

***Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Allium sativum* L.: Avaliação da Atividade Nematicida, Toxicidade e Alterações Morfológicas e Ultraestruturais sobre Nematoides Gastrintestinais**

LETÍCIA OLIVEIRA DA ROCHA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

Agosto/2016

***Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Allium sativum* L.: Avaliação da Atividade Nematicida, Toxicidade e Alterações Morfológicas e Ultraestruturais sobre Nematoides Gastrintestinais**

LETÍCIA OLIVEIRA DA ROCHA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular.

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLÓVIS DE PAULA SANTOS

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

Agosto/2016

***Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Allium sativum* L.: Avaliação da Atividade Nematicida, Toxicidade e Alterações Morfológicas e Ultraestruturais sobre Nematoides Gastrointestinais**

LETÍCIA OLIVEIRA DA ROCHA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia

APROVADA EM: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr.^a. Aleksandra Menezes de Oliveira (Dr.^a Ciências) – UFRJ/ Macaé

Dr.^a. Maria Angélica Vieira da Costa Pereira (Dr.^a Parasitologia Veterinária) – UENF

Dr. Renato Augusto DaMatta (Dr. Ciências) – UENF

Dr. Clóvis de Paula Santos (Dr. Parasitologia Veterinária) – CBB/ UENF (orientador)

“Não importa o quanto você lute ou ande para chegar onde se quer,
o importante é começar a caminhada”.

PVNC – Vila Operária/ Renato Gomes

Ofereço à:

Deus, que me dá força, perseverança e saúde
para lutar e conseguir chegar até o final.

“Confia ao SENHOR as tuas obras, e teus pensamentos
serão estabelecidos”. Provérbios 16:3

Dedico à:

Meu pai Gilberto Luiz (*In Memoriam*), meu pai
Sílvio César (padrasto) e minha mãe Maria de Fátima
pela dedicação, paciência, amor e confiança, por
permanecerem ao meu lado nos momentos mais fáceis e
mais difíceis e por serem simplesmente meus pais.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Faperj, a UENF e a Capes, pelo financiamento do projeto e pela concessão da bolsa de Doutorado.

A minha família por todo seu carinho e apoio, obrigada por torcerem sempre pela minha vitória.

Ao professor Dr. Clóvis de Paula Santos por todos esses anos de ensinamentos na minha vida acadêmica, mas em especial por sua amizade e confiança, por seu carinho e por me mostrar que sou capaz durante todos esses anos, acreditando no meu trabalho. Nesses 12 anos de parceria, digo que ganhei mais que um orientador e agradeço a Deus por colocar em meu caminho pessoas como você, sua amizade e seu carinho significam muito pra mim. Obrigada por tudo!

Ao professor Dr. Francimar Fernandes Gomes, por estar presente em minha vida acadêmica e pela revisão deste trabalho científico.

A Prof^a Aleksandra Menezes, Prof^a Maria Angélica Vieira e Prof. Renato Augusto DaMatta por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Ao professor Ivo José Curcino, pela colaboração, ensinamentos e contribuição para execução do projeto e ainda pela amizade e carinho com o qual me recebeu em seu laboratório e que sempre teve comigo.

A professora Dr. Nadir Francisca Sant'Anna, ao prof Dr. Renato DaMatta e Prof. Jorge Pretestki pela amizade, carinho e apoio que me deram sempre.

A professora Dr. Antonia Elenir e Doutorando Eduardo, por permitirem e ajudarem no uso do liofilizador.

Ao Professor Eulógio Carlos Queiroz, a técnica Elizabeth Gonçalves e ao doutorando e amigo Hassan Jerdy pela ajuda na obtenção das amostras histopatológica e por toda sua atenção, disponibilidade e carinho com o qual me receberam.

Ao Sr. Osvaldo pela colaboração, por permitir o uso dos animais de sua fazenda e pela atenção com a qual me recebeu.

A todo corpo docente desta universidade por transmitirem todo seu conhecimento com sabedoria.

Aos técnicos administrativos Pedro Cabral, Marilene Reid e Maurício Falcão por simplesmente existirem na minha vida.

As técnicas do LBCT Adriana Alves, Beatriz Ferreira, Darli Grativol, Rosemary Cardoso, Márcia Adriana, Giovana Alves e a secretária Luciana Timóteo pela ajuda, pela amizade, pelos abraços apertados e momentos de descontração.

A Dona Maria Célia da Conceição (Mãezinha), pelo enorme carinho, grandes abraços e por sua amizade, com certeza você é abençoada.

Aos colegas de laboratório Lara Pereira, Jordana Adrioli e Deivid França pelos momentos de descontração na bancada e por sua amizade.

As amigas que levarei pra vida toda e que ganhei nesse tempo de laboratório Josiana Gomes, Daniela Guedes e Cristiane Vergílio pelos muitos e inesquecíveis momentos, inúmeras histórias, risadas e por seus conselhos. Obrigada por sempre estarem presentes.

As minhas alunas de Iniciação Científica Teresa Pontes e Bruna Silva, que durante todo esse tempo se mostraram responsáveis, me ajudaram tanto e me agradeceram com sua amizade, carinho e cumplicidade, eu agradeço por confiarem tanto em mim e sou grata por ter tido vocês em minha vida.

Aos amigos do LBCT, Juliana Azevedo, Fernanda Silva, Lais Pessanha, Amélia Miranda e Saulo Pireda pelos muitos momentos de descontrações no corredor, na copa e por sua amizade.

Aos amigos que ganhei na UENF Renata Lopes, Juliana Santos, Carolina Marques, Juliana Costa, Nathália Bastos, Caio Antônio, Aline Luize, Seldon Aleixo, Irapoan Bertholo, Igor David, Leon Pessanha, Gustavo Rezende, Lorena Lima e Helena Vargas por sempre estarem ao meu lado e por me ajudarem quando sempre precisei.

Aos amigos do Rio, Joice Pimentel, Priscila Godoy, Nádia Cristina, Gabriel Jotta, Diego Brandão, Evelyn Catarina, Priscila Vicente, Nathália Fernandes e Rafael Fernandes amigos únicos que durante tantos anos de amizade só me deram alegrias e muita força para continuar lutando.

A família PVNC (pré Vestibular Social para Negros e Carentes) e principalmente a Renato Gomes e sua família, sem sua força e ajuda tenho certeza que não teria chegado tão longe. Meu grande e eterno amigo!

A todos o meu muitíssimo obrigado!!!

SUMÁRIO

Resumo	14
Abstract	15
1. Introdução	16
2. Revisão de literatura	18
2.1. Ovinocultura e sua importância econômica	18
2.2. Nematoides e suas características	19
2.2.1. Classificação Taxonômica	19
2.2.2. Características gerais dos nematoides	20
Ovos e Larvas	22
2.2.3. Ciclo de vida dos nematoides	24
Fase de Vida Livre	24
Fase Parasitária	25
2.3. Nematoides de importância veterinária	27
2.4. Controle das nematodioses em pequenos ruminantes	28
2.5. Controle Químico e a Resistência Anti-helmíntica	31
2.6. Farmacologia: Sua história e seu uso	32
2.7. Diversidade Botânica do Brasil	33
2.8. Plantas medicinais e os Produtos Naturais	35
2.9. Metabolismo Vegetal	36
2.10. Toxicologia Botânica	38
2.11. Atividade anti-helmíntica de plantas medicinais	40
- <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf. (Capim-limão ou Capim-santo)	41
- <i>Allium Sativum</i> L. (Alho)	42
3. Objetivos	44
3.1. Objetivo geral	44
3.2. Objetivo Específico	44

4. Material e Metodos	45
4.1. Coleta e identificação do material botânico	45
4.2. Obtenção de ovos e larvas de nematoides gastrintestinais	45
4.3. Obtenção dos extratos brutos botânicos	46
4.4. Ensaio de atividade larvicida e ovicida com os extratos brutos	47
4.5. Ensaio de atividade para LC ₅₀ com frações metanólicas de <i>C. citratus</i>	47
4.6. Análise morfológica e ultraestrutural dos ovos e L ₃ tratados com os extratos e frações botânicas.	48
- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	48
- Preparo de amostras para identificação de corpos lipídicos em nematoides tratados com extratos brutos.	49
4.7. Ensaio Toxicológico <i>in vivo</i> dos extratos e frações botânica.	49
4.8. Análise Estatística	51
5. Resultados	52
5.1. Atividade nematicida dos extratos de <i>Allium sativum</i> e <i>Cymbopogon citratus</i>	52
5.2. Ensaio nematicida e LC ₅₀ para as frações obtidas do extrato metanólico de <i>C. citratus</i>	55
5.3. Alterações morfológicas e Ultraestruturais sobre ovos e L ₃ tratados com extratos botânicos brutos e frações de <i>C. citratus</i> .	57
5.4. Ensaio de toxidade dos extratos brutos botânicos e frações metanólicas de <i>C. citratus</i> .	77
6. Discussão	84
7. Conclusão	88
8. Referência Bibliográfica	89
Anexo I: Ficha de Acompanhamento dos Camundongos	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cladograma representativo com a nova classificação taxonômica dos diferentes grupos de nematoides	20
Figura 2. Estrutura geral do corpo do nematoide	21
Figura 3. Representação esquemática tridimensional da cutícula de <i>Aspiculuris tetráptera</i> , após observação em microscopia óptica.	23
Figura 4. Ciclo de Vida dos nematoides strongylida, parasitas do trato gastrointestinal de ruminantes.	26
Figura 5. Representação esquemática da via de biossíntese dos metabólitos secundários nos organismos vegetais	38
Figura 6. Plantas medicinais: Imagem ilustrativa das plantas utilizadas para os ensaios nematicidas.	43
Figura 7. Necropsia dos animais, após período de administração das frações e extratos brutos.	51
Figura 8. Ensaio larvicida extrato bruto de <i>A. sativum</i> .	53
Figura 9. Ensaio larvicida com extrato bruto de <i>C. citratus</i> .	54
Figura 10. Atividade Ovicida do extrato bruto de <i>A. sativum</i>	55
Figura 11. Ensaio ovicida extrato bruto de <i>C. citratus</i>	56
Figura 12. Ensaio ovicida das frações metanólicas FCCM9 e FCCM10 obtidas de <i>C. citratus</i> .	57
Figura 13. Análise de LC ₅₀ das frações metanólicas FCCM9 e FCCM10 obtidas de <i>C. citratus</i> .	58
Figura 14. Análise morfológica de L ₃ tratadas com extrato aquoso de <i>C. citratus</i>	60
Figura 15. Análise morfológica de L ₃ tratadas com extrato metanólico de <i>C. citratus</i> .	61
Figura 16. Análise morfológica de L ₃ tratadas com extrato aquoso de <i>A. sativum</i> .	63
Figura 17. Análise morfológica de L ₃ tratadas com extrato metanólico de <i>A. sativum</i>	64
Figura 18. Análise morfológica de ovos de nematoide tratados com extrato	66

bruto de *C. citratus*.

Figura 19. Análise ultraestrutural de ovos de nematoide tratados com fração metanólica FCCM8 de *C. citratus*. 67

Figura 20. Análise ultraestrutural dos ovos de nematoide tratados com a fração metanólica FCCM9 de *C. citratus* 69

Figura 21. Análise ultraestrutural de ovos de nematoide tratados com fração metanólica FCCM10 de *C. citratus* 70

Figura 22. Análise ultraestrutural de L₃ tratadas com extrato metanólico de *C. citratus* 72

Figura 23. Análise ultraestrutural de L₃ tratadas com o extrato liofilizado de *C. citratus* 73

Figura 24. Análise ultraestrutural de L3 tratadas com extrato aquoso de *A. sativum* 74

Figura 25. Visualização de corpos lipídicos em L3 incubadas com extrato bruto de *C. citratus* e *A. sativum* 76

Figura 26. Análise do peso corporal dos camundongos 78

Figura 27. Avaliação do consumo de água e comida durante o ensaio de toxicidade 80

Figura 28. Sinais Clínicos desenvolvidos durante o ensaio de toxicidade aguda. 82

Figura 29. Análise histopatológica dos órgãos coletados após administração da dose 100µg/mL/Kg da fração metanólica FCCM10 de *C. citratus* 83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos adversos provocados por algumas espécies botânicas e seus constituintes responsáveis 40

Lista de Abreviaturas

DMSO	Dimetilsulfóxido
L₃	Larva Infectante
L₁	Larva de 1° estágio
LC	Concentração Letal
CTL	Controle
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OPG	Ovos de nematoides por grama de fezes

RESUMO

O desenvolvimento da resistência anti-helmíntica intensificou a busca por alternativas de controle. Entre estas, as plantas medicinais se tornaram alvo de diversas pesquisas devido as suas propriedades nematicidas para o controle da nematodiose ovina. O objetivo deste trabalho foi demonstrar a atividade nematicida de *Allium sativum* e *Cymbopogon citratus*, bem como a toxicidade e as alterações morfológicas e ultraestruturais em nematoides gastrintestinais de ovinos. Ovos e Larvas infectantes (L₃) foram obtidas de fezes ovinas e incubados com extratos brutos metanólicos e aquosos destas plantas nas concentrações 50 - 3.12mg/mL e 25 - 1.56mg/mL por 48h. O ensaio ovicida de LD₅₀ foi obtido nas concentrações de 100 - 10µg/mL para as frações metanólicas de *C. citratus* FCCM9 e FCCM10. As alterações morfológicas e ultraestruturais foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). A toxicidade foi obtida através de ensaios *in vivo* nas concentrações 20 - 5mg/mL/Kg para os extratos aquosos e 100 - 25 µg/mL/ Kg para FCCM10, seguido de análise histopatológica dos órgãos, peso e consumo de água pelos animais. Ambos os extratos brutos de *A. sativum* demonstraram atividade larvicida, porém o extrato metanólico apresentou maior eficácia ($p < 0,0001$). O extrato bruto de *C. citratus* apresentou atividade ovicida e larvicida, porém o extrato aquoso demonstrou maior eficácia sobre a eclosão larval ($p < 0,001$). FCCM9 apresentou menor dose terapêutica ovicida (LD₅₀) (10µg/mL). As alterações morfológicas foram visualizadas para ovos e L₃, os quais apresentaram depressões em sua casca e flacidez cuticular, respectivamente. Alterações ultraestruturais como presença de vacúolos, alterações na cutícula com dissociação da hipoderme, alterações em perfis mitocondriais e núcleos e nucléolos foram visualizadas sobre ovos e L₃. Apenas a fração FCCM10 apresentou sinais clínicos, como alterações do tônus muscular e contração abdominal. Alterações macroscópicas pulmão hemorrágico e rim icterico e ainda alterações histopatológicas e perda de peso na concentração 100µg/mL/Kg. *Allium sativum* e *Cymbopogon citratus* demonstraram ser extratos promissores para estudos de controle dos nematoides gastrintestinais de ruminantes.

Palavras-chave: Plantas medicinais, nematoides gastrintestinais, ovinocultura

Abstract

Development of anthelmintic resistance increased research for control alternatives. Among these, the medicinal plants they were targeted of several research because their properties nematicides to control nematodes and sheep. The objective this work was demonstrate the nematicide activity of *Allium sativum* and *Cymbopogon citratus*, as well as the toxicity and morphological and structural changes in gastrointestinal nematodes of sheep. Eggs and infective larvae (L₃) were obtained sheep feces and incubated with metanolic and aqueous crude extract in the concentration 50 - 3.12mg/mL and 25 - 1.56mg/mL for 48h, respectively. The assay ovicidal of LD₅₀ was obtained in concentration of 100 - 10µg/mL to the metanolic fractions of *C. citratus* FCCM9 and FCCM10. The morphological and ultrastructural changes were observed with the scanning electron microscopy (SEM) and transmission (TEM). The toxicity was obtained through tests *in vivo* in the concentrations 20 - 5mg/mL/Kg for the aqueous and 100 - 25µg/mL/ Kg for FCCM10, the histopathological analysis was obtained, as well as weight, food and water of the animals. Both extract of *A. sativum* demonstrate larvicidal activity, but the metanolic extract showed higher efficiency ($p < 0,001$). The crude extract of *C. citratus* showed ovicidal and larvicidal activity, but the aqueous extract demonstrate higher efficiency for larval hatching ($p < 0,001$). FCCM9 showed lower dose therapeutic ovicidal (LD₅₀) (10µg/mL). The morphological changes were observed to eggs and L₃, which showed depressions in your skin and flaccid cuticle, respectively. Ultrastructural changes as the presence of vacuoles, changes in the cuticle with dissociation of the hypodermis, changes in mitochondrial profile and nucleus and nucleolus were showed on eggs and L₃. Only the fraction FCCM10 were showed clinical sings such as change muscle tone and muscular contraction. Macroscopic changes hemorrhagic lung and icteric kidney and histopathological changes and weight loss in the concentration 100µg/mL/Kg. *A. sativum* and *C. citratus* proved promising extracts for study of control of the gastrointestinal nematodes of ruminants.

Key words: medicinal plants, gastrointestinal nematodiosis, alternative control.

1. Introdução

A pecuária ovina no Brasil vem sendo cada vez mais explorada devido ao aumento no consumo da carne e lã. De acordo com o IBGE, a concentração do rebanho ovino é variada nas diferentes regiões. O Nordeste apresenta o maior número de cabeças ovinas (57, 5%), seguido da região Sul (29,3%), Centro-Oeste (5,6%), Sudeste (4,0%) e Norte (3,6%) (IBGE, 2014).

No entanto, fatores como as nematodioses tem se tornado agravante para o crescimento da ovinocultura. Sinais clínicos como depressão do apetite, prejuízos nas funções gastrintestinais, alterações no metabolismo protéico, energético, mineral e morte são encontrados em animais parasitados (Charles, 1992). Principalmente em animais jovens, visto que o sistema imune encontra-se em formação.

A resistência anti-helmíntica se tornou um dos principais fatores para o aumento da nematodiose ovina. Estudos realizados no Norte e Noroeste fluminense comprovaram que a falta de conhecimento de proprietários e funcionários de fazenda e ainda a falta de atualização de médicos veterinários esta diretamente correlacionada com o aumento da resistência no estado do Rio de Janeiro (Cruz et al., 2010). A existência de resíduos tóxicos no ambiente e em produtos de origem animal relacionado aos anti-helmínticos, juntamente com o surgimento da resistência anti-helmíntica, tornaram-se um fator importante no estudo de produtos alternativos para o controle da nematodiose (Padilha, 1996).

Devido aos danos provocados pelas infecções parasitárias na pecuária mundial e a resistência anti-helmíntica, o interesse por novas formas de controle vem aumentando cada vez mais, e nesta área os estudos com plantas medicinais vêm ganhando cada vez mais destaque (Hördegen et al., 2003). A eficácia anti-helmíntica de extratos vegetais vem sendo demonstrada para helmintos parasitos de pequenos ruminantes através de ensaios *in vitro* e *in vivo* (Tariq et al., 2009; Iqbal et al., 2001).

O uso do óleo essencial e do extrato bruto de *Cymbopogon citratus* vem sendo demonstrado para o controle das nematodioses ovinas (Macedo et al., 2015), bem como para outras espécies de *Cymbopogon* spp. (Katiki et al., 2011). Para A.

sativum a atividade nematicida vem sendo demonstrada em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Palacios-Landín et al., 2015). O uso do princípio ativo allicina, presente em de *A. sativum*, tem sido demonstrado em ensaios de alterações morfológicas sobre *Schistosoma mansoni* (Lima et al., 2011). No entanto, estudos sobre os efeitos tóxicos, alterações morfológicas ultraestruturais, mecanismos de ação destes extratos e princípios ativos ainda não são bem elucidados, necessitando de maiores estudos nesta área.

Assim, este trabalho tem por objetivo demonstrar a atividade nematicida *in vitro* de *Allium sativum* e *Cymbopogon citratus*, bem como as alterações morfológicas e ultraestruturais provocadas pelos extratos brutos e ainda a toxicidade aguda *in vivo* destas plantas medicinais, usadas popularmente.

2. Revisão de literatura

2.1. Ovinocultura e sua importância econômica

Com influência portuguesa e espanhola, a pecuária ovina teve sua cultura disseminada por todo o mundo (Zen et al., 2014). Apesar da importância econômica desta pecuária em todos os continentes, somente alguns países possuem uma expressão econômica para essa prática (Vargas Júnior et al., 2013). No Brasil, os maiores rebanhos ovinos encontram-se localizados nas regiões Sul e Nordeste, e sua maior fonte de renda provém da carne e da lã (Zen et al., 2014). Os ovinos são animais facilmente acometidos por diversas doenças. Porém, cabe a coordenação geral de combate às doenças, do Departamento de Saúde Animal, a vigilância ao controle, à profilaxia e a erradicação das doenças dos caprinos e ovinos (MAPA, 2009).

No Brasil, a pecuária ovina vem sendo bastante explorada e sua prática aumentando cada vez mais, devido ao aumento no consumo de carne. De acordo com o IBGE, em 2014 o número efetivo de ovinos foi de 17.61 milhões de unidades de cabeças ovinas, indicando um aumento de 1,9% quando comparado a 2013. O Nordeste apresenta o maior número de cabeças ovinas (57, 5%), seguido da região Sul (29,3%), Centro-Oeste (5,6%), Sudeste (4,0%) e Norte (3,6%) (IBGE, 2014).

A combinação de diferentes características como, sabor, suculência, textura, maciez e aparência são condições conhecidas para uma carne de qualidade. A implantação de novas técnicas racionais de criação, que visam maior produtividade e mais qualidade, vem sendo fundamental dentro da pecuária ovina (Sobrinho et al., 2005). Assim, o confinamento animal vem se tornando uma estratégia considerada e capaz de satisfazer tanto produtor quanto consumidor, sendo capaz de permitir a redução do ciclo de produção e disponibilizando carcaças de maior qualidade no mercado (Urano et al., 2006). A diminuição do uso de fármacos anti-helmínticos e o uso de medidas alternativas de controle contribuem para obtenção da produção mais eficaz de carcaças de qualidade na ovinocultura.

2.2. Nematoides e suas características

2.2.1. Classificação Taxonômica

A classificação dos grupos taxonômicos é dito como essencial para biologia, podendo ser contestada (Ley e Blaxter, 2002) de acordo com novas características apontadas em diferentes grupos de animais ou dentro de um mesmo grupo. Devido a sua diversidade, a classificação sistemática dos nematoides sempre se mostra de forma inconstante e sua classificação atual vem apresentando uma nova fase (Ley e Blaxter, 2002).

Apesar deste ser um grupo de grande biodiversidade e ainda provocando grandes impactos. Quando comparados com recentes avanços de classificação filogenética de outros organismos, as espécies de nematoides, destacando-se os zooparasitos, possuem uma grande carência de estudos com base na filogenética molecular. (Park et al., 2011).

Em várias áreas de importância econômica, os sistemas de classificação de nematoides vêm se modificando, de forma a agrupar novamente espécies de diferentes nematoides. Sendo estas antes classificadas somente de acordo com suas características evolutivas observadas e compreendidas através de chaves morfológicas e ainda de acordo com características ecológicas. Sendo assim, estes dados estão sendo modificados de acordo com novas informações com base nas pesquisas moleculares (Park et al., 2011) a fim de obter a classificação correta deste grupo (figura 1).

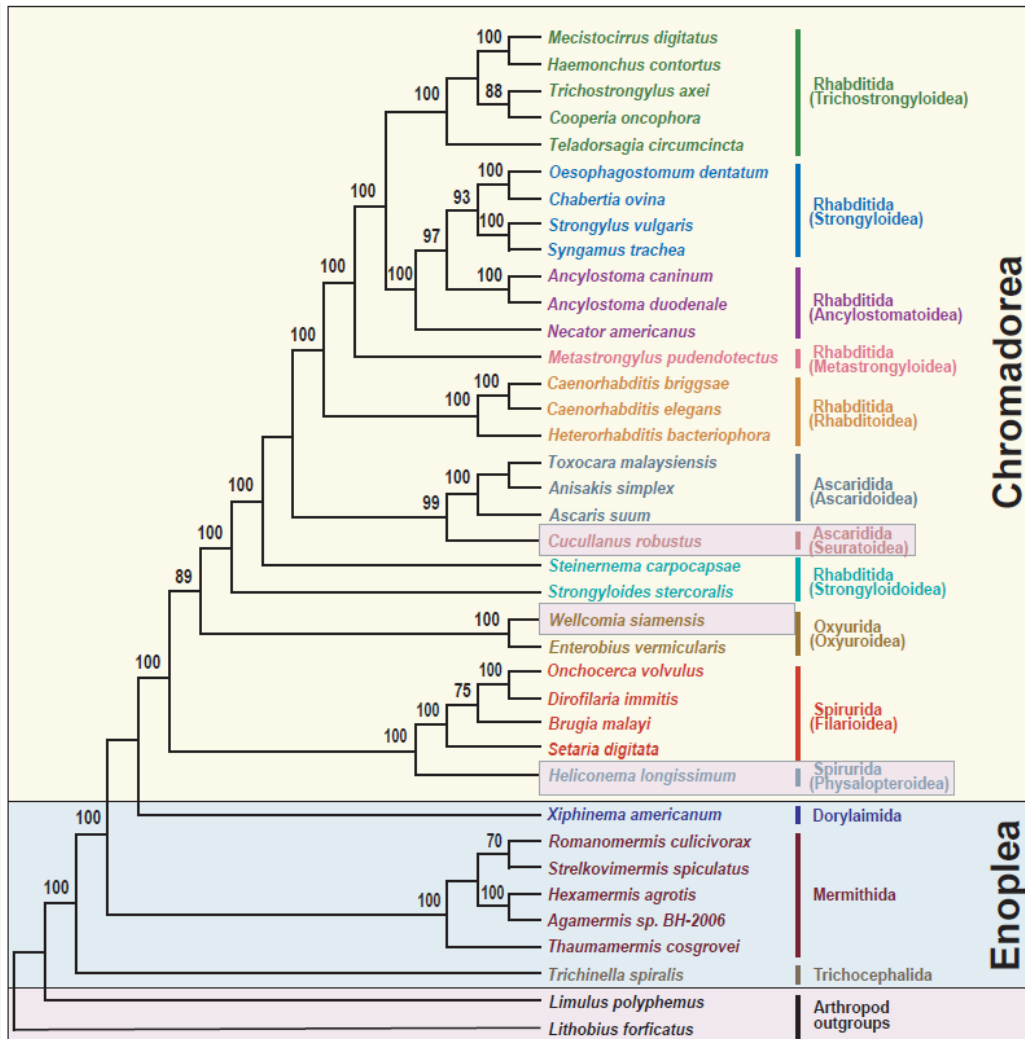


Figura 1. Cladograma representativo com a nova classificação taxonômica dos diferentes grupos de nematoides (Park et al., 2011).

2.2.2. Características gerais dos nematoides

Os nematoides são organismos com corpo filiforme, alongados, não-segmentados e com simetria bilateral, apresentando uma organização funcional bem desenvolvida (Rey, 2001). Possuem sistema digestivo completo com boca e ânus, sistema nervoso, são dióicos sendo a fêmea com ovários, útero, vulva e ânus e macho com cloaca e espículo. São organismos encontrados em todos os ambientes desde o aquático ao terrestre e até mesmo em ambientes extremamente frios. Podem ser de vida livre ou vida parasitária. (Figura 2)

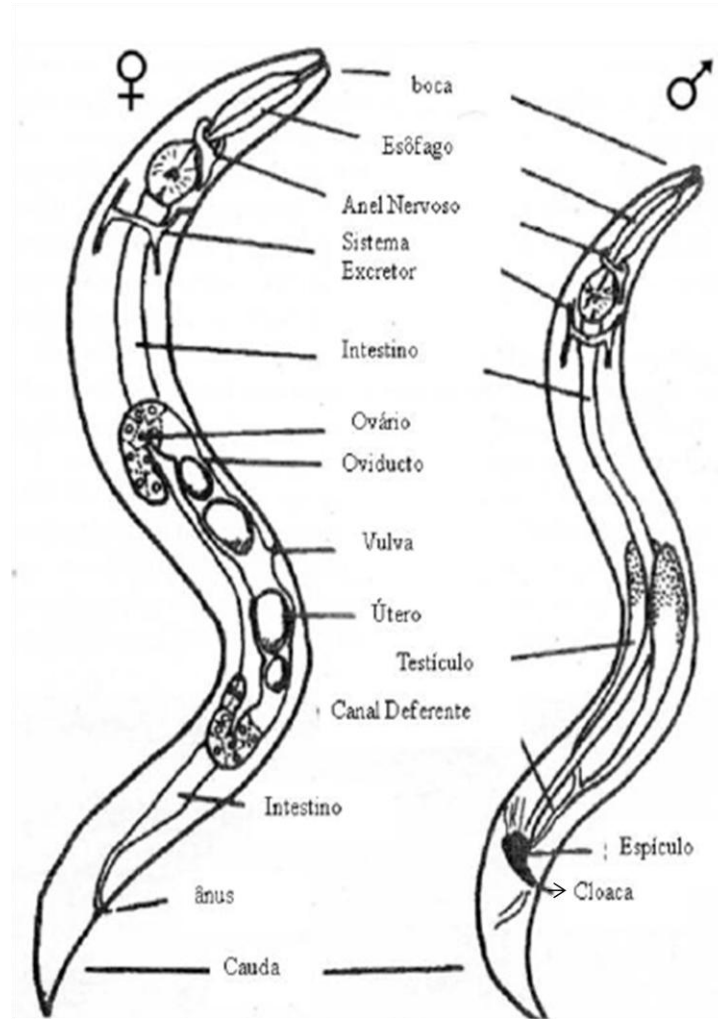


Figura 2. Estrutura geral do corpo do nematoide: fêmea à esquerda, e macho à direita (adaptado de Weischer e Brown, 2000).

As espécies de nematoides parasitos conhecidas podem ser encontradas em diferentes organismos como plantas, animais, humanos e insetos (Rey, 2001). As formas morfológicas de ovo a vermes adultos são representadas evolutivamente por estágios dos nematoides, sendo os estádios larvais terminados em processos de mudas ou ecdises. Os estágios juvenis são diferenciados dos adultos pelo tamanho de seu corpo e pelo surgimento de gônadas e órgãos copuladores (Rey, 2001).

Estruturas como dentes e dentículos estão presentes em diferentes grupos de nematoides e tem por função auxiliarem na fixação destes em órgãos, tecidos e alimentação (Rey, 2001).

No caso dos nematoides parasitos, estas estruturas podem provocar feridas nas mucosas dos seres parasitados, o que pode acarretar em grave perda de sangue levando o hospedeiro a um grave quadro de anemia. Nematoides com este tipo de alimentação são ditos hematófagos.

Ovos e Larvas

Os diferentes estágios de vida dos nematoides como ovos, larvas e adultos, possuem diferenças estruturais e podem variar em tamanho, composição da cutícula e da casca do ovo e na forma corporal dependendo de cada espécie. No entanto, a estrutura geral dos nematoides é semelhante para todas as espécies de nematoide.

Externamente à cutícula, encontra-se a epicutícula, uma camada única e homogênea. A espessura da cutícula pode variar, dependendo da região corporal e sexo do parasito (Araújo et al., 1995). A cutícula se divide em três camadas básicas, sendo um córtex, uma camada de matriz e uma camada basal (Figura 3). O córtex se divide em uma camada interna e externa, esta última é de consistência mais gelatinosa. A camada de matriz se dá a partir do córtex interno e possui forma homogênea. A camada basal é rica em fibras, as quais podem variar em diferentes camadas dependendo da espécie em que se encontram (Anyá, 1966).

A epicutícula dos nematoides possui uma função protetora contra a dessecação superficial, devido a presença de mucopolissacarídeos sulfatados, como demonstrado em L₃ de *Strongyloides ratti* (Murrell e Graham, 1983). Neste contexto, a cutícula também possui uma função protetora, ambas auxiliam os nematoides a suportarem estresses ambientais (Weischer e Brown, 2000).

A cutícula tem um papel importante na locomoção, mantendo a integridade e características morfológicas dos nematoides (Page e Johnstone, 2007). Bioquimicamente, a composição da cutícula dos nematoides é semelhante para todas as espécies, porém a deposição de diferentes moléculas presentes na cutícula é na maioria das vezes diferenciada. A camada lipídica pode se apresentar heterogênea nas diferentes espécies de nematoides, nos nematoides *Acanthocheilonema viteae*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichinella spiralis* e

Ostertagia ostertagi, esta diferenciação foi visualizada durante a interação parasito/hospedeiro (Proudfoot et al., 1990).

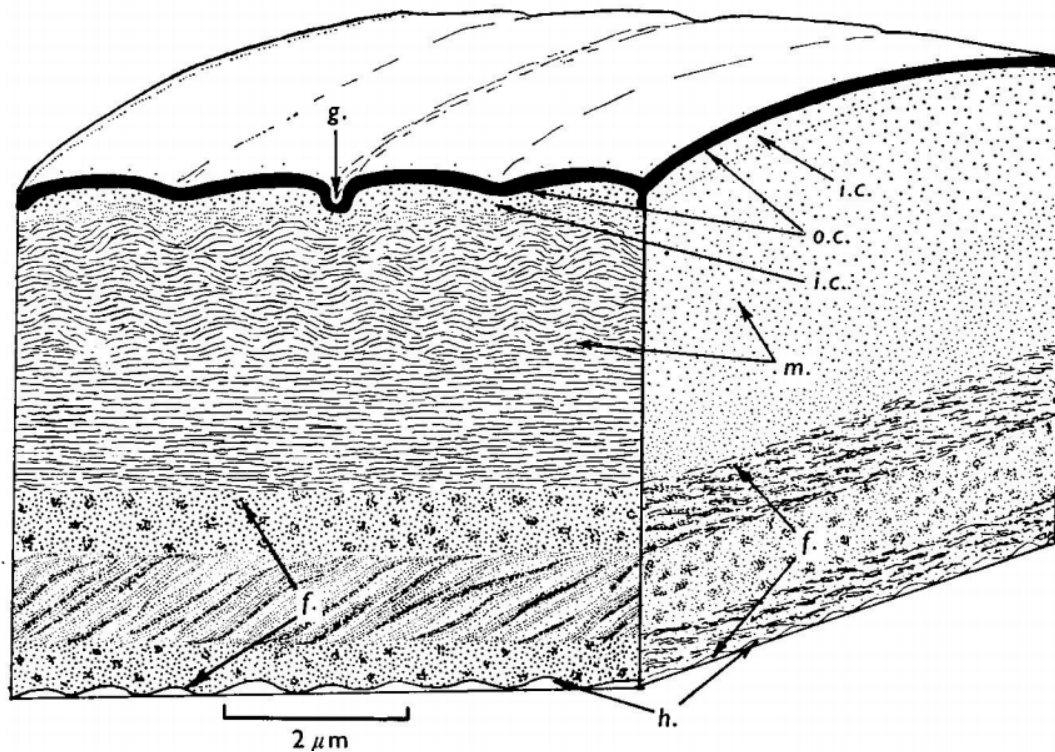


Figura 3. Representação esquemática tridimensional da cutícula de *Aspiculuris tetráptera*, após observação em microscopia óptica. Camada fibrilar (f); estrias cuticulares (g); hipoderme (h); camada de matriz (m); córtex interno (i.c.); córtex externo (o.c.). (Any, 1966)

A estrutura corporal dos nematoides é composta de hipoderme, constituída de uma monocamada de células responsáveis pela produção da cutícula (Weischer e Brown, 2000). Quimicamente a cutícula possui várias camadas sendo composta por colágeno, queratina e proteínas e ainda outras substâncias encontradas como polifenóis, carboidratos e lipídios (Winkfein et al., 1985; Weischer e Brown, 2000).

Os nematoides possuem diferenças morfológicas visíveis, o que auxilia na identificação de diferentes espécies, porém o ovo possui características morfológicas e tamanhos semelhantes (Perry, 2002), dificultando a identificação de gêneros e espécies através da observação dos mesmos. Em muitas espécies o ovo pode ser o principal estágio de sobrevivência, podendo haver o retardo da eclosão

por dias ou anos. Precisamente, para que ocorra a eclosão é preciso que fatores bióticos e abióticos ocorram em condições e maneira adequadas (Perry, 2002).

Para que se conheçam plenamente as alterações ocorridas nos ovos de nematoides é necessário o conhecimento das camadas presente no mesmo. Quando analisadas, pode-se perceber de uma a cinco camadas, na casca do ovo, no entanto, descritas até hoje são conhecidas três camadas, sendo: vitelina, quitinosa e protéica. Após a ingestão do ovo, a eclosão ocorrerá desde que haja estímulos liberados pelo hospedeiro (Perry, 2002).

2.2.3. Ciclo de vida dos nematoides

O ciclo de vida dos nematoides da ordem Strongylida e super família Trichostrongyloidea é semelhante para todas as espécies. Ele é direto, rápido e monoxéno. É dividido em duas fases: a de vida livre e a parasitária. A fase de vida livre se caracteriza pelo desenvolvimento dos ovos até larvas infectantes ocorrendo no ambiente. A fase parasitária caracteriza-se pela evolução das larvas após a ingestão pelo animal até atingirem o estágio adulto e começarem a produzir ovos (Charles, 1992). (Figura 4)

Fase de vida livre

Os ovos quando eliminados juntamente com as fezes encontram-se na fase de mórula e contêm de 8 a 16 células. Em condições ideais, uma larva se desenvolve dentro do ovo e é liberada após eclosão em cerca de 24 horas. A larva de primeiro estágio (L_1), então cresce e passa por um período de muda, sendo chamada larva de segundo estágio (L_2), substituindo a cutícula protetora e ambas alimentando-se de microrganismos. A L_2 muda para larva de terceiro estágio (L_3), esta retém a cutícula da fase anterior e não mais se alimenta de microrganismos, sobrevivendo das reservas nutritivas armazenadas nas células intestinais. A cutícula retida pela L_3 funciona como uma bainha de proteção às condições adversas do meio ambiente (Charles, 1992). . A evolução do ovo a L_3 poderá ocorrer em um período de cinco a sete dias.

A faixa ótima de temperatura para o desenvolvimento das L₃ esta compreendida entre 20°C e 30°C e as temperaturas elevadas aceleram o seu desenvolvimento, mas diminuem a sobrevivência (Padilha, 1996).

Fase parasitária

Após a ingestão das pastagens, as L₃ passam ao abomaso e intestinos, onde atingem o estágio adulto com cerca de 21-28 dias, na maioria das espécies (Figura 2). Durante este período, as larvas mudam para quarto estágio (L₄) e posteriormente para quinto estágio ou adulto imaturo (L₅), aumentam de tamanho, diferenciam os órgãos e se tornam adultos maduros (machos e fêmeas) (Charles, 1992). Os adultos copulam e as fêmeas iniciam a postura dos ovos. O número de ovos produzidos por cada espécie de nematoide varia de centenas a milhares a cada dia.

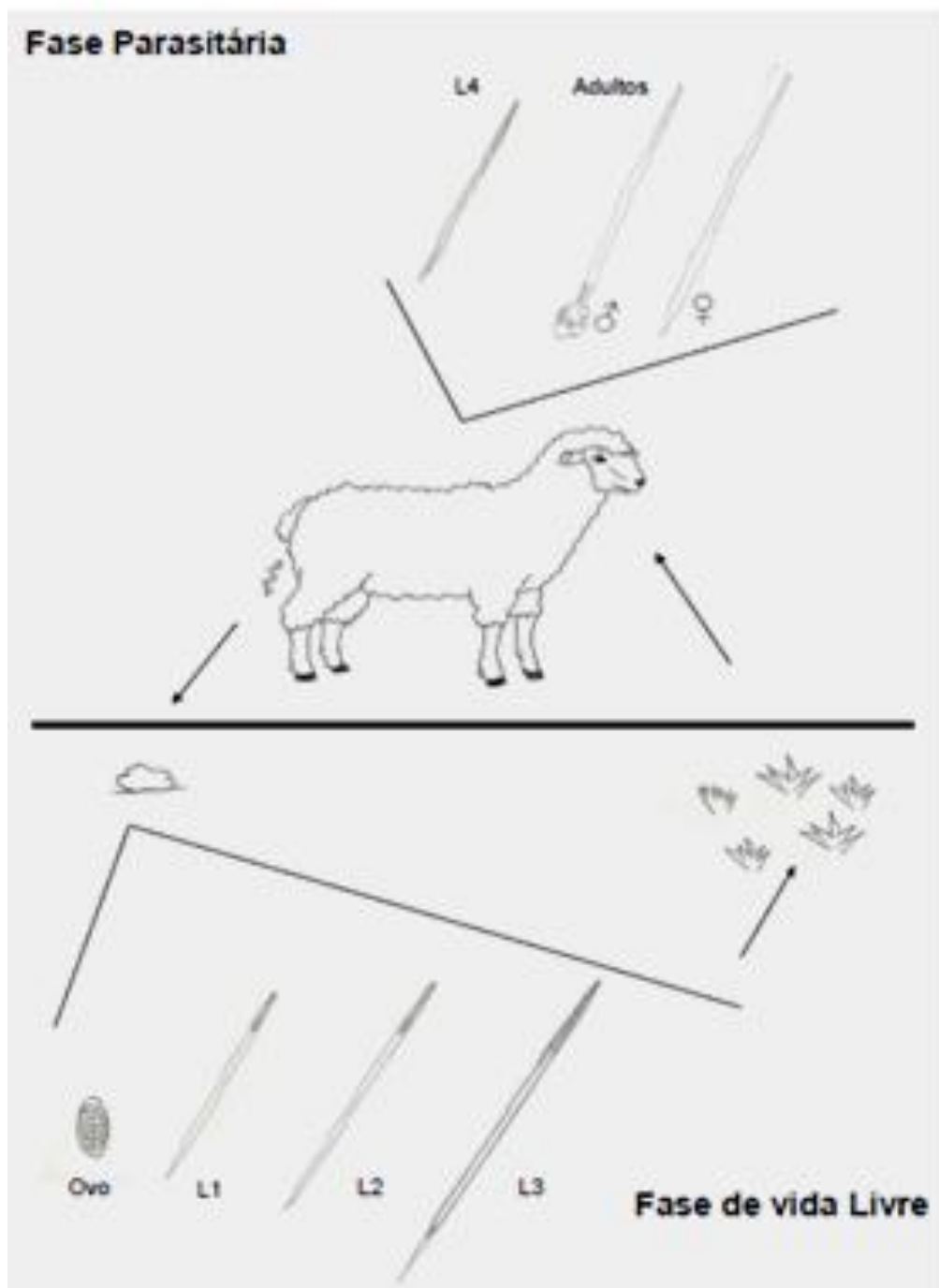


Figura 4. Ciclo de Vida dos nematoides strongylida, parasitas do trato gastrointestinal de ruminantes. A fase de vida livre é caracterizada pelo desenvolvimento dos ovos até L₃. A fase parasitária ocorre durante o desenvolvimento das larvas infectantes até se tornarem adultos e produzirem ovos (Cruz, 2011).

2.3. Nematoides de importância veterinária

Diversos nematoides de importância médico veterinária são descritos, como sendo responsáveis pelo grande número de doenças provocadas em animais. No entanto, para os pequenos ruminantes podemos destacar um pequeno número destes parasitos, responsáveis pelas nematodioses gastrintestinais. O grau de patogenia destes nematoides varia de acordo com a espécie e com lesão causada, podendo ser o nematoide classificado como mais ou menos patogênico. Fatores ambientais como temperatura, níveis fluviais e diferentes condições de tempo influenciam o desenvolvimento e sobrevivência de diferentes fases da vida dos nematoides (Okon e Enyenihi, 1977). *Trichostrongylus columbriformis*, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia* spp., *Cooperia punctata*, *Nematodirus battus* e *Oesophagostomum columbianum* são os principais nematoides parasitos encontrados em ovinos.

Dentre todos os nematoides conhecidos, *H. contortus* se destaca por ser o parasito mais patogênico dentro da ovinocultura e de maior prevalência. Este parasito está localizado no abomaso e são hematófagos. Em animais com elevado grau de infecção os sinais clínicos se manifestam como anemia, edema submandibular e até mesmo a morte (Amarante e Sales, 2007). A transmissão do parasito ao hospedeiro se dá através da ingestão de larvas infectantes (L₃) nas pastagens (Shorb, 1944), seu grau de prevalência pode ser destacado pelo nível de contaminação dos animais presentes.

O período de reprodução na ovinocultura é um dos fatores importantes que influenciam no grau de infecção por nematoides. Sabe-se que ovelhas lactantes podem apresentar maior grau de infecção e assim favorecer maior dispersão dos ovos de nematoides nas pastagens. Este processo leva ao aumento do nível de contaminação em pastos e conseqüentemente nos animais. Como conseqüência o nível de parasitismo no rebanho se elevará de forma considerável (Costa e Vieira, 1984).

A Haemonchose pode ser caracterizada por duas fases: aguda e crônica. É conhecido que esta doença provoca anemia em animais altamente infectados.

Então, durante a fase aguda ocorre uma queda progressiva do hematócrito elevando o mecanismo de compensação da eritropoese pela medula óssea (Taylor et al., 2010). Durante a fase crônica, os parasitos presentes no abomaso não provocam danos, como anemia, por estarem em menor número neste órgão (Taylor et al., 2010; Bowman et al., 2003). Uma das principais alterações significativas a níveis plasmáticos causados pela doença é a hipoalbuminemia facial (Holmes, 1985).

Trichostrongylus columbriformis é o segundo nematoide de maior prevalência na infecção ovina. Devido o grande impacto econômico provocado por *H. contortus*, este nematoide acaba não recebendo a devida importância. No entanto, um alto grau de infecção por *T. columbriformis* também pode acarretar em grandes perdas econômicas.

Após infestação, estes nematoides se localizam no intestino delgado de seus hospedeiros. Apesar de *H. contortus* apresentar maior oviposição, *T. columbriformis* possui maior período pré-patente, o que leva este nematoide a apresentar um grande potencial biótico para nematodioses (Romero e Boero, 2001). A ecologia e a sobrevivência destes e outros nematoides é altamente influenciada por fatores ambientais como temperatura e umidade, o que irá atuar diretamente na taxa epidemiológica de nematoides gastrintestinais (O'Connor et al., 2006).

Em cordeiros da raça Santa Inês, infectados com *T. columbriformis* experimentalmente, sinais como perda de peso, eosinofilia, aumento de células inflamatórias na mucosa, aumento das lesões intestinais, redução do nível de albumina sérica e erosões epiteliais foram visualizados após eutanásia (Cardia et al., 2011).

2.4. Controle das nematodioses em pequenos ruminantes

O crescimento da ovinocultura e o surgimento da resistência anti-helmíntica desencadearam a busca por formas de controle mais eficazes no mundo (Besier e Love, 2003), objetivando a redução do uso de produtos químicos na ovinocultura. Habitualmente, o controle da nematodiose ovina ocorre com o uso de anti-helmínticos. Estes têm por objetivo não só a cura da nematodiose ovina mais também a prevenção das infecções prejudiciais para o animal (Costa e Vieira, 1984).

Um variado número de técnicas é conhecido atualmente. O manejo de animais em áreas de pastagens, usando diferentes técnicas de controle, associados ao uso dos químicos sintéticos auxilia no controle mais eficaz da nematodiose.

O Controle químico é a técnica mais utilizada no controle da nematodiose, no entanto a busca por novas formas de controle como rotação de pastagem, refúgio, controle alternativo utilizando fungos nematófagos (Mota et al., 2003; Larsen, 2006, Santos, 2008) e plantas medicinais, nutrição animal, melhoramento genético animal (Benavides, 2009), desenvolvimento de novos fármacos (Kaminsky et al., 2008) e uso de vacinas (Hein e Harrison, 2005) vêm sendo cada vez mais estudada e desenvolvidas.

Além de auxiliar na remoção do parasito adulto de seu hospedeiro, o uso de anti-helmíntico tem por objetivo prevenir ou reduzir a infecção dos animais susceptíveis através do manejo da pastagem ou ainda pela combinação deste composto químico a outros métodos. No entanto, para que seja feito um manejo eficaz é necessário considerar o grau de sobrevivência e as condições naturais que influenciam na vida da larva (Shorb, 1944). O controle integrado implica no uso racional de uma combinação de diversos fatores biológicos, medidas biotecnológicas e o uso mínimo de químicos sintéticos.

A técnica de manejo de pastagem é uma das mais empregadas visando a diminuição no uso de produtos químicos no controle da nematodiose. A importância desta técnica dada pelo fato de ser rápida, simples e eficaz, podendo levar muitas vezes a extinção do uso de uma molécula anti-helmíntica (Barger, 1997) evitando o surgimento de populações resistentes de helmintos no local. O manejo de pastagens associado ao uso de anti-helmínticos comerciais foi introduzido no sistema de controle de nematodiose em ruminantes nos anos 60, sendo usado no controle integrado (Michael, 1969; citado por Thamsborg et al., 1999). A aplicação de uma mesma dose de um anti-helmíntico a um rebanho pode levar ao surgimento de uma resistência ao produto, uma vez que este rebanho se reinfecta após o tratamento. Então, o uso de moléculas anti-helmínticas de forma moderada leva a diminuição do problema de resistência, aumentando a eficácia do controle da nematodiose (Thamsborg et al., 1999).

A seleção de raças de ovinos resistentes a nematodioses é outro método utilizado, acarretando no aumento do ganho de peso diretamente relacionado ao mercado de carne ovina (Amarante e Amarante, 2003). No entanto, a presença de animais susceptíveis no pasto, ovelhas em parição e cordeiros desmamados, deve ser evitada devido à facilidade de infecção por helmintos (Barger, 1999). Métodos sensíveis de diagnóstico como McMaster e Mini-Flotac para contagem de OPG (ovos de nematoides por grama de fezes), diferenças no hematócrito e FAMACHA[®] podem ser usados para auxiliar na classificação de animais susceptíveis e resistentes (Sotomaior et al., 2007; Kenyon et al., 2016). Sabe-se ainda, que a resistência as nematodioses esta relacionada à presença de linfócitos CD4⁺ Th2, aumento do número de mastócitos na mucosa, maior número de eosinófilos, produção de anticorpos específicos, presença de muco e presença de substâncias inibitórias neste muco. Estes fatores de imunidade estão relacionados com expulsão do nematoide adulto pelo hospedeiro, alterações morfológicas nos nematoides adultos, diminuição da ovipostura e fecundidade da fêmea (Amarante e Amarante, 2003).

Os animais resistentes estão correlacionados com o melhoramento genético animal e o padrão nutricional. A implantação destes programas pode promover um aumento no número de ovinos do Brasil e em todo o mundo. O uso destes animais leva a diminuição da frequência no uso de moléculas anti-helmínticas, levando a uma maior economia para o produtor, redução do número de populações de nematoides resistentes e ainda produção de carcaças de melhor qualidade na ovinocultura (Amarante, 2004).

A produção de vacinas vem demonstrando grandes avanços na pesquisa para o controle das nematodioses. O objetivo destas vacinas é atuar sobre o ciclo de vida dos nematoides e no controle efetivo da população parasitaria presente (Hein e Harrison, 2005). A proteína Hc23 identificada, purificada e obtida de *H. contortus*, vem sendo utilizada como antígeno promovendo o aumento do número de eosinófilos, levando a diminuição do nível de anemia dos animais e aumento no ganho de peso, induzindo um efeito protetor em cordeiros com haemonchose (Fawzi et al., 2014). Estudos comprovam que quando imunizados com 5 a 50µg deste

antígeno, os cordeiros apresentam o aumento do número de anticorpos, queda no nível de anemia e redução do número de OPG e dos nematoides adultos de *H. contortus* (Bassetto et al., 2014).

2.5. Controle Químico e a Resistência Anti-helmíntica

O controle químico é conhecido pelo uso de anti-helmínticos comerciais, sendo esta a forma mais empregada pelos produtores na pecuária ovina. O desenvolvimento de produtos anti-helmínticos teve início a partir da década de 60, desde então estas moléculas se tornaram de grande importância no controle da nematodiose. Dentro dos anti-helmínticos, podem ser descritos: três grupos apresentando amplo espectro, sendo os benzimidazóis, imidazotiazóis e avermectinas e ainda dois grupos de pequeno espectro como as salicilanilidas/fenóis substituídos e os organofosforados. A classificação estabelecida para estas moléculas é baseada no mecanismo de ação de cada uma sobre os nematoides gastrintestinais (Amarante e Sales, 2007).

O primeiro relato de resistência anti-helmíntica teve início em 1964, com o fármaco tiabendazol (Drudge et al., 1964) após, outros fármacos conhecidos como levamisol (1979), ivermectina (1988) e moxidectina (1995) foram relatados para resistência (Molento, 2004). O tempo entre a aprovação destas drogas e relatos sobre a resistência do produto em questão é curto, o que dificulta o controle da nematodiose. Em relação ao tiabendazol, este prazo foi de três anos (Molento, 2004). A resistência ao produto está relacionada à falta de resposta clínica em decorrência ao tratamento animal, sendo associado ao uso constante destas drogas (Kelly e Hall, 1979 a, b., citado por Taylor 2002).

O surgimento de um alelo de resistência em nematóides, proporcionou diversas vantagens aos mesmos. Quando presentes, estes alelos são transmitidos a novas gerações de nematoides, levando ao surgimento de populações resistentes que sobrevivem na presença de drogas anti-helmínticas (Gilleard e Beech, 2007). A combinação de diferentes tipos de drogas com mecanismos de ação similares, é implementado na pecuária ovina a fim de proporcionar um retardo no processo de resistência anti-helmíntica (Anderson et al., 1988, 1991; McKenna, 1990; Smith,

1990; Coles e Roush, 1992; Barnes et al., 1995; Leathwick et al., 2009, citados por Bartram et al., 2012), porém este método acarretou o aumento da resistência para um maior número de moléculas destes fármacos.

Neste contexto medidas como, diminuir a frequência do uso destes químicos associados a métodos de detecção da nematodiose como OPG e FAMACHA[®], evitar a aplicação de subdosagens nos animais, implantar a rotação de pastagens, manter os animais recém adquiridos ao rebanho em quarentena e prover o tratamento anti-helmíntico antes destes animais serem colocados no pasto e fazer uso da rotação de classes de moléculas anti-helmínticas, podem auxiliar na diluição de genótipos resistentes de diferentes espécies de nematoides (Morgan e Coles, 2010).

2.6. Farmacologia: Sua história e seu uso

A filosofia do modelo político-sócio-econômico levou ao surgimento de uma sociedade capitalista, e este modelo é considerado a base da economia mundial. Neste contexto, a compulsividade capitalista esta proporcionalmente ligada a ações de saúde e estimulada pelas necessidades no complexo médico-industrial podendo muitas vezes estar suprimida no propósito ético ou social e visando o bem estar da sociedade . O objetivo da indústria farmacêutica visa o máximo consumo, sendo assim o que interessa é a ocorrência do máximo de doença pelo máximo de tratamento, este fator é conhecido como medicalização (Barros, 1983).

A chamada “explosão farmacológica” ocorreu em 1950 e 1960, com o desenvolvimento da área biológica, possibilitando compreender como os mecanismos moleculares, celulares e homeostáticos ocorriam na relação entre saúde e doença (Laporte, Tognoni, Rosenfeld 1989; citados por Melo et al., 2006). A segunda guerra mundial foi um marco crucial para o crescimento da indústria farmacêutica no mundo, devido a suas conquistas tecnológicas e econômicas. Em 1987 e 1988, o crescimento da indústria farmacêutica alcançou o marco de 13%, superando a economia mundial (Melo et al., 2006).

Mesmo com um grande número de medicamentos no mercado, ainda hoje, a população de baixa renda é a mais prejudicada devido ao o alto custo destes fármacos. Assim, durante a década de 70, o Brasil e diversos países

subdesenvolvidos promoveram a criação de programas governamentais, com o objetivo de garantir e aumentar o número de medicamentos de maior importância para a população de baixa renda. Neste contexto, foi instituída a Central de Medicamentos (CEME) (Melo et al., 2006), criada em 1971 junto a Presidência da República visando minimizar os custos dos medicamentos mais caros, tornando-os mais acessíveis a população mais carente. Após dez anos, este órgão passou a fazer parte do Ministério da Saúde (Negri, 2002).

Visando ainda diminuir o problema do alto custo dos medicamentos, o Brasil retoma a ideia da implementação dos medicamentos genéricos de forma categórica. Em 1999, ocorreu a conclusão e regulamentação destes medicamentos, sendo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) responsável por todo processo de registro e controle. De acordo com os dados, estes medicamentos possuem custo 40% menor quando comparados aos de marca (Negri, 2002)

No Brasil, o complexo industrial da saúde vem desenvolvendo diversas mudanças na estrutura produtiva, nas estratégias públicas e privadas, na forma de atuação do Estado e ainda nas organizações dos serviços da saúde. Assim, o dinamismo social e os graus de inovação e interesse social vêm sendo congregados em setores de atividades que fazem parte deste complexo (Gadelha, 2003). Sabe-se que grande parte dos medicamentos presentes na indústria farmacêutica foi obtida através do isolamento e síntese de moléculas presentes em diversas espécies de plantas medicinais. Devido o alto custo destes medicamentos, o retorno ao uso de produtos naturais pela população tem se tornado cada vez mais uma realidade na cura de diversas doenças mundialmente conhecidas.

2.7. Diversidade Botânica do Brasil

De acordo com o levantamento botânico, o Brasil possui uma diversidade de plantas, algas e fungos sendo um total de 46.097 espécies presentes. Deste montante 43% são endêmicas, colocando o Brasil como o país com a maior riqueza botânica mundial. Algumas estimativas indicam que este número continuará em crescimento, devido à descrição de novas espécies em diferentes estudos (Fioravanti, 2006). Desde os séculos XIV até o século XIX, botânicos europeus

visitam a flora do Brasil, enriquecendo o conhecimento e depositando diferentes coleções vegetais em seus herbários (Giuliette et al., 2005). Assim, devido a sua grande diversidade, a flora brasileira se tornou alvo de diversos pesquisadores do mundo para a descoberta de novos medicamentos.

No Brasil são relatadas seis grandes regiões como a Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Pampa, sendo estas de importância para o conhecimento de plantas nativas e com interesse farmacológico. A procura por agentes medicinais botânicos, ganha sua importância através do conhecimento botânico nativo e da sua história etnobotânica documentada (Brito e Brito, 1993). A importância das regiões brasileiras é assim demonstrada por Stasi et al. (2002) quando apresentam um levantamento de plantas medicinais presentes na Mata Atlântica. Em seu estudo, foi revelado um total de 99 gêneros, 50 famílias, 114 espécies, 290 remédios populares e 628 usos medicinais demonstrando a alta diversidade deste local e o conhecimento farmacológico, fitoquímico, toxicológico e ecológico.

Muitas espécies nativas são usadas ainda hoje para fins medicinais, Roque et al., (2010) descreveram um levantamento de plantas medicinais, com base no conhecimento etnobotânico, usadas pela comunidade rural de Laginhas, localizada no município de Caicó – RN, onde foram citadas um total de 62 espécies nativas com potencial medicinal, estas foram distribuídas em 55 gêneros e 33 famílias. As famílias com maior representatividade foram citadas, sendo: Fabaceae (13 spp.), Euphorbiaceae (6 spp.), Cactaceae (3 spp.) e Lamiaceae (3 spp.)

Devido o processo de desmatamento da flora tornou-se necessário demonstrar à importância da educação ambiental para a preservação da flora medicinal, presente nestas regiões (Neto, 2006). De acordo com Júnior e Pinto (2005) é importante o estudo multidisciplinar, envolvendo etnobotânicos, químicos, farmacólogos e agrônomos para que se possa ampliar cada vez mais o conhecimento sobre plantas medicinais.

2.8. Plantas Medicinais e os Produtos Naturais

Durante milhares de anos e ainda hoje o uso de plantas medicinais ocorre de maneira empírica e tradicional, em algumas populações, devido a suas propriedades terapêuticas. Na maioria das vezes, essas plantas são as mais usadas ou ainda é o único método conhecido contra diversas doenças (Maciel et al., 2002). Os produtos naturais foram alvos de diversas indústrias farmacêuticas durante muitos anos. Devido o grande número de metabólitos secundários que podem ser obtidos das plantas medicinais dando origem diversos tipos de medicamentos.

De acordo com sua história, o uso de estas plantas ocorre a muitos séculos, estando presente em todo o mundo desde civilizações antigas (Firmo et al., 2011). O primeiro relato do uso de plantas medicinais foi datado em 500 a. C. na China, no qual um documento encontrado relata doses e indicações utilizadas no tratamento de doenças (Duarte, 2006). Em contrapartida, seu uso foi relato também em 2838-2698 a. C. com um imperador chinês conhecido por Shen Nung, sendo este responsável por catalogar mais de 365 tipos de ervas medicinais e venenos naturais (Simões et al., 2001; Vale, 2002). Ainda neste contexto, o uso de plantas medicinais foi relatado desde 4000 a. C. (Helfand e Cowen, 1990), foram também encontrados registros no “Papiro de Ebers” presente no Egito em 1500 a. C. (Duarte 2006). Foi relatado ainda registros médicos localizados em um museu da Pensilvânia, onde se encontravam 30 fórmulas de diferentes drogas vegetal, animal e mineral (Firmo et al., 2011).

A Farmacopeia Geral do Reino Unido e domínios de Portugal (1794) constituem seus relatos de 30 produtos de origem mineral, 11 de origem animal e 400 espécies botânicas (Firmo et al., 2011). No século XIX, os recursos terapêuticos eram basicamente obtidos de plantas e seus extratos. O Isolamento dos princípios ativos teve seu início no século XX (Brasil 2005). Assim, de acordo com os registros históricos citados acima o uso de plantas medicinais ocorre desde décadas em todo o mundo, demonstrando a importância de diversas moléculas usadas em diferentes tratamentos terapêuticos.

A Farmacognosia é a ciência que estuda substâncias e matérias primas de origem vegetal ou por fermentação de microrganismos, confirmando suas atividades terapêuticas e promovendo a identificação estrutural, morfológica e química (Rates,

2001). A obtenção dos produtos naturais pode ocorrer por parte das plantas, através de preparações caseiras ou ainda pela obtenção dos extratos brutos, tinturas, pulverizações e a purificação de substâncias a partir destes extratos através de técnicas de cromatografia (Rates, 2001).

A interação de moléculas, oriundas de produtos naturais, com alvos celulares específicos, permitem o tratamento terapêutico de diversas doenças infecciosas e oncológicas viabilizando o conhecimento de novas drogas mais eficazes. De acordo com Junior e Pinto (2005) no Brasil são conhecidas resoluções recentes da Agência Nacional de Vigilância (ANVISA) de 16 de março de 2004, visando normalizar os medicamentos de origem fitoterápica. Ainda neste contexto, a resolução RDC nº 48 determina que para garantir a qualidade de um produto fitoterápico, testes devem ser realizados em rede credenciada no sistema REBLAS (Rede Brasileira de Laboratórios em Saúde) ou empresas com certificados de BPFC (Boas Práticas de Fabricação e Controle)

2.9. Metabolismo Vegetal

O Metabolismo vegetal é responsável pela síntese de diversos compostos vegetais bioativos. A síntese destes compostos pode ser desencadeada pela competitividade e interação dos vegetais com diferentes organismos presentes no meio ambiente, podendo estes compostos exibir ação sobre diferentes mecanismos da planta, incluindo o de defesa ao meio externo. Os compostos químicos sintetizados a partir de produtos extraídos do metabolismo secundário vegetal se tornaram alvos na farmacologia médica, em especial no tratamento de doenças infecciosas e oncológicas (Mishra e Tiwari, 2011). Neste contexto, a pesquisa com plantas medicinais se tornou vantajosa dentro da indústria farmacêutica. Porém a dificuldade para isolar moléculas ativas de produtos naturais e a síntese de moléculas vegetais, levou a uma queda no uso dos mesmos para a produção de novas drogas (Harvey, 2008).

O estudo em plantas medicinais exige conhecimento, se fazendo então necessário a presença de um botânico para identificação correta das plantas, o conhecimento etnobotânico e etnofarmacológico para fins medicinais e por fim um ecólogo para coleta das espécies escolhidas. O aumento no número de metabólitos

secundários isolados proporcionou a fabricação de novos medicamentos através de técnicas recentemente usadas (Balunas e Kinghorn, 2005). Porém, o conhecimento da rota metabólica das plantas medicinais se faz necessário, a fim de descrever corretamente a origem da molécula isolada.

Assim, um grande número de compostos pode ser sintetizado pelas plantas através de rotas metabólicas. Esses metabólitos sintetizados podem atuar em diferentes funções fisiológicas dentro da planta e interagir com os meios bióticos e abióticos (Facchini, 1999). Os metabólitos secundários dos vegetais são classificados e organizados em diferentes grupos, sendo: flavonóides, terpenos, alcalóides, ácidos graxos, saponinas, taninos, entre outros. Estes compostos possuem origem de diferentes rotas metabólicas na célula vegetal (Figura 5) (Dewick, 2001; Santos, 2001).

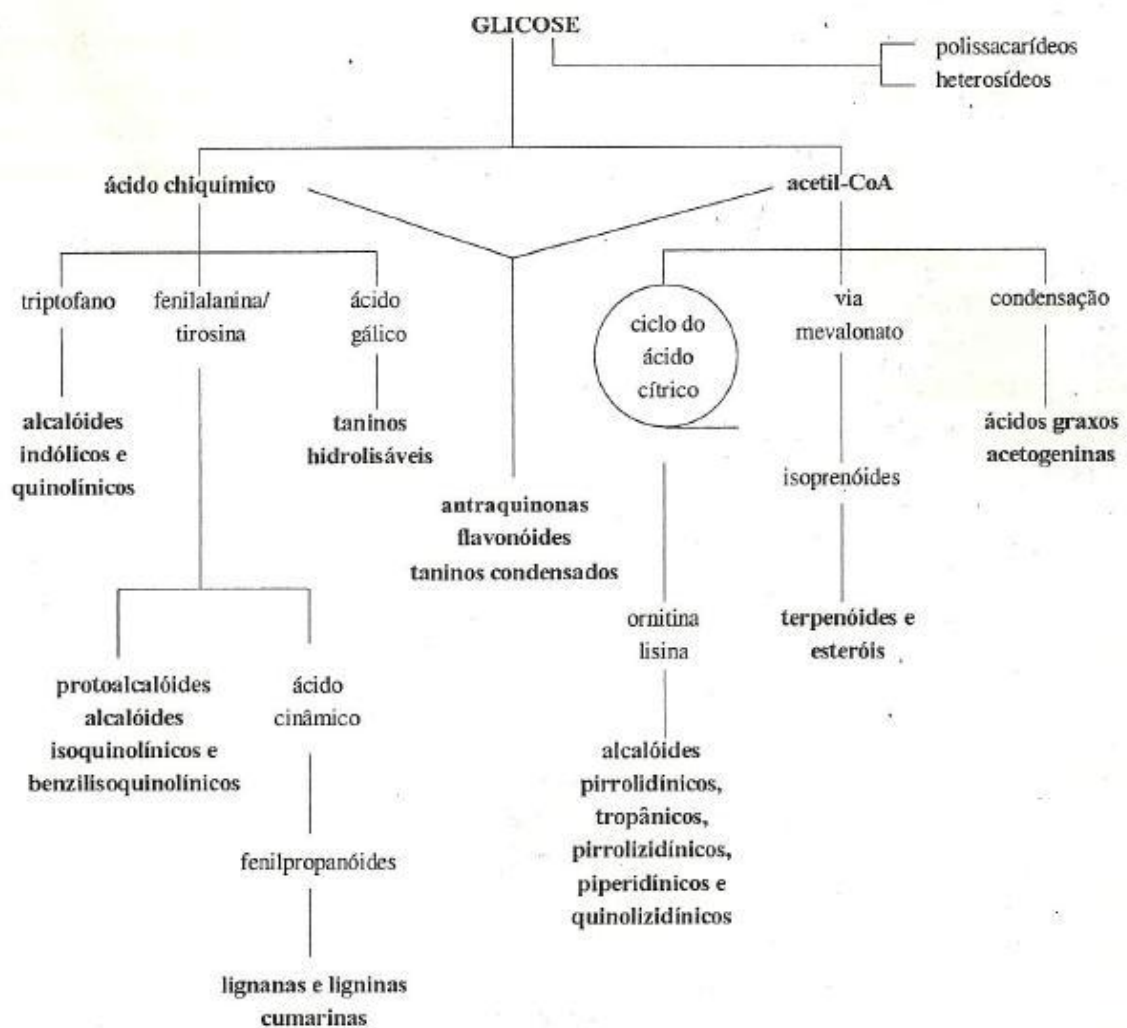


Figura 5. Representação esquemática da via de biossíntese dos metabólitos secundários nos organismos vegetais (Santos, 2001).

2.10. Toxicologia Botânica

Atualmente, a pesquisa com fitoterápicos tornou-se crescente em todo o mundo, desempenhando um importante papel na medicina moderna. Assim, diferentes países da Europa, visam unificar a legislação referente a medicamentos fitoterápicos, que são comercializados normalmente nestes países. No entanto, por serem consideradas de base nutricional, em países como Estados Unidos, as preparações baseadas em fitoterápicos não são submetidas a nenhum teste de segurança e eficácia ao *Food and Drug Administration (FDA)*, para sua

comercialização. Porém, no Brasil a legislação para utilização de medicamentos fitoterápicos sofre diversas modificações. As normas de regulamentação para o uso seguro destes medicamentos vêm sendo elaborada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a Portaria n. 6 de 1995 exigindo e estabelecendo prazos para diversas indústrias farmacêuticas demonstrarem dados apresentando eficácia e segurança do produto. Acredita-se que, devido a sua origem natural, os medicamentos fitoterápicos não desencadeiam reações adversas. Essa crença baseada no conhecimento popular fez com que diversas plantas não fossem avaliadas em ensaios pré-clínicos e clínicos (Turolla e Nascimento, 2006) levando a insegurança do seu uso.

As substâncias presentes em plantas medicinais podem provocar reações adversas, seja por seus componentes, presença de contaminantes no solo ou produtos adulterantes utilizados nas preparações fitoterápicas. Este fato exige que se obtenha um maior controle na qualidade do cultivo, durante a coleta do material vegetal, na extração dos compostos até a elaboração do medicamento (Turolla e Nascimento, 2006). As substâncias tóxicas presentes nas plantas podem ser agressivas, devendo ocorrer o cuidado em sua manipulação e seu uso. Alguns efeitos tóxicos são do tipo hepatotóxico, renal e podendo ainda provocar alguns tipos de dermatites (Veiga Junior e Pinto, 2005).

A hipersensibilidade é um dos efeitos mais comuns provocados pelas plantas, podendo provocar dermatites temporárias levando até mesmo a um choque anafilático, sendo os óleos essenciais extraídos dos vegetais um dos principais agentes causadores (Veiga Junior e Pinto, 2005). No entanto, o uso de produtos botânicos tóxicos podem causar diversos outros efeitos (Tabela 1).

Nome popular	Espécie	Efeitos adversos(toxicidade)	Constituintes responsáveis
Alho	<i>Allium sativum</i> (Liliaceae)	Nauseas, vômitos, dermatite por contato	Compostos à base de enxofre
Aloe	<i>Aloe ferox</i> (Liliaceae)	Desconforto abdominal	Antraquinonas
Angélica	<i>Angelica archangelica</i> (Umbelliferae)	Fotodermatite	Furanocumarinas
Anis	<i>Pimpinella anisum</i> (Umbelliferae)	Dermatite por contato	Anetol
Boldo	<i>Peumus boldo</i> (Monimiaceae)	Irritação renal	Óleo volátil (ascaridol)
Capsicum	<i>Capsicum annum</i> (Solanaceae)	Alveolite alérgica	Capsaicinóides
Cássia	<i>Cinnamomum cassia</i> (Lauraceae)	Reações alérgicas	Cinamaldeído
Confrei	<i>Symphytum officinale</i> (Boraginaceae)	Hepatotoxicidade	Alcalóides pirrolizidínicos
Dente-de-leão	<i>Taraxacum officinale</i> (Compositae)	Reações alérgicas por contato	Lactonas sesquiterpênicas
Erva-de-São-João	<i>Hypericum perforatum</i> (Guttiferae)	Fotodermatite	Hipericina
Guaiacum	<i>Guaiacum officinale</i> (Zygophyllaceae)	Dermatite por contato	Resina
Mate	<i>Ilex paraguayensis</i> (Aquifoliaceae)	Distúrbios hepáticos	Xantinas
Sene	<i>Cassia angustifolia</i> (Leguminosae)	Desconforto abdominal, perda de eletrólitos e água	Antraquinonas

Tabela 1. Efeitos adversos provocados por algumas espécies botânicas e seus constituintes responsáveis (Veiga Junior e Pinto, 2005).

Para a confirmação da toxicidade dos vegetais podem ser utilizados ensaios alternativos e *in vitro*, que visam a diminuição do uso de animais de experimentação, baseado no princípio dos 3Rs: substituição (replacement), redução (reduction) e refinamento (refinement) (Repetto e Repetto ., 1995 citado por Bednarczuk et al., 2010), visando a utilização de microrganismos e até mesmo cultivos celulares durante os ensaios (Frazier, 1992, citado por Bednarczuk et al., 2010). Porém, somente através de ensaios *in vivo* é possível demonstrar os níveis de toxicidade reais, e seus sinais clínicos, podendo classificar este efeito em crônico, subcrônico e agudo. No entanto, os padrões animais (idade, peso, sexo e espécie) devem ser levados em consideração.

2.11. Atividade Anti-helmíntica de plantas medicinais

A atividade anti-helmíntica de plantas medicinais vem sendo confirmada, através de diferentes estudos para diversas espécies botânicas. O que confirma e aumenta sua procura para estudos no controle da nematodiose em ovinos, podendo ser usada como um controle alternativo.

Através de ensaios *in vitro* e *in vivo* e testes a campo, foi possível demonstrar a atividade de extratos botânicos sobre diferentes fases de vida dos nematoides, como ovos, larvas infectantes e adultos. Além da fase de vida, alguns extratos interferiram na motilidade, sobrevivência e eclosão larval em ensaios *in vitro*, como *Thymus capitatus* (Elandalousi et al., 2013), *Ziziphus nummularia*, *Acacia nilotica*

(Bachaya et al., 2009), *Cocos nucifera* (Oliveira et al., 2009), *Trianthema portulacastrum*, *Musa paradisíaca* (Hussain et al., 2011) e *Eucalyptus globulus* (Kanojiya et al., 2015).

Alguns ensaios *in vitro* demonstram ainda a eficácia dos extratos e de moléculas isoladas de plantas medicinais. A ação destes sobre espécie específica e em ensaios *in vivo* foi demonstrada para diversas espécies botânicas (Hussain et al., 2011; Ahmed et al., 2012; Poné et al., 2010; Vatta et al., 2011). Estes estudos permitem confirmar o uso de produtos vegetais para o controle eficaz da nematodíose ovina, a partir do qual pode se obter novos medicamentos.

- *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (Capim-limão ou Capim-santo)

C. citratus (figura 6, B) pertence a família Poaceae, considerada não tóxica, utilizada no tratamento de hipertensão, distúrbios gastrointestinais, ansiedade, epilepsia e outras desordens do sistema nervoso central (Viana et al. 2000; Singi et al. 2005; Matos 2007; Quintans-Júnior et al. 2008). O óleo essencial é rico em citral (mistura dos isômeros neral: 37% e geranial; 45%), e mirceno (12%) (Craveiro et al. 1981; Matos, 2007). A atividade desta planta vem sendo descrita em especial para seu óleo essencial. Trabalhos comprovam que quando associado a um íon Ag^+ ou não, este óleo essencial pode apresentar ação antibacteriana (Ahmad e Viljoen, 2015; Silva et al., 2014) e atividade carrapaticida demonstrada no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Santos e Vogel, 2012). A atividade nematocida desta planta foi comprovada em testes com extrato bruto obtido desta planta sobre *Meloidogyne incógnita* e contra *H. contortus*, nematóides presente no tomateiro e em ovinos, respectivamente (Carboni e Mazzonetto, 2013; Macedo et al., 2015). Óleos essenciais extraídos de outras espécies de *Cymbopogon* spp., também demonstraram atividade sobre diferentes trichonstrongilídeos de ovinos (Katiki et al., 2011). No entanto, se torna necessário o isolamento de diferentes moléculas ativas e a demonstração de seu mecanismo de ação sobre estes organismos, visto que neste campo não existem informações complementares. (Figura 6)

- *Allium sativum* L. (Alho-comum)

A. sativum (Figura 6, A) é uma planta da família Liliaceae, é utilizada no tratamento de perturbações do aparelho digestivo, parasitoses intestinais, edema, gripe, trombose, arteriosclerose, até infecções da pele e das mucosas (Lorenzi e Matos). Os óleos essenciais obtidos do bulbo contêm principalmente ajoeno, alicina (Harris et al., 2001) e aliina (Allison et al., 2006) como principais compostos. Pesquisas farmacológicas têm demonstrado as propriedades do alho sendo antitrombótica, antifúngica, antibacteriana, antioxidante e antitumoral (Lorenzi e Matos, 2002). Sua ação é descrita para os protozoários *Acanthamoeba* sp. e *Leishmania* spp, sendo seu extrato utilizado no tratamento de leishmaniose cutânea e podendo exercer uma atividade imunomoduladora nas infecções ocorridas por *Leishmania major* e *Leishmania donovani* (Polat et al., 2008; Gamboa-Leon et al., 2014; Wabwoba et al., 2010).

A atividade *in vivo* contra *Schistosoma mansoni* foi demonstrada para o composto alicina, provocando ainda alterações morfológicas sobre *Shistosoma mansoni* (Lima et al., 2011). Sua atividade nematicida foi comprovada para *C. elegans* (Iqbal et al., 2001), bem como para *H. contortus* em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Powolny et al., 2011; Ahmed et al., 2013; Palacios-Landin et al., 2015). No entanto, a falta de conhecimento de sua ação sobre morfologia, seu mecanismo de ação e seus efeitos tóxicos são pouco ou não descritos para nematoides, tornando necessário o campo de pesquisa nesta área. (Figura 6)



Figura 6. Plantas medicinais: Imagem ilustrativa das plantas utilizadas para os ensaios nematicidas. A) *Allium sativum* (L.), Alho comum; B) *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, Capim limão ou Capim santo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Identificar a atividade nematicida, assim como as alterações morfológicas e ultraestruturais e Toxicidade de extratos vegetais de plantas medicinais sobre nematoides gastrintestinais de ovinos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito *in vitro* dos extratos metanólicos e aquosos *A. sativum* e *C. citratus* sobre ovos e larvas de nematoides gastrintestinais em ovinos.
- Avaliar o efeito sobre a eclosão larval *in vitro* das frações isoladas do extrato metanólico de *C. citratus*.
- Demonstrar a Concentração Letal (LC₅₀) para as frações metanólicas de *C. citratus* sobre ovos e Larvas infectantes de nematoides.
- Avaliar a possível toxicidade aguda dos extratos vegetais de *C. citratus* e sua fração FCCM10 e extrato bruto de *A. sativum* em ensaios *in vivo*.
- Avaliar o efeito dos extratos brutos metanólico e liofilizado, bem como de as frações sobre a morfologia e ultraestrutura de ovos e larvas de nematoides gastrintestinais de ovinos.
- Detectar a presença de corpos lipídicos em larvas infectantes de nematoides gastrintestinais, após tratamento com extratos botânicos.

4. Material e Métodos

O projeto foi desenvolvido na Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, localizado no Centro de Biociências e Biotecnologia; no Laboratório de Ciências Químicas – Setor de Produtos Naturais, localizado no Centro de Ciências e Tecnologia; Laboratório de Sanidade Animal – Setor de Morfologia e Anatomia Patológica, localizado no Centro de Ciências Tecnológica e Agrícola.

4.1. Coleta e identificação do material botânico

As plantas foram coletadas, identificadas e levadas ao herbário para identificação do material botânico. Após a coleta, as exsicatas foram processadas e depositadas sobre o número de registro no Herbário/CBB/UENF. *Cymbopogon citratus* (H.8225) foi coletado na Unidade de Apoio a Pesquisa, do Centro de Ciências Tecnológicas e Agrícolas da Universidade Estadual do Norte Fluminense (CCTA - UENF). *Allium sativum* (H.8226) foi obtido através de um centro comercial localizado na Cidade de Campos dos Goytacazes – RJ.

4.2. Obtenção de ovos e larvas de nematoides gastrintestinais

Fezes ovinas foram obtidas diretamente da ampola retal de animais naturalmente infectados, alocados em uma fazenda localizada no município de São Francisco de Itabapoana, RJ. Foram usados um total de 20 animais para obtenção dos ovos e larvas infectantes de nematoides. As fezes foram acondicionadas em bolsa térmica, refrigeradas e transportadas até o laboratório.

Para a obtenção das larvas infectantes foi utilizado o método de coprocultura modificado (Robert O´Sullivan, 1950). Foram pesados 4g de fezes ovinas em copos descartáveis de 50mL e estas foram colocadas em caixas fechadas contendo 100 mL de água destilada ao fundo. Após sete dias, as L₃ foram coletadas e armazenadas em garrafas de cultura com água destilada, deixadas em geladeira à 4°C.

Para obtenção dos ovos, foram usadas amostras fecais com OPG acima de 2000 ovos. As amostras fecais foram reunidas, homogeneizadas e maceradas,

sendo em seguida passadas em um conjunto de peneiras granulométricas com aberturas de 24, 48, 80, 100, 200, 270 e 400 mesh, esta última foi usada para reter os ovos. Depois de retidos, estes foram colocados em tubos Falcon de 15mL e levados a centrifuga à 1600g/ 5 minutos. Este processo foi repetido com a adição de solução salina e o sobrenadante lavado com água destilada abundante na peneira de 400 mesh. Em seguida o material foi transferido para um cálice de sedimentação sendo deixado por 2h em repouso e em temperatura ambiente. Os ovos foram recuperados com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidos para um tubo Falcon sendo usados em seguida.

4.3. Obtenção dos extratos brutos botânicos

Foram obtidos extratos aquosos e metanólicos de *C. citratus* e *A. sativum*. Foram utilizados 1kg de bulbo de *A. sativum* e de folha de *C. citratus*. Para *C. citratus*, as folhas foram coletadas, picadas e levadas para secagem em estufa vegetal por 72h a 30°C. O bulbo de *A. sativum* foi usado fresco, picado e colocado junto ao solvente.

Para obtenção do extrato aquoso, foram adicionados 6L de água destilada ao bulbo de *A. sativum* ou folha seca de *C. citratus*. As plantas foram deixadas em maceração por dois dias e logo após este período, foi feita a filtração do material. O extrato obtido foi distribuído em balões de liofilização, congelados em nitrogênio líquido e levado ao liofilizador. A massa final obtida foi pesada e armazenada em tubos Falcon de 50mL à -20°C.

Para obtenção dos extratos metanólicos, foram adicionadas 2,7L de metanol a 1,7Kg do bulbo de *A. sativum* picado e 1Kg de folha seca de *C. citratus*. O extrato foi deixado em maceração em metanol por 10 dias, sendo este último rotaevaporado a 60°C a cada três dias. A massa final obtida foi pesada e armazenada em geladeira a 4°C.

4.4. Ensaio de atividade larvicida e ovicida com os extratos brutos

Após obtenção dos extratos brutos, estes foram pesados e soluções estoques dos mesmos foram obtidas. Para os extratos aquosos e metanólicos de *A. sativum* foram obtidas soluções estoques de 1g/mL, bem como para os extratos de *C. citratus*. A partir das soluções estoques foram obtidas as concentrações usadas para os ensaios larvicidas e ovicidas.

Para os ensaios ovicidas, foi utilizado um total de aproximadamente 120 ovos/poço sendo suspensos em 20µL de água destilada. Foram acrescentados os extratos nas concentrações de 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12mg/mL. Para o ensaio larvicida, foi utilizado um total de aproximadamente 80L₃/ poço, resuspensas em 20µL de água destilada. Foram acrescentados os extratos nas concentrações de 25, 12.5, 6.25, 3.12 e 1.56mg/mL.

Larvas e ovos foram incubados com os extratos a 30 e 27°C, respectivamente por 48h em estufa B.O.D. Os extratos foram diluídos em DMSO 3%. O controle negativo foi obtido com Dimetilsulfóxido (DMSO) 3% e um controle positivo foi obtido com albendazol 1mg/mL.

4.5. Ensaio de atividade para LC₅₀ com frações metanólicas de *C. citratus*

As frações foram obtidas a partir do extrato bruto metanólico de *C. citratus* pelo método de Cromatografia de Coluna Aberta (CCA), em experimentos anteriores (Rocha, 2012). Foram realizados ensaios para demonstrar a menor concentração letal (LC₅₀) da eclosão larval para as frações metanólicas. Para este ensaio, foram usados aproximadamente 120 ovos/poço suspensos em 0,02mL de água destilada e incubada em concentrações de 100, 80, 60, 40, 20 e 10µg/mL destas frações. Estes ovos foram deixados em estufa B.O.D. a 30°C e após 48h foram contabilizados o número de L₁ eclodidas.

4.6. Análise morfológica e ultraestrutural dos ovos e L₃ tratados com os extratos e frações botânicas.

Para as análises em Microscopia Eletrônica as amostras foram fixadas em Paraformaldeído (PA) 4%, Glutaraldeído (GA) 2,5% e Tampão CaCodilato de Sódio (TCaCO) 0,1M, por 24h. Após este período todas as amostras foram lavadas três vezes em mesmo tampão no tempo de 30 minutos, pós-fixadas em Ósmio 1% por 1h e lavadas novamente em TCaCO conforme descrito acima. As amostras foram então processadas conforme descrito a seguir:

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As L₃ e ovos foram aderidos a lamínulas com auxílio de poli-L-lisina, para facilitar o processamento e visualização. Todas as amostras foram desidratadas em series crescentes de álcool (30, 50, 70, 90 e 100%) sendo a troca a cada 1h, no entanto para o último foram feitos três trocas a cada 30 minutos, seguido de ponto crítico em CO₂. Em seguida, as amostras foram fixados em stubs e cobertos com ouro paládio. Após o processamento as amostras foram visualizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura *SEM 940*.

- Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

L₃ e ovos foram desidratados em series crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) sendo a troca a cada 1h, no entanto para o último foram feitos três trocas a cada 30 minutos, em seguida as amostras foram incluídas em resina do tipo SPURR em proporções de 5:1 acetona/spurr: spurr/acetona e sua troca feita a cada 24h. Ao final as amostras em resina pura foram levadas em estufa 60°C por 48h. Os blocos foram levados ao ultramicrotômo e cortes de 70nm foram obtidos. Os cortes foram colocados em grandes de cobre de 400mesh contrastados em acetato de uranila 1% e citrato de chumbo 5%, lavados em água destilada e visualizados em microscópio eletrônico de transmissão *Zeiss 900*.

- Preparo de amostras para identificação de corpos lipídicos em nematoides tratados com extratos brutos.

Após incubação das L₃ com os extratos brutos por 48h na concentração de 25mg/mL, estas foram fixadas conforme descrito acima. No entanto, após a última lavagem com tampão CaCodilato de sódio 0,1M, foram feitas lavagens em tampão imidazol 0,1M pH7,5 três vezes de 30 minutos cada. Seguido de pós-fixação em uma mistura de Ósmio 1%/Imidazol 0,1M por 1h, lavado novamente em tampão imidazol conforme acima, seguido de desidratação e inclusão em resina conforme descrito acima. Foram obtidos cortes ultrafinos em grades de cobre 400 mesh não contrastadas e visualizadas em MET *Zeiss 900.Z*

4.7. Ensaio Toxicológico *in vivo* dos extratos e frações botânicas.

Os ensaios foram executados no Biotério de experimentação animal Teresa Kipnis da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro com autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade sob número de registro 211. Foi utilizado um total de 150 camundongos *Swiss* fêmeas 8-12 semanas. Os animais foram mantidos no biotério até o final do experimento. Os ensaios de toxicidade foram seguidos da fração FCCM-10 (obtida do extrato metanólico de *C. citratus*) e os extratos brutos aquosos de *C. citratus* e *A. sativum*. Para cada experimento os camundongos foram separados em cinco grupos, sendo:

- Grupo 1: Tratado A;
- Grupo 2: Tratado B
- Grupo 3: Tratado C
- Grupo 4 e 5: Controles com DMSO 3% e PBS

Antes da administração de cada dosagem, os animais foram deixados em jejum por 1h e após administração da mesma os animais foram observados por 15 dias sendo deixados com água e comida à vontade. Todas as doses foram administradas oralmente e de acordo com o peso de cada animal, para cada experimento. Os animais foram acompanhados nas primeiras 24h, sendo

observados a cada 4h. Após as primeiras 24h os animais foram observados por 15 dias, a cada três dias os animais eram pesados e o consumo de água (mL) e comida (g) mensurado. Ao final dos ensaios os camundongos foram eutanasiados em CO₂ e necropsiados em seguida (Figura 7).

As concentrações foram estabelecidas de acordo com resultados obtidos em testes *in vitro*. Para os ensaios com a fração FCCM10 foram usadas dosagens de acordo com LD₅₀, sendo: 100, 40 e 25 µg/mL/Kg. Para os extratos brutos aquosos de *A. sativum* e *C. citratus* foram estabelecidas as mesmas dosagens, sendo: 20, 10 e 5 mg/mL/Kg. Todas as concentrações foram obtidas a partir de soluções estoques. Estes procedimentos seguem as recomendações contidas na resolução 90/2004 “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” da ANVISA (2004)

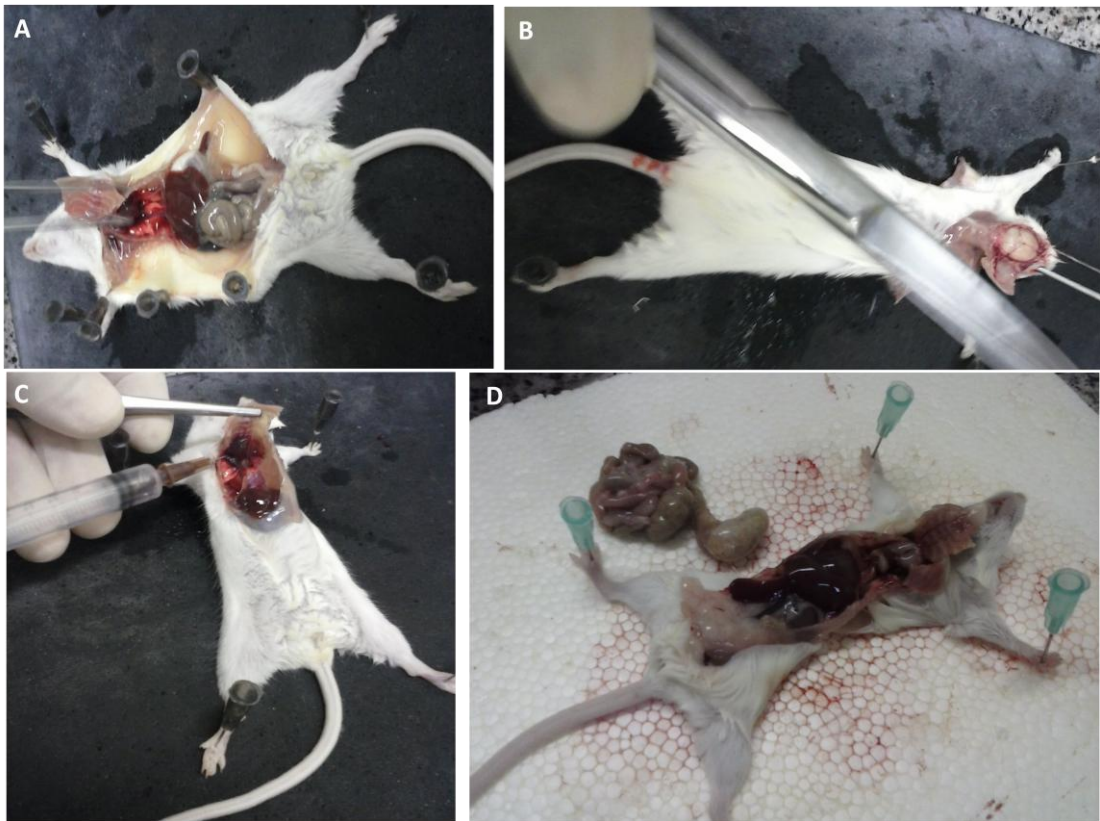


Figura 7. Necropsia dos camundongos após período de administração das frações e extratos brutos. Imagens demonstrativas da necropsia de camundongos após administração das dosagens dos extratos aquosos vegetais de *C. citratus* e *A. sativum* e ainda frações metanólicas de *C. citratus* FCCM10. (A e D) coleta dos órgãos enviados para análise histopatológica; (B) coleta do cérebro, as amostras coletadas foram fixadas em formol tamponado 10%, antes do processamento; (C) método de punção cardíaca utilizado para coleta das amostras sanguíneas, foi coletado 1mL de sangue de cada animal e o método foi realizado após eutanásia dos animais em CO₂.

4.8. Análise Estatística

As médias de mortalidade de ovos e larvas foram obtidos e os resultados foram submetidos a análise de variância simples (ANOVA). Foram obtidas médias e desvio padrão. As médias foram comparadas através do teste Tukey, o nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

A análise em *probit* foi realizada para determinar DL_{50} (dose letal requerida para 50% de mortalidade de ovos de nematoides), através do qual a curva de dose-resposta.

5. Resultados

5.1. Atividade nematicida dos extratos de *Allium sativum* e *Cymbopogon citratus*

A atividade larvívica foi demonstrada para os dois extratos obtidos das duas espécies vegetais. O extrato metanólico de *A. sativum* apresentou eficácia a partir da concentração de 6,25 mg/mL ($p < 0,0001$). Para o extrato aquoso foi apresentada atividade em todas as concentrações, com exceção da concentração de 1.56mg/mL. Ambos os extratos quando comparados aos dois controles apresentaram alta eficácia (Figura 8).

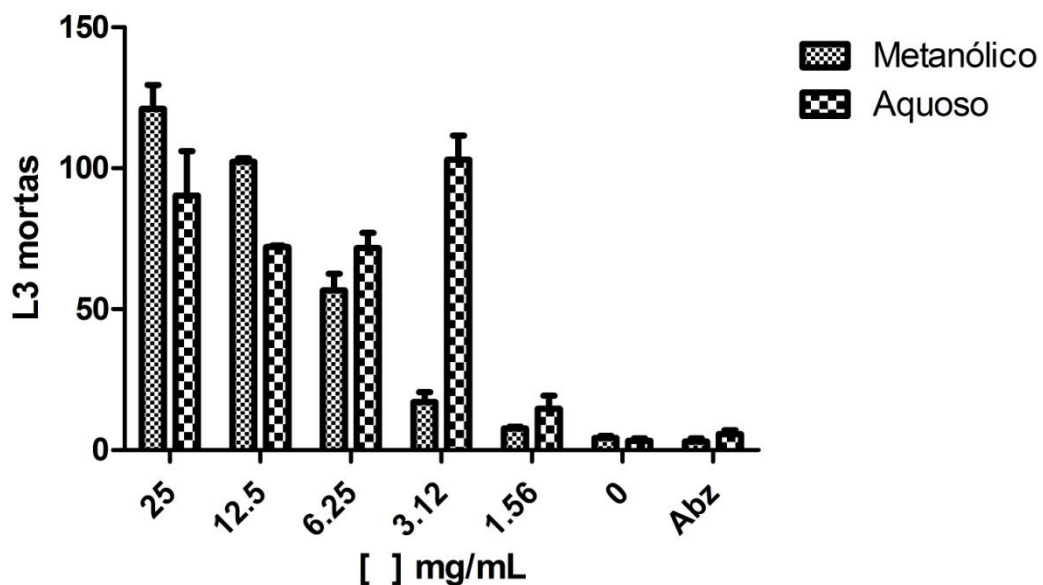


Figura 8. Ensaio larvívica do extrato bruto de *A. sativum*. L₃ foram incubadas em concentrações iguais para ambos os extratos metanólicos e aquosos: 25, 12.5, 6.25, 3.12 e 1.56mg/mL. Os controles negativo com DMSO 3% e positivo com o anti-helmíntico Albendazol 1mg/mL, foram obtidos. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas. As placas foram colocadas em B. O. D. 27°C por 48h. O número de L₃ mortas foi obtido e contabilizado com o auxílio de um microscópio óptico. Ambos os extratos provocaram a mortalidade larval, porém o extrato aquoso demonstrou maior atividade.

O extrato de *C. citratus* provocou mortalidade sobre L₃ quando comparado aos controles. O extrato metanólico demonstrou atividade em sua menor concentração (1,56mg/mL) ao passo que o extrato aquoso não. (Figura 9)

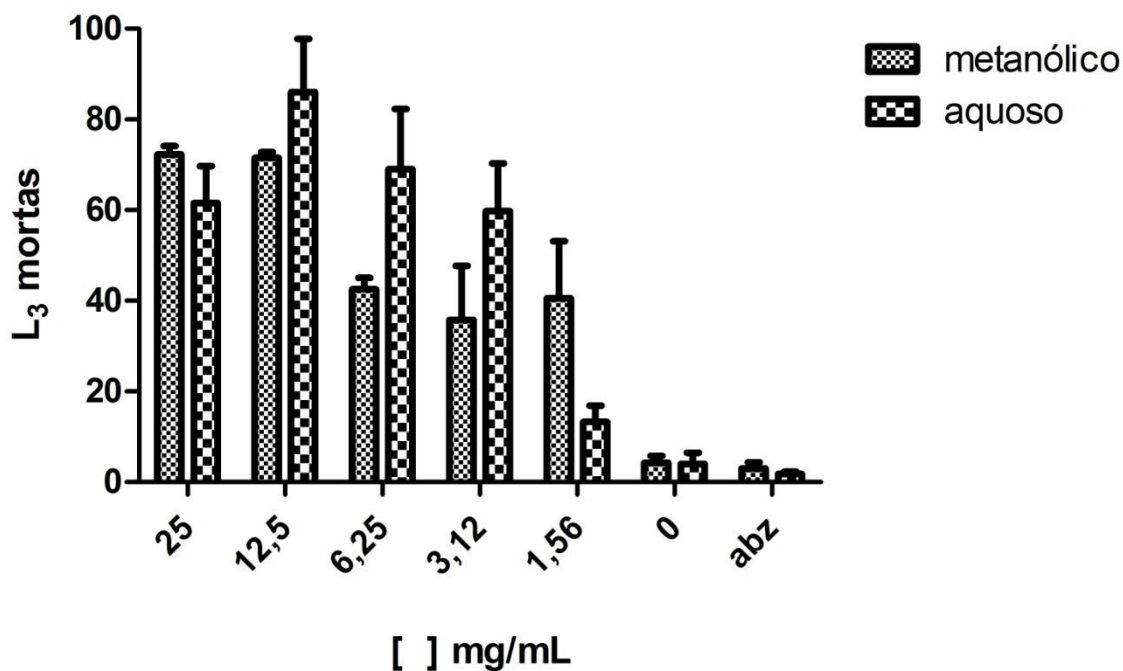


Figura 9. Ensaio larvicida do extrato bruto de *C. citratus*. As L₃ foram incubadas em concentrações iguais para ambos os extratos: 25, 12.5, 6.25, 3.12 e 1.56mg/mL. Os controles negativo com DMSO 3% e positivo com o anti-helmíntico Albendazol 1mg/mL, foram obtidos. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas. As placas foram deixadas em B. O. D. 27°C por 48h. O número de L₃ mortas foi obtido e contabilizado com o auxílio de um microscópio óptico. Ambos os extratos apresentaram atividade em todas as concentrações testadas, com exceção do extrato aquoso em sua menor concentração (1,56mg/mL).

A atividade ovicida foi demonstrada para os dois extratos das duas espécies vegetais, a exceção do extrato metanólico de *A. sativum*. , no entanto para o extrato aquoso na concentração mais elevada foi demonstrada atividade ($p < 0,0001$). (Figura 10)

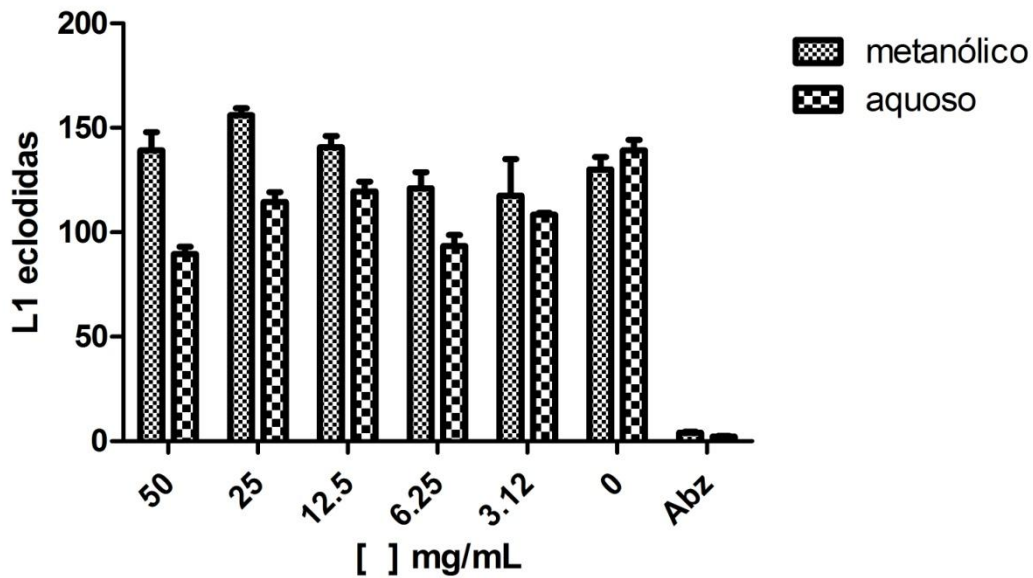


Figura 10. Atividade Ovicida do extrato bruto de *A. sativum*. Ovos de nematoide foram incubados com concentrações iguais para ambos os extratos: 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12mg/mL. Foram obtidos controle negativo com DMSO 3% e positivo com o anti-helmíntico Albendazol 1mg/mL. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas. As placas foram deixadas em B. O. D. 27°C por 48h. O número de L₁ eclodidas foi obtido e contabilizado com o auxílio de um microscópio óptico. Para ambos os extratos não foram visualizadas inibição da eclosão larval, porém em sua maior concentração o extrato aquoso apresentou eficácia de 50%.

Ambos os extratos de *C. citratus* apresentaram atividade ovicida, inibindo a eclosão larval. Porém, quando comparado ao extrato metanólico, o extrato aquoso demonstrou maior atividade ($p < 0,001$) sobre a eclosão larval. (Figura 11)

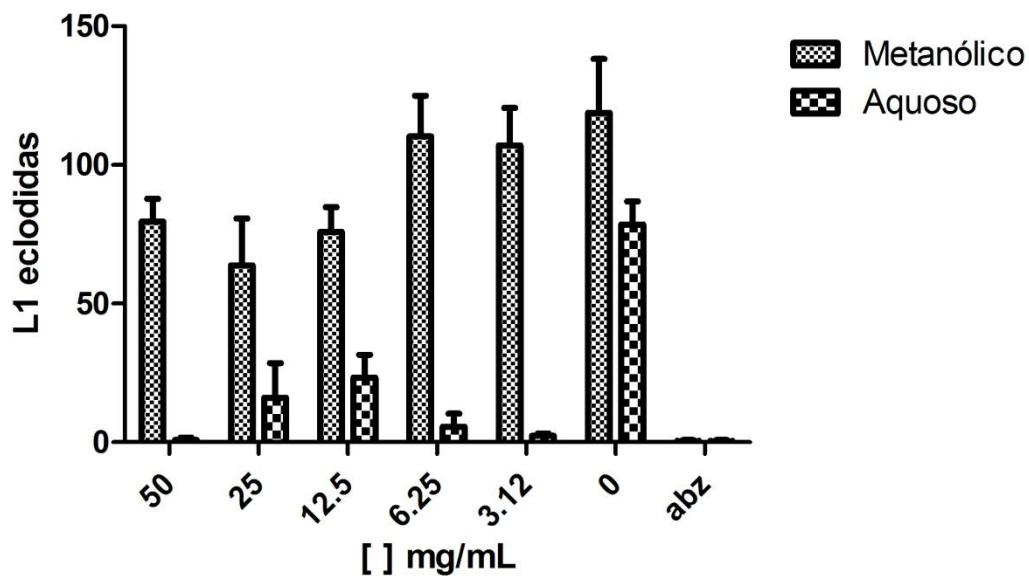


Figura 11. Ensaio ovicida do extrato bruto de *C. citratus*. Os ovos de nematoide foram incubados com concentrações iguais para ambos extratos: 50, 25, 12.5, 6.25 e 3.12 mg/mL. Foram obtidos controle negativo com DMSO 3% e um controle positivo com o anti-helmíntico Albendazol 1mg/mL. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas. As placas foram deixadas em B. O. D. 30°C por 48h. O número de L₁ eclodida foi obtido e contabilizado com o auxílio de um microscópio óptico. O extrato aquoso apresentou atividade em todas as concentrações testadas para inibição da eclosão larval.

5.2. Ensaio nematicida e LC₅₀ para as frações obtidas do extrato metanólico de *C. citratus*

A atividade ovicida foi demonstrada para as frações FCCM9 e FCCM10, as quais inibiram 100% da eclosão larval em suas maiores concentrações. Quando comparado ao controle positivo, as frações demonstraram alta eficácia.

A partir do resultado acima, foram obtidos ensaios ovicidas com as frações citadas em concentrações menores, onde a fração FCCM9 apresentou maior atividade sobre a eclosão larval. Quando comparadas, esta fração apresentou maior diferença significativa ($p < 0,001$) nas concentrações 40 e 20µg/mL. (Figura 12)

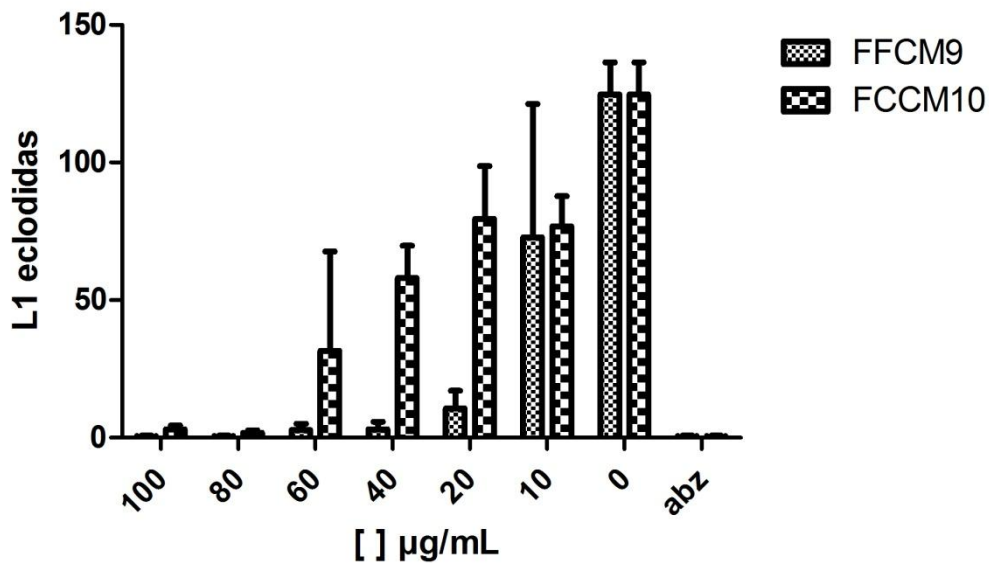


Figura 12. Ensaio ovicida das frações metanólicas FCCM9 e FCCM10 obtidas de *C. citratus*. Os ovos foram incubadas com concentrações iguais para ambas frações: 100, 80, 60, 40, 20 e 10µg/mL. Foram obtidos controle negativo com DMSO 3% e um controle positivo com o anti-helmíntico Albendazol 1mg/mL. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas. As placas foram colocadas em B. O. D. 30°C por 48h. O número de L₁ eclodidas foi obtido e contabilizado com o auxílio de um microscópio óptico. Ambas as frações metanólicas inibiram 100% da eclosão larval em suas maiores concentrações.

A partir do ensaio acima foi obtido a menor concentração letal (LC₅₀). Dentre as frações citadas, FCCM9 apresentou maior eficácia para inibição de 50% eclosão larval quando comparada a FCCM10. Para FCCM9 a concentração inibitória foi entre 10µg/mL e 20 µg/mL, enquanto que para FCCM10 a concentração inibitória foi entre 40µg/mL a 60 µg/mL. (Figura 13)

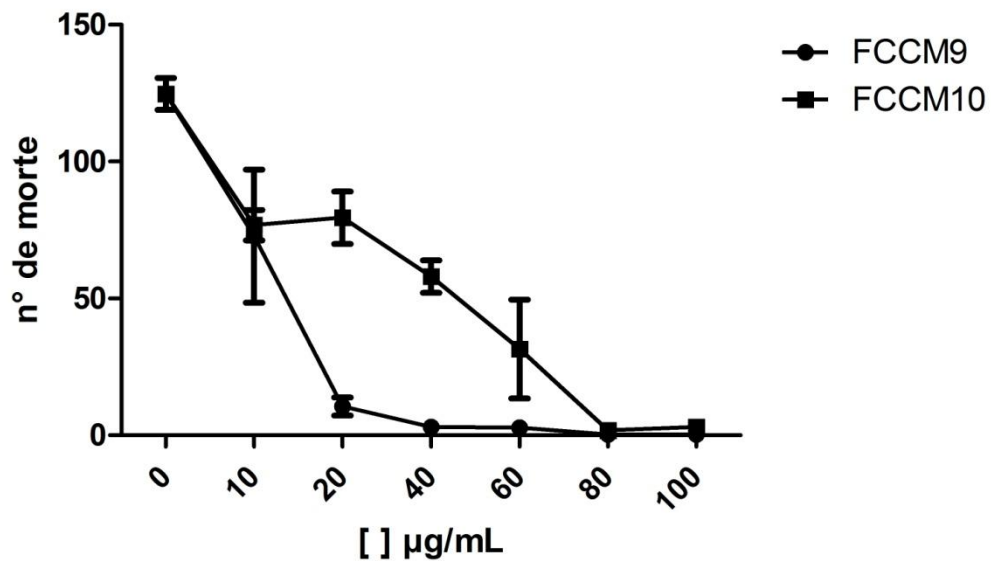


Figura 13. Análise de LC₅₀ das frações metanólicas FCCM9 e FCCM10 obtidas de *C. citratus*. Os ovos foram incubadas com concentrações iguais para ambas frações: 100, 80, 60, 40, 20 e 10µg/mL. Foi obtido o controle negativo com DMSO 3%. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas. As placas foram deixadas em B. O. D. 30°C por 48h. O número de mortalidade foi obtido e contabilizado com o auxílio de um microscópio óptico. A fração metanólica FCCM9 demonstrou maior eficácia, pois sua concentração letal foi menor (10µg/mL) quando comparada a fração FCCM10 (40µg/mL).

5.3. Alterações morfológicas e Ultraestruturais sobre ovos e L₃ tratados com os extratos botânicos brutos e frações de *C. citratus*

Após incubação dos ovos e larvas de nematoides com extratos metanólicos e aquosos de *A. sativum* e *C. citratus* e ainda as frações metanólicas FCCM8, FCCM9 e FCCM10 de *C. citratus*, diferentes alterações foram observadas sobre a morfologia e ultraestrutura dos nematoides.

Nas larvas infectantes foi possível observar linha lateral bem visível, corpo alongado composto de cabeça e cauda (Figura 14 e 15, A). Para as alterações morfológicas as larvas infectantes apresentaram deformações cuticulares como, cutícula colapsada e poros na presença do extrato aquoso de *C. citratus* (Figura 14,

B e C) e cutícula colapsada e descamações para seu extrato metanólico (Figura 15, B e C).

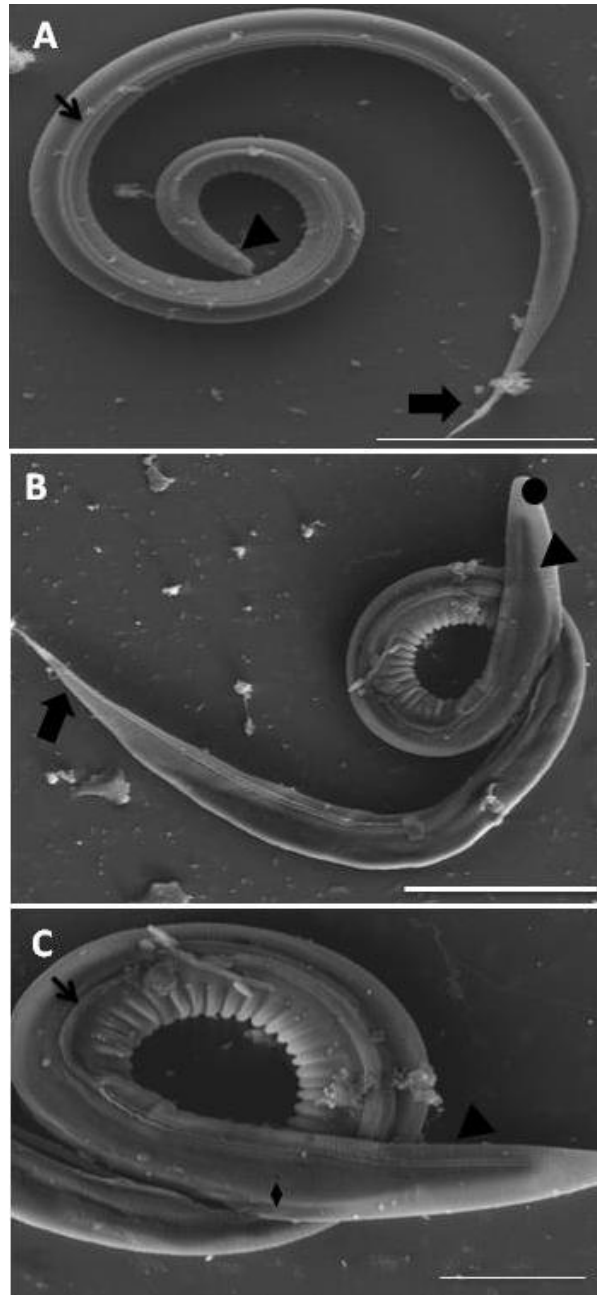


Figura 14. Análise morfológica de L₃ tratadas com extrato aquoso de *C. citratus*. As alterações na morfologia das L₃ foram visualizadas após 48h incubadas com 25mg/L dos extratos brutos. Controle negativo em DMSO 3% (A) cabeça do nematoide (cabeça de seta), cauda (seta larga) e linha lateral ao longo do corpo (seta fina); L₃ tratadas com extrato aquoso de *C. citratus* (B e C), apresentaram deformações como cutícula colapsada e poros ao longo da cutícula do nematoide (losango); Aumento: 500x (A); 600x (B); 1000x (C). Barra de escala: 20µm e 50µm.

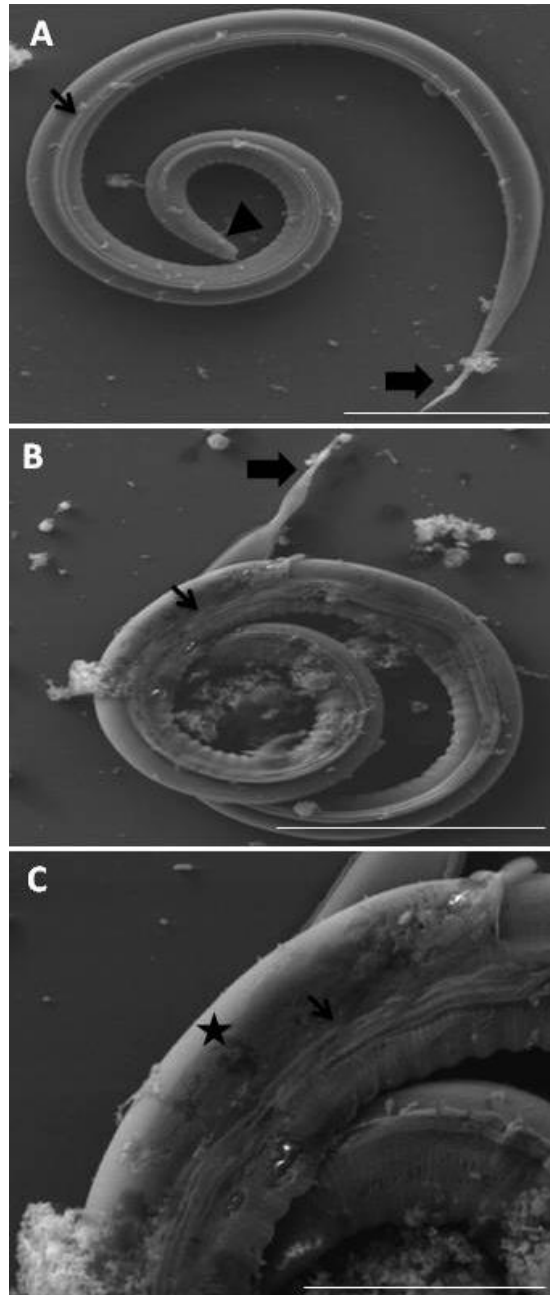


Figura 15. Análise morfológica de L₃ tratadas com extrato metanólico de *C. citratus*. As alterações na morfologia das L₃ foram visualizadas após 48h incubadas com 25mg/L dos extratos brutos. Controle negativo em DMSO 3% (A) apresenta nematoide composto por cabeça (cabeça de seta), cauda (seta larga) e linha lateral ao longo do corpo (seta fina); L₃ tratadas com extrato metanólico de *C. citratus* (B e C), apresentaram deformações como cutícula colapsada e descamações ao longo da cutícula do nematoide (estrela); Aumento: 500x (A); 700x (B); 2000x (C). Barra de escala: 20µm e 50µm.

Quando tratadas com extratos de *A. sativum* foram visualizadas deformações cuticulares como cutícula colapsada, porém não tão evidente para o extrato aquoso e presença de pequenos poros ao lado da linha lateral (figura 16, B e C). Para o extrato metanólico somente foi visualizado a presença de cutícula colapsada (Figura 17, B e C). O controle negativo em DMSO3% não apresentou alterações morfológicas, podendo ser visualizadas cabeça e cauda do nematoide e linha lateral ao longo do corpo (Figura 16 e 17, A).

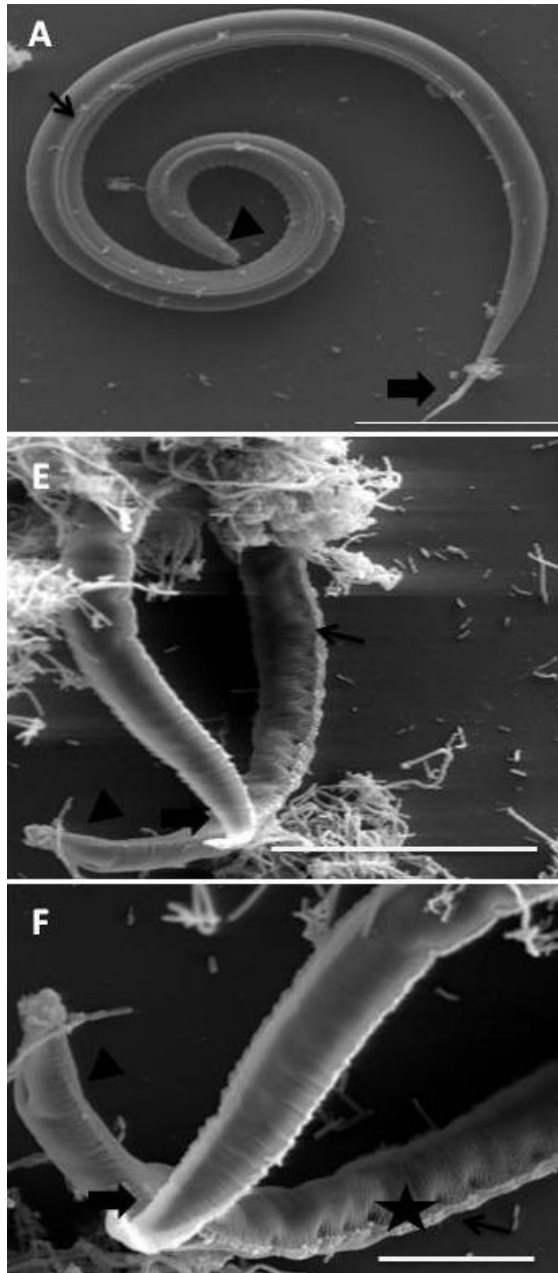


Figura 16. Análise morfológica de L₃ tratadas com extrato aquoso de *A. sativum*. As alterações na morfologia das L₃ foram visualizadas após 48h incubadas com 25mg/L do extrato bruto. Controle negativo em DMSO 3% (A) apresenta nematoide composto por cabeça (cabeça de seta), cauda (seta larga) e linha lateral ao longo do corpo (seta fina); L₃ tratadas com extrato aquoso de *A. sativum* (B e C), apresentaram deformações como cutícula colapsada não muito evidentes e pequenos poros ao lado da linha lateral (estrela); Aumento: 500x (A); 500x (B); 1400x (C). Barra de escala: 20µm e 50µm.

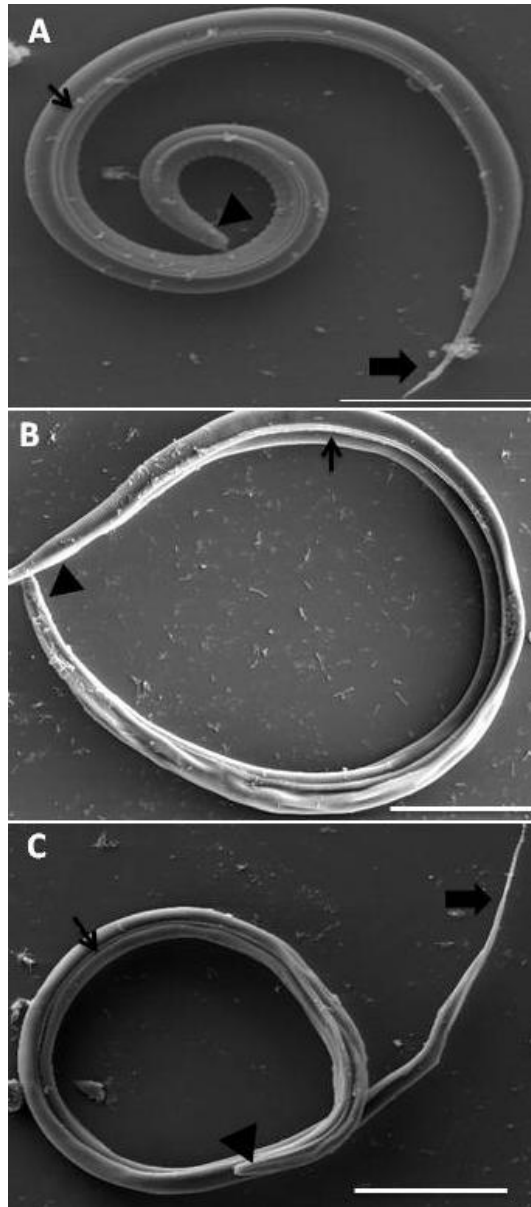


Figura 17. Análise morfológica de L₃ tratadas com extrato metanólico de *A. sativum*. As alterações na morfologia das L₃ foram visualizadas após 48h incubadas com 25mg/L do extrato bruto. Controle negativo em DMSO 3% (A) apresenta nematoide composto por cabeça (cabeça de seta), cauda (seta larga) e linha lateral ao longo do corpo (seta fina); L₃ tratadas com extrato metanólico de *A. sativum* (B e C), apresentaram deformações como cutícula colapsada bem evidente e murchamento; Aumento: 500x (A); 625x (B); 500x (C). Barra de escala: 20µm e 50µm.

Os ovos de nematoide após tratados com extratos metanólico e aquoso de *C. citratus* apresentaram respectivamente a presença de depressões em sua casca (Figura 18, B e C) para ambos os extratos. O controle incubado em DMSO3% foi possível visualizar ovo com casca lisa (figura 18, A), não apresentando alterações superficiais e formato oval.

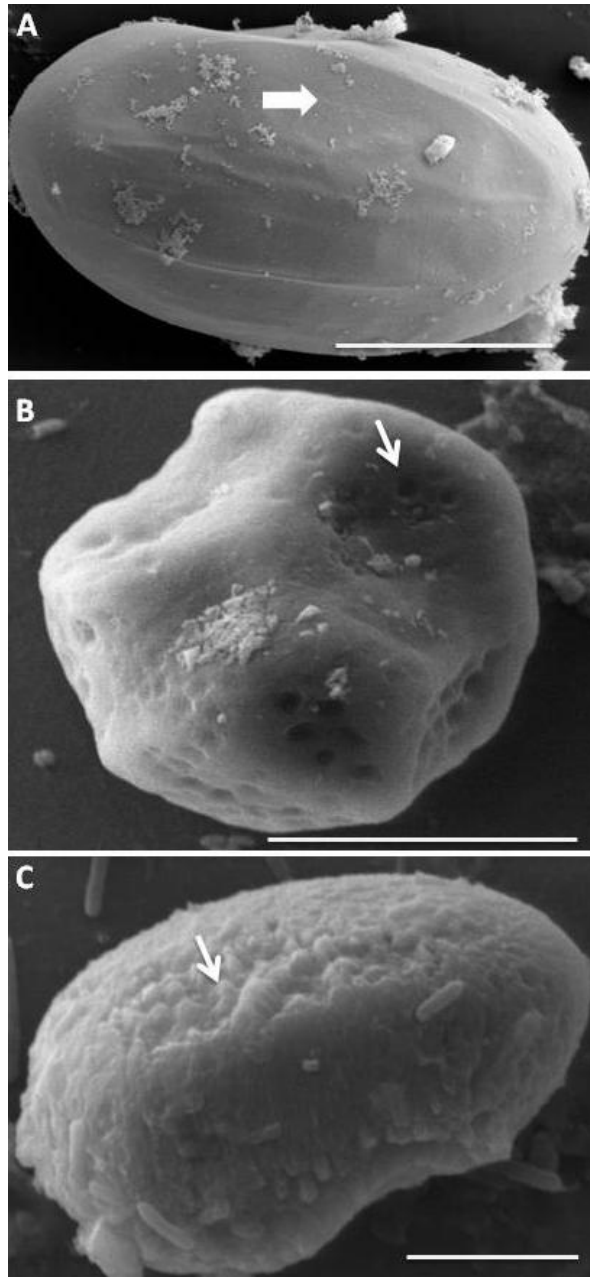


Figura 18. Análise morfológica de ovos de nematoide tratados com extrato bruto de *C. citratus*. Foi possível visualizar alterações sobre a casca dos ovos, após 48h incubados com 50mg/mL dos extratos brutos de *C. citratus*. Controle negativo em DMSO 3% (A) ovos sem alterações superficiais apresentando casca lisa (seta larga); ovos tratados com extrato metanólico (B) e aquoso (C), alterações sobre a morfologia da casca como depressões (seta fina) foram visualizadas após 48h de tratamento. Aumento: 2000x (A); 4000 (B); 5000x (C). Barra de escala: 5µm, 10µm e 20µm.

Através da análise ultraestrutural dos ovos de nematoides foi possível demonstrar a presença de casca, núcleo e nucléolo e ainda a presença de retículo endoplasmático rugoso (Figura 19, 20 e 21 A). Após o período de incubação com as frações metanólicas FCCM8, foi possível visualizar alterações de núcleo, desintegração do nucléolo, presença de vacúolos e alterações em sua casca (Figura 19, D, E e F). Para as frações FCCM9 e FCCM10 os ovos apresentaram um desarranjo no conteúdo interno com presença de diversos vacúolos (Figuras 20 e 21, D, E, F).

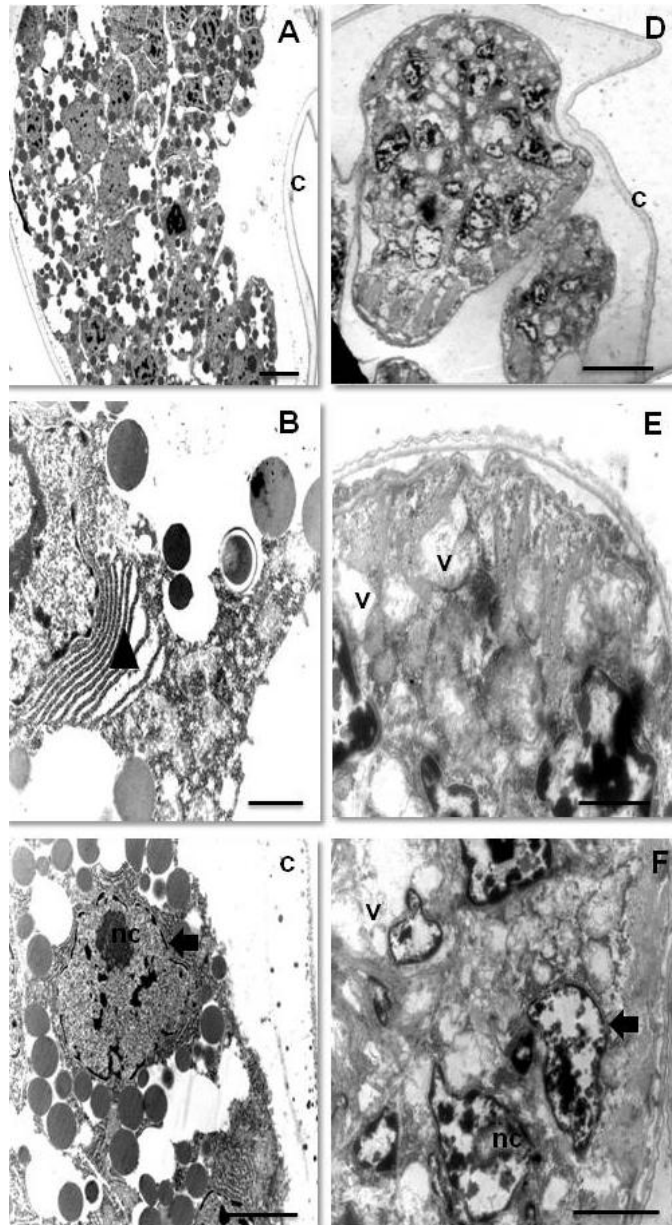


Figura 19. Análise ultraestrutural de ovos de nematoide tratados com a fração metanólica FCCM8 de *C. citratus*. Foram visualizadas alterações na estrutura interna dos ovos, após 48h de incubação com 500µg/mL da fração FCCM8 (D, E e F). Controle negativo em DMSO 3% (A, B e C) ovos sem alterações superficiais apresentando casca (c), nucléolo (nc) núcleo (seta larga) e retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta). Alterações ultraestruturais foram observadas como presença de vacúolos (v), desintegração de nucléolo, alteração do núcleo e casca. Aumento: 3000x (A e D); 2000x (B e E); 12000 (C e F). Barra de escala: 1µm, 2µm e 5µm.

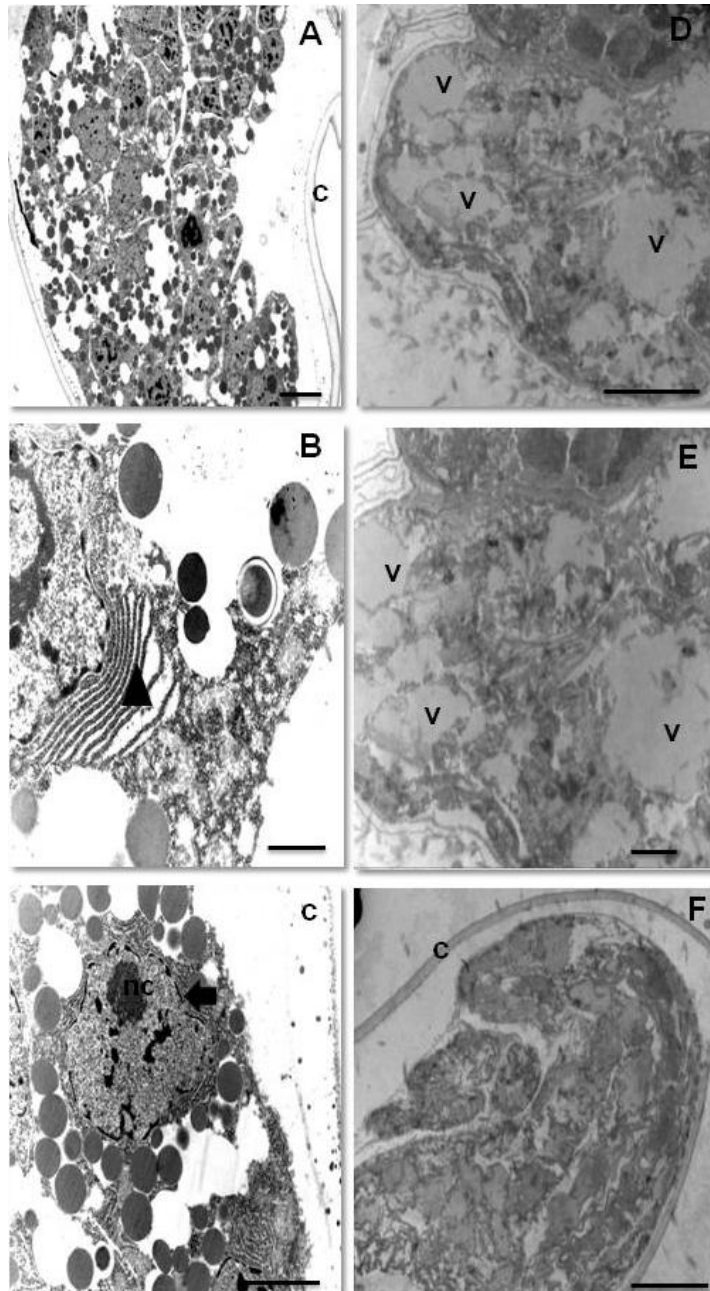


Figura 20. Análise ultraestrutural de ovos de nematoide tratados com a fração metanólica FCCM9 de *C. citratus*. Foram visualizadas alterações na estrutura interna dos ovos, após 48h de incubação com 1000µg/mL da fração FCCM9 (D, E e F). Controle negativo em DMSO 3% (A, B e C) ovos sem alterações superficiais apresentando casca (c), nucléolo (nc) núcleo (seta larga) e retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta). Foi observado um desarranjo na estrutura interna dos ovos e intensa presença de vacúolos (v). Aumento: 3000x (A e D); 2000x (B); 7000x (E); 4400x (F); 12000 (C). Barra de escala: 2µm e 5µm.

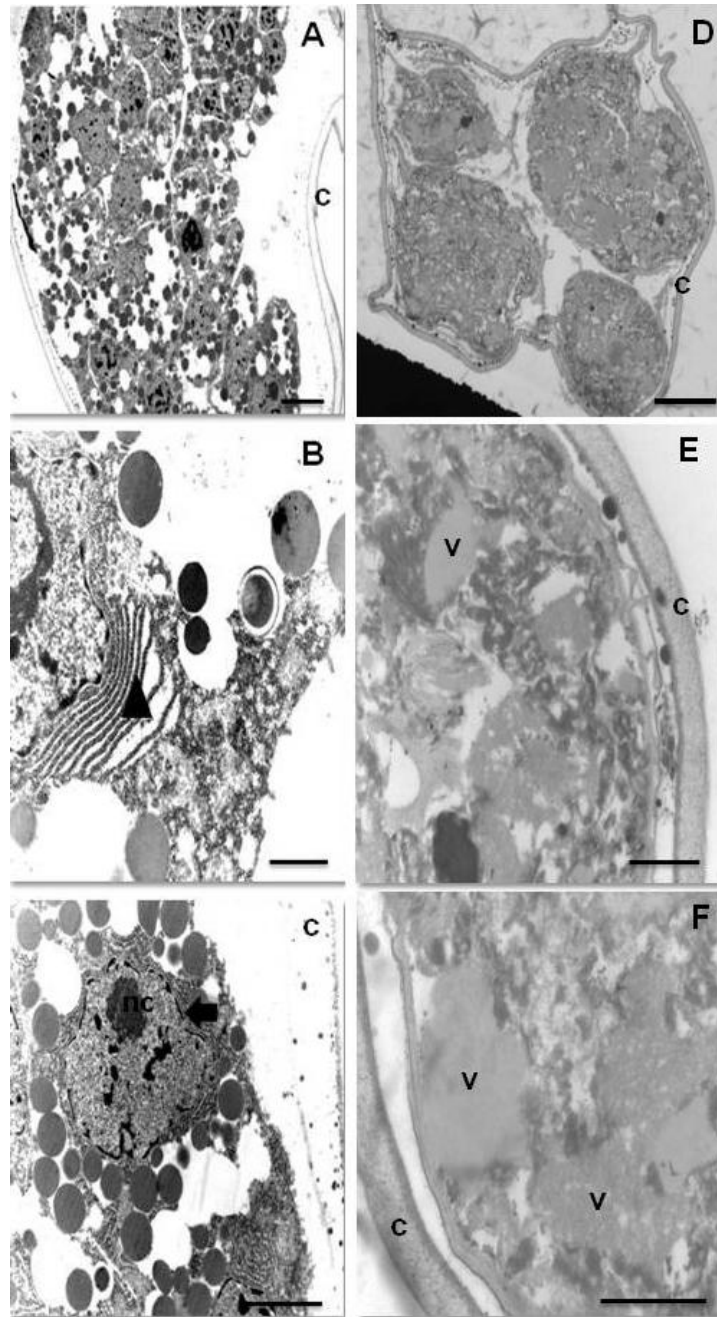


Figura 21. Análise ultraestrutural de ovos de nematoide tratados com a fração metanólica FCCM10 de *C. citratus*. Foram visualizadas alterações na estrutura interna dos ovos, após 48h de incubação com 1000µg/mL da fração FCCM9 (D, E e F). Controle negativo em DMSO 3% (A, B e C) ovos sem alterações superficiais apresentando casca (c), nucléolo (nc) núcleo (seta larga) e retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta). Foi observado um desarranjo na estrutura interna dos ovos e intensa presença de vacúolos (v). Aumento: 3000x (A e D); 2000x (B e E); 12000 (C e F). Barra de escala: 2µm e 5µm.

A análise ultraestrutural de L₃ apresentou cutícula, hipoderme, camada muscular, núcleo, nucléolo e ainda perfis mitocondriais com cristas mitocondriais (Figura 22, 23 e 24 A, B e C). No entanto, após incubadas com extrato bruto de *C. citratus* e *A. sativum*, estas apresentaram alterações em sua cutícula, dissociação da hipoderme e camada muscular e ainda a presença de diversos vacúolos. Alteração das cristas mitocondriais e desintegração de nucléolo também foram observadas (Figura 22, 23 e 24 D, E e F).

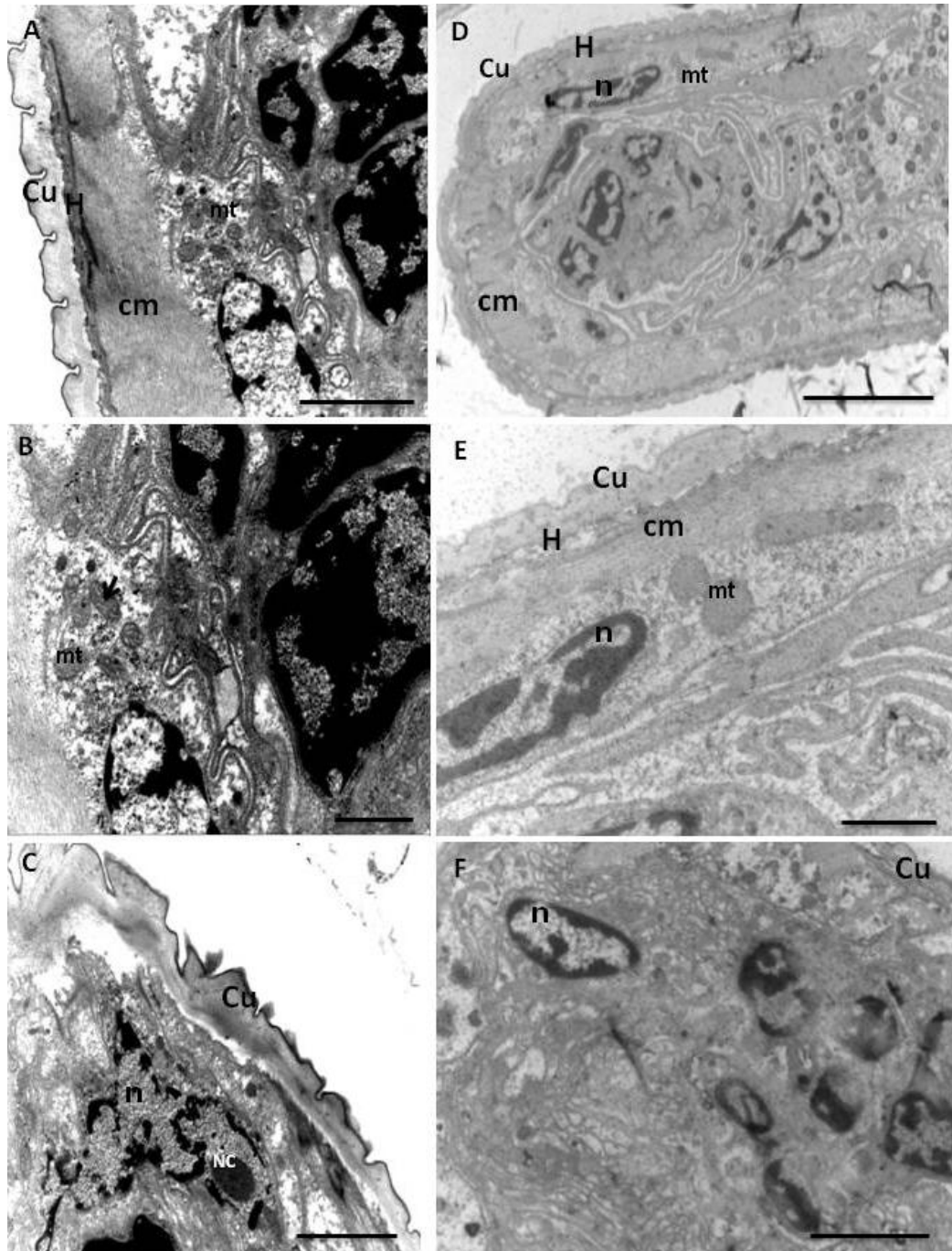


Figura 22. Análise ultraestrutural de L₃ tratadas com o extrato metanólico de *C. citratus*. Controle (A, B e C), foi possível observar cutícula (cu), hipoderme (H), músculo contráctil (cm) mitocondriais (mt), perfis mitocondriais (seta fina), núcleo (n), nucléolo (nc); as larvas foram incubadas com 25mg/mL do extrato bruto metanólico de *C. citratus* por 48h à 27°C. Alterações em perfis mitocondriais, nucléolo, separação da cutícula, hipoderme e camada muscular. Aumento: 12000x (A, C e F); 20000x (B e E); 4400x (D). Barra de escala: 1µm, 2µm e 5µm.

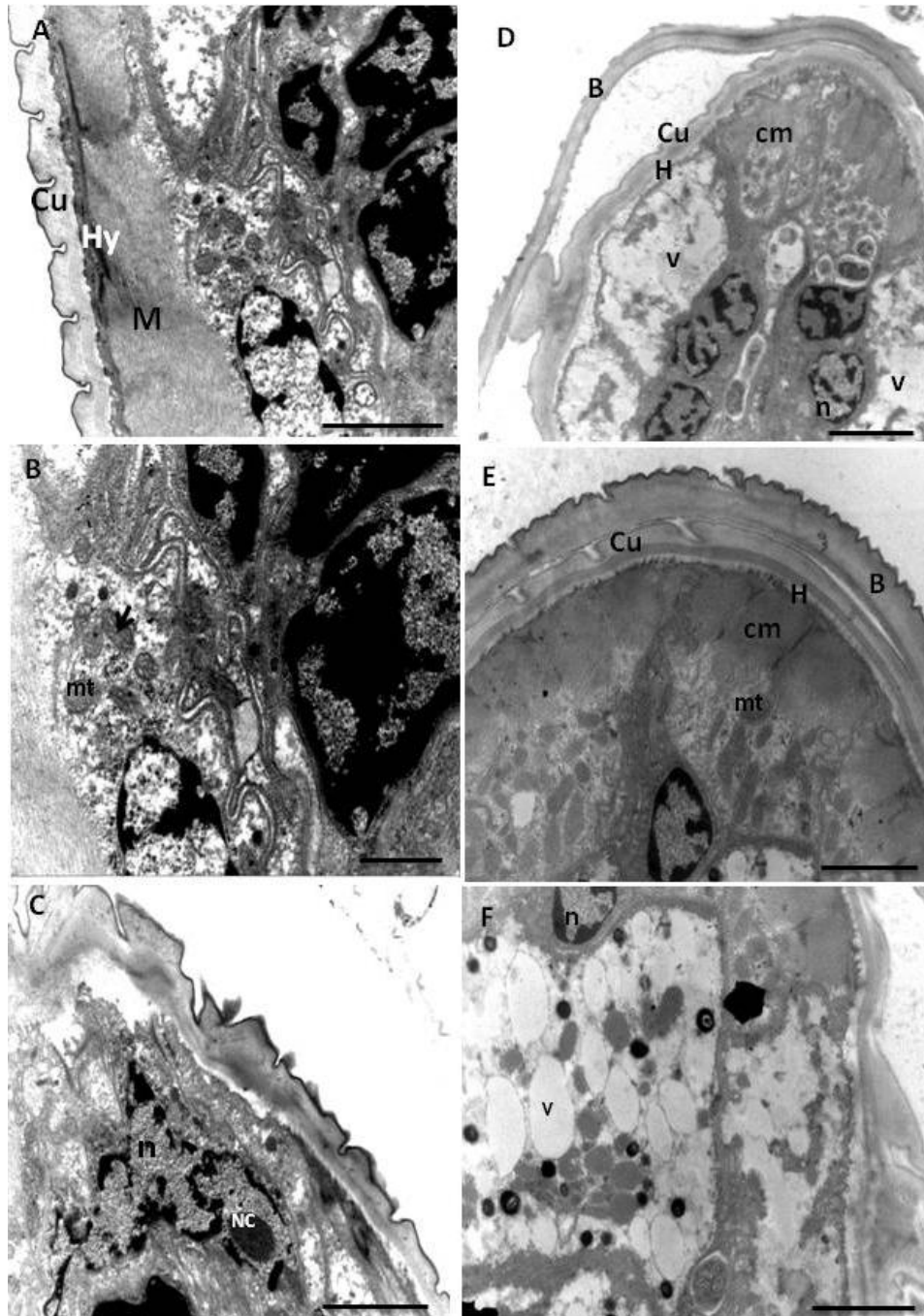


Figura 23. Análise ultraestrutural de L₃ tratadas com o extrato liofilizado de *C. citratus*. Controle (A, B e C), foi possível observar cutícula (cu), hipoderme (H), músculo contráctil (cm) mitocondriais (mt), perfis mitocondriais (seta fina), núcleo (n), nucléolo (nc); as larvas foram incubadas com 25mg/mL do extrato bruto metanólico de *C. citratus* por 48h à 27°C. Alterações em perfis bainha (B), mitocondriais, nucléolo, separação da cutícula, hipoderme e camada muscular. Aumento: 12000x (A, C e E); 20000x (B, Fe D). Barra de escala: 1µm, 2µm e 5µm.

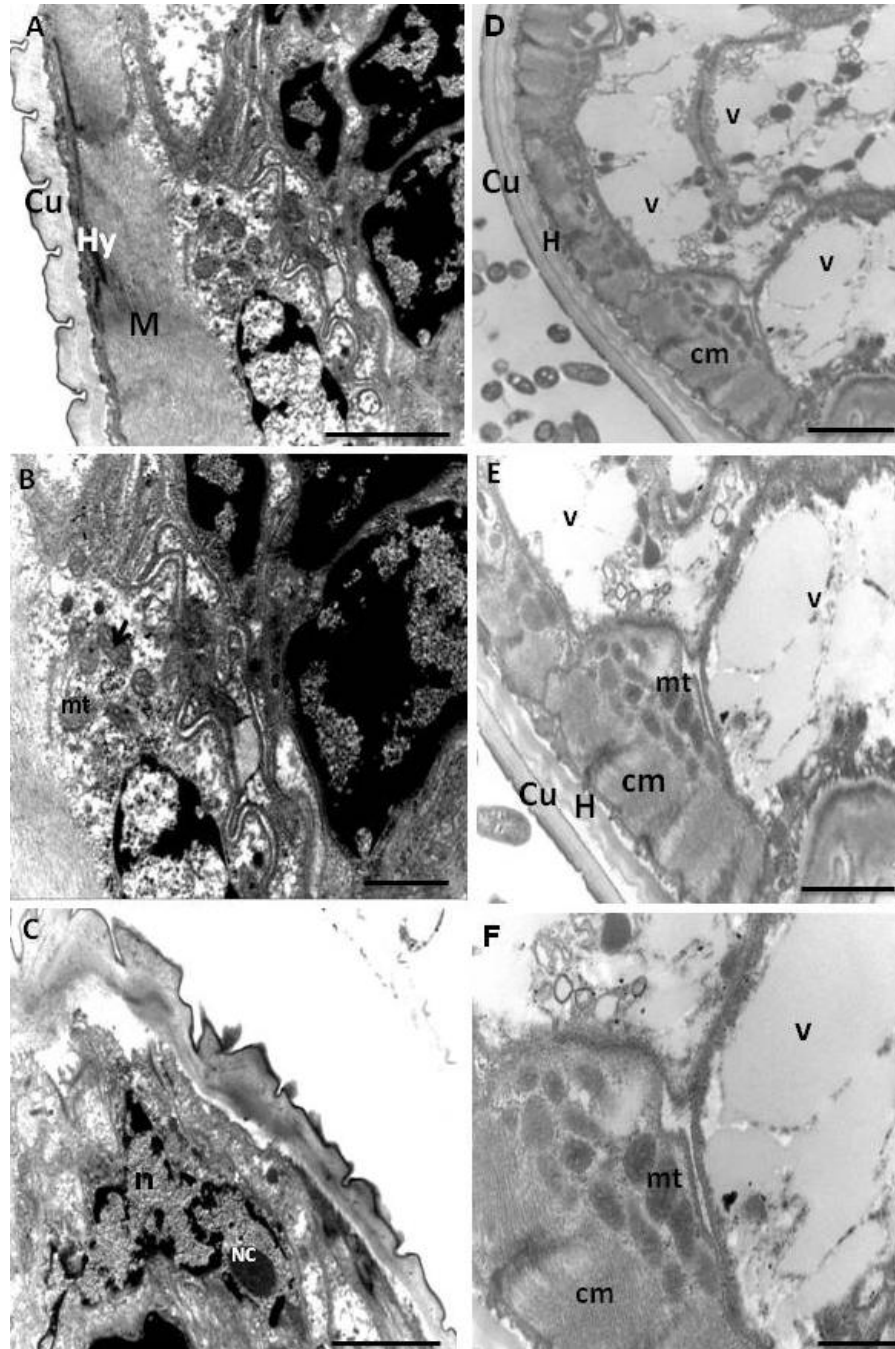


Figura 24. Análise ultraestrutural de L₃ tratadas com o extrato aquoso de *A. sativum*. Controle (A, B e C), foi possível observar cutícula (cu), hipoderme (H), músculo contráctil (cm) mitocondriais (mt), perfis mitocondriais (seta fina), núcleo (n), nucléolo (nc); as larvas foram incubadas com 25mg/mL do extrato bruto aquoso de *A. sativum* por 48h à 27°C. Alterações em bainha (B), perfis mitocondriais, nucléolo, separação da cutícula, hipoderme e camada muscular. Aumento: 12000x (A, C e E); 20000x (B e F); 7000 (D). Barra de escala: 1µm, 2µm e 5µm.

Após 48h de incubação, foi possível demonstrar a presença de corpos lipídicos, somente para as larvas tratadas com extrato bruto de *A. sativum* (Figura 25 C, D), para as L3 tratadas com extrato bruto de *C. citratus* foi confirmada somente a presença de vacúolos (Figura 25 E, F).

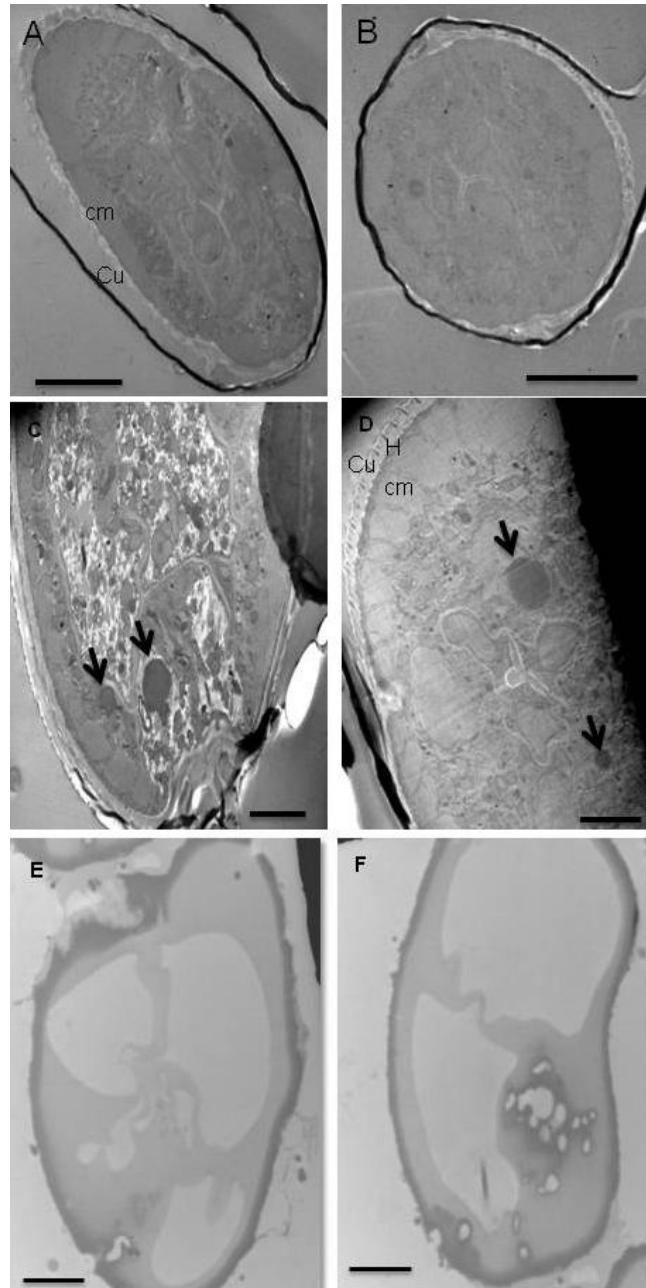


Figura 25. Visualização de corpos lipídicos em L₃ incubadas com extrato de *C. citratus* e *A. sativum*. Larvas infectantes tratadas com 25mg/mL de extrato metanólico de *C. citratus* e marcadas pelo método Ósmio/Imidazol para demonstrar a presença de corpos lipídicos. As L₃ foram incubadas por 48h à 27°C. Foi feita a fixação de rotina para MET, porém não encontrada a presença de corpos lipídicos. Foram visualizadas cutícula (Cu), músculo contráctil (cm), hipoderme (H) e corpos lipídicos (seta). Aumento: A, B: 3000; C, D, E, F: 7000x. Barra de escala: 2µm e 5µm.

5.4. Ensaio de toxicidade dos extratos brutos botânicos e frações metanólicas de *C. citratus*.

Para ambos os extratos aquosos *C. citratus* e *A. sativum*, os camundongos não apresentaram diferença na pesagem quando comparados com os controles. Porém, após a administração das maiores doses de FCCM10, 100 e 40µg/mL/kg, quando comparadas ao controle houve uma diferença no ganho de peso corporal dos camundongos, porém não houve diferença significativa. (Figura 26)

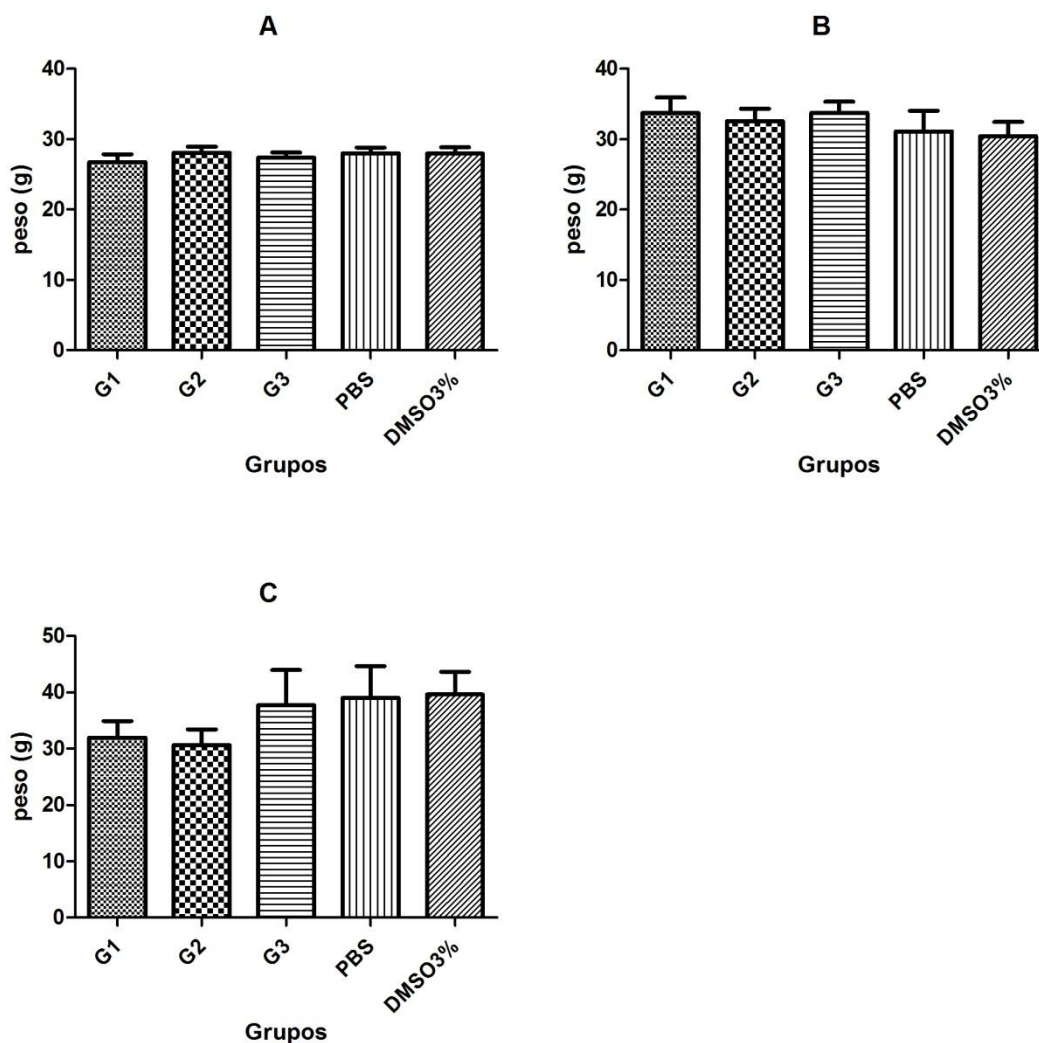


Figura 26. Análise do peso corporal dos camundongos. Para o ensaio de toxicidade, após a administração das doses, os camundongos foram pesados a cada três dias. (A) Extrato aquoso de *C. citratus*; (B) Extrato Aquoso de *A. sativum*; (C) Fração metanólica de *C. citratus* FCCM10. Grupos tratados G1, G2 e G3 para ambos extratos aquosos foram usados as doses de 20, 10 e 5mg/mL/Kg; para a fração FCCM10 as doses usadas foram 100, 40 e 25µg/mL/Kg. Para todos os ensaios o controle negativo foi obtido com PBS e DMSO3%. O volume final administrado para todos os camundongos foi de 1mL e o peso dos camundongos foi apresentado em gramas (g). Foram usados camundongos de 8-12 semanas para todos os ensaios, sendo todas fêmeas.

O consumo de água e comida não se mostrou alterado em nenhum dos grupos durante todo o período de tratamento (Figura 27).

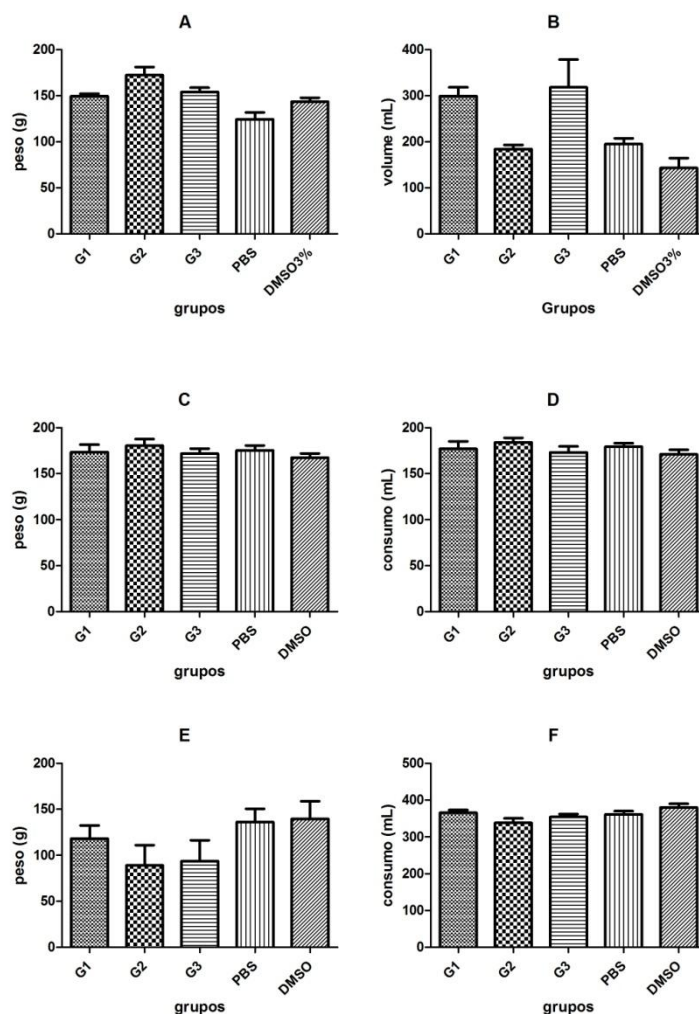


Figura 27. Avaliação do consumo de água e comida durante o ensaio de toxicidade. (A, B) Ensaio de Toxicidade aguda com fração metanólica de *C. citratus* FCCM10, foram testadas as concentrações 100, 40 e 25µg/mL, o consumo de comida e água foram mensurados respectivamente; (C, D) Extrato aquoso de *C. citratus*, consumo de comida e água demonstradas respectivamente; (E, F) Extrato aquoso de *A. sativum*, consumo de comida e água demonstrados respectivamente. Para ambos os extratos aquosos foram usadas as concentrações de 20, 10 e 5mg/mL. Para todos os ensaios as medidas foram realizadas a cada três dias após administração da dosagem oral do medicamento, e os camundongos acompanhados por 15 dias após administração da mesma.

Durante o ensaio de toxicidade, no quarto dia de experimento, um único animal, após o tratado com a dose de 100µg/mL/Kg da fração FCCM10, apresentou sinais clínicos como piloerção, contrações abdominais, alteração da locomoção, tremores e alteração do tônus muscular, permanecendo em observação. Após sexto dia, o mesmo foi sacrificado em câmara de CO₂, e a coleta do sangue e órgãos para análise histológica foi realizada. A análise macroscópica dos órgãos coletados demonstrou alterações como rim com coloração icterica e pulmão com grave hemorragia (Figura 28).

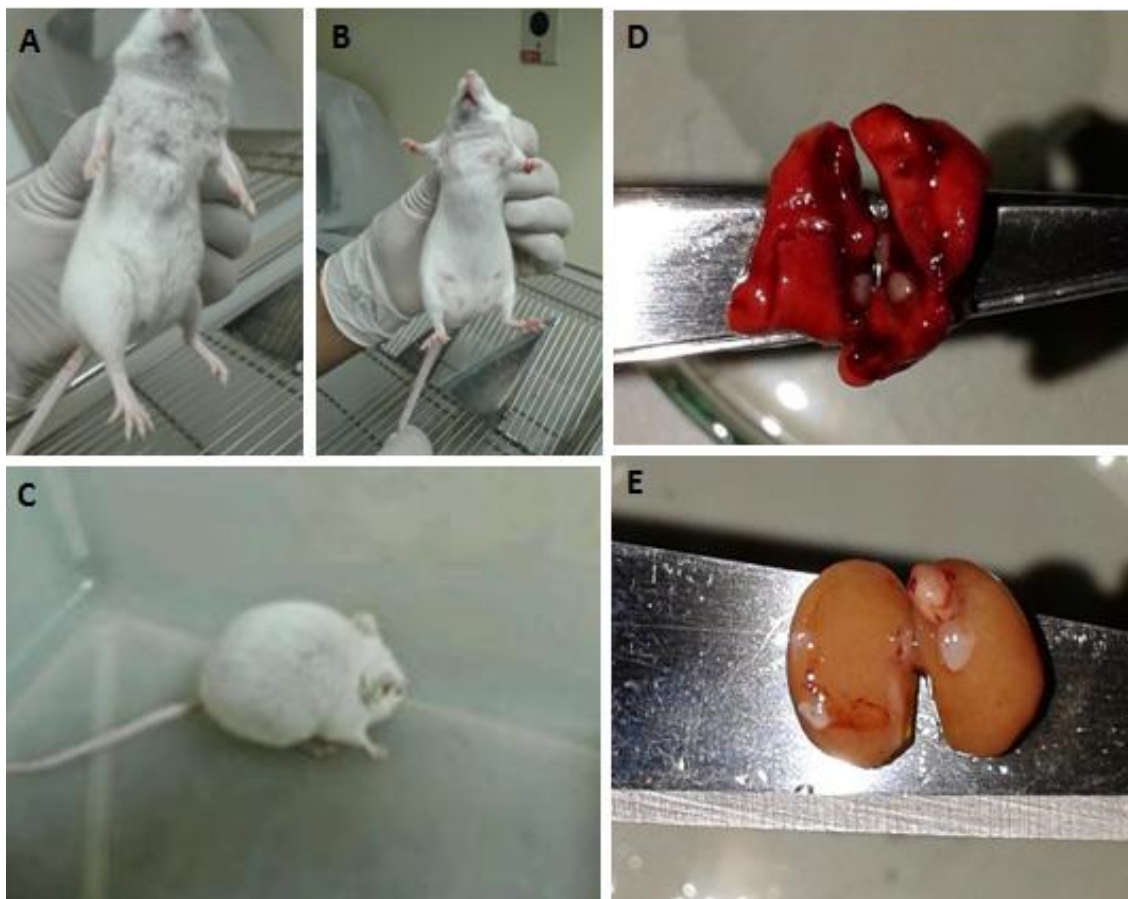


Figura 28. Sinais clínicos desenvolvidos durante o ensaio de toxicidade aguda.

Os sinais clínicos foram demonstrados durante o ensaio de toxicidade da aguda e após a administração da dose de $100\mu\text{g/mL/Kg}$ da fração metanólica de *C. citratus*. (A, B) alterações do tônus muscular; (C) Animal apresentando contração abdominal. Lesões macroscópicas foram observadas em alguns órgãos durante o processo de necropsia, pode ser observada então a presença de (D) Pulmão com grave hemorragia e (E) Rim com coloração ictérica.

A avaliação histopatológica demonstrou um edema leve no encéfalo, o intestino delgado com enterite focal, cerosite estomacal, processo congestivo hemorrágico no pulmão. O fígado apresentou degeneração hidrópica leve, necrose multifocal, congestão vascular e megalócitos; enquanto que os rins demonstraram inúmeros cistos de retenção proteica, glomérulo em necrose, nefrite intersticial crônica multifocal caracterizando insuficiência renal. As alterações citadas foram

demonstradas somente para o camundongo tratado com maior dosagem para a fração metanólica de *C. citratus* FCCM10, o qual apresentou os sinais clínicos (Figura 29).

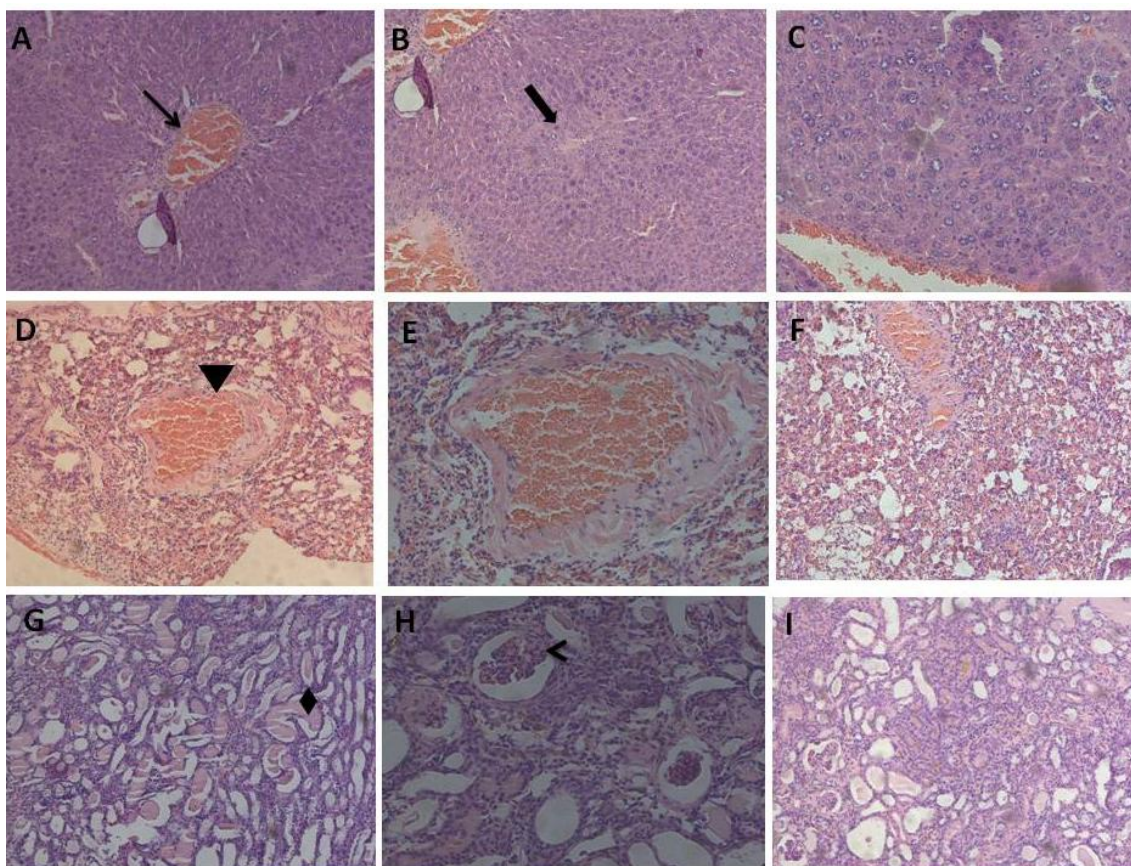


Figura 29. Análise Histopatológica dos órgãos coletados após administração da dose 100µg/mL/Kg da fração metanólica FCCM10 de *C. citratus*. A - Fígado apresentando congestão vascular (seta); B - necrose multifocal (seta larga); C - degeneração hidrópica leve e megalócitos; D, E, F - Pulmão com processo congestivo hemorrágico (cabeça de seta larga); G - Rim apresentando inúmeros cistos de retenção proteica (losango); H - glomérulo em necrose (cabeça de seta fina); i - nefrite intersticial crônica multifocal.

Para os extratos aquosos de *C. citratus* e *A. sativum* não foram visualizados presença de sinais clínicos nos animais durante os 15 dias, após administração das doses. Durante as análises histopatológicas não foram demonstrados alterações macroscópica e microscópica durante e após a coleta dos órgãos citados, para nenhuma das doses testadas.

6. Discussão

A busca por novos medicamentos para o combate as nematodioses ovinas tem se intensificado nas ultimas décadas diante o crescimento da resistência anti-helmíntica. Neste contexto, o uso de produtos alternativos que auxiliem neste controle ou até mesmo nas formulações de novos medicamentos, tem se tornado cada vez mais intensa. Deste modo, devido o grande número de moléculas, as plantas medicinais ganham cada vez mais destaque no controle de nematoides gastrintestinais.

A atividade larvicida e ovicida foi demonstrada para os extratos de *A. sativum* e *C. citratus* e frações metanólicas de *C. citratus*. Para *C. citratus* a atividade larvicida e ovicida foi demonstrada ($p < 0,0001$). Ambos os extratos de *A. sativum* apresentaram atividade sobre L₃, porém o extrato metanólico demonstrou maior atividade (93%). A atividade ovicida das frações metanólicas de *C. citratus* foram comprovadas para FCCM9 (99,9%) e FCCM10 (97%).

A atividade *in vitro* de *C. citratus* foi confirmada por Macedo et al., (2015), para eclosão e desenvolvimento de larvas de *H. contortus* após a incubação com decocção e óleo essencial desta planta. Em ensaios *in vitro* Katiki et al., (2011) demonstraram a atividade do óleo essencial *C. martinii*, *C. shoenanthus* e *Mentha piperita*, sobre diferentes estágios de vida de nematoides Trichostrongylideos. A atividade larvicida de 68% foi comprovada por Palacios-Landin et al., (2015), para o extrato hexânico de *A. sativum* sobre *H. contortus*.

Em estudos com diferentes espécies botânicas Ahmed et al., (2013) comprovaram a atividade do extrato etanólico de *A. sativum* (68-84%) sobre L₃ de *H. contortus*. Após obtenção do extrato aquoso de *Mangifera indica* Nery et al. (2012) apresentaram sua atividade 100% para o desenvolvimento larval. O extrato aquoso de *Ocimum sanctum* apresentou atividade de 100% para inibição da eclosão larval em estudos realizados por Kanojiya et al. (2015). Os diferentes ensaios com plantas medicinais permitem confirmar sua eficácia e seu possível uso no controle da nematodiose ovina.

Através do ensaio de LC₅₀ foi possível avaliar a menor concentração necessária para inibir a eclosão larval. Sendo demonstrado o potencial terapêutico destas frações após cada ensaio. Quando analisadas a fração FCCM9 (10µg/mL) apresentou maior atividade quando comparado a FCCM10 (40µg/mL), visto que a concentração letal observada foi menor. Diferentes ensaios com extratos alcoólicos de *Combretum molle*, Ademola e Ellof (2010), demonstraram a curva de LC₅₀ para eclosão larval (0.866 – 0.065mg/mL) e desenvolvimento larval (0.604 – 0.131mg/mL) para larvas de *H. contortus*. Com base no ED₅₀, Eguale e Giday (2010), demonstraram que os extratos hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* (0,09mg/mL) e aquoso de *Jatropha curcas* (0,1mg/mL), foram os mais promissores para inibir 50% da eclosão larval.

Baixas concentrações dos extratos aquosos de *Senna occidentalis*, *Rumex abyssinicus* e *Albizia schimperiana*, segundo Eguale et al., (2011) inibiram 50% da eclosão larval. Estudos com *Eucalyptus globulus* foram demonstrados por Kanojiya et al. (2015), onde ambos os extratos aquosos (ED₅₀ = 1,502mg/mL) e metanólico (ED₅₀ = 3,756mg/mL) reduziram a eclosão larval. Extratos aquoso e metanólico de *Ocimum sanctum* foram utilizados para ensaios contra nematoides gastrointestinal por Kanojiya et al., (2015) sendo o EC₅₀ avaliado para paralisia larval (16,486mg/mL e 12,982mg/mL), eclosão larval (5,827mg/mL e 6,218mg/mL) e desenvolvimento larval (7,746mg/mL e 12,179mg/mL), respectivamente. Através do ensaio de LC₅₀ foi possível conhecer a concentração efetiva para mortalidade de 50% de larvas e ovos de nematoide, destacando a fração FCCM9 como a mais efetiva para atividade ovicida.

O estudo morfológico e ultraestrutural dos nematoides é bastante conhecido. No entanto, poucos trabalhos demonstram a ocorrência de deformações na morfologia e ultraestrutura destes organismos na presença de medicamentos e em especial, plantas medicinais. Mudanças na morfologia e ultraestrutura de L₃ e ovos de nematoides gastrintestinais foram observados após tratadas com extratos brutos de *C. citratus*, *A. sativum* e frações metanólicas de *C. citratus*. Flacidez da cutícula e ainda alterações hipoderme, cristas mitocondriais, núcleo e nucléolo e presença de

vacúolos foram visualizadas para L₃, bem como presença de poros e vacúolos e alterações nucleares foram percebidas para ovos dos nematoides.

O extrato de *Onobrychis viciifolia* levou a alterações das fibras musculares, surgimento de citoplasma e vesículas elétron-densas, lesões na hipoderme, desorganização nuclear, segundo Brunet et al. (2011) em L₃ de *H. contortus* e *T. columbriformis*. De acordo com Cruz-Reyes et al (2012), alterações ultraestruturais em regiões do esôfago, muscular e glandular e ainda redução do número de mitocôndrias e presença de vacúolos autofágicos foram observadas após 96h de incubação com Albendazol e sulfóxido de albendazol para L₃ de *Gnathostoma binucleatum*.

A presença de um intenso número de vacúolos e desorganização interna foram observados por Dasgupta et al. (2010), para helminto *Raillietina echinobothrida*, após tratadas com 10mg/mL do extrato bruto alcoólico e fração acetona de *Acacia oxyphyla*. Estudos realizados por Santana et al. (2013) comprovaram o surgimento de alterações na morfologia de ovos e larvas de *C. elegans* apresentando aparência granular, bem como na ultraestrutura como desorganização corporal, hipodérmica, região não contráctil do músculo, vacúolos com elementos internos e autofágicos, após tratados com 25µM. O estudo das alterações sobre a morfologia e ultraestrutura de nematoides tratados com diferentes extratos de plantas medicinais, permite o possível conhecimento dos diferentes mecanismos de ação de moléculas presentes nos extratos.

Corpos lipídicos ou gotículas lipídicas são estruturas esféricas, presentes em todos os organismos, desde bactérias a mamíferos, com maior evidencia em células de condições inflamatórias, neoplásicas e infecciosas. A presença de corpos lipídicos foi demonstrada para nematoides tratados com extrato metanólico de *A. sativum* na concentração de 25mg/mL. A presença de corpos lipídicos foi observada por Robenek et al., (2005) em macrófagos e adipocitos com o auxílio de MET e criofratura. Posteriormente, Robenek et al., (2006), verificaram o a presença destas estruturas sob a membrana do retículo endoplasmático através de técnicas de criofratura aplicadas em macrófagos. Estudos realizados por Mota et al., (2014), correlacionaram a indução do aumento do número destas organelas em macrófagos

na presença de *Toxoplasma gondii*. Neste contexto, Gomes et al., (2014) demonstrou a localização de corpos lipídicos próximo ao vacúolo parasitóforo de *T. gondii*, em macrófagos infectados, correlacionando estas organelas como um mecanismo de sobrevivência deste parasito. Assim, acredita-se que presença destas organelas em nematoides pode estar relacionada à manutenção da sobrevivência destes organismos, após expostos a situações de estresse.

A presença de substâncias tóxicas em plantas medicinais é pouco descrita. No entanto, o uso populacional de chás e outros preparos botânicos, torna necessário o estudo da toxicidade vegetal sobre um determinado organismo. Os estudos *in vivo* permitem avaliar os efeitos tóxicos reais de plantas medicinais. Os extratos brutos aquosos obtidos de *C. citratus* e *A. sativum* não demonstraram toxicidade para nenhuma das doses avaliadas durante o ensaio *in vivo*. No entanto, durante o ensaio com a fração FCCM10, foi observada uma interferência no ganho de peso corporal para os grupos com dosagens 100 e 40µg/mL/Kg, sinais clínicos e alterações macroscópicas e microscópicas foram visualizadas sobre órgãos dos camundongos. A toxicidade aguda do extrato etanólico de *Lawsonia inermis* foi avaliada por Gull et al. (2013) sobre camundongos e após duas semanas não foram observadas características toxicológicas e índice mortalidade entre os animais. A toxicidade aguda e subaguda do óleo essencial de *Azadirachta indica* foi demonstrada por Deng et al., (2013) em animais expostos a dose de 1600mg/Kg/dia, sendo rim, fígado e testículos os órgãos alvos. Em contrapartida, Malebo et al. (2015), após avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico de *Maytenus senegalensis* não observaram sinais de toxicidade para a dose de 1600mg/kg sugerindo que doses letais para este extrato estão acima deste valor para camundongos. Efeitos tóxicos dermatológicos não foram observados por Teshome et al., (2008) em ratos tratados com extrato metanólico de *Plumbago zeylanica*, porém aumento do peso corporal, aumento dos testículos ($p < 0,05$) e concentrações de uréia e potássio ($p < 0,05$), foram levados em consideração em doses mais elevadas de 1000mg/Kg. O estudo toxicológico de plantas medicinais, habitualmente usadas pela população, torna possível o conhecimento do uso seguro destas espécies botânicas.

7. Conclusão

Ambos os extratos, *A. sativum* e *C. citratus* demonstraram atividade nematicida, porém *C. citratus* apresentou maior espectro de ação. A fração obtida do extrato metanólico de *C. citratus* FCCM9 apresentou menor concentração terapêutica para inibir a eclosão larval, sendo assim mais eficaz. As alterações morfo-ultraestruturais observadas em L₃ e ovos incubados com extratos e frações, comprovam os diferentes mecanismos de ação destas plantas. A presença de corpos lipídicos em L₃ tratadas com extrato metanólico de *A. sativum* sugere, sua correlação como fonte energia para sobrevivência destes organismos em situação de estresse.

Através dos ensaios de toxicidade foi possível demonstrar que o nível tóxico para os extratos obtidos destas plantas, estão presentes em concentrações acima de 20mg/mL/Kg. Neste contexto, os ensaios permitem demonstrar que *A. sativum* e *C. citratus* são plantas medicinais com um grande potencial anti-helmíntico podendo no futuro, serem usadas na produção de novos medicamentos eficazes no controle da verminose ovina.

8. Referências Bibliográficas

- Ademola, I. O.; Eloff, J. N.; “In vitro anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae”. **Veterinary Parasitology**. v. 169, p. 198-203, 2010.
- Ahmad, A.; Viljoen, A.; “The *in vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions”. **Phytomedicine**. v. 22, p. 657–665, 2015.
- Ahmed, M.; Laing, M. D.; Nsahlai I. V.; “*In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep”. **Journal of Helminthology**, p. 1-6, 2012.
- Ahmed, M.; Laing, M. D.; Nsahlai, I. V.; “*In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep”. **Journal of Helminthology**. v. 87, p. 174–179, 2013.
- Allison, G. L.; Lowe, G. M.; Rahman, K.; “Aged Garlic Extract and Its Constituents Inhibit Platelet Aggregation Through Multiple Mechanisms”. **The Journal of Nutrition**. v. 136, p. 782S-788S, 2006.
- Amarante, A. F. T.; Sales, R. de O.; “Controle de Endoparasitoses dos Ovinos: Uma Revisão 1”. **Revista Brasileira Higiene e Sanidade Animal**. v. 01, p. 14 – 36, 2007.
- Amarante, A. F. T.; Amarante, M. R. V.; “Breeding Sheep for Resistance to Nematode Infections”. **Journal of Animal and Veterinary Advances** 2. v. 3, p. 147-161, 2003.
- Amarante, A. F. T.; “Resistência Genética a helmintos Gastrintestinais”. In: V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. Pirassununga, SP, 2004.
- Anya, A. O.; “The structure and chemical composition of the nematode cuticle. Observations on some oxyurids and Ascaris”. **Parasitology**. v. 56, p. 179-198, 1966.

Bachaya, H. A.; Iqbal, Z.; Khan, M. N.; Sindhu, Z. D.; Jabbar, A.; “Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against Trichostrongylid nematodes of sheep”. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 123, p. 325–329, 2009.

Balunas, M. J., Kinghorn, A. D., “Minireview: Drug discovery from medicinal plants”. **Life Science**. v. 78, p. 431-441, 2005.

Barger, I.; “Control by management”. **Veterinary Parasitology**. v. 72, p. 493-506, 1997.

Barros, J. A. C.; “Estratégias Mercadológicas da Indústria Farmacêutica e o Consumo de Medicamentos”. *Revista Saúde Pública, São Paulo*. v. 17, p. 377-386, 1983.

Bassetto, C. C.; Picharillo, M. E.; Newlands, G. F. J.; Smith, W. D.; Fernandes, S.; Siqueira, E. R.; Amarante, A. F. T.; “Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection with *Haemonchus contortus* in a tropical environment”. **International Journal for Parasitology**. v. 44, p. 1049–1054, 2014.

Bartram, D. J., Leathwick, D. M., M. A., Geurden, T., Maeder, S. J., “Review: The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes”. **Veterinary Parasitology**. v. 186, p. 151–158, 2012.

Bednarczuk, V. O.; Verdam, M. C. S.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G.; “Testes *in vitro* e *in vivo* Utilizados na Triagem Toxicológica de Produtos naturais”. **Visão Acadêmica**. v. 11, p. 43-49, 2010.

Benavides, M. V., “Marcadores moleculares para resistência”. In: Cavalcante, A.C.R., Vieira, L.S. Chagas, A. C. S. & Molento, M. B. (Eds.). *Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, p.505-546, 2009.

Bowman, D. D.; Georgi, J. R.; Lynn, R. C.; “Georgi's Parasitology for Veterinarians”. 8 edição, **Saunders Publishing Compan**, p. 422, 2003.

BRASIL; “Ministério da Saúde. Política nacional de medicina natural e práticas complementares-PMNPC”. **Brasília, DF**, 2005.

Brito, A. R. M. S.; Brito, A. A. S.; “Forty years of Brazilian medicinal plant research”. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p. 53-67, 1993.

Brunet, S.; Fourquaux, I.; Hoste, H.; “Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. **Parasitology International**. v. 60, p. 419–424, 2011.

Cardia, D. F. F.; Rocha-Oliveira, R. A.; Tsunemi, M. H.; Amarante, A. F. T.; “Immune response and performance of growing Santa Inês lambs to artificial *Trichostrongylus colubriformis* infections”. **Veterinary Parasitology**. v. 182, p. 248-258, 2011.

Charles, T. P. “Verminoses dos bovinos de leite”. In: Charles, T.P. & Furlong, J. (Eds.). Doenças parasitárias dos bovinos de leite. EMBRAPA, CNPGL, Coronel Pacheco, Brasil. p. 55-110, 1992.

Corbani, R. Z.; Mazzonetto, F.. “Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies vegetais no manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em ambiente protegido”. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 5, p. 61-66, 2013.

Costa, C. A. F.; Vieira, L. da S.; “Controle de Nematodeos Gastrintestinais de Caprinos e Ovinos no Estado do Ceará”. **Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos**. v. 13, p. 6, 1984.

Craveiro, A. A., Fernandes, A. G., Andrade, C. H. S., Matos, F. J. A., Alencar, J. W., Machado, M. I. L., “Óleos essenciais de Plantas do Nordeste”. Fortaleza: **editora UFC**, 1981.

Cruz- Reyes, A.; Ortega-Corona, B. G.; Zepeda-Rodríguez, A.; Pérez-Torres, A.; “Ultrastructural changes in the advanced third larval stage of *Gnathostoma*

binucleatum Almeyda-Artigas, 1991 (Nematoda: Spirurida) following albendazole and albendazole sulfoxide *in vitro* exposure”. **Parasitology Research**. v. 110, p.557–563, 2012.

Cruz, D. G. da, Rocha, L. O da, Arruda, S. S., Palieraqui, J. G. B., Cordeiro, R. C., Junior, E. S., Molento, M. B., Santos, C. de P., “Short Communication: Anthelmintic efficacy and management practices in sheep farms from the state of Rio de Janeiro, Brazil”. **Veterinary Parasitology**. v. 170, p. 340-343, 2010.

Cruz, D. G. da, “Determinação da Atividade de Protease e Fosfatases ácidas durante a interação do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* com as Larvas infectantes de nematóides Trichostrongilídeos e nematóide de vida livre *Panagrellus* sp”. **Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia)** Universidade Estadual do Norte Fluminense – Brasil, 2011.

Dasgupta, S.;Roy, B.; Tandon, V.; “Ultrastructural alterations of the tegument of *Raillietina echinobothrida* treated with the stem bark of *Acacia oxyphylla* (Leguminosae)”. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, p. 568–571, 2010.

Deng, Yun-xia; Cao, M.; Shi, Dong-xia; Yin, Zhong-qiong; Jia, Ren-yong; Xu, J.; Wang, Ch.; Lv, Ch.; Liang, Xiao-xi; He, Chang-liang; Yang, Zhi-rong; Zhao, J.; “Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: Acute and subacute toxicity”. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 35, p. 240–246, 2013.

Dewick, P. M., “Medicinal Natural Products: An Biosynthetic Approach”. **2ª edição**, John Wiley & Sons, LTD, England, 2001.

Drudge, J. H., Szanto, J., Wyant, Z. N., ELAM, G., “Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene and phenothiazine”. **American Journal of Veterinary Research**. v.25, p.1512-1518. 1964.

Duarte, M. C. T.; “Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil”. **Revista Multiciência**, n. 7, 2006.

Eguale, T.; Giday, M.; “*In vitro* anthelmintic activity of three medicinal plants against *Haemonchus contortus*”. **International Journal of Green Pharmacy**, 2010.

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, p. 108-113, 2011.

Elandalousi, R. B.; Akkari, H.; B´chir, F.; Gharbi, M.; Mhadhbi, M.; Awadi, S.; Darghouth, M. A.; “*Thymus capitatus* from Tunisian arid zone: Chemical composition and *in vitro* anthelmintic effects on *Haemonchus contortus*”. **Veterinary Parasitology**, v. 197, p. 374– 378, 2013.

Facchini, P. J., “Plant secondary metabolism: out of the evolutionary abyss”. **Trends in Plant Science**. v. 4, p. 382-384, 1999.

Fawzi, E. M.; González-Sánchez, M. E.; Corral, M. J.; Cuquerella, M.; Alunda, J. M.; “Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths”. **International Journal for Parasitology**. v. 44, p. 429– 436, 2014.

Firmo, W. da C. A.; Menezes, V. de J. M. de; Passos, C. E. de C.; Dias, C. N.; Alves, L. P. L.; Dias, I. C. L.; Neto, M. S.; Olea, R. S. G.; “Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica Sobre Plantas Medicinais”. **Caderno Pesquisa**. São Luís, v. 18, 2011.

Fioravanti, C.; “A Maior Diversidade de Plantas do Mundo”. *Ciência Ecologia. Pesquisa FAPESP*. p. 43-47, 2006. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2016/03/21/a-maior-diversidade-de-plantas-do-mundo/> - Acessado em 27/06/2016

Gadelha, C. A. G.; “O complexo industrial da saúde e a necessidade de um enfoque dinâmico na economia da saúde”. **Ciência e Saúde Coletiva**. v. 8, p. 521-535, 2003.

Gamboa-Leon, R.; Vera-Ku, M.; Peraza-Sanchez, S. R.; Ku-Chulim, C.; Horta-Baas, A.; Rosado-Vallado, M.; “Antileishmanial activity of a mixture of *Tridax procumbens* and *Allium sativum* in mice”. **Parasite**. v. 21, p. 15, 2014.

Gilleard, J. S., Beech, R. N., “Population genetics of anthelmintic resistance in parasitic nematodes”. **Parasitology**. v. 134, p. 1133–1147, 2007.

Giulietti, A. M.; Harley, R. M.; Queiroz, L. P. de; Wandreley, M. das G. L.; Berg, C. V. D.; “Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil”. **Megadiversidade**. v. 1 p. 52-61, 2005.

Gomes, A. F.; Magalhães, K. G.; Rodrigues, R. M.; Carvalho, L. de; Molinaro, R.; Bozza, P. T.; Barbosa, H. S.; “*Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN-g and PGE2”. **Parasites & Vectors**. v.7, p. 47, 2014.

Harris, J. C.; Cottrell, S. L.; Plummer, S.; Lloyd, D.; “Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic)”. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 57, p. 282-286, 2001.

Harvey, A. L., “Natural products in drug discovery”. **Drug Discovery Today**. v. 13, p. 19-20, 2008.

Hein, W. R.; Harrison, G. B. L., “Vaccines against veterinary helminthes”. **Veterinary Parasitology**. v. 132, p. 217-222, 2005.

Helfand, W. H.; Cowen, D. L.; “Pharmacy Illustrated History”. **New York: Harry N. Abrams**, 1990.

Hördegen, P.; Hertzberg, H.; Heilmann, J.; Langhans, W.; Maurer, V.; “The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs”. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 51–60, 2003.

Holmes, P. H.; “Pathogenesis of Trichostrongylosis”. **Veterinary Parasitology**. v.18, p.89-101, 1985.

Hussain, A.; Khan, M. N.; Iqbal, Z.; Sajid, M. S.; Khan, M. K.; “Anthelmintic activity of *Trianthema portulacastrum* L. e *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep”. **Veterinary Parasitology**, v. 179, p. 92- 99, 2011.

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2014, Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf

Acessado em Janeiro de 2014.

Iqbal, Z.; Nadeem, Q. K.; Khan, M. N.; Akhtar, M. S.; Waraich, F. N.; “*In Vitro* Anthelmintic Activity of *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Curcubita mexicana* and *Ficus religiosa*”. International Journal of Agricultura e Biology. v. 3, p.1560–8530, 2001.

Junior, V. F. V.; Pinto A. C.; “Plantas Medicinais: Cura Segura?”; **Química Nova**. v. 28, p. 519-528, 2005.

Kaminsky,R., Gauvry,N., Schorderet Weber,S., Skripsky,T., Bouvier,J., Wenger, A., Schroeder,F., Desaulles,Y., Hotz,R., Goebel,T., Hosking,B.C., Pautrat,F., Wieland-Berghausen,S., Ducray, P., “Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate”. **Parasitology Research**, v. 103, p. 931–939. 2008.

Kanojiya, D.; Shanker, D.; Sudan, V.; Jaiswal, A. K.; Parashar, R.; “*In vitro* and *in vivo* efficacy of extracts of leaves of *Eucalyptus globulus* on ovine gastrointestinal nematodes”. **Parasitology Research**. v. 114, p. 141-148, 2015.

Kanojiya, D.; Shanker, D.; Sudan, V.; Jaiswal, A. K.; Parashar, R.; “Anthelmintic activity of *Ocimum sanctum* leaf extract against ovine gastrointestinal nematodes in India”. **Research in Veterinary Science**. v. 99, p.165–170, 2015.

Katiki, L. M.; Chagas, A. C. S.; Bizzo, H. R.; Ferreira, J. F. S.; Amarante, A. F. T.; “Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests”. **Veterinary Parasitology**. v. 183, p. 103 – 108, 2011.

Kenyon, F.; Rinaldi, L.; McBean, D.; Pepe, P.; Bosco, A.; Melville, L.; Devin, L.; Mitchell, G.; Ianniello, D.; Charlier, J.; Vercruyse, J.; Cringoli, G.; Levecke, B.; “Pooling sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and *Nematodirus* infection”. **Veterinary Parasitology**. v. 225, p. 53–60, 2016.

Larsen, M. “Biological control of nematode parasites in sheep”. **Journal Animal Science**, n. 84, p. 133-139, 2006.

Ley, P. de; Mark Blaxter. Systematic Position and Phylogeny. In: Taylor & Francis. The Biology of nematodes. Editora: Lee, D. L., Londres, p. 01-29, 2002.

Lima, C. M. B. L.; Freitas, F. I. de S.; Morais, L. C. S. L. de Cavalcanti, M. G. dos S.; Silva, L. F. da; Padilha, R. J. R.; Barbosa, C. G. S.; Santos, F. A. B. dos; Alves, L. C.; Diniz, M. de F. F. M.; “Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to allicin”. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, p. 327-330, 2011.

Lorenzi, H., Matos, F. J. A., “Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas”. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA**, 2002.

Macedo, I. T. F.; Oliveira, L. M. B. de; Ribeiro, W. L. C.; Santos, J. M. L. dos; Silva, K. das C.; Araújo Filho, J. V. de; Camurça-Vasconcelos, A. L. F. Camurça-Vasconcelos; Bevilaqua, C. M. L.; “Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*”. **Brazil Journal Veterinary Parasitology**. v. 24, p. 268 - 275, 2015.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Junior, V. F. V.; “Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares”. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

Malebo, H. M.; Wiketye, V.; Katani, S. J.; Kitufe, N. A.; Nyigo, V. A.; Imeda, C. P.; Ogondiek, J. W.; Sunguruma, R.; Mhame, P. P.; Massaga, J. J.; Mammuya, B.; Senkoro, K. P.; Rumisha, S. F.; Malecela, M. N.; Kitua, A. Y.; “*In vivo* antiplasmodial and toxicological effect of *Maytenus senegalensis* traditionally used in the treatment of malaria in Tanzania”. **Malaria Journal**. v. 14, p. 79, 2015.

Melo, D. O.; Ribeiro, E.; Storpirtis, S.; “A importância e a história dos estudos de utilização de medicamentos”. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, p. 475-485, 2006.

Matos, F. J. A., “Plantas medicinais—Guia de seleção e emprego de plantas medicinais do Nordeste do Brasil”, 3ª ed. **Editora UFC**, Fortaleza, 2007.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); “Manual de Legislação: Programas Nacionais de Saúde Animal do Brasil”. **Secretaria de Defesa Agropecuária**. MAPA/ SDA/ DSA, Brasília, 2009.

Mishra, B. B., Tiwari, V. K., “Mini-review: Natural products: An evolving role in futures drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 46, p. 4769-4807, 2011.

Molento, M. B., “Resistência de helmintos em ovinos e caprinos”. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, p.82-87. 2004.

Mota, M. A., Campos, A. K., Araújo, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, p. 93-100, 2003.

Mota, L. A. M.; Roberto-Neto, J.; Monteiro, V. G.; Lobato, C. S. S.; Oliveira, M. A. de; Cunha, M. da; D’Ávila, H., Seabra, S. H.; Bozza, P. T.; DaMatta, R. A.; “Culture of mouse peritoneal macrophages with mouse serum induces lipid bodies that associate with the parasitophorous vacuole and decrease their microbicidal capacity

against *Toxoplasma gondii*". **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 109, p. 767-774, 2014.

Morgan, E. R.; Coles, G. C.; "Nematode control practices on sheep farms following an information campaign aiming to delay anthelmintic resistance". **Veterinary Record**. v. 166, p. 301-303, 2010.

Negri, B.; "Política Federal de Assistência Farmacêutica: 1990 A 2002". **Ministério da Saúde**, Brasília – DF 2002.

Nery, P. S.; Nogueira, F. A.; Oliveira, N. J. F.; Martins, E. R.; Duarte, E. R.; "Efficacy of extracts of immature mango on ovine gastrointestinal nematodes". **Parasitology Research**, v. 111, p. 2467–2471, 2012.

Neto, G. G; "O Saber Tradicional Pantaneiro: AS Plantas Medicinais e a EducaçãoAmbiental". **Revista Eletrônica Mestrado Educação Ambiental**. ISSN 1517-1256, v.17, 2006

O'Connor, L. J.; Walkden-Brown, S. W.; Kahn, L. P.; "Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep". **Veterinary Parasitology**. v. 142, p. 1-15, 2006.

Okon, E. D.; Enyenihi, U. K.; "Development and Survival of *Haemonchus contortus* Larvae on Pastures in Ibadan". **Tropical Animal Health Production**. v. 9, p. 7 – 10, 1977.

Oliveira, L. M. B.; Bevilaqua, C. M. L.; Costa, C. T. C.; Macedo, I. T. F.; Barros, R. S.; Rodrigues, A. C. M.; Camurça-Vasconcelos, A. L. F.; Morais, S. M.; Lima, Y. C.; Vieira, L. S.; Navarro, A. M. C.; "Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes". **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 55-59, 2009.

Padilha, T., "Controle da verminose gastrintestinal em pequenos ruminantes nas regiões áridas e semi-áridas do nordeste do Brasil". In: Padilha, T. (Ed.), Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes. EMBRAPA, CNPGL, Coronel Pacheco, Brasil, p. 77-93, 1996.

Page, A. P.; Johnstone, I. L.; "The Cuticle". **Wormbook**, v. 19, p. 1-15, 2007.

Palacios-Landin, J.; Gives, P. M. de; Salinas-Sanchez, D. O.; Lopez-Arellano, M. E.; Libeano-Hernandez, E.; Hernandez-Velazquez, V. M.; Valladares-Cisneros, M. G.; “*In vitro* and *in vivo* Nematocidal Activity of *Allium sativum* and *Tagetes erecta* Extracts Against *Haemonchus contortus*”. **Turkiye Parazitology Derg.** v. 39, p. 260-264, 2015.

Park, Joong-Ki; Sultana, T.; Lee, Sang-Hwa; Kang, S.; Kim, H. K.; Min, Gi-Sik; Eom, K. S.; Nadler, S. A.; “Monophyly of clade III nematodes is not supported by phylogenetic analysis of complete mitochondrial genome sequences”. **BMC Genomics.** v. 12, p. 1471-2164, 2011.

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.

Perry, R. N.; “Capitulo 6: Hatching”. **In:** Taylor & Francis. The Biology of nematodes. Editora: Lee, D. L., Londres, p. 01-29, 2002.

Polat, Z. A.; Vural, A.; Ozan, F.; Tepe, B.; Özcelik, S.; Cetin, A.; “*In Vitro* Evaluation of the Amoebicidal Activity of Garlic (*Allium sativum*) Extract on *Acanthamoeba castellanii* and its Cytotoxic Potential on Corneal Cells”. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.** v. 24, p. 8-14, 2008.

Poné, J. W.; Bilong, C. F. B.; Mpoame, M.; “*In vitro* nematicidal activity of extracts of *Canthium mannii* (Rubiaceae), on different life-cycle stages of *Heligmosomoides polygyrus* (Nematoda, Heligmosomatidae)”. **Journal of Helminthology,** v. 84, p.156–165, 2010.

Powolny, A. A.; Singh, S. V.; Melov, S., Hubbard, A.; Fisher, A. L.; “The garlic constituent diallyl trisulfide increases the lifespan of *C. elegans* via *skn-1* activation”. **Experimental Gerontology.** v. 46, p. 441–452, 2011.

Proudfoot, L.; Kusel, J. R.; Smith, H. V.; Harnett, W.; Worms, M. J.; Kennedy, M. W.; "The surface lipid of parasitic nematodes: organization, and modifications during transition to the mammalian host environment". **Acta Tropica**. v. 47, p. 323-330, 1990.

Quintans-Júnior, L. J., Souza, T. T., Leite, B. S., Lessa, N. M. N, Bonjardim, L. R, Santos, M. R. V., Alves, P. B., Blank, A. F., Antonioli, A. R., "Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents". **Phytomedicine**. v. 15, p. 619-624, 2008.

Rates, S. M. K.; "Promoção do uso Racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia", **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n.2, p. 57-69, 2001.

Rey, L.; "Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África". 3ª edição, editora: Guanabara Koogan S.A., 2001.

Robenek, H.; Robenek, M. J.; Buers, I.; Lorkowski, S.; Hofnagel, O.; Troyer, D.; Severs, N. J.; "Lipid Droplets Gain PAT Family Proteins by Interaction with Specialized Plasma Membrane Domains". **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 26330 –26338, 2005.

Robenek, H.; Hofnagel, O.; Buers, I.; Robenek, M. J.; Troyer, D.; Severs, N. J.; "Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis". *Journal of Cell Science*, v. 119, p. 4215-4224, 2006.

Robert, F. H. S., O'Sullivan, P. J., "Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting tract of cattle". **Australian Journal of Agricultural Research**, v.1, p.99-102, 1950.

Romero, J. R.; Boero, C. A.; "Epidemiología de la Gastroenteritis Verminosa de los ovinos en las Regiones Templadas y Cálidas de la Argentina". **Analecta Veterinaria**. v. 1, p.21-37, 2001.

Roque, A. A.; Rocha, R. M.; Loiola, M. I. B.; “Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil)”. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*. v. 12, p. 31-42, 2010.

Sant’anna, V.; Vommaro, R. C.; Souza, W. de; “*Caenorhabditis elegans* as a model for the screening of anthelmintic compounds: Ultrastructural study of the effects of albendazole”. *Experimental Parasitology*. v. 135, p.1–8, 2013.

Santos, R. I. dos, “Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos”. **In:** Cláudia M^a. Oliveira Simões, Eloir Paulo Schenkel, Grace Gosmann, João Carlos P. de Mello, Lilian A. Mentz, Pedro R. Petrovick (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. **Ed. UFSC**, Porto Alegre, Florianópolis, 3^a edição, p. 341, 2001.

Santos, C. P., “Fungos Nematófagos”. **In:** Cecília José Veríssimo. (Org.). *Alternativas de controle da verminose em pequenos*. Nova Odessa, SP, p. 83-103. 2008.

Santos, F.C.C.*; Vogel, F.S.F; “Avaliação *in vitro* da ação do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) sobre o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.14, p.712-716, 2012.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Simon, D. O; “Guia Decepar Chora de Ervas: 40 Receitas Naturais Para sua Saúde Perfeita. **Rio de Janeiro: Campus**, 2001.

Silva, F. de L.; Sugauara, E. Y. Y.; Magalhães, H. M.; Pascotto, C. R.; Colauto, N. B.; Linde, G. A.; Gazim, Z. C.; “Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus*”. *Arquivo Ciências Veterinárias Zoologia*, UNIPAR, Umuarama, v. 17, p. 179-182, 2014.

Singi, G., Damasceno, D. D., D’Andréa, E. D., Silva, G. A., “Acute effects of *Allium sativum* L. and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf hydroalcoholic extracts on arterial blood pressure of anesthetized rats”. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 15(2), p. 94–97, 2005.

Shorb, D. A.; "Survival on Grass Plots of Eggs and Larvae of the Stomach Worm, *Haemonchus contortus*". **Journal of Agricultural Research**. v. 68, p. 317-324, 1944.

Sobrinho, A. G. da S.; Purchas, R. W.; Kadim, I. T.; Yamamoto, S. M.; "Características de Qualidade da Carne de Ovinos de Diferentes Genótipos e Idades ao Abate". **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 34, n. 3, p. 1070-1078, 2005.

Sotomaior, C. S.; Carli, L. M. de; Tangleica, L.; Kaiber, B. K.; Souza, F. P. de; "Identificação de Ovinos e Caprinos Resistentes e Susceptíveis aos Helmintos Gastrointestinais". **Revista Acadêmica**, Curitiba. v. 5, p. 397-412, 2007.

Stasi, L. C. Di; Oliveira, G. P.; Carvalho, M. A.; Queiroz-Junior, M.; Tiena, O. S.; Kakinamia, S. H.; Reis, M. S.; "Medicinal Plants Popularly Used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest". **Fitoterapia**, v. 73 p. 69-91, 2002.

Thamsborg, S. M.; Roepstorff, A.; Larsen, M.; "Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems". **Veterinary Parasitology**. v. 84, p. 169–186, 1999.

Tariq, K. A., Chishti, M. Z., Ahmad, F., Shawl, A. S., "Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes". **Veterinary Parasitology**, v.160, p. 83-88, 2009.

Taylor M. A., Hunt, K. R., Goodyear, K. L., "Review: Anthelmintic resistance detection methods". **Veterinary Parasitology**. v. 103, p. 183 – 194, 2002.

Taylor, M. A.; Coop, R. L.; Wall, R. L.; "Parasitologia veterinária". 3.edição, **Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan**, 2010.

Teshome, K.; Gebre-Mariam, T.; Asres, K.; Perry, F.; Engidawork, E.; "Toxicity studies on dermal application of plant extract of *Plumbago zeylanica* used in Ethiopian traditional medicine". **Journal of Ethnopharmacology**. v. 117, p. 236-248, 2008.

Turolla, M. S. dos R.; Nascimento, E. de S.; “Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil”. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, p. 289-306, 2006.

Urano, F. S.; Pires, A. V.; Susin, I.; Mendes, C. Q.; Rodrigues, G. H.; Araújo, R. C. de; Mattos, W. R. S.; “Desempenho e características da carcaça de cordeiros confinados alimentados com grãos de soja”. **Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília**. v. 41, p.1525-1530, 2006.

Vale, N. B. A; “Farmacobotânica, Ainda Tem Lugar na Moderna Anestesiologia?”. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 368-380, 2002.

Vargas Júnior, F. M. de; Leão, A. G.; Longo, M. L.; Osório, J. C. da S.; Osório, M. T. M.; Leonardo, A. P.; “A Situação dos Pequenos Ruminantes na América Latina: Mercado e Potencial Futuro”. In: Congresso Latino-Americano de Especialistas em Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. p. 79-87, 2013.

Vatta, A. F.; Kandu-Lelo, C.; Ademola, I. O.; Eloff, J. N.; “Direct anthelmintic effects of *Cereus jamacaru* (Cactaceae) on trichostrongylid nematodes of sheep: *In vivo* studies”. **Veterinary Parasitology**, v. 180, p. 279 – 286, 2011.

Veiga Junior, V. F.; Pinto, A. C.; “Plantas Medicinais: Cura Segura?”. **Química Nova**. v. 28, p. 519-528, 2005.

Viana, G. S. B., Vale, T. G., Pinho, R. S. N., Matos, F. J. A., “Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **Journal Ethnopharmacology**. v. 70, p. 323–327, 2000.

Wabwobaa, B. W.; Anjilib, C. O.; Ngeiywac, M. M.; Ngured, P. K.; Kigondue, E. M.; Ingongab, J.; Makwalic, J.; “Experimental chemotherapy with *Allium sativum* (Liliaceae) methanolic extract in rodents infected with *Leishmania major* and *Leishmania donovani*”. **Journal Vector Borne Disease**. v. 47, 2010, p. 160–167, 2010.

Weischer, B.; Brown, D. J. F.; "Structure and organisation of nematodes". **In:** An Introduction to nematodes general nematology. A student's text book . Pensoft. Editor: Sofia, Moscow, 2000.

Winkfein, R. J.; Pasternak, J.; Mudry, T.; Martin, L. H.; "Ascaris lumbricoides: Characterization of the Collagenous Components of the Adult Cuticle". **Experimental Parasitology**. v. 59, p. 197-203, 1985.

Zen, S. de; Santos, M. C. dos; "Evolução da Caprino e Ovinocultura". **Ativos Ovinos e Caprinos**. Ano I, 1º Edição, Setembro 2014

Anexo I

FICHA DE ACOMPANHAMENTO DOS CAMUNDONGOS

ENSAIOS DE TOXICIDADE

Grupo: _____

Dose: _____

Animal: _____

Peso: _____

Concentração da droga: _____

Sinais Clínicos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Piloereção															
Ptose palpebral															
Contrações abdominais															
Alteração de locomoção															
Alteração do tônus muscular															
Tremores															
Sialorréia															
Secreção bronquiolar															
Convulsão															
Diarreia															

Observações: