-helmíntica quando comparado aos demais extratos com 65,39% de inibição da eclodibilidade na maior concentração testada (40 mg/mL). Nas concentrações seguintes verificou-se diferença significativa nos percentuais de inibição entre as concentrações testadas, sendo este efeito diretamente proporcional à concentração ( $p \leq 0,05$ ). Os dois extratos aquosos não apresentaram resultados semelhantes ao controle com anti-helmíntico, porém, apesar da baixa atividade, todos diferiram do controle com água destilada ( $p \leq 0,05$ ).

O percentual médio de inibição do extrato hidroalcóolico por banho maria na concentração de 20 e 40 mg/mL foi 97,42 e 99,75%, respectivamente, não diferindo

estatisticamente entre si e do controle com anti-helmíntico ( $p>0,05$ ). A partir destas concentrações a atividade anti-helmíntica apresentou um decréscimo gradual até atingir 20,35% de inibição na concentração de 1,25 mg/mL.

Os resultados do extrato hidroalcoólico por ultrassom demonstraram inibição da eclodibilidade superior a 88% em todas as concentrações testadas. A ação permaneceu acima de 98% nas concentrações de 10, 20 e 40 mg/mL, as quais não diferiram estatisticamente entre si e nem do controle com anti-helmíntico ( $p>0,05$ ). Resultado semelhante foi observado no extrato hidroalcoólico por maceração que apresentou atividade de 97,02 a 99,73%, sendo que todas as concentrações testadas não apresentaram diferença estatística do controle com anti-helmíntico ( $p>0,05$ ).

Na avaliação *in vivo* o percentual de redução do OPG variou de 70,29% a 94,06% para o grupo controle positivo, sendo que a máxima redução foi sete dias após a administração do anti-helmíntico. Para os grupos tratamento e controle negativo não foi observado redução na contagem do OPG (Quadro 3). Durante o experimento todos os animais apresentavam 99% de infecção por *Haemonchus contortus* e 1% por *Trichostrongylus* spp.

## DISCUSSÃO

Os nematódeos gastrintestinais são o principal entrave para a saúde e bem-estar dos pequenos ruminantes criados em sistema extensivo de produção (Hernández-Villegasa et al. 2011). Os riscos decorrentes de resíduos de anti-helmínticos ou seus metabólitos em alimentos derivados de animais reforçam a necessidade da descoberta de compostos ativos seguros e acessíveis através das plantas (Cabaret 2008). Estas produzem inúmeros metabólitos secundários que interagem com o ecossistema, agindo como antibióticos, antifúngicos e antivirais, mantendo a sua integridade contra competidores, predadores e patógenos (Wink 2003).

No teste de citotoxicidade os resultados revelaram uma ação tóxica de moderada a nula dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de *E. uniflora* nas concentrações testadas. Pesquisas avaliando a toxicidade celular *in vitro* de *E. uniflora* são escassas, no entanto Santos et al. (2012) ao avaliarem a citotoxicidade de extrato etanólico de *E. uniflora* em macrófagos observaram baixo efeito citotóxico na concentração de 100 µg/mL. Outro estudo analisou a citotoxicidade dos frutos da planta *Eugenia dysenterica* na forma de extrato etanólico e verificou ausência de efeito citotóxico até a concentração de 300 µg/mL (Roesler et al. 2010). O presente estudo apresentou citotoxicidade semelhante aos trabalhos citados anteriormente, visto que na concentração de 250 µg/mL todos os extratos apresentaram o percentual de células viáveis variando de 72,07 a 90,29%.

Pesquisas acerca da toxicidade *in vivo* de extrato hidroalcoólico de folhas de *E. uniflora* realizados em camundongos Balb/C demonstraram ausência de efeitos tóxicos em doses até 4200 mg/kg quando administrado por via oral e dose letal 50% de 220 mg/kg quando administrado por via intraperitoneal (Schemeda-Hirschmann et al. 1987). Em outro estudo desenvolvido por Auricchio & Bacchi (2003), a dose letal para 50% das cobaias foi de 5930 mg/kg. Esses trabalhos demonstram a segurança da utilização dos extratos em animais experimentais, pois apresentam valores mais elevados ao utilizado no presente estudo para realização do teste *in vivo*.

Os resultados observados no teste *in vitro* indicam que *E. uniflora* apresenta efeito ovicida diferenciado em *Haemonchus contortus* conforme o tipo de extrato da planta, visto que na concentração de 40 mg/mL, o percentual médio de inibição da eclodibilidade foi de 99% para os extratos EHA/BM, EHA/US e EHA/MA, de 76,04% para o EA/DEC e 64,99% para o EA/BM. Estes resultados evidenciam a superioridade da ação anti-helmíntica *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos quando comparados aos aquosos. Esta diferença sugere que os extratos possuem componentes ativos diferentes, devido às metodologias utilizadas, mas principalmente devido ao

tipo de solvente utilizado. Isto pode ser comprovado no estudo realizado por Balansard et al. (1991) que ao analisarem a composição de extratos utilizando água como solvente identificaram a presença de heterosídeos, iridóides e taninos; já para os extratos com metanol os constituintes eram taninos, catequinas, terpenos e alcalóides; e para solventes mais apolares, como diclorometano, era heterosídeos, terpenos, esteroides e carotenoides.

Estudos científicos avaliando o potencial anti-helmíntico da pitangueira são escassos, entretanto, Furtado (2006) ao pesquisar a atividade do extrato hidroalcoólico de *E. uniflora* na concentração de 108,4 mg/mL sobre trichostrongilídeos verificou taxa de inibição da eclodibilidade dos ovos superior a 80%. O presente estudo demonstrou ação semelhante em todos os extratos hidroalcoólicos, porém esta atividade foi obtida em concentrações cerca de 10 vezes inferiores a testada por Furtado (2006). Hassum et al. (2013) ao avaliarem a ação do extrato hidroalcoólico de *E. uniflora* na concentração de 200 mg/mL observaram uma inibição de 90,5% no desenvolvimento de larvas do primeiro ao terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais, especialmente *H. contortus* e *Trichostrongylus* spp.. Embora nosso estudo tenha avaliado outra fase de desenvolvimento dos nematódeos, os resultados de inibição obtidos foram semelhantes, entretanto em concentrações muito inferiores (40 mg/mL).

Estudos avaliando o potencial antiparasitário de plantas do gênero *Eugenia*, como extrato aquoso de *E. aquea* demonstraram ação de 65,12% na inibição da eclodibilidade dos ovos de *H. contortus* (Daryatmo et al. 2010), resultados semelhantes aos obtidos com os extratos aquosos do presente estudo, na concentração de 20 mg/mL. Em teste *in vivo*, Gaspar et al. (2010) observaram a redução de 81% na contagem de ovos por grama de fezes após 14 dias da administração junto a ração de folhas secas de *E. dysenteriae* e *Caryocar brasiliense*, na proporção de 1,2 g/Kg, em ovinos parasitados por *H. contortus*.

Embora não tenha sido realizada a análise fitoquímica com os extratos do presente estudo, sugere-se que estes possuam alguns dos metabólicos secundários presentes na planta, como terpenos, flavanóides e taninos condensados (Amorim et al. 2009). Pesquisas desenvolvidas conferem a ação anti-helmíntica de muitos extratos devido a presença destes constituintes (Hoste et al. 2006, Brunet et al. 2008, Minho et al. 2008), este efeito esta relacionado a capacidade dos taninos formarem complexos com as proteínas dos parasitos, afetando os processos biológicos destes nematódeos, dependendo de onde e como os taninos se ligam as estruturas do parasito (Paolini et al. 2004). Em outro estudo, Júnior (2003) relatou a atividade inseticida de alguns terpenos, devido a inibição do crescimento, danos de maturação e redução da capacidade reprodutiva. Assim, podemos sugerir que a atividade dos extratos de *E. uniflora* no desenvolvimento de *H. contortus* pode estar relacionada com a presença de alguns componentes descritos acima.

Apesar da eficácia observada no teste *in vitro*, o extrato hidroalcoólico por maceração de *E. uniflora* não demonstrou efeito anti-helmíntico no experimento *in vivo*, nas condições em que foi testado. Diferenças entre os percentuais de eficácia dos testes *in vitro* e *in vivo* têm sido registradas, as quais podem ser justificadas pela influência de fatores ambientais e pela metodologia experimental, incluindo dose e período de administração do extrato (Martin et al. 2001), além disso, nos testes *in vitro* os extratos permanecem em condições ideais em contato direto com o parasito, diferente do que ocorre no teste *in vivo* (Peneluc et al. 2009). A microbiota ruminal pode ser responsável por variações na eficácia dos compostos bioativos, pois pode alterar a estrutura química do componente, o mecanismo de ação de alguns nutrientes, ou medicamentos administrados por via oral (Vandamme & Ellis 2004).

## CONCLUSÃO

Os diferentes extratos de *Eugenia uniflora* inibiram a eclodibilidade de *Haemonchus contortus*, sendo os extratos hidroalcoólicos as formas mais promissoras. Quanto à toxicidade celular, os resultados sugerem que os extratos possuem ação tóxica de moderada a nula nas

condições testadas. Os resultados do teste *in vivo* demonstram que o extrato hidroalcolico na concentração testada não reduziu a contagem de ovos por grama de fezes.

## REFERÊNCIAS

- Adebajo A.C., Oloki K.J. & Aladesanmi A. 1989. Antimicrobial activity of the leaf extract of *Eugenia uniflora*. J. Phyt. Res. 3:258-259.
- Almeida F.A., Garcia K.C.O.D., Torgerson P.R. & Amarante, A.F.T. 2010. Multipleresistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. Parasitol Int, 59:622-625.
- Amorim A.C.L., Lima C.K.F., Hovell A.M.C., Miranda A.L.P. & Rezende C.M. 2009. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian pitanga). Phytomedicine. 16:923-928.
- Athanasiadou S. & Kyriazakis I. 2004. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. Proc. Nutr. Soc. 63:631-639.
- Auricchio M.T. & Bacchi E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. 2003. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 62:55-61.
- Balansard G., Maillard C. & Vidal-Ollivier E. 1991 Méthodes d'extractionenvue d'obtenir des extraits ou produits purs à partir des plantes médicinales. In: Encyclopédie Médicale Naturelle, vol. B8-3:18. Phytothérapie, Aromathérapie, 1991, p.18.
- Brunet S., Martinez-Ortiz de Montellano C., Torres-Acosta J.F.J., Sandoval-Castro C.A., Aguilar-caballero A.J., Capetillo-Leal C. & Hoste H. 2008. Effect of the consumption of *Lysilomala tisilliquum* on the larval establishment of parasitic nematodes in goats. Vet. Parasitol. 157:81-88.
- Cabaret J. 2008. Pro and cons of targeted selective treatment against digestive-tract strongyles of ruminants. Parasite. 15:506-509.
- Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua C.M.L., Morais S.M., Maciel M.V., Costa C.T.C., Macedo I.T.F., Oliveira L.M.B., Braga R.R., Silva R.A. & Vieira L.S. 2007 Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippiasidoides* essential oils. Vet. Parasitol. 148:288-294.
- Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A. & Waller P.J. 1992. World Association for the advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet. Parasitol. 44:35-44.
- Consolini A.E. & Sarubbio M. 2002. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) aqueous extract on rat's heart. J. Ethnopharmacolo. 81:57-63.
- Daryatmo J., Hartadi H., Orskov E.R., Adiwimarta K. & Nurcahyo W. 2010. *In vitro* screening of various forages for anthelmintic activity on *Haemonchus contortus* egg. Adv. Anim. Biosc. 1:113-113.
- Furtado K. S. 2006. Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo*. Tese de Doutorado em Produção Vegetal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, 147f.
- Gaspar A.T., Henrique R.G., Araujo A.H., Aguiar F.G.L., Zilis T., Silva B.V., Barros E.L.E., Oliveira Q.M.L., Molica M.E. & Melo R.F. 2010 *Haemonchus contortus*: *in vivo* anthelmintic activity of *Eugenia dysenterica* DC and *Caryocar brasiliense* Cambes leaves in sheep. Planta Medica. 76:636-636.
- Gillan S., Behnke J.M., Buttle D.J. & Duce L.R. 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? Trends Parasitol. v. 20, p. 322-327, 2004.
- Gordon H.M. & Whitlock H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. J Counc. Sci. Ind. Res. 12:50-52.
- Hassum I.C., Venturi C.R., Gosmann G. & Deiro A.M.G. 2013. Ação dos extratos de quatro plantas sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos. Rev. Cubana Plant. Med. 18:278-287.



- Hernández-Villegasa M.M., Borges-Argáez R., Rodríguez-Vivas R.I., Torres-Acosta J.F.J., Méndez-González M. & Cáceres-Farfana, M. 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 179:100–106.
- Hoste H., Jackson F., Athanasiadou S., Thamsborg S.M. & Hoskin S.O. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. Trends Parasitol. 22:253–261.
- Hubert J. & Kerboeuf D.A. 2003. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. Vet. Res. 130:442–446.
- Júnior V.C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. Quim. Nova 26:390–400.
- Krecek R.C. & Waller P.J. 2006 Towards the implementation of the “basket of options” approach to helminth parasite control of livestock: Emphasis on the tropics/subtropics. Vet. Parasitol. 139:270–282.
- Martin M., Mcorkle C.M. & Mathias E. 2001. An Annotated Bibliography of Community Animal Healthcare. Ethnovet. Medicine. 1379–1384.
- Melo A.C.F.L., Bevilacqua C.M.L. & Reis I.F. 2009. Anthelmintic resistance to benzimidazole in gastrointestinal nematodes from small ruminants of semiarid Brazilian northeast. Cienc. Anim. 10:294–300.
- Minho A.P., Bueno I.C.S., Gennari S.M., Jackson F., Abdalla A.L. 2008. *In vitro* effect of condensed tannin extract from acácia (*Acácia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 17:144–148.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 65:55–63.
- Paolini V., Fouraste I. & Hoste H. 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. Parasitol. 129:69–77.
- Peneluc T., Domingues L.F., Almeida G.N., Ayre M.C.C., Moreira E.L.T., Cruz A.C.F., Bittencourt T.C.B.S., Almeida M.A.O. & Batatinha M.J.M. 2009. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae). Rev. Bras. Parasitol. Vet. 18:43–48.
- Perry B.D. & Randolph T.F. 1999. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. Vet. Parasitol. 84:145–168.
- Prichard R.K. 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. Trends Parasitol. 17:445–453.
- Roberts F.H.S. & O'Sullivan S.P. 1950. Methods for egg counts and larvae cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. Aust. J. Agric. Res. 1:99–102.
- Roesler R., Lorencini M. & Pastore G. 2010. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity *in vitro*. Cienc. Tec. Alim. 30:814–821.
- Santos K.K.A., Matias E.F.F., Tintino S.R., Souza C.E.S., Braga M.B.B.M., Guedes G.M.M., Rolón M., Veja C., Arias A.R., Costa J.G.M., Menezes I.R.A., & Coutinho H.D.M. 2012. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. Exp. Parasitol. 131:130–132.
- Schapoval E.E.S., Silveira S.M., Miranda M.L., Alice C.B. & Henriques A.T. 1994. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora*. J. Ethnopharmacol. 44:137–142.
- Schmeda-Hirschmann G., Theodor Ulo Z. C., Franco L. & Ferro E. 1987. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. J. Ethnopharmacol. 21:183–186.
- Vandamme T.H.F. & Ellis K.J. 2004. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. Adv. Drug Deliv. Rev. 56:1415–1436.
- Wink M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry. 64:3–19.
- Wolstenholme A.J., Fairweather I., Prichard R., Von Samson-Himmelstjerna G., Sangster N. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. Trends Parasitol. 20:469–476.

**Quadro 1 – Média percentual de células viáveis tratadas com extratos de *Eugenia uniflora* em diferentes concentrações.**

| Concentrações<br>(µg/mL) | Extratos            |                     |                     |                     |                     |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                          | EA/DEC              | EA/BM               | EHA/BM              | EHA/US              | EHA/MA              |
| 4000                     | 60,39 <sup>A</sup>  | 51,23 <sup>A</sup>  | 55,62 <sup>A</sup>  | 51,35 <sup>A</sup>  | 57,96 <sup>A</sup>  |
| 2000                     | 67,03 <sup>A</sup>  | 52,28 <sup>C</sup>  | 55,88 <sup>BC</sup> | 62,59 <sup>AB</sup> | 63,28 <sup>AB</sup> |
| 1000                     | 71,78 <sup>A</sup>  | 66,27 <sup>AB</sup> | 59,63 <sup>B</sup>  | 72,45 <sup>A</sup>  | 64,98 <sup>AB</sup> |
| 500                      | 78,38 <sup>AB</sup> | 71,09 <sup>BC</sup> | 60,61 <sup>C</sup>  | 87,97 <sup>A</sup>  | 65,68 <sup>C</sup>  |
| 250                      | 82,86 <sup>AB</sup> | 72,34 <sup>C</sup>  | 75,99 <sup>BC</sup> | 90,29 <sup>A</sup>  | 72,07 <sup>C</sup>  |
| 125                      | 87,22 <sup>AB</sup> | 82,96 <sup>BC</sup> | 81,76 <sup>BC</sup> | 92,65 <sup>A</sup>  | 74,88 <sup>C</sup>  |
| 62,50                    | 88,52 <sup>AB</sup> | 92,82 <sup>A</sup>  | 87,66 <sup>AB</sup> | 93,77 <sup>A</sup>  | 76,54 <sup>B</sup>  |
| 31,25                    | 96,46 <sup>A</sup>  | 93,01 <sup>A</sup>  | 89,56 <sup>A</sup>  | 95,48 <sup>A</sup>  | 78,57 <sup>A</sup>  |
| 15,63                    | 98,97 <sup>A</sup>  | 98,41 <sup>A</sup>  | 99,99 <sup>A</sup>  | 98,97 <sup>A</sup>  | 87,18 <sup>A</sup>  |
| 7,81                     | 100 <sup>A</sup>    | 100 <sup>A</sup>    | 100 <sup>A</sup>    | 99,99 <sup>A</sup>  | 90,46 <sup>B</sup>  |
| 3,90                     | 99,99 <sup>A</sup>  | 100 <sup>A</sup>    | 100 <sup>A</sup>    | 100 <sup>A</sup>    | 96,33 <sup>A</sup>  |
| 1,95                     | 99,99 <sup>A</sup>  | 100 <sup>A</sup>    | 100 <sup>A</sup>    | 100 <sup>A</sup>    | 98,44 <sup>A</sup>  |

EA/DEC – extrato aquoso por decocção; EA/BM – extrato aquoso em banho maria; EHA/BM – extrato hidroalcoólico em banho maria; EHA/US – extrato hidroalcoólico por ultrassom; EHA/MA – extrato hidroalcoólico por maceração.

Letras maiúsculas diferentes, na linha, diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

**Quadro 2 - Percentual médio de inibição da eclodibilidade nematódeos gastrintestinais de ovinos ( $\pm$  desvio padrão) pelos extratos hidroalcoólicos de *Eugenia uniflora*.**

| Concentração<br>(mg/mL) | Extratos Hidroalcoólicos       |                                |                                 |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
|                         | EHA/BM                         | EHA/US                         | EHA/MA                          |
| 40                      | 99,75 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,50 | 99,71 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,49 | 99,73 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,51  |
| 20                      | 97,42 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,99 | 99,41 <sup>Aa</sup> $\pm$ 1,03 | 99,35 <sup>Aa</sup> $\pm$ 1,07  |
| 10                      | 81,73 <sup>Bb</sup> $\pm$ 1,81 | 98,58 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,83 | 99,42 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,57  |
| 5                       | 59,26 <sup>Bc</sup> $\pm$ 6,53 | 92,52 <sup>Ab</sup> $\pm$ 2,16 | 98,21 <sup>Aab</sup> $\pm$ 0,26 |
| 2,5                     | 36,55 <sup>Cd</sup> $\pm$ 1,57 | 90,72 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0,95 | 97,52 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0,67  |
| 1,25                    | 20,35 <sup>Ce</sup> $\pm$ 1,10 | 88,02 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0,89 | 97,02 <sup>Ab</sup> $\pm$ 1,59  |

EHA/BM – Extrato hidroalcoólico por banho maria; EHA/US - Extrato hidroalcoólico por ultrassom; EHA/MA – Extrato hidroalcoólico por maceração.

Letras maiúsculas diferentes, na linha, e letras minúsculas diferentes, na coluna, diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ).

**Quadro 3 – Média da contagem do OPG  $\pm$  desvio padrão dos grupos controle positivo (anti-helmíntico), tratamento (EHA/MA), controle negativo (água) e porcentagem média de redução do OPG para o grupo controle positivo.**

| Tratamento        | D 0               | D3                | D7                | D10               | D14               |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Controle Positivo |                   |                   |                   |                   |                   |
| OPG               | 2525 <sup>A</sup> | 750 <sup>B</sup>  | 150 <sup>C</sup>  | 200 <sup>C</sup>  | 525 <sup>B</sup>  |
|                   | $\pm 411,29$      | $\pm 29,09$       | $\pm 57,73$       | $\pm 115,47$      | $\pm 95,74$       |
| % Redução         |                   | 70,29             | 94,06             | 92,08             | 79,21             |
| Tratamento        |                   |                   |                   |                   |                   |
| OPG               | 2425 <sup>A</sup> | 2350 <sup>A</sup> | 2700 <sup>A</sup> | 2500 <sup>A</sup> | 2625 <sup>A</sup> |
|                   | $\pm 607,59$      | $\pm 704,74$      | $\pm 469,04$      | $\pm 752,77$      | $\pm 512,35$      |
| Controle Negativo |                   |                   |                   |                   |                   |
| OPG               | 2950 <sup>A</sup> | 2925 <sup>A</sup> | 2850 <sup>A</sup> | 3075 <sup>A</sup> | 3175 <sup>A</sup> |
|                   | $\pm 208,17$      | $\pm 150$         | $\pm 435,89$      | $\pm 309,57$      | $\pm 499,16$      |

Letras maiúsculas diferentes, na linha, diferem significativamente ( $p \leq 0,05$ ).

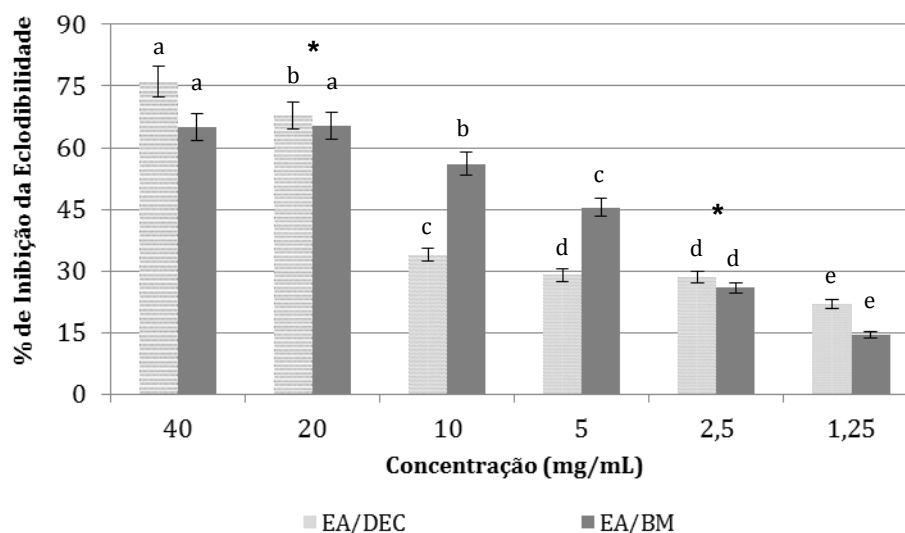


Fig. 1 – Percentual médio de inibição da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de ovinos ( $\pm$  desvio padrão) pelos extratos aquosos por decocção (EA/DEC) e por banho maria (EA/BM) de *Eugenia uniflora*. Letras minúsculas entre as concentrações do mesmo extrato diferem estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ). \* indica as concentrações em que os extratos aquosos não diferiram estatisticamente.

#### 4 CONCLUSÃO GERAL

- Os diferentes extratos de *Origanum vulgare* e *Eugenia uniflora* inibiram o desenvolvimento de nematódeos de ruminantes;
- A tintura e o extrato hidroalcólico de *Origanum vulgare* foram as formas mais promissoras na inibição *in vitro* da eclodibilidade de nematódeos gastrintestinais de bovinos;
- Os extratos hidroalcólicos de *Eugenia uniflora* apresentaram maior atividade *in vitro* na inibição da eclodibilidade de *Haemonchus contortus* quando comparados com os extratos aquosos;
- Nas condições testadas os resultados sugerem que os extratos de *Eugenia uniflora* possuem ação tóxica de moderada a nula em células VERO;
- Os resultados do teste *in vivo* demonstram que o extrato hidroalcólico de *Eugenia uniflora* na concentração e período de administração testado não reduziu a contagem de ovos por grama de fezes.

## 5 REFERÊNCIAS

- ADEBAJO, A. C.; OLOKI, K. J.; ALADESANMI, A. Antimicrobial activity of the leaf extract of *Eugenia uniflora*. **Journal of Phytotherapy Research**, v. 3, n. 6, p. 258-259, 1989.
- ALMEIDA, M. A. O.; DOMINGUES, L. F.; ALMEIDA, G. N.; SIMAS, M. M. S.; BOTURA, M. B.; CRUZ, A. C. F. G.; SILVA, A. V. A. F.; MENEZES, T. P.; BATATINHA, M. J. M. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Mentha piperita* L. e de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre cultivos de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 57-59, 2007.
- ALMEIDA, F. A.; GARCIA, K. C. O. D.; TORGERSON, P. R.; AMARANTE, A. F. T. Multipleresistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v. 59, p. 622–625, 2010.
- AMARANTE, A. F. T.; ROCHA, R. A.; BRICARELLO, P. A. Relationship of intestinal histology with the resistance to *Trichostrongylus colubriformis* infection in three breeds of sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 43-48, 2007.
- AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian pitanga). **Phytomedicine**, v. 16, p. 923-928, 2009.
- ANUALPEC. **Anuário estatístico da pecuária de corte**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio. 2011.
- ATHNASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v. 99, p. 205–219, 2001.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 631-639, 2004.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 62, n.1, p. 55–61, 2003.
- BARBOSA, P.; LIMA, A. S.; VIEIRA, P.; DIAS, L. S.; TINOCO, M. T.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; FIGUEIREDO, A. C.; MOTA, M. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Journal of Nematology**, v. 42, n. 1, p. 8-16, 2010.

BALANSARD, G.; MAILLARD, C.; VIDAL-OLLIVIER, E. Méthodes d'extraction en vue d'obtenir des extraits ou produits purs à partir des plantes médicinales. **Encyclopédie Médicale Naturelle**, vol. B-8-3. Phytothérapie, Aromathérapie, 1991, p. 18.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. 1.ed. Brasília: Anvisa, 2011, 126p.

BRUNET, S.; MARTINEZ-ORTIZ DE MONTELLANO, C.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; AGUILAR-CABALLERO, A. J.; CAPETILLO-LEAL, C.; HOSTE, H. Effect of the consumption of *Lysiloma latisilliquum* on the larval establishment of parasitic nematodes in goats. **Veterinary Parasitology**, v. 157, p. 81–88, 2008.

CABARET, J. Pro and cons of targeted selective treatment against digestive-tract strongyles of ruminants. **Parasite**, v. 15, p. 506–509, 2008.

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

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3-4, p. 288-294, 2007.

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

CHAGAS, A. C. S.; NICIURA, S. C. M.; MOLENTO, M. B. **Manual Prático: metodologias de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011.

CHARLES, T. P.; POMPEU, J.; MIRANDA, D. B. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 34, p. 71-75, 1989.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; XAVIER, M.; SCHUCH, L. F.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, J. R. B. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 116-123, 2010.

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, n. 1-2, p. 35-44, 1992.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) aqueous extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 57-63, 2002.

COUMENDOUROS, K.; TANCREDI, I. P.; SCOTT, F. B.; MARTINS, I. V. F.; SANT'ANNA, F. B.; GRISI, L. Eficácia anti-helmíntica da eprinimectina no controle de nematoides gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 3, p. 121-124, 2003.

DARYATMO, J.; HARTADI, H.; ORSKOV, E. R.; ADIWIMARTA, K.; NURCAHYO, W. *In vitro* screening of various forages for anthelmintic activity on *Haemonchus contortus* egg. **Advances in Animal biosciences**, v. 1, n. 1, p. -113-113, 2010.

ECHEVARRIA, F. Resistência anti-helmíntica. In: PADILHA, T. **Controle dos Nematódeos Gastrointestinais em Ruminantes**. Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1996, p. 53-75.

EGUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAY, M. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 108-113, 2011.

ELOFF, J. N. Which extractant should be used for screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal Ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 1998.

FAO, Salud Animal. **Resistência a los Antiparasitarios: Estado Actual Énfasis em América Latina**. Roma: FAO, 2003, 52p.

FORCE, M.; SPARKS, W. S.; RONZIO, R. A. Inhibition of Enteric Parasites by Emulsified Oil of Oregano *in vivo*. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 3, p. 213-214, 2000.

FURTADO, S. K. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 2006. 127f. Tese (Doutorado em PPG em Agronomia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GASPAR, A. T.; HENRIQUE, R. G.; ARAUJO, A. H.; AGUIAR, F. G. L.; ZILIS, T.; SILVA, B. V.; BARROS, E. L. E.; OLIVEIRA, Q. M. L.; MOLICA, M. E.; MELO, R. F. *Haemonchus contortus*: *in vivo* anthelmintic activity of *Eugenia dysenterica* DC and *Caryocar brasiliense* Cambes sleeves in sheep. **Planta Medica**, v. 76, p. 636-636, 2010.

GARDIANO, C. G.; MURAMOTTO, S. P.; KRZYZANOWISKI, A. A.; ALMEIDA, W. P.; SAAB, O. J. G. A. Efeito de extratos aquosos de espécies vegetais sobre a multiplicação de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.4, p.553-556, 2011.

GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZAHARIADOU, M.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N. A.; SPAIS, A. B. Effect of dietary supplementation with oregano

essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archives fur Tierernahrung**, p. 57, n. 2, p. 99-106, 2003.

GILLIAN, S.; BEHNKE, J. M.; BUTTLE, D. J.; DUCE, L. R. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 322–327, 2004.

GONZALES, J. C.; SANTIAGO, O. M. Estudo do cariótipo de *Haemonchus contortus* de ovinos e bovinos no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 3, p. 276-289, 1969.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, n. 1, p. 50-52, 1939.

HASSUM, I. C.; VENTURI, C. R.; GOSMANN, G.; DEIRO, A. M. G. Ação dos extratos de quatro plantas sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.18, n.2, p.278-287, 2013.

HERNÁNDEZ-VILLEGASA, M. M.; BORGES-ARGÁEZA, R.; RODRIGUEZ-VIVASB, R. I.; TORRES-ACOSTAB, J. F. J.; MÉNDEZ-GONZALEZA, M.; CÁCERES-FARFANA, M. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, n. 179, p. 100–106, 2011.

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

HOUDIJK, J. G.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; HUNTLEY, J. F.; COOP, R. L. Effects of protein supply and reproductive status on local and systemic immune responses to *Teladorsagia circumcincta* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 105-117, 2005.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A. Microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Research**, v. 130, n. 20, p. 442-446, 1992.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. [2013]. **Estatísticas sobre pecuária, rebanho e produção**. Disponível em: < [www.sidra.ibge.gov.br](http://www.sidra.ibge.gov.br) > Acesso em 12 de Dezembro de 2013.

JÚNIOR, V. C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa parao controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, p. 390–400, 2003.

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

KERBOEUF, D.; RIOU, M.; GUÉGNARD, F. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. **Mini-Reviews Medicinal Chemmistry**, v. 8, p. 116–128, 2008.



KRECEK, R. C., WALLER, P. J. Towards the implementation of the “basket of options” approach to helminth parasite control of livestock: Emphasis on the tropics/subtropics. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 270–282, 2006.

LIMA, W. S. **Os inimigos ocultos da Pecuária**. DBO Saúde Animal, Out: 8-16, 2004.

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

MACEDO, I. T. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; OLIVEIRA, L. M. B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; VIEIRA, L. S.; OLIVEIRA, F. R.; QUEIROZ-JUNIOR, E. M.; PORTELA, B. G.; BARROS, R. S.; CHAGAS, A. C. S. Atividade ovcida e larvica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 62-66, 2009.

MARTIN, M.; MCORKLE, C. M.; MATHIAS, E. An Annotated Bibliography of Community Animal Healthcare. **Ethnoveterinary Medicine**, p. 1379-1384, 2001.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; REIS, I. F. Anthelmintic resistance to benzimidazole in gastrointestinal nematodes from small ruminants of semiarid Brazilian northeast. **Ciência Animal**, v. 10, p. 294–300, 2009.

MILLER, J. E.; HOROHOF, D. W. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 84, (suplem E), p. 124-132, 2006.

MINHO, A. P.; BUENO, I. C. S.; GENNARI, S. M.; JACKSON, F.; ABDALLA, A. L.; In vitro effect of condensed tannin extract from acácia (*Acácia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 144-148, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NARI, A.; FIEL, C. (Eds.). **Enfermedades parasitarias de importancia economica en bovinos: Bases epidemiológicas para su prevencion y control**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1993. 420p.

NASCIMENTO, E. M.; FURLONG, J.; PIMENTA, D. S.; PRATA, M. C. A. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Hunds. (Lamiaceae) em nematoides gastrintestinais de bovinos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 817-824, 2009.

NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Eficácia de plantas para o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes: revisão de estudos publicados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 3, p. 330-338, 2009.

OKA, Y.; KOLTAL, H.; BAR-EYAL, M.; MOR, M.; SHARON, E.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. **Pest Management Science**, v. 56, p. 983-988, 2000.

PAIVA, F.; SATO, M. O.; ACUNÃ, A. H.; JESEN, R. J.; BRESSAN, A. C. R. V. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 20, n. 120, p. 29-32, 2001.

PAOLINI, V.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. *In vitro* effects of three woodyplant and sainfoin on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. **Parasitology**, v. 129, p. 69-77, 2004.

PENELUC, T.; DOMINGUES, L. F.; ALMEIDA, G. N.; AYRE, M. C. C.; MOREIRA, E. L. T.; CRUZ, A. C. F.; BITTENCOURT, T. C. B. S.; ALMEIDA, M. A. O.; BATATINHA, M. J. M. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl.1, p. 43-48, 2009.

PERRY, B. D.; RANDOLPH, T. F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 145-168, 1999.

PINHEIRO, A. C.; ECHEVARRIA, F. A. M. Susceptibilidade de *Haemonchus* spp. em bovinos ao tratamento anti-helmíntico com albendazole e oxfendazole. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 10, n. 1/2, p. 19-21, 1990.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends Parasitology**, v. 17, p. 445-453, 2001.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; AVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; SOUZA, A. P. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no Estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 473-477, 2002.

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

ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidante sources: cytotoxicity and phototoxicity *in vitro*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 814-821, 2010.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G.; FREIRE, J. M.; SOARES, M. J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v. 134, p. 1649-1656, 2007.

SANTOS, M. C.; SILVA, B. F.; AMARANTE, A. F. T. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 277-284, 2012a.

SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; TINTINO, S. R.; SOUZA, C. E. S.; BRAGA, M. B. B. M.; GUEDES, G. M. M.; ROLÓN, M.; VEJA, C.; ARIAS, A. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. **Experimental Parasitology**, v. 131, p. 130-132, 2012b.

SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R. A.; SILVA, A. S.; DE LA RUE, M. L.; MONTEIRO, S. G.; ALVES, S. H. Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamydospores production for livestock use. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 344-346, 2009.

SILVA, B. F.; AMARANTE, M. R. V.; KADRI, S. M.; CARRIJO-MAUAD, J. R.; AMARANTE, A. F. T. Vertical migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae on *Brachiaria decumbens* grass. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 85-92, 2008.

SINOTT, M. C.; CUNHA FILHO, N. A.; CASTRO, L. L. D.; LORENZON, L. B.; PINTO, N. B.; CAPELLA, G. A.; LEITE, F. P. L. *Bacillus* spp. toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures. **Experimental Parasitology**, v. 132, p.103-108, 2012.

SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G. A. P.; NACHTIGAL, G. F.; BAUER, M. V. **Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas**. EMBRAPA – Comunicado Técnico, v. 190, Out, p.1-4, 2008.

SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L.; ALICE, C. B.; HENRIQUES, A. T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 137–142, 1994.

SCHMEDA -HIRSCHMANN , G.; THEOD ULO Z, C.; FRANCO , L; FERRO , E. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **Journal Ethnopharmacol**, v.21, p.183-186, 1987.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; ELISABETSKY, R. Farmácias caseiras comunitárias do município de Maquiné (RS): uma avaliação etnofarmacológico. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 6, n. 2, p. 83-91, 2004.

SPÓSITO FILHA, E.; OLIVEIRA, S. M.; REBOUÇAS, M. M.; BARCI, L. A. G. Diagnóstico de enfermidades parasitárias em animais domésticos no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p. 1-306, 2002.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; PESSOA, M. C.; MOCELIN, G. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Tchenology**, v. 47, p. 41-47, 2004.

VANDAMME, T. H. F.; ELLIS, K. J. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1415-1436, 2004.

VAN WYK, J. A.; HOSTE, H.; KAPLAN, R. M.; BESIER, R. B. Targeted selective treatment for worm management-how do we sell rational programs to farmers? **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 336-346, 2006.

WALLER, P. J. Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2/3, p. 195–207, 1997.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3-19, 2003.

WOLSTENHOLME, A. J.; FAIRWEATHER, I.; PRICHARD, R.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SANGSTER, N. Drug resistance in veterinary helminths. **Trends Parasitology**, v. 20, n. 469–476, 2004.

ZAJAC, A. M. Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, p. 529-541, 2006.

## ANEXO



Pelotas, 25 de abril de 2012

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)*

**Para:** Professora Maria Elisabeth Aires Berne

*Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia*

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: "**Avaliação da atividade antihelmíntica de extratos vegetais em nematódeos gastrointestinais de ovinos**", processo nº23110.003897/2012-23, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 3897).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**

*Presidente da CEEA*

Ciente em: 26 / 04 /2012

Assinatura da Professora Responsável: