

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO DE *Cymbopogon citratus* (DC) STAPF
(CAPIM LIMÃO) SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS E
CAMUNDONGOS**

VIVIANE SOUZA DE CAMPOS

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ
Fevereiro- 2018**

VIVIANE SOUZA DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO DE *Cymbopogon citratus* (DC) STAPF
(CAPIM LIMÃO) SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS E
CAMUNDONGOS**

Dissertação 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 Mestre em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular.

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLÓVIS DE PAULA SANTOS
COORIENTADORA: Dr^a. LETÍCIA OLIVEIRA DA ROCHA

**CAMPOS DOS GOYTACAZES/ RJ
Fevereiro-2018**

VIVIANE SOUZA DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO DE *Cymbopogon citratus* (DC) STAPF
(CAPIM LIMÃO) SOBRE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS E
CAMUNDONGOS**

Dissertação 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 Mestre em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular.

Aprovada em: 06 de fevereiro de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Angelo José Burla Dias (Dr. Biociências e Biotecnologia) - UENF

Prof. Eulógio Carlos Queiroz Carvalho (Dr. Patologia Anatomia Patológica) –
UENF

Prof. Isabella Vilhena Freire Martins (Dr. Med.Veterinária-Parasitologia) – UFES

Letícia Oliveira da Rocha (Dr. Biociências e Biotecnologias) – UENF
(co-orientador)

Prof. Clóvis de Paula Santos (Dr. Med. Veterinária- Parasitologia) – UENF
(orientador)

“O sonho é a jornada, não apenas o destino.”
Kobe Bryant

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui e concluir este trabalho.
- Agradeço à minha família por estar sempre ao meu lado e entender minhas ausências em alguns momentos, sem vocês eu não conseguiria.
- À Capes e a UENF, pelo financiamento do projeto e pela estrutura concedida.
- Agradeço ao meu orientador professor Dr. Clóvis de Paula, por aceitar me orientar mesmo antes de conhecer meu trabalho como aluna.
- Agradeço imensamente minha coorientadora Dr.^a Letícia Oliveira que me orientou desde o primeiro segundo de mestrado até o presente momento. Mesmo quando em outra cidade me atendia a qualquer momento do dia, aquelas ligações desesperadas e com voz de choro. Os experimentos feitos via aplicativos, sou grata imensamente por sua paciência, por me passar seus conhecimentos e por me dar a oportunidade de ser sua amiga.
- Agradeço a minha equipe de trabalho: Teresa Pontes. Sim uma dupla é uma equipe, aprendemos juntas que um trabalho de campo é pesado, mas quando é feito com amor e vontade conseguimos terminar com alegria e até um resto de energia. Obrigada por não me deixar surtar e desistir nos momentos de desespero, você terá um futuro brilhante, porque você merece e trabalha para isso.
- Agradeço aos meus amigos que podem ser chamados de família: Matheus Moura, Julya Bastos, Beatriz Muniz, Gabriel Machado, Marianne Caiado, por me aturarem e não me expulsarem de casa nos meus momentos de estresse.
- Agradeço imensamente aos amigos que fiz em Campos: Luísa Viana e Gabriela Petroceli, às vezes precisamos ir longe para conhecer pessoas tão parecidas conosco e que complementam nossos pensamentos, nos ensinando que certas coisas não são tão importantes ou que outras devem ser levadas com total importância, tal qual, nossa amizade.
- Agradeço ao professor Eulogio Queiroz e ao seu grupo de pesquisa, que me auxiliou e me ensinou as técnicas histológicas necessárias para parte de meu projeto. Em especial agradeço ao Hassan Jerdy, pela colaboração

na análise e realização das imagens histológicas. Toda equipe é muito paciente e generosa.

- Agradeço ao dono da fazenda Campo Novo, Vicente, onde realizei todo o trabalho de campo. Em especial agradeço ao senhor João que com toda sua paciência ajudou no trabalho com os ovinos, mesmo não sendo sua função, são essas pessoas que nos fazem persistir.
- Agradeço à Fernanda Silva, que é a melhor conselheira deste universo! Quantas vezes nesses dois anos a procurando para conversas sobre a vida acadêmica e até mesmo a pessoal às vezes. Obrigada por todo apoio.
- Agradeço à minha amiga Julia Resende e ao Kayan Eudorico, pela amizade, os conselhos científicos, ajuda em experimentos. Foram vários momentos que vocês puderam e iluminaram de fato meu caminho.
- Agradeço ao professor Leonardo Glória pelo auxílio com a análise estatística do presente trabalho.
- Agradeço aos funcionários do LBCT, em especial a Rosemary Maciel, Adriana Martins, Giovana Moraes, Beatriz Ribeiro, Darly Keller, Márcia Adriana e Luciana Timóteo pela paciência, auxílio e ensinamentos.

ÍNDICE DE FIGURAS

Revisão		Pág.
Figura 1	Morfologia geral do corpo do nematoide: fêmea à esquerda, e macho à direita.	13
Figura 2	Ciclo de vida dos nematoides strongylida, parasitos do trato gastrintestinal de ruminantes.	15
Figura 3	Ciclo de vida do <i>Heligmosomoides polygyrus</i> .	18
Figura 4	Imagem ilustrativa <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.	25
Artigo		
Figura 1	Teste de eficácia <i>in vivo</i> <i>H. polygyrus</i> .	38
Figura 2	Análise anatomohistopatológica do intestino delgado.	40
Figura 3	Análise anatomohistopatológica do fígado dos camundongos.	41
Figura 4	Análise anatomohistopatológica dos rins dos camundongos.	42
Figura 5	Teste de eficácia <i>in vivo</i> em ovinos.	44
Figura 6	Nódulos macroscópicos no intestino delgado.	45

ÍNDICE DE TABELAS

Revisão		Pág.
Tabela 1	Espécies de nematoides gastrintestinais de ovinos, habitat, período pré-patente.	17
Artigo		
Tabela 1	Número médio de leucócitos de camundongos não infectados (G1) e infectados (G2, G3) com <i>Heligmosomoides polygyrus</i> e tratados com extrato aquoso de <i>Cymbopogon citratus</i> (G3).	39
Tabela 2	Intensidade e prevalência de parasitos encontrados no conteúdo do trato gastrintestinal de ovinos.	45
Tabela 3	Eficácia de <i>Cymbopogon citratus</i> na RCOF e na contagem de nematoides adultos em camundongos e ovinos.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	Abomaso
CTL	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
ID	Intestino delgado
IG	Intestino grosso
L ₁	Larva de 1º estágio
L ₂	Larva de 2º estágio
L ₃	Larva Infectante
L ₄	Larva de 4º estágio
OPG	Ovos por grama
RA	Resistência anti-helmíntica
TRCOF	Teste de Redução da contagem de ovos nas fezes
TCc	Tratado com <i>Cymbopogon citratus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA OVINOCULTURA.....	12
2.2	NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS	12
2.2.1	Estrutura e ciclo de vida	12
2.2.2	Nematoides gastrintestinais em pequenos ruminantes	15
2.2.3	Nematoides de roedores: como modelo para nematodioses.....	17
2.3	CONTROLE DE NEMATODIOSES EM PEQUENOS RUMINANTES	19
2.4	CONTROLE QUÍMICO E A RESISTÊNCIA ANTIHELMINTICA	20
2.5	A IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS COM PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS	21
2.6	CONTROLE DAS PARASITOSSES GASTRINTESTINAIS UTILIZANDO PLANTAS MEDICINAIS.....	23
2.7	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf, 1906 (Capim-limão ou Capim-santo)	24
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	ARTIGO.....	27
1	INTRODUÇÃO.....	30
2	METODOLOGIA.....	32
2.1	COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO	32
2.2	FORMULAÇÃO DA RAÇÃO VEÍCULO COMPLEXADA AO <i>C. citratus</i>	32
2.3	OBTENÇÃO EXTRATOS VEGETAIS AQUOSOS.....	32
2.4	Ensaio DE EFICÁCIA em camundongos	33

2.4.1	Ensaio anti-helmíntico em camundongos	33
2.4.2	Anatomohistopatologia	33
2.5	Ensaio DE EFICÁCIA em ovinos	34
2.5.1	Teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF).....	34
2.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
3	RESULTADOS	36
3.1	Ensaio anti-helmíntico em camundongos.....	36
3.2	ensaio anti-helmíntico em ovinos	43
4	DISCUSSÃO.....	46
5	CONCLUSÃO	49
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

Nematodioses gastrintestinais representam um dos principais limitantes na criação de caprinos e ovinos. Animais intensamente parasitados podem apresentar sinais clínicos de fraqueza, emagrecimento, anemia, diarreia e edema submandibular, tornando-se mais susceptíveis a outras doenças (SANDOVAL JR et al., 2011). Os prejuízos ocorridos na ovinocultura estão relacionados, entre outras questões, à queda na produção, aumento no custo com tratamentos profiláticos e a morte dos animais (MOTA; CAMPOS; ARAÚJO, 2003).

O controle das nematodioses gastrintestinais tem ocorrido por meio do uso de anti-helmínticos comerciais pertencentes a diferentes grupos químicos (COSTA COELHO et al., 2010). O uso desses compostos de forma indiscriminada ou por repetidas vezes, num curto espaço de tempo, facilita o surgimento da resistência anti-helmíntica (RA) e ao mesmo tempo torna as nematodioses, um dos maiores agravantes para a limitação do crescimento da cadeia produtiva animal (MOLENTO, 2004). A introdução de animais de raças altamente susceptíveis a parasitoses pode elevar o aumento da utilização de anti-helmínticos e conseqüentemente o aumento da RA. Com a diminuição da busca por novos fármacos pela indústria farmacêutica, possivelmente devido à dificuldade de implantação e alto custo, faz-se necessário à busca por novas formas de controle dessas parasitoses (AMARANTE; SALES, 2007).

As características terapêuticas de produtos naturais provenientes de plantas, minerais e animais foram demonstradas desde as mais antigas civilizações humanas. Com a comprovação da eficácia da atividade de plantas medicinais, os estudos que visam aprofundar a busca por novos medicamentos têm crescido cada vez mais (SOUSA et al., 2013). Dessa forma, o interesse no uso de plantas medicinais para o controle de nematoides gastrintestinais demonstrou um aumento significativo. A utilização de plantas com propriedades anti-helmínticas tem sido considerada uma abordagem adequada para controle de parasitas, especialmente para criadores com poucos recursos, uma vez que esta abordagem pode ser potencialmente utilizada de forma sustentável (MACEDO et al., 2015).

Dentre as espécies de plantas que tem sido investigada para o controle das nematodioses gastrintestinais em ovinos temos *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecido como Capim Limão. Os poucos estudos realizados

demonstram a eficácia anti-helmíntica desta planta em testes *in vitro* (ALMEIDA et al., 2003; ROCHA, 2016; MACEDO et al., 2015) e *in vivo* (MACEDO et al., 2015; SILVA et al., 2005).

A atividade anti-helmíntica de diferentes formulações de *C. citratus* foi comprovada *in vitro*, tais como, óleo essencial, decoto, extrato aquoso como também para seu componente principal, o citral (ROCHA, 2016; MACEDO et al., 2015). Contudo, ainda são poucos resultados demonstrando a eficácia *in vivo*. Um estudo utilizando *Meriones unguiculatus* (gerbil), demonstrou a eficácia de óleo essencial de *C. citratus* na redução da carga parasitária de animais infectados com *H. contortus*, representando um indicativo da potencialidade da eficácia no organismo alvo. Neste contexto, o presente estudo busca avaliar o efeito anti-helmíntico *in vivo* do extrato aquoso de *C. citratus*, uma vez que sua ação *in vitro* causou alterações sobre ovos e larvas de nematoides gastrintestinais de ovinos segundo dados não publicados de ROCHA, 2016.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA OVINOCULTURA

Os ovinos foram um dos primeiros animais domesticados, sendo portugueses e espanhóis os disseminadores da ovinocultura no mundo (ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014). A criação de ovinos possibilita a obtenção de importantes e lucrativos produtos tais como, carne e leite para a alimentação e a lã para a proteção (VARGAS JÚNIOR et al., 2013). Embora a ovinocultura seja uma prática altamente rentável e de grande importância econômica, sua disseminação em todos os continentes ainda não é evidenciada. A exploração da pecuária ovina no Brasil está em maior parte concentrada nas regiões Sul e Nordeste (ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014).

De acordo com os dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) em 2010 a população mundial de ovinos era aproximadamente de 1,1 bilhão de cabeças, destas 134 milhões se concentram na China. O Brasil, ocupa a 18ª posição do ranking de rebanhos com 17,6 milhões de cabeças, das quais 10,1 milhões estão no Nordeste e 5,1 milhões na região Sul (MARTINS et al., 2016; VARGAS JÚNIOR et al., 2013). No entanto, tem sido observado um aumento no consumo da carne de origem ovina pelos brasileiros, o que pode ser associado com uma elevação do poder aquisitivo dos mesmos. Porém, por falta de abastecimento nacional, a carne é importada em grande parte do Uruguai (ZEN; SANTOS; MONTEIRO, 2014). A caracterização da qualidade da carne ovina é dada por um conjunto de atributos como suculência, sabor, textura, maciez e aparência combinados à uma carcaça com pouca gordura e bastante músculo (DA SILVA SOBRINHO et al., 2005).

Uma das principais barreiras para o crescimento da ovinocultura são as infecções por parasitoses gastrintestinais, pois influenciam no desenvolvimento do animal e conseqüentemente na qualidade da carne (VIEIRA, 2008).

2.2 NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS

2.2.1 Estrutura e ciclo de vida

Nematoides, vulgarmente chamados de vermes, são parasitos de corpo filiforme, alongado, não-segmentado com simetria bilateral. Podem possuir ciclo de vida livre ou parasitário. Muitos nematoides são de interesse médico e

veterinário por configurarem quadros de parasitoses em humanos e animais (REY, 2001). Possuem sistema nervoso, sistema digestivo completo com boca e ânus, sistema reprodutor, fêmea com vulva e ânus e macho com cloaca e , sendo dioicos (Figura 1). Estão presentes em nematoides parasitos algumas estruturas como dentes, dentículos e ventosas que auxiliam em sua fixação nos órgãos e tecidos a serem parasitados em seus hospedeiros, logo, na sua alimentação. Como consequência, geram feridas nas mucosas dos hospedeiros parasitados, o que pode ocasionar em grave perda de sangue levando o hospedeiro a um quadro de anemia. Nematoides com este tipo de alimentação são denominados hematófagos (REY, 2001).

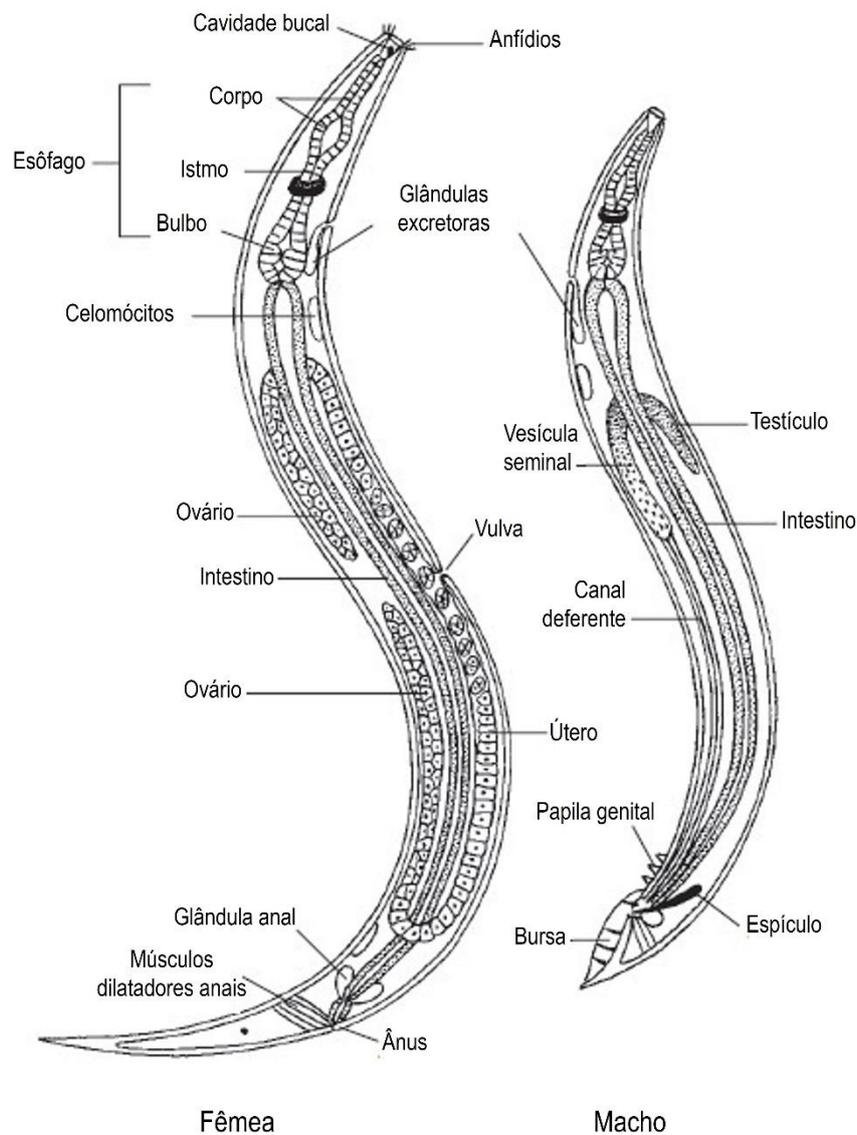


Figura 1. Morfologia geral do corpo do nematoide: fêmea à esquerda, e macho à direita (Adaptado SCHMIDT, 1990).

O ciclo de vida dos nematoides parasitos de ovinos inclui 2 fases: vida livre e parasitária. Os nematoides são encontrados na pastagem nas formas evolutivas de ovos e larvas. As larvas de primeiro (L₁) e segundo estágio (L₂) se alimentam de microrganismos do ambiente fecal e passam por duas mudas até atingir o estágio seguinte que é o infectante para o hospedeiro. O estágio infectante (L₃) não se alimenta, retém a cutícula remanescente da segunda muda e abandona o bolo fecal migrando para a vegetação ao redor. Ao se alimentar, os animais ingerem a L₃, que se aloja na mucosa do abomaso ou intestinos. Neste período as larvas se diferenciam no quarto estágio (L₄) e posteriormente emergem como um adulto imaturo. Ocorre então o aumento de tamanho, a diferenciação dos órgãos e se tornam adultos maduros (machos e fêmeas). Após a cópula as fêmeas iniciam a postura dos ovos que serão eliminados junto com as fezes do animal (Figura 2). O período pré-patente dura em torno de 21 a 28 dias para a maior parte das espécies de nematoides gastrintestinais (HANSEN; PERRY, 1994).

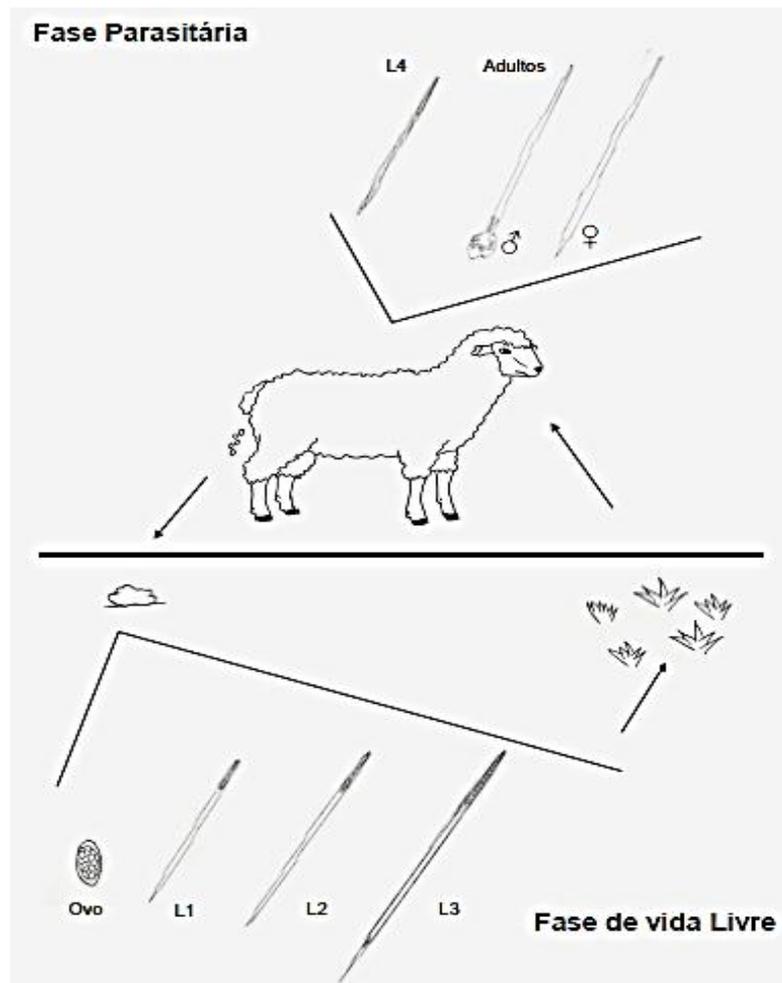


Figura 2. Ciclo de vida dos nematoides trichostrongyloidea, parasitas do trato gastrointestinal de ruminantes. A fase de vida livre é caracterizada pela evolução dos ovos até L3 ao passo que na fase parasitária ocorre o desenvolvimento das larvas infectantes à nematoides adultos e postura dos ovos (CRUZ, 2011).

2.2.2 Nematoides gastrintestinais em pequenos ruminantes

Um número variado de nematoides pode parasitar o trato gastrointestinal dos ovinos (Tabela 1). Os principais gêneros de nematoides parasitos encontrados em ovinos são: *Trichostrongylus spp.*, *Haemonchus spp.*, *Ostertagia spp.*, *Cooperia spp.*, *Strongyloides spp.*, *Trichuris spp.* e *Oesophagostomum spp.* (AMARANTE, 2015). O grau de patogenia destes nematoides pode variar com a espécie e a lesão causada, podendo então este ser classificado como mais ou menos patogênico. Inúmeros fatores ambientais podem influenciar o desenvolvimento e a sobrevivência das fases de vida livre dos nematoides tais como os

fatores climáticos, tipo de vegetação, tipo e relevo do solo e taxa de lotação de animais. A temperatura e umidade são principais fatores climáticos a interferir na evolução de ovos e larvas bem como migração, distribuição e persistência das L₃ nas pastagens (CHARLES; FURLONG, 1992).

Em países com clima tropical, *H. contortus* é o nematoide com maior prevalência nos rebanhos ovinos. Este parasito se prende a parede do abomaso do hospedeiro e por hematofagia se alimenta dos nutrientes ao ingerir o sangue. A Hemoncose é capaz de causar anemia, edema submandibular e em um estado mais grave pode levar o animal a óbito (AMARANTE; SALES, 2007). A infecção é caracterizada por duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, por conter um número maior de parasitos, o animal apresenta anemia e queda acentuada no hematócrito. Já na fase crônica, ocorre uma diminuição da carga parasitária e não é constatada a presença de anemia (ROEBER; JEX; GASSER, 2013).

Trichostrongylus colubriformis é o segundo nematoide com maior prevalência nos rebanhos em países tropicais (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011). Depois da infecção, estes nematoides se fixam no intestino delgado de seus hospedeiros e com a emergência das L₄ ocorrem ulcerações na superfície da mucosa com consequente perda sanguínea em especial das proteínas plasmáticas. As vilosidades tornam-se alteradas e seu desenvolvimento é interrompido causando uma atrofia destas, reduzindo assim, a superfície intestinal de absorção resultando em digestão prejudicada e má absorção. Em infecções severas, como consequência pode-se ter diarreia e perda de peso (ROMERO; BOERO, 2001).

Tabela 1 - Espécies de nematoides gastrintestinais de ovinos, habitat, período pré-patente.

Família*	Espécie	Habitat	Período Pré Patente (dias)
<i>Haemonchidae</i>	<i>Haemonchus contortus</i>	Abomaso	18 - 21
	<i>Haemonchus similis</i>		
	<i>Trichostrongylus axei</i>	Abomaso	
<i>Trichostrongylidae</i>	<i>T. colubriformis</i>	Intestino delgado	15 - 23
	<i>Ostertagia ostertagi</i>		
	<i>O. circumcincta</i>	Abomaso	
	<i>O. trifurcata</i>		
	<i>Cooperia punctata</i>		
<i>Cooperiidae</i>	<i>Cooperia oncophora</i>		17 - 22
	<i>Cooperia pectinata</i>	Intestino delgado	
	<i>Cooperia curticei</i>		
<i>Molineidae</i>	<i>Cooperia macmasteri</i>		15 - 25
	<i>Nematodirus spatigher</i>	Intestino delgado	
	<i>Nematodirus fillicolis</i>		
<i>Ancylostomatidae</i>	<i>Bunostomum trigonocephalum</i>	Intestino delgado	53 – 60
<i>Strongyloididae</i>	<i>Strongyloides papillosus</i>	Intestino delgado	07 – 09
<i>Cloacinidae</i>	<i>Oesophagostomum columbianum</i>	Intestino grosso	40
	<i>O. venulosum</i>	Intestino grosso	28 - 31
<i>Chabertidae</i>	<i>Chabertia ovina</i>	Intestino grosso	63 - 70
	<i>Trichuris ovis</i>		
<i>Tricuridae</i>	<i>Trichuris discolor</i>	Intestino grosso	42-84
	<i>Trichuris globulosa</i>		

* Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6231>

2.2.3 Nematoides de roedores como modelo para o estudo das nematodioses

Heligmosomoides polygyrus, também conhecido como *H. bakeri* ou *Nematospiroides dubius*, é um nematoide gastrintestinal de roedores. Pertencente à família trichostrongylidae, possui ciclo de vida direto, sendo L₃ a forma infecciosa. Após a infecção feco-oral, as L₃ penetram pelas microvilosidades e migram

para a camada subserosa do duodeno após 24h de infecção. Neste local, cerca de quatro dias após ingestão a L₃ muda para L₄. Após oito dias os nematoides adultos retornam ao lúmen intestinal. O acasalamento e a postura de ovos ocorrem até o décimo dia, os ovos são eliminados junto às fezes dos animais de onde as larvas eclodem e se desenvolvem (L₁, L₂ e L₃), (Figura 3) (JOHNSTON et al., 2015; MONROY; ENRIQUEZ, 1992).

Heligmosomoides polygyrus é considerado um organismo apropriado para modelo de helmintoses crônicas, devido à persistência de suas infecções primárias por meses em cepas de camundongos susceptíveis (REYNOLDS; FILBEY; MAIZELS, 2012). A similaridade com nematoides parasitos de ruminantes torna este helminto um alvo de testes *in vitro* para validação de plantas medicinais, assim como teste pré-clínicos (GITHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006).

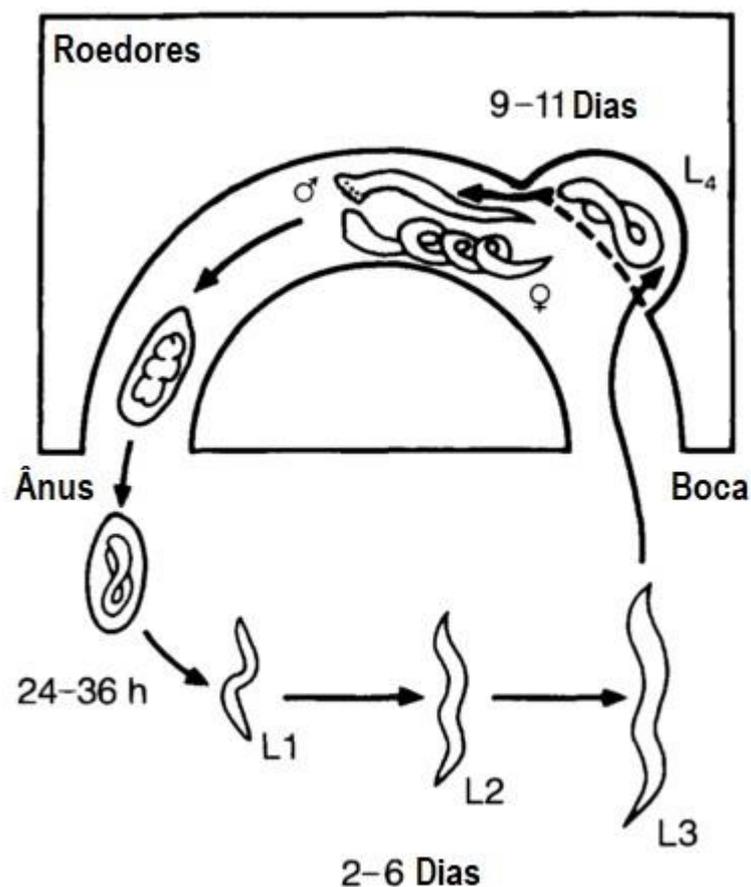


Figura 3. Ciclo de vida do *Heligmosomoides polygyrus* (Adaptado de MONROY, 1992).

2.3 CONTROLE DE NEMATODIOSES EM PEQUENOS RUMINANTES

O controle de infecções por nematoides gastrointestinais tradicionalmente é feito por uso de anti-helmínticos comerciais (CHARLES, 1992). Estes medicamentos podem ter ação de amplo ou reduzido espectro, agindo em vários ou especificamente em alguns tipos de helmintos.

No mercado existem os seguintes anti-helmínticos com amplo espectro: (1) benzimidazóis (thiabendazol, mebendazol, parabendazol, albendazol, fenbendazol, oxbendazol, oxfendazol e triclabendazol), que atuam ligando-se à beta-tubulina e evitam a polimerização dos dímeros de tubulina em microtúbulos, e também inibem a fumarato-redutase e o transporte de glicose; (2) imidazotiazóis (levamisol e tetramisol) e pirimidinas (pirantel e morantel), que são agonistas de receptores de acetilcolina e provocam contração muscular e paralisia; (3) lactonas macrocíclicas (avermectinas: ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina; e milbemicinas: moxidectina, nemadectina e milbemicina oxima), que abrem canais de cloro direcionados por glutamato e ocasionam paralisia neuromuscular; (4) derivado de amino acetonitrila (monopantel) que age como agonista direto de canais iônicos contendo a proteína ACR-23, um receptor nicotínico da acetilcolina, causando hipercontração muscular que conduz a paralisia e morte do nematoide e (5) Espiroindoles (derquantel) que são antagonistas colinérgicos nicotínicos, que bloqueiam os canais de cátions nas membranas celulares do músculo do nematoide levando a paralisia. O derquantel tem sido comercializado associado à abamectina (LITTLE et al., 2010, 2011).

Os anti-helmínticos de reduzido espectro são: (1) salicilanilidas (closantel, rafoxanida niclosamida e oxiclozamida) e nitrofenóis ou substitutos fenólicos (disofenol, nitroxinil, niclofan, nitroscanato e bitionol), desacopladores de fosforilação oxidativa e (2) organofosforados (diclorvós, triclorfon, coumafós e fention), inibidores da acetilcolinesterase (NICIURA; VERÍSSIMO; MOLENTO, 2009). Embora existam, uma gama razoável de substâncias disponíveis para o controle dos endoparasitos, o uso indiscriminado e equivocado destes produtos acarretou o surgimento da resistência dos nematoides (MOLENTO et al., 2013).

Em paralelo, outras formas de controle podem ser utilizadas para se realizar um controle integrado, visando a diminuição da utilização de medicamentos anti-helmínticos. Entre estas, tem-se prontamente disponíveis o pastejo rotacionado, descontaminação prévia das pastagens, pastejo com alternância de

categorias e ou espécies de hospedeiros, maior controle nutricional e melhoramento genético do rebanho para resistência parasitária (CEZAR; CATTO; BIANCHIN, 2008). O método FAMACHA auxilia no diagnóstico de animais parasitados por *H. contortus*, direcionando o tratamento seletivo a animais que apresentem diferentes graus de anemia, logo diminuindo a utilização de anti-helmínticos no rebanho (VAN WYK, 2001). Outras alternativas de controle, ainda estão em fase de estudos tais como o controle biológico, marcadores genéticos, vacinas e fitoterapia (CEZAR; CATTO; BIANCHIN, 2008).

Devido à alta taxa de RA criada após o uso descontrolado de anti-helmínticos, tornou-se necessária a busca por novas estratégias de controle parasitário. Atualmente ocorre um aumento do interesse nas práticas etnomédica e etnoveterinária em todo o mundo, especialmente em relação ao uso de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças (BIZIMENYERA et al., 2006).

2.4 CONTROLE QUÍMICO E A RESISTÊNCIA ANTIHELMINTICA

O curto intervalo de tempo entre os tratamentos, a rápida alternância entre dois diferentes grupos de vermífugos, medicamentos de longa duração, a aquisição de animais contaminados e o tempo de aprovação dos anti-helmínticos, são apontados como as causas para o surgimento da resistência parasitária em ovinos (MOLENTO, 2004). A RA pode ser definida como o aumento na aptidão das cepas de parasitos em resistir ou sobreviver a ação dos compostos químicos que seriam eficazes na morte de indivíduos em uma mesma espécie de nematoides. A resistência a drogas nematocidas se tornou um dos fatores mais limitantes para o desenvolvimento da ovinocultura (HOLSBACK; DE SOUZA MARQUEZ; MENEGHEL, 2013).

A fenotiazina foi a primeira substância a ser relatada com RA no mundo, primeiramente em nematoides de ovinos (DRUDGE; LELAND; WYANT, 1957) e mais tarde em nematoides de equinos (DRUDGE; ELAM, 1961). Os benzimidazóis foram as primeiras classes de anti-helmínticos atualmente utilizados com relato de RA, com nematoides resistentes a tiabendazol (DRUDGE et al., 1964). Dos Santos e Gonçalves (1967) relataram o primeiro caso de RA ocorrido no Brasil em ovinos e para o albendazol no estado do Rio Grande do Sul. Desde então inúmeros casos de RA vem sendo descritos a nível mundial (FALZON et al., 2014; MACIEL et al., 1996; PLAYFORD et al., 2014; SUTER et al., 2004; WAGHORN et al., 2006) e no Brasil (SALGADO; SANTOS, 2016) envolvendo

anti-helmínticos com diferentes modos de ação (resistência cruzada) ou envolvendo indivíduos resistentes a dois ou mais grupos de anti-helmínticos quimicamente diferentes e com diferentes mecanismos de ação (resistência múltipla).

Populações de parasitos que não entraram em contato com o tratamento químico, presentes na pastagem ou em animais não tratados, são chamados de população de refugia. Esta população é de extrema importância, uma vez que a RA está diretamente relacionada com a progênie que sobreviveu ao tratamento, logo é importante manter a população em refugia, pois pode auxiliar a retardar o surgimento da RA (VAN WYK, 2001). A característica susceptível das larvas em refugia permanece, pois ficam livres da seleção para RA (MOLENTO, 2005). O método FAMACHA, permite que haja persistência de uma população de parasitos sensíveis no meio ambiente na medida em que este direciona o tratamento somente a animais que necessitam, retardando o aparecimento da RA e mantendo a eficácia do composto químico por um período maior, além de promover a redução de resíduos químicos nos alimentos de origem animal e no meio ambiente, sendo indicado apenas para infecções por *H. contortus* (COSTA; SIMÕES; RIET-CORREA, 2011).

Há RA quando a eficácia do fármaco é inferior a 95%, desta forma é recomendado que seja feito um teste de RA para escolher o fármaco a ser utilizado. O principal método para a detecção de resistência continua sendo o teste de redução da contagem de ovos nas fezes que pode ser usado com todos os grupos anti-helmínticos. Os ovos são contados nas fezes antes e após o tratamento, dependendo do grupo anti-helmíntico utilizado (COLES et al., 2006).

2.5 A IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS COM PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS

As civilizações antigas utilizaram por longo tempo produtos naturais com propriedades terapêuticas, de origem mineral, animal e vegetal (PASQUALE, 1984). Após a revolução industrial, houve o desenvolvimento da química orgânica resultando na preferência da utilização de produtos sintéticos em tratamentos farmacológicos. Devido à facilidade na obtenção de compostos puros, a produção de drogas potencialmente ativas e mais seguras e o aumento do poder econômico das companhias farmacêuticas, houve um aumento na preferência do uso de produtos sintéticos para tratamento farmacológico.

Ao longo do desenvolvimento da cultura humana, o uso de produtos naturais passou a se relacionar à magia, marginalizando seu uso. Dessa forma, esta abordagem foi posta de lado, sendo considerada sem valor para indústria farmacêutica e utilizada apenas por pessoas de baixa renda ou com religião supersticiosa. Após anos de uso abusivo e/ou incorreto de drogas sintéticas resultou no surgimento de efeitos colaterais. Elevando a busca por abordagens alternativas, as plantas voltaram a se tornar um alvo nos últimos anos (RATES, 2001).

A utilização de recursos naturais por populações urbanas descende de um conjunto de conhecimento da localidade onde seus ancestrais nasceram e baseados exclusivamente na observação e transmitido de uma geração a outra (OLIVEIRA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2010). A ciência que estuda o conhecimento popular sobre os fármacos é denominada, etnofarmacologia. A partir do levantamento deste conhecimento, é feito o estudo dos princípios ativos naturais, antes da manipulação. Esta é uma das vertentes mais antigas da farmacologia, conhecida como farmacognosia. A farmacognosia é uma precursora milenar da ciência médica (PASQUALE, 1984).

Em meados de 1960, reascendeu o interesse da indústria farmacêutica e da pesquisa pela busca por novas substâncias de origem vegetal. Com o avanço da tecnologia e do desenvolvimento de novas metodologias, a partir de 1980, ocorreu o ressurgimento do interesse pela pesquisa de extratos vegetais como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos (SILVA et al., 2006). A exploração de produtos naturais e seus derivados forneceu numerosos medicamentos utilizados clinicamente e ainda lidera vários alvos farmacológicos, tais como câncer, HIV/AIDS, Alzheimer e malária (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Atualmente segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), 252 medicamentos são considerados como básicos e essenciais, 11% possuem origem vegetal e grande parte dos medicamentos sintéticos são obtidos de precursores naturais (RATES, 2001). Para que essas descobertas sejam feitas são necessários vários anos de trabalho e pesquisa, para que então seja validado o efeito da planta (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

2.6 CONTROLE DAS PARASIToses GASTRINTESTINAIS UTILIZANDO PLANTAS MEDICINAIS

Após o aumento da demanda do setor farmacêutico e o reconhecimento da importância de pesquisas com plantas medicinais que se adequam a abordagem e ao desenvolvimento de novas drogas, as plantas medicinais têm sido mundialmente recomendadas para o controle de infecções parasitárias como uma alternativa para a falta de medicamentos novos e eficazes (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Diversas plantas, de diferentes partes do mundo, são conhecidas por sua atividade anti-helmíntica devido à presença de diferentes substâncias com propriedades que atuam sobre nematoides parasitos que afetam culturas agrícolas ou nematoides parasitos de animais. A China, Índia, África do Sul e o Brasil, são países que possuem vasta biodiversidade vegetal e atualmente possuem uma importante indústria de extratos vegetais com base científica (DE GIVES et al., 2012). Algumas etapas devem ser seguidas para a validação das plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. Estas etapas incluem: levantamento botânico da espécie a ser avaliada, contando com os dados do uso ou conhecimento popular; ensaios *in vitro* para avaliação da atividade anti-helmíntica da planta; e ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, determinando a eficácia e avaliando a ocorrência de toxicidade. Os testes clínicos no organismo alvo são os mais custosos e mais importantes. Ao concluir estas etapas, pode se então, registrar a planta ou produto a ser empregado (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Na busca por novas abordagens de controle parasitário utilizando plantas medicinais, têm sido descritas na literatura plantas com atividade sobre eclosão larval, larvas infectantes, nematoides adultos, comprovadas após testes *in vitro*, tais como, *Mentha cordifolia* sobre *Ascaris suum* (VILLASEÑOR et al., 2002) e *Albizia anthelmintica* sobre *H. contortus* e *H. polygyrus* (GITHIORI et al., 2003). Contudo, os testes *in vivo* são considerados mais relevantes para a indústria. Algumas espécies vegetais foram testadas *in vivo* e apresentaram excelentes resultados semelhantes aos testes *in vitro*, tais como *Carica papaya*, *Fumaria parviflor*, ambas sobre *H. contortus* (GITHIORI, 2006).

2.7 *Cymbopogon citratus* (DC) STAPP, 1906 (CAPIM-LIMÃO OU CAPIM-SANTO)

O gênero *Cymbopogon* pertencente à família Poaceae, possui aproximadamente 140 espécies, as quais são originárias de regiões tropicais e semitropicais nativas da Ásia e são cultivadas nas Américas Central e do Sul, África e outros países tropicais. As diferentes espécies do gênero *Cymbopogon* possuem como constituintes de seus óleos essenciais monoterpenos como citral, citrionelol, citronelal, linalol, elemol, 1,8-cineol, limoneno, geraniol, b-carofileno, metil heptenona, acetato de geranila e formiato de geranila. Porém, o citral é o componente encontrado em maior porcentagem e o mais utilizado pela indústria (KHANUJA et al., 2005).

O estudo etnofarmacológico do gênero descreve as diferentes espécies que são utilizadas amplamente no mundo para diversas finalidades. Tanto as folhas quanto a planta inteira podem ser utilizadas para fazer chá e sopas, além de seu uso medicinal. *Cymbopogon citratus* (Figura 4) é classificado como uma das espécies mais distribuídas do gênero, sendo usado em todas as partes do mundo (AVOSEH et al., 2015). No Brasil esta espécie é vulgarmente conhecida como, Capim limão ou Capim santo e é utilizado popularmente como anti-inflamatório, antipirético, diurético, sedativo e antiespasmódico (SHAH et al., 2011). O capim limão é famoso por seu odor cítrico bem característico, proveniente do citral. O óleo essencial é amplamente utilizado na indústria de perfumes e cosméticos e para síntese química, teor de citral presente no óleo essencial varia dependendo da origem do *C. citratus* (VIANA et al., 2000).



Figura 4. Imagem ilustrativa do *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (**Fonte:** Arquivo pessoal).

Atualmente há relatos na literatura de sua atividade anti-inflamatória, antioxidante, anti-obesidade, anti-hipertensivo, ansiolítica, antinoceptiva, antifúngica e antimutagênica (OLORUNNISOLA et al., 2014). Macedo et al., 2015, descreveram ação anti-helmíntica do óleo essencial de *C. citratus* sobre *Meriones unguiculatus* (gerbil) infectados com *H. contortus in vitro* e *in vivo*, indicando a possibilidade do uso desta planta como controle alternativo de nematodioses em pequenos ruminantes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia nematicida *in vivo* de *C. citratus* sobre nematoides gastrintestinais de ovinos e *H. polygyrus*, nematoide do trato intestinal de camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o número de *H. polygyrus* em camundongos tratados e não tratados com *C. citratus*;
- Determinar os parâmetros hematológicos e histopatológicos em camundongos submetidos a tratamento ou não com *C. citratus*;
- Avaliar a redução de ovos de nematoide presente nas fezes de ovinos coletadas após o tratamento com a ração a base de *C. citratus*;
- Quantificar o número de nematoides adultos do trato gastrintestinal em ovinos tratados e não tratados com *C. citratus*.

4 ARTIGO

**Eficácia nematicida *in vivo* de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf
(Capim limão) sobre nematoides gastrintestinais de ovinos e
camundongos**

***In vivo* nematicidal efficacy of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf
(lemon Grass) on gastrointestinal nematodes of sheep and mice**

RESUMO

Infecções causadas por nematoides gastrintestinais são responsáveis por limitar o crescimento da ovinocultura causando perdas econômicas para os criadores. O uso indiscriminado de fármacos anti-helmínticos para o controle destes parasitos gerou uma alta taxa de resistência parasitária, tornando necessária a busca por novos métodos de controle. As plantas medicinais têm sido apontadas como alternativa para o tratamento destas nematodioses. Neste estudo avaliamos o efeito *in vivo* do *Cymbopogon citratus* (capim limão) contra nematoides gastrintestinais de ovinos e camundongos. Os testes foram feitos utilizando camundongos C57BL-6 infectados com *Heligmosomoides polygyrus*. Os camundongos foram separados em 3 grupos G1: não infectado; G2: controle negativo (DMSO3%); G3: extrato aquoso de *C. citratus* (50mg/kg). Os tratamentos foram administrados via oral e a contagem de ovos por grama de fezes (OPG), quantidade de parasitos, sangue e tecido intestinal foram avaliados. Além disto, foram utilizados 10 ovinos naturalmente infectados de ambos os sexos. Os animais foram separados em dois grupos: controle e tratado, que recebeu uma ração complexada com *C. citratus*, recebendo 50mg/kg/dia durante cinco dias. Após cinco dias pós tratamento os animais foram abatidos e a contagem de parasitos efetuada. Houve redução na contagem do OPG (65%) e nematoides adultos (87%) de camundongos tratados com *C. citratus* enquanto para os ovinos a redução foi verificada apenas nos nematoides adultos (62%). Foi notada uma redução na eosinofilia dos camundongos após tratamento com *C. citratus*. Houve redução das lesões intestinais dos camundongos após o tratamento com *C. citratus*, sugerindo que o mesmo pode estar agindo sobre o tecido. Estes resultados sugerem que o extrato aquoso das folhas de *C. citratus* possui eficácia contra nematoides gastrointestinais *in vivo* e há possibilidade de ação sobre tecidos lesionados, sendo necessários mais estudos *in vivo* utilizando outras dosagens.

Palavras chave: *Cymbopogon citratus*, Capim limão, Nematoides gastrintestinais, *Heligmosomoides polygyrus*, Camundongos, Ovinos.

ABSTRACT

Infections induced by gastrointestinal nematodes are responsible for limit growth of sheep farming causing economic losses to the farmers. The indiscriminate use of anthelmintic to control these parasites generated a high rate of parasite resistance making necessary the search for new controls methods. Medicinal plants have been reported like an alternative to the treatment of these nematodes diseases. This study evaluated the effect *in vivo* of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) against gastrointestinal nematodes of sheep and mice. The tests were made using C57BL-6 mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. The mice were separated in 3 groups, G1: not-infected; G2: negative control (DMSO3%); G3: aqueous extract of *C. citratus* (50mg/kg). The treatments were administered orally and the eggs per gram (EPG), number of parasites, blood and intestinal tissue were evaluated. Moreover, 10 sheep of both sexes naturally infected were used. The animals were separated in two groups: control and treated, which received a complexed ration with *C. citratus*, receiving 50mg/kg/day, during five days. After five days of treatment, the animals were slaughtered and the parasite count was performed. There was a decrease in the EPG count (65%) and in the adult nematodes (87%) of mice treated with *C. citratus*, while to sheep the decrease was observed only in the adult nematodes (62%). A decrease in the eosinophilia of mice was noticed after treatment with *C. citratus*. There was a reduction in the intestinal injuries of mice after treatment with *C. citratus*, suggesting that it could be acting in the tissue. Those results suggesting that the aqueous extract of *C. citratus* has efficacy against gastrointestinal nematodes *in vivo* and have possibility of action in the injuries tissues, being necessary more studies *in vivo* using others dosages.

Keywords: *Cymbopogon citratus*, lemon grass; gastrointestinal nematodes, *Heligmosomoides polygyrus*, mice, sheep.

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por nematoides tem se tornado cada vez mais um fator limitante para o crescimento da ovinocultura no Brasil e no mundo. Essas nematodioses são responsáveis pela queda da produtividade do rebanho e aumento da suscetibilidade às infecções oportunistas podendo levar os animais a morte (ROEBER; JEX; GASSER, 2013). O controle químico é o método mais utilizado nestes casos, porém o uso inapropriado e frequente, além de causar danos ao meio ambiente tem propiciado o desenvolvimento de resistência anti-helmíntica dos nematoides (CEZAR; CATTO; BIANCHIN, 2008). Apesar de alguns anti-helmínticos ainda apresentarem eficácia frente à nematodioses, é necessária que sejam realizadas buscas por novos métodos capazes de auxiliar no controle, aumentando o tempo do anti-helmíntico no mercado (MOLENTO, 2009).

Neste contexto, nas últimas décadas a busca por controles alternativos foi intensificada. A utilização de plantas medicinais no controle biológico alternativo destas nematodioses tem sido apontada como uma abordagem promissora (BIZIMENYERA et al., 2006). O Brasil, com sua alta biodiversidade vegetal possui uma gama de estudos sobre plantas com possível atividade anti-helmíntica (DE AQUINO MESQUITA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013).

Cymbopogon é um gênero pertencente à família Poaceae, amplamente disseminados, podendo ser encontrados na Ásia, África e Américas (AVOSEH et al., 2015). A eficácia da atividade anti-helmíntica do óleo essencial das espécies *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon schoenanthus*, foi testada *in vitro* e ambas foram consideradas promissoras para a etapa de validação com testes *in vivo* (KATIKI et al., 2011). *Cymbopogon citratus* é conhecido popularmente no Brasil como Capim Limão ou Capim Santo e o seu uso é feito na forma de chás e sopas, sendo utilizado como anti-inflamatório, antipirético, diurético, sedativo e antiespasmódico (SHAH et al., 2011) e anti-helmíntico (RITTER et al., 2012).

Embora *C. citratus* seja utilizado em alguns locais para tratamento de helmintos em cães (RITTER et al., 2012), a sua atividade anti-helmíntica pouco tem sido investigada contra nematoides gastrintestinais. Testes *in vitro* (ALMEIDA et al., 2003; MACEDO et al., 2015; ROCHA, 2016) e *in vivo* (MACEDO et al., 2015; SILVA et al., 2005) são escassos, contudo, apontam resultados promissores

contra nematoides que afetam o trato gastrintestinal de animais. Como testes *in vivo* compõem uma das etapas para a comprovação da atividade biológica da planta para possível uso como medicamento (ROCHA, 2016; MACEDO et al., 2015) vários estudos ainda são necessários. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar *in vivo* a eficácia anti-helmíntica de *C. citratus* em camundongos infectados com *Heligmosomoides polygyrus*, e em ovinos infectados naturalmente com nematoides gastrintestinais.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO

As plantas foram coletadas e levadas ao herbário para identificação do material botânico. As exsicatas foram processadas e depositadas sobre o número de registro no Herbário/CBB/UENF. *Cymbopogon citratus* (H.8225) foi coletado na Casa de Vegetação, do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (CBB/UENF).

Após a coleta as plantas foram levadas para a estufa de secagem, onde ficaram na temperatura de 30°C por 72h. Após a secagem, as plantas foram moídas em moinho de facas pertencente ao Laboratório de Ciências Ambientais do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (LCA/CBB/UENF).

2.2 FORMULAÇÃO DA RAÇÃO VEÍCULO COMPLEXADA AO *C. citratus*

A ração foi preparada sob a supervisão do Dr. Adolpho Marlon Antonioli, zootecnista da FIOCRUZ e consultor da empresa Químtia para formulação de rações para animais de laboratório. As rações foram formuladas de acordo com a palatabilidade e nutrição necessária para o animal durante o tratamento. A ração foi constituída de 2,5 kg de farelo de milho, 1,5 kg de farelo de soja e 1,5 kg de farelo de trigo. Após misturar esses ingredientes, foi feita a pesagem da ração e adicionado 300g de *C. citratus* em pó para cada 2,75 Kg do concentrado e após foi feita a mistura manualmente para formar a ração. As doses foram determinadas de acordo com a média de peso dos animais tendo como parâmetros as doses 50mg/kg/animal usadas nos testes *in vitro* efetuados por ROCHA, 2016.

2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS AQUOSOS

Para obtenção dos extratos aquosos foram usadas as folhas secas de *C. citratus*, sendo processada de acordo com a metodologia descrita por ROCHA, 2016 com pequenas alterações. Resumidamente foram: (1) pesar 490g das folhas secas, (2) adicionar 7L de água destilada, (3) macerar por 24h em temperatura ambiente em erlenmeyer, (4) Filtrar e reservar as folhas e filtrado, (5) adicionar 3,5L de água destilada, (6) macerar por 24h, (7) filtrar novamente, (8)

resfriar. O extrato bruto filtrado foi resfriado à -20°C e liofilizado. O extrato liofilizado foi armazenado à -20°C até seu uso no teste com os camundongos.

2.4 ENSAIO DE EFICÁCIA EM CAMUNDONGOS

2.4.1 Ensaio anti-helmíntico em camundongos

Os ensaios pré-clínicos 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. Foram usados camundongos fêmeas da linhagem C57BL-6, com quatro semanas de idade e peso entre 20 e 25g. Os camundongos foram infectados oralmente com *H. polygyrus* por gavagem, sendo inoculados com 200 L₃ por camundongo, em volume de 0,2 mL de água destilada. As fezes foram coletadas a partir do nono dia pós-infecção, para avaliar se a infecção havia se estabelecido. Para o tratamento com o extrato, os camundongos foram distribuídos em três grupos contendo sete camundongos cada, sendo: grupo um (G1) com camundongos não infectados, grupo dois (G2) controle negativo com DMSO 3% e o grupo três (G3) camundongos tratados. As doses do extrato foram administradas oralmente e os extratos diluídos em 0,5 mL de DMSO 3%, cujas doses foram determinadas de acordo com o peso corporal de cada animal. Foram administradas duas doses de 50mg/kg do extrato, sendo a primeira no dia 0 após a confirmação da infecção por *H. polygyrus* e a segunda dose no dia cinco. As fezes foram coletadas nos dias 0, 5, 7, 10 e 15 para analisar a redução do OPG. No 15º dia de tratamento os animais foram eutanasiados com CO₂ e necropsiados. O intestino foi inspecionado e os nematoides adultos foram coletados e quantificados. Amostras teciduais também foram coletadas para análise histopatológica. Nesse mesmo dia, foram feitas coletas de sangue para contagem de glóbulos brancos e para realização de hematócrito, a fim de analisar a influência do tratamento nos parâmetros sanguíneos.

2.4.2 Anatomohistopatologia

Amostras teciduais do intestino delgado, fígado e rins foram coletadas e fixadas em 10% de formalina tamponada após a necropsia. Posteriormente, amostras foram clivadas e desidratadas em uma solução de álcoois, diafanizadas em xilol, infiltração em parafina, seccionado (5 µm), corado com

hematoxilina-eosina, montado em lâminas e observadas sob um microscópio (*Nikon Eclipse 80i*) usando software específico (*NIS Elements*).

2.5 ENSAIO DE EFICÁCIA EM OVINOS

2.5.1 Teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF)

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de carneiros naturalmente infectados, pertencentes à Fazenda Campo Novo, localizada na cidade Campos dos Goytacazes – RJ. Foi feita coprocultura no dia 0, a fim de identificar as espécies de parasitos gastrintestinais. O rebanho foi dividido em dois grupos de cinco animais cada. Grupo 1 não recebeu tratamento, enquanto para o grupo 2 foi administrada a ração complexada com *C. citratus* durante cinco dias. Amostras de fezes dos animais foram coletadas, diretamente da ampola retal, do dia 0 a 4 de pós-tratamento. As amostras de fezes foram processadas para determinação da contagem de ovos por grama (OPG) de acordo com Gordon e Whitlock (1939).

Para a obtenção das larvas infectantes e identificação das espécies presentes, foi utilizado o método de coprocultura modificado (Robert O'Sullivan, 1950). Foram pesadas 4g de fezes ovinas em copos descartáveis de 50mL e estas foram colocadas em caixas fechadas contendo 100mL de água destilada ao fundo. Após sete dias, as L₃ foram coletadas e armazenadas em garrafas de cultura à 4°C e identificadas segundo os critérios morfológicos de Van Wyk et al. (2004).

2.5.2 Coleta e Contagem de parasitos adultos

Após cinco dias do término do tratamento os animais foram eutanasiados e o conteúdo do abomaso, intestinos delgado e grosso foram coletados. A técnica de coleta e a contagem de nematoides gastrintestinais foram realizadas de acordo com Ueno (1998).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A eficácia do tratamento foi determinada utilizando a seguinte fórmula: $100(1 - \bar{X}_t/\bar{X}_c)$, onde \bar{X}_t representa a média do grupo tratado e \bar{X}_c a média do grupo controle.

Os resultados foram submetidos à análise de variância simples ANOVA. Foram obtidos médias e desvio padrão, nas quais as médias foram comparadas

através do teste *Tukey*, o nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$. As análises foram obtidas com o auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0*.

Para a contagem diferencial de leucócitos, a análise foi realizada utilizando a teoria de modelos lineares generalizados mistos, utilizando a distribuição de Poisson utilizando o procedimento GLIMMIX do Statistical Analysis System (SAS System, Inc., Cary, NC, USA) e, em caso de diferença significativa, foi aplicado o teste de *Tukey*

3 RESULTADOS

3.1 ENSAIO ANTI-HELMÍNTICO EM CAMUNDONGOS

Foram observados ovos de nematoides nas fezes dos camundongos, no decorrer dos 15 dias de experimento, exceto para os camundongos do controle não infectado (G1) (Figura 1 A). Os níveis de OPG se mantiveram superiores no grupo G2 (controle negativo DMSO 3%), exceto no dia 5 em que foi administrada a segunda dose de tratamento, onde foi observado similaridade entre a contagem de OPG dos grupos. Ao final do experimento a média de OPG nas fezes foi maior em G2 quando comparado ao grupo tratado com extrato aquoso de *C. citratus* (G3).

A contagem de nematoides adultos no intestino delgado dos animais infectados revelou uma média de 43,4 (G2) parasitos enquanto o grupo infectado e tratado com *C. citratus* (G3) a média foi de 4,87 parasitos. Esta diferença foi significativa ($p < 0,05$).

Não foi observada variação no hematócrito dos indivíduos entre os grupos G2 (37%) e G3 (43%), porém quando comparados ao grupo G1 foi observado um aumento entre 1 a 6% (Figura 1C).

Na contagem diferencial de leucócitos (Tabela 1), podemos observar diferença entre os grupos. O grupo G2 teve maior contagem de neutrófilo e eosinófilo que os demais grupos. Todos os grupos apresentaram monócito, basófilo e bastões sem diferenças significativas. Não houve diferença significativa entre eosinófilo, linfócito e neutrófilo entre G1 e G3. Linfócito sem diferença significativa entre G2 e G3.

Para o G1 a análise histopatológica não demonstrou lesões no intestino delgado dos animais não infectados (Figura 2A e B). Foram observadas lesões típicas de enterite granulomatosa crônica ativa, na camada muscular dos indivíduos do grupo G2 (Figura 2C). Foi notada a presença demasiada de eosinófilos na lesão, indicada pela seta vermelha (Figura 2D). O grupo G3 tratado com *C. citratus*, (Figura 2E) estava semelhante ao G1 e apresentava lesões leve, indicada pela seta vermelha (Figura 2F). Não foram observadas diferenças na histopatologia dos tecidos do fígado entre os grupos G1 (Figura 3A e B), G2 (Figura 3C e D) e G3 (Figura 3E e F). Também não foram encontradas alterações na

histologia dos tecidos dos rins entre os grupos G1 (Figura 4A e B), G2 (Figura 4C e D) e G3 (Figura 4E e F).

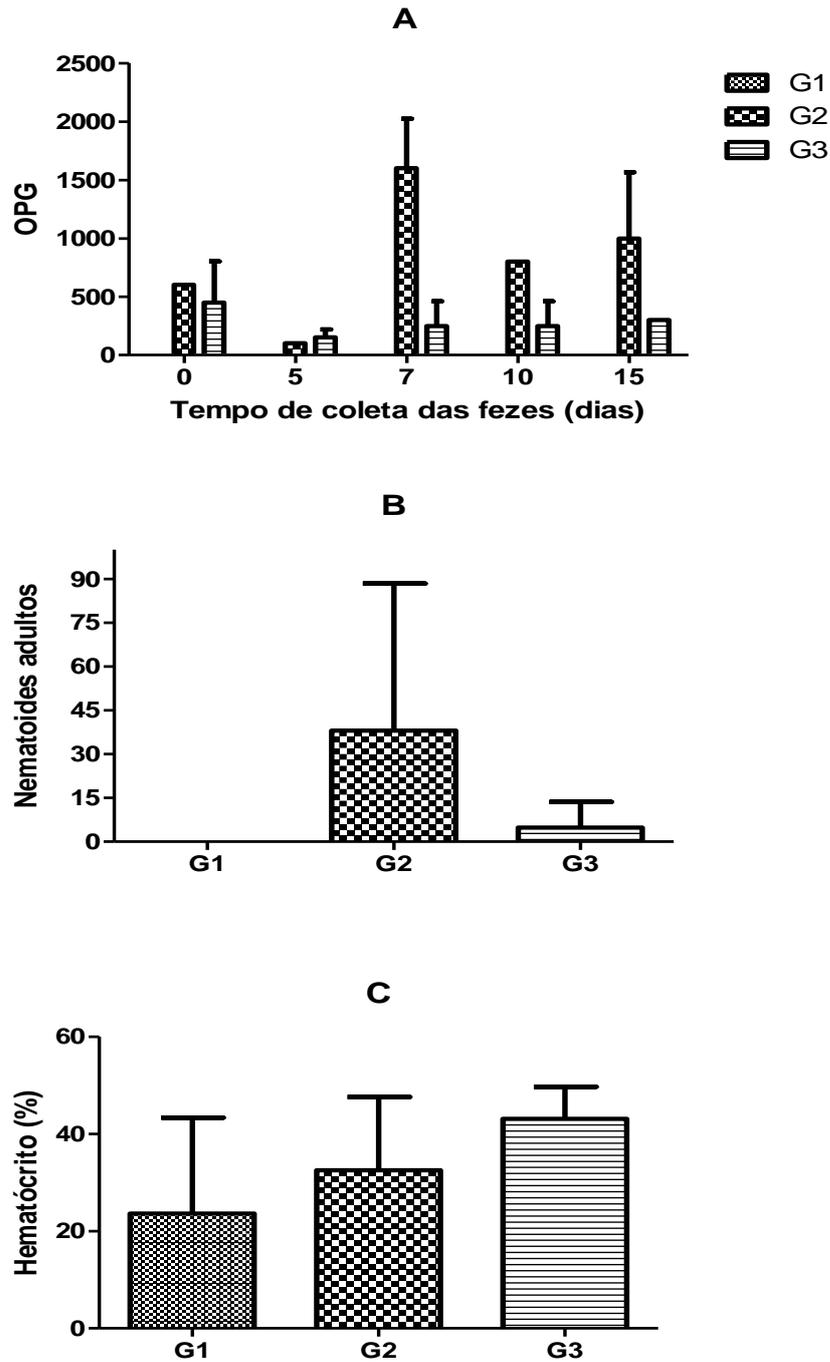


Figura 1. Teste de eficácia *in vivo* *H. polygyrus*. Os gráficos representam: (A) o número de OPG obtidos durante os 15 dias de experimento; (B) número de nematoides adultos encontrados nos camundongos e (C) valor percentual do número de hemácias obtidos dos camundongos após necropsia dos animais. Grupos: G1. Controle Não Infectado; G2. Controle Infectado Tratado com DMSO e G3 Infectado tratado com extrato aquoso de *C. citratus*.

Tabela 1. Número médio de leucócitos de camundongos não infectados (G1) e infectados (G2, G3) com *Heligmosomoides polygyrus* e tratados com extrato aquoso de *Cymbopogon citratus* (G3).

Grupos	Leucócitos					
	Neutrófilo	Monócito	Linfócito	Eosinófilo	Basófilo	Bastão
G1	4 (3.1, 5.2) ^a	5.8 (4.7, 7.2) ^a	90 (85.2, 95.0) ^a	0 (0, 0) ^a	0 (0, 0) ^a	0.2 (0.1, 0.6) ^a
G2	9.6 (8.3, 11.0) ^b	5.4 (4.4, 6.5) ^a	80.8 (76.9, 84.8) ^b	1.9 (1.4, 2.6) ^b	0.2 (0.1, 0.5) ^a	0.1 (0.0, 0.4) ^a
G3	5.2 (4.3, 6.3) ^a	7.4 (6.3, 8.7) ^a	86.1 (82.1, 90.2) ^{a,b}	0.5 (0.3, 1.0) ^a	0.4 (0.2, 0.8) ^a	0.2 (0.1, 0.5) ^a

Média e intervalo de confiança de 95% (inferior e superior) entre parênteses. Compartilhar diferentes sobrescritos nas colunas significa que são significativamente diferentes uns dos outros.

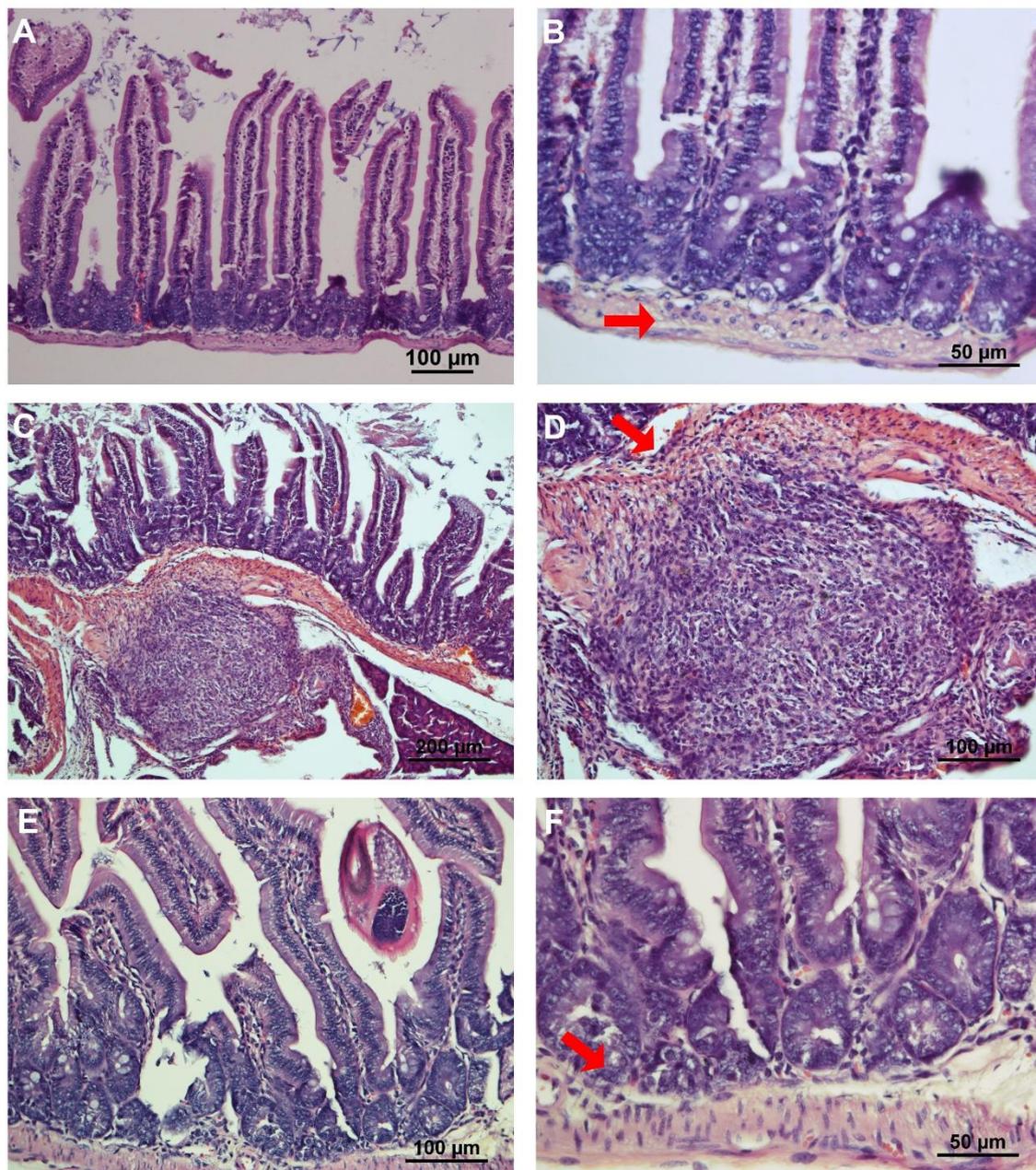


Figura 2. Análise histopatológica dos intestinos delgado dos camundongos. Controle não infectado apresentando normalidade em sua lâmina basal (A e B). O controle negativo (DMSO) apresentando enterite granulomatosa (crônica ativa) na camada muscular (C e D). O grupo tratado com *C. citratus*, apresentando enterite discreta (E e F). As setas vermelhas apontam a lâmina basal. Aumento de 10x (A, C e E), aumento de 20x (B e D) e aumento de 40x em E. Coloração HE.

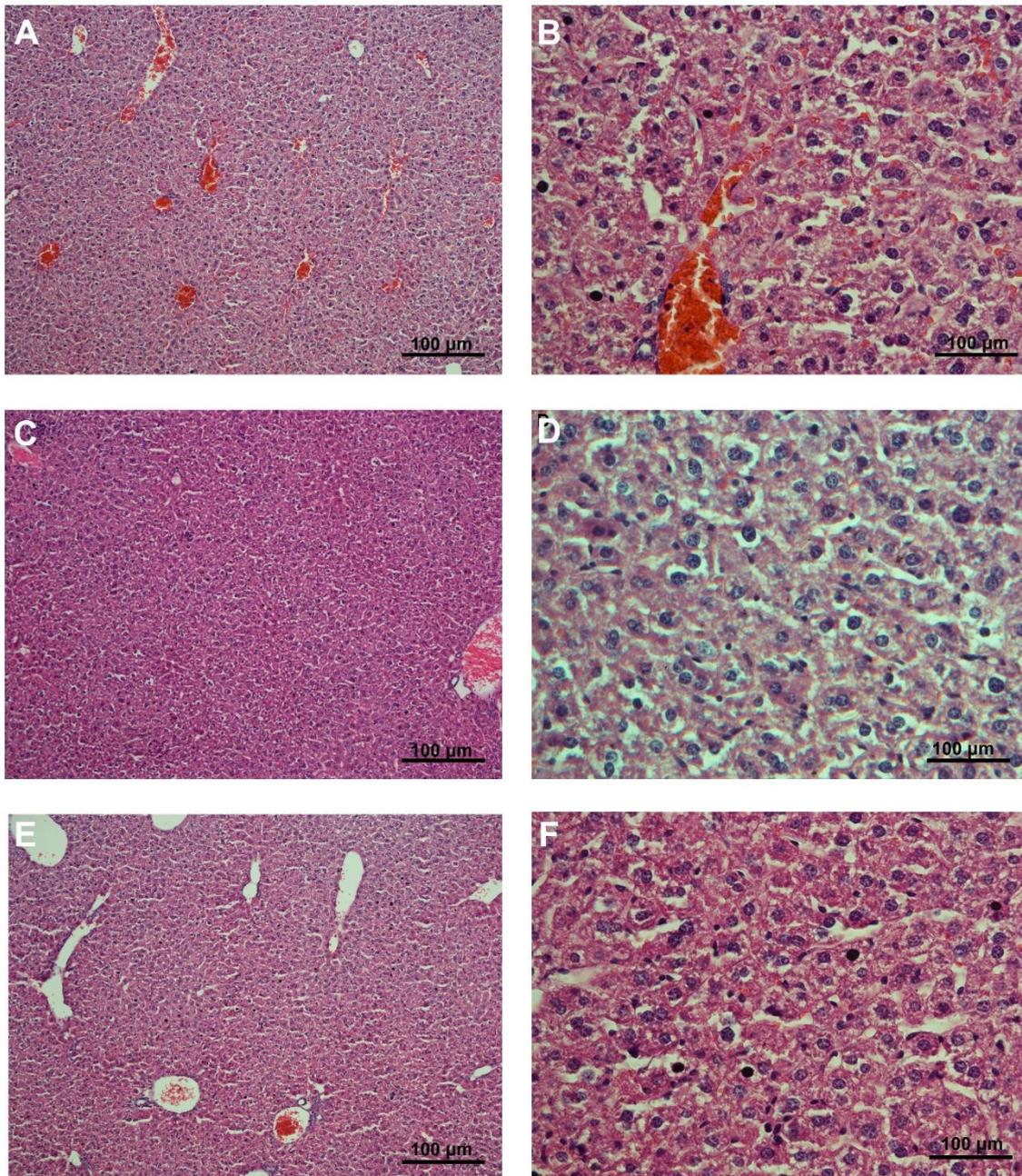


Figura 3. Análise histopatológica do fígado dos camundongos. Controle não infectado (A e B). O controle negativo (DMSO 3%) (C e D). O grupo tratado com *C. citratus*, (E e F). Ambos tecidos apresentam normalidade em sua morfologia. Aumento de 10x (A, C e E), aumento de 40x (B, D e F). Coloração HE.

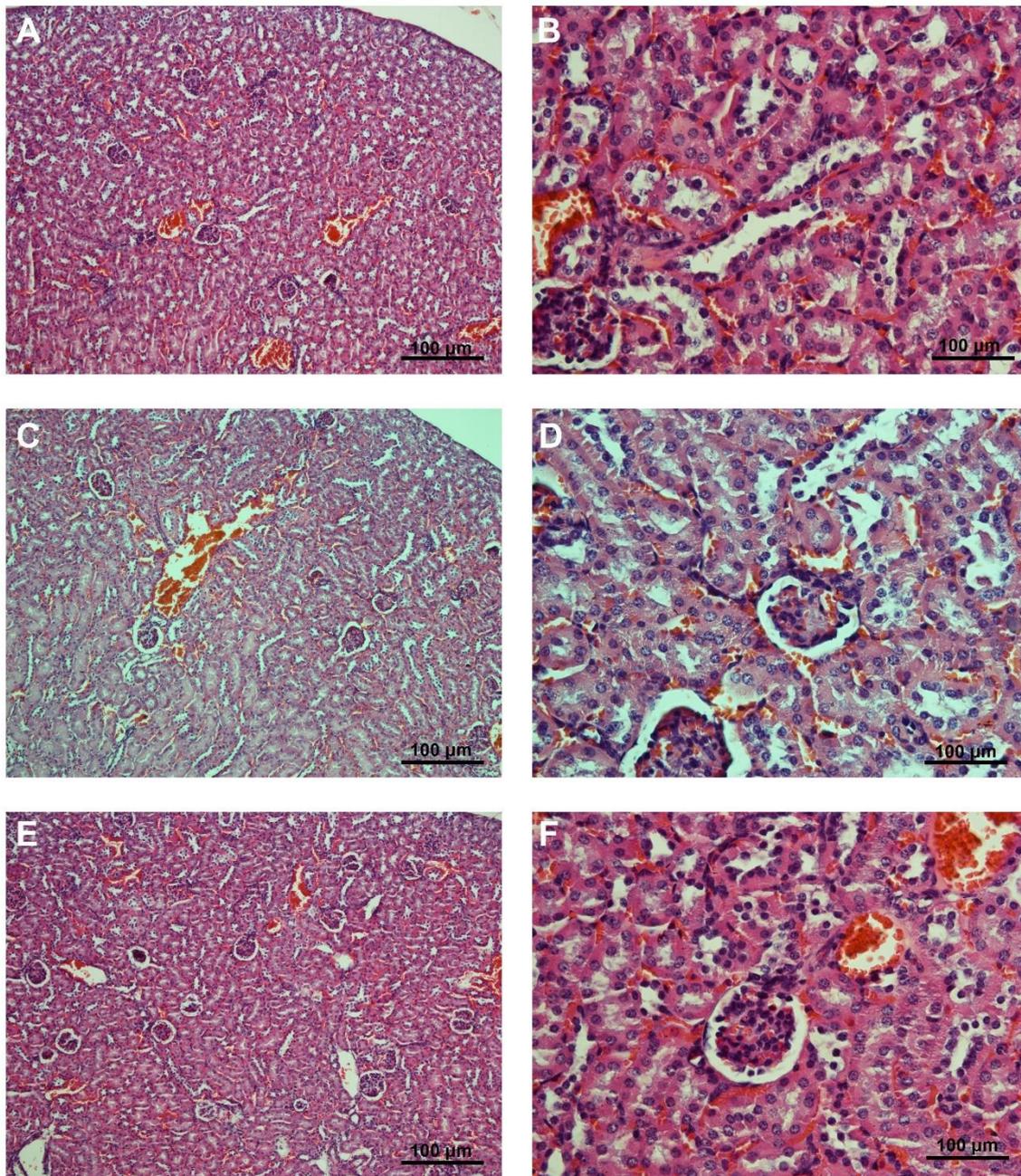


Figura 4. Análise histopatológica dos rins dos camundongos. Controle não infectado (A e B). O controle negativo (DMSO 3%) (C e D). O grupo tratado com *C. citratus*, (E e F). Ambos tecidos apresentam normalidade em sua morfologia. Aumento de 10x (A, C e E), aumento de 40x (B, D e F). Coloração HE.

3.2 ENSAIO ANTI-HELMÍNTICO EM OVINOS

Na contagem de OPG das fezes de ovinos, não foi encontrada redução do número de ovos durante os cinco dias de experimento (Figura 5A). Foi observado que o número de nematoides adultos encontrados no conteúdo do trato gastrointestinal no grupo controle foi maior em comparação a do grupo tratado (Figura 5B). A coprocultura realizada revelou que os animais apresentaram infecção mista com *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.* e *Oesophagostomum spp.* Durante a necropsia dos ovinos foram observados nódulos macroscópicos ao longo do intestino delgado e grosso dos animais do grupo controle, identificados pelas setas vermelhas (Figura 6A e B).

A intensidade dos nematoides encontrados na contagem foi de *Haemonchus* 2420, *Trichostrongylus* 8040 e *Oesophagostomum* 20 no grupo controle, totalizando 10530 nematoides. Para o grupo tratado foram contabilizados, *Haemonchus* 470, *Trichostrongylus* 3430 e *Oesophagostomum* 40, com o total de 3940 nematoides. A prevalência de *Haemonchus* e *Trichostrongylus* foi de 100% ao passo que a de *Oesophagostomum* foi de 80%, no grupo controle. Já no grupo tratado *Haemonchus* 100%, *Trichostrongylus* e *Oesophagostomum* 40% (Tabela 2).

A eficácia de *C. citratus* na RCOF foi de 65% em camundongos e não foi demonstrada eficácia em ovinos. Quanto aos nematoides adultos em camundongos e ovinos, foi observada respectivamente, 87% e 62% de eficácia.

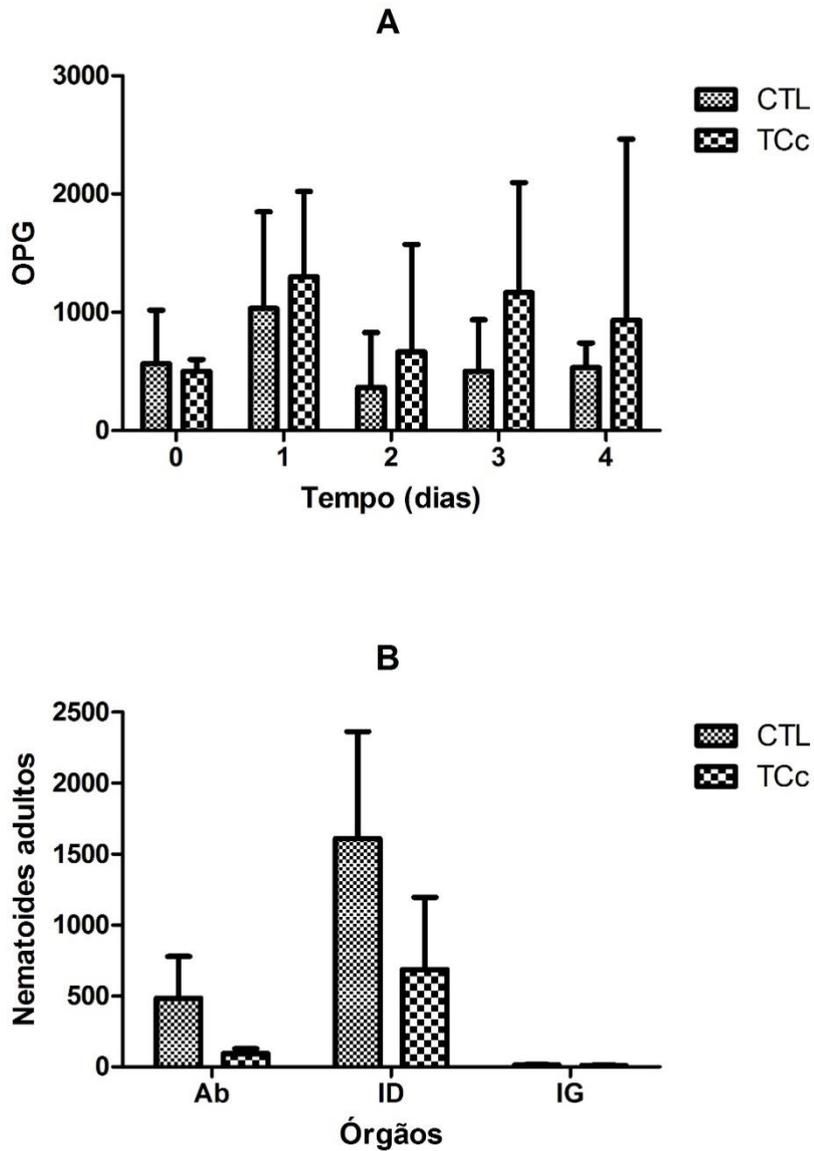


Figura 5. Ensaio anti-helmíntico de eficácia em ovinos. (A) a média de OPG obtidos durante os cinco dias de tratamento; (B) número de nematoides adultos encontrados no conteúdo do trato gastrointestinal dos ovinos. Ab referente ao conteúdo do abomaso; ID- intestino delgado e IG- intestino grosso. Grupos: Controle (CTL); tratado com ração complexada com *Cymbopogon citratus* (TCc).

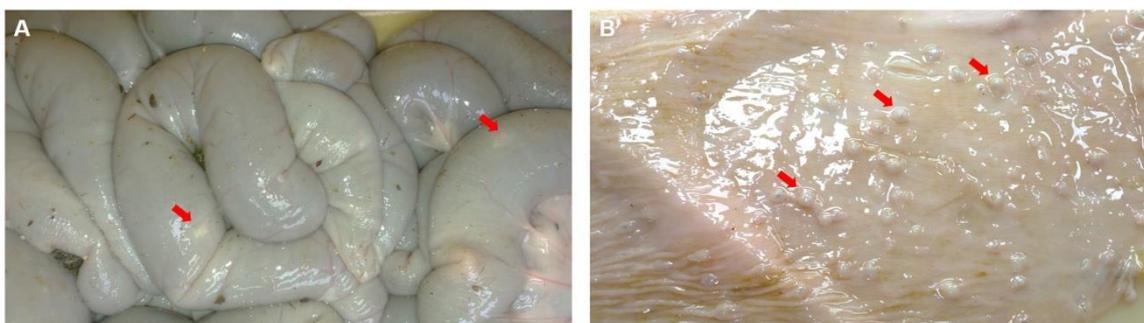


Figura 6. Nódulos macroscópicos no intestino delgado. Observa-se a presença de nódulos vistos externos no intestino delgado (A). Após a retirada do conteúdo intestinal, pode-se observar a quantidade de nódulos (B). As setas vermelhas indicam os nódulos.

Tabela 2. Intensidade e prevalência de parasitos encontrados no conteúdo do trato gastrointestinal de ovinos.

Nematoides	Intensidade (Prevalência%)	
	Controle	Tratado <i>C.citratus</i>
<i>Haemonchus spp.</i>	2420 (100%)	470 (100%)
<i>Trichostrongylus spp.</i>	8040 (100%)	3430 (40%)
<i>Oesophogostomum spp.</i>	20 (80%)	40 (40%)
Total	10530	3940

Tabela 3. Eficácia de *Cymbopogon citratus* na RCOF e na contagem de nematoides adultos em camundongos e ovinos.

Modelo	Eficácia (%)	
	RCOF	Adultos
Camundongos	65%	87%
Ovinos	--	62%

4 DISCUSSÃO

O uso indiscriminado de fármacos anti-helmínticos para o controle de parasitos gerou uma alta taxa de resistência parasitária (MOLENTO, 2004), tornando necessário a busca por novos métodos de controle. As plantas medicinais têm ganhado destaque por serem uma possível solução de baixo custo e fácil acesso pelos produtores. Neste estudo, investigamos e demonstramos o efeito *in vivo* do *Cymbopogon citratus* (capim limão) contra nematoides gastrintestinais de ovinos e *H. polygyrus*, um nematoide de camundongos.

Os testes em camundongos demonstraram que ocorreu redução do OPG nos dias iniciais do grupo tratado com *C. citratus* (Figura 1 A), onde foi observado a eficácia de 65% sobre a TRCOF de *H. polygyrus* e 87% sobre nematoides adultos (Tabela 3), enquanto no grupo controle os níveis de OPG aumentaram com o decorrer dos dias de experimento (Figura 1A). MACEDO et al. (2015), trabalhando com *Meriones unguiculatus* (Gerbil) infectados com *H. contortus* observaram redução de 38,5% da carga parasitária de animais tratados com óleo essencial de *C. citratus* na dose de 800mg/kg. Nossos resultados utilizando dosagem menor (50mg/kg) mostram uma eficácia maior na redução da carga parasitária. Isto pode ser decorrência dos constituintes químicos presentes no cultivar de capim utilizado bem como a forma de administração que pode ser o óleo essencial, decocção, extrato aquoso ou alcoólico.

A contagem de leucócitos realizada neste estudo, mostra algumas alterações sanguíneas tais como, neutrofilia e eosinofilia em camundongos infectados com *H. polygyrus*. De acordo com MONROY (1992), murinos infectados com *H. polygyrus* podem sofrer alterações imunológicas que incluem: esplenomegalia, linfadenopatia mesentérica, leucocitose, eosinofilia, neutrofilia, ativação de macrófagos e ativação do complemento. Houve diferença estatística significativa, sobre a diminuição da neutrofilia, eosinofilia e linfocitopenia em camundongos do grupo G3 pode indicar que o tratamento com *C.citratus* atuou na diminuição da carga parasitária, induzindo o organismo a retornar à homeostase sanguínea (Tabela 1).

As lesões eosinofílicas encontradas na parede muscular do intestino delgado do grupo (G2) são devido à alta carga de infecção parasitária (Figura 2C e D). Isto ocorre devido à infecção por *H. polygyrus* causar a deficiência de

interleucina-21 resultando na formação reduzida de granulomas intestinais, expansão e sobrevivência de células T prejudicadas e menor número de basófilos circulantes e eosinófilos (REYNOLDS; FILBEY; MAIZELS, 2012). O fato das lesões serem moderadas ou a ausência das mesmas (Figura 2E e F), sugere que o tratamento com *C. citratus* está sendo eficaz. A ausência de lesões no fígado e nos rins (Figuras 3 e 4) corrobora com a falta de toxicidade de *C. citratus* para as células do organismo hospedeiro, demonstrada por ROCHA, 2016.

Os resultados dos testes em camundongos indicam que além de diminuir o OPG e a carga de parasitos adultos, o tratamento com extrato aquoso de *C. citratus* pode induzir a uma maior agilidade no processo de estabilização e diminuição das lesões. COSTA et al. (2016) descreveram que a presença de polifenóis, taninos e flavonoides em *C. citratus* podem contribuir para o efeito anti-inflamatório tópico, podendo ser utilizado no tratamento de patologias inflamatórias relacionadas à pele. Em nosso estudo, poderia estar ocorrendo uma atuação dos mesmos constituintes sobre as lesões intestinais causadas pela infecção com *H. polygyrus*, e após o tratamento apenas restarem às lesões moderadas ou o retorno à normalidade da morfologia dos tecidos. Portanto, é possível que *C. citratus* além de agir diretamente no parasito provocando sua morte também contribua para a recuperação tecidual das lesões provocadas por estes.

Não foi observada a redução do OPG em ovinos durante os dias de administração de *C. citratus*. É possível que isso tenha ocorrido devido as coletas terem sido feitas apenas nos dias da administração e não no dia da necropsia. SILVA et al. (2005) descreveram redução significativa do OPG em ovinos após tratamento com extrato alcoólico de *C. citratus* na dosagem única ou a intervalos de três ou quatro dias contendo 20mg/Kg, porém a análise foi efetuada após 10 dias da administração. Embora não tenha sido observada diferença no TRCOF em ovinos, após os dias de tratamento com *C. citratus* houve redução na contagem de nematoides adultos (Tabela 2) mostrando que o tratamento foi eficaz em 62% (Tabela 3).

A diferença na eficácia dos testes em camundongos e ovinos pode estar relacionada ao trato digestivo de cada animal. Camundongos são monogástricos, permitindo que o tratamento chegue mais rápido ao órgão alvo. Os ovinos por sua vez são ruminantes, poligástricos, assim o tratamento demora mais tempo para chegar aos órgãos alvo. A reatividade dos compostos presentes no

extrato aquoso pode ser mais eficaz quando comparados à eficácia da planta seca e triturada complexada a ração.

A coprocultura feita com o intuito de identificar os parasitos predominantes nos ovinos revelou a presença de uma infecção mista composta por: *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus spp.* e *Oesophagostomum spp.*. *Haemonchus contortus* é apontada como a principal espécie de nematoide que parasita ovinos no Brasil (AMARANTE, 2015). Neste estudo, houve predominância de *Trichostrongylus spp* na infecção dos animais tanto controle quanto tratado com *C. citratus*, com a intensidade de 8040 e 3430 (Tabela 2), respectivamente.

5 CONCLUSÃO

O extrato aquoso de *C. citratus* foi eficaz no tratamento *in vivo* de *H. polygyrus* em camundongos. Mais estudos *in vivo* em ovinos são necessários uma vez que a formulação usada foi a ração complexada ao *C. citratus*, onde não foi observada eficácia na redução do OPG, porém foi notada eficácia frente a nematoides adultos gastrintestinais de ovinos.

A interessante redução das lesões intestinais causadas, após o tratamento com *C. citratus*, induz a novas perspectivas de pesquisa do seu uso para controle alternativo das nematodioses gastrintestinais e possível ação concomitante sobre tecidos lesionados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, MARIA ÂNGELA O.; ALMEIDA, GISELE N.; BOTURA, MARIANA B.; DOMINGUES, LUCIANA F.; COSTA, SILVIA L. Efeitos dos extratos aquosos de *Cymbopogon citratus* (DC .) Stapf (Capim-santo) e de *Digitaria insularis* (L .) Fedde (Capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 12, n. 3, p. 125–129, 2003.

AMARANTE, A. F. T. .; SALES, R. O. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. **Revista Brasileira Higiene e Sanidade Animal.**, v. 1, n. 2, p. 14–36, 2007.

AMARANTE, A. F. T.; SILVA, B. F. DA; RAGOZO, A. M. A. **Os parasitas de ovinos**. São Paulo: Unesp, 2015.

AVOSEH, O.; OYEDEJI, OPEOLUWA R. P.; NKEH-CHUNGAG, B.; OYEDEJI, A. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7438–7453, 2015.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.

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

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 97–106, 2005.

CEZAR, A. S.; CATTO, J. B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 38,

n. 7, p. 2083–2091, 2008.

CHARLES, T. P.; FURLONG, J. Doenças parasitárias dos bovinos de leite. **Coronel Pacheco : EMBRAPA-CNPGL**, 1992.

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

COSTA, G.; PINTO, J. F.; VITORINO, C.; PINA, M. E.; SOUSA, J. J.; FIGUEIREDO, I. V. BATISTA, M. T. Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 222–228, 2016.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65–71, 2011.

COSTA COELHO, W. A.; MENDES AHID, S. M.; VIEIRA, L. S.; SOUZA FONSECA, Z. A.; SILVA, I. P. Resistência Anti-Helmíntica Em Caprinos No Município De Mossoró, Rn. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, 2010.

DA SILVA SOBRINHO, A. G.; PURCHAS, R. W.; KADIM, I. T.; YAMAMOTO, S. M. Características de Qualidade da Carne de Ovinos de Diferentes Genótipos e Idades ao Abate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1129–1134, 2005.

DE AQUINO MESQUITA, M.; SILVA JÚNIOR, J. B.; PANASSOL, A. M.; DE OLIVEIRA, E. F.; VASCONCELOS, A. L. C. F.; DE PAULA, H. C. B.; BEVILAQUA, C. M. L. Anthelmintic activity of *Eucalyptus staigeriana* encapsulated oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Parasitology Research**, v. 112, n. 9, p. 3161–3165, 2013.

DE GIVES, P. M.; ARELLANO, ME L.; HERNÁNDEZ, E. L.; MARCELINO, L. A. Plant extracts: a potential tool for controlling animal parasitic nematodes. In: ISHWARAN, N. (Ed.). **The biosphere**. p. 119–131.

DOS SANTOS, V.T. GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpes de *Haemonchus contortus* resistentes ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade Agronomia e Veterinária**, v. 9, p. 201–211, 1967.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYANT, Z.N.; ELAM, G.W. Field studies on parasite control of sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 1512–1518., 1964.

DRUDGE, J. H.; ELAM, G. Preliminary observations on the resistance of horse strongyles to phenothiazine. **Journal of Parasitology**, v. 47, p. 38–39, 1961.

DRUDGE, J. H.; LELAND, S. E.; WYANT, Z. N. Strain variation I. in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. Studies of mixed infections in experimental animals. **American Journal of Veterinary Research**, v. 18, p. 133–141, 1957.

FALZON, L.C.; O'NEILL, T.J.; MENZIES, P.I.; PEREGRINE, A.S.; JONES-BITTON, A.; VANLEEJWEN, J.; MEDEROS, A. A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, n. 2, p. 388–402, 2014.

GITHIORI, J. B. et al. The anthelmintic efficacy of the plant , *Albizia anthelmintica* , against the nematode parasites *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. v. 116, p. 23–34, 2003.

GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 308–320,

2006.

HANSEN, J.; PERRY, B. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 129, 1994.

HOLSBACK, L.; DE SOUZA MARQUEZ, E.; MENEGHEL, P. P. Resistência parasitária de helmintos gastrointestinais e avaliação dos parâmetros hematológicos de ovinos no norte do Paraná. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 1, p. 85–92, 2013.

JOHNSTON, CHRIS J. C.; ROBERTSON, E.; HARCUS, Y.; GRAINGER, J. R.; COAKLEY, G.; SMYTH, D. J.; MCSORLEY, H. J.; MAIZELS, R. Cultivation of *Heligmosomoides Polygyrus*: An Immunomodulatory Nematode Parasite and its Secreted Products. **Journal of Visualized Experiments**, n. 98, p. 1–10, 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, n. 1, p. 103–108, 2011.

KHANUJA, SUMAN P.S.; SHASANY, AJIT K.; PAWAR, A.; LAL, R. K.; DAROKAR, M. P.; NAQVI, A. A.; RAJKUMAR, S.; SUNDARESAN, V.; LAL, N.; KUMAR, S. Essential oil constituents and RAPD markers to establish species relationship in *Cymbopogon* Spreng. (Poaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 2, p. 171–186, 2005.

LITTLE, P R.; HODGE, A.; WATSON, T. G.; SEED, J. A.; MAEDER, S. J.; Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic , derquantel- abamectin , in sheep in New Zealand anthelmintic , derquantel-abamectin , in sheep in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 169, n. April 2016, p. 121–129, 2010.

LITTLE, P. R.; HODGE, A.; MAEDER, S. J.; WIRTHERLE, N. C.; NICHOLAS, D. R.; COX, G. G.; CONDER, G. A. Efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 180–193, 2011.

MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; RIBEIRO, W. L. C.; SANTOS, J. M. L.; SILVA, K. C.; FILHO, J. V. A.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILÁQUA, C. M. L. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 268–275, 2015.

MACIEL, S.; GIMÉNEZ, A. M.; GAONA, C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Paraguay. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 3–4, p. 207–212, 1996.

MARTINS, E. C.; MAGALHÃES, K. A.; SOUZA, J. D. F.; GUIMARÃES, V. P.; BARBOSA, C. M. P. FILHO, Z. F. H. Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura. **Boletim Ativos Ovinos e Caprinos**, v. 2, p. 3–6, 2016.

MOLENTO, C. F. M. Animal welfare and production: economic aspects – Review. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, 2005.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 82–87, 2004.

MOLENTO, M. B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 3, p. 229–234, 2009.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; AMARANTE, A. T.; VAN WYK, J. A.; CHAGAS, A. C. S.; DE ARAÚJO, J. V.; BORGES, F. A. Alternativas para o controle

ce nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 2, p. 253–263, 2013.

MONROY, F. G.; ENRIQUEZ, F. J. *Heligmosomoides polygyrus*: A model for chronic gastrointestinal helminthiasis. **Parasitology Today**, v. 8, n. 2, p. 2–6, 1992.

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

NICIURA, S. C. M.; VERÍSSIMO, C. J.; MOLENTO, M. B. **Determinação da Eficácia Anti-Helmintíca em Rebanhos Ovinos: Metodologia de Colheita de Amostras e de Informações de Manejo Zoossanitário**. 1. ed. São Carlos - SP: p. 12-13.

OLIVEIRA, G. L. DE; OLIVEIRA, A. F. M. DE; ANDRADE, L. DE H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 571–577, 2010.

OLORUNNISOLA, S. K. et al. Biological properties of lemongrass: An overview. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 455–462, 2014.

PASQUALE, A. **Pharmacognosy: The oldest modern science** *Journal of Ethnopharmacology*, 1984.

PLAYFORD, M. C.; SMITH, A. N.; LOVE, S.; BESIÉ, R. B.; KLUVER, P.; BAILEY, J. N.; PLAYFORD, M. C. Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009-2012). **Australian Veterinary Journal**, v. 92, n. 12, p. 464–471, 2014.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603–613, 2001.

REY, L. **Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África**. 3ª ed. editora: Guanabara Koogan S.A., 2001.

REYNOLDS, L. A.; FILBEY, K. J.; MAIZELS, R. M. Immunity to the model intestinal helminth parasite *Heligmosomoides polygyrus*. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 829–846, 2012.

RIBEIRO, W. L. C.; MACEDO, I. T. F.; DOS SANTOS, J. M. L.; OLIVEIRA, E. F.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; DE PAULA, H. C. B.; BEVILAQUA, C. M. L. Activity of chitosan-encapsulated Eucalyptus staigeriana essential oil on *Haemonchus contortus*. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 1, p. 24–29, 2013.

RITTER, R. A.; MONTEIRO, M. V. B.; MONTEIRO, F. O. B.; RODRIGUES, S. T.; SOARES, M. L.; SILVA, J. C. R.; PALHA, M. D. C.; BIONDI, G. F.; RAHAL, S. C.; TOURINHO, M. M. Ethnoveterinary knowledge and practices at Colares island, Pará state, eastern Amazon, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 346–352, 2012.

ROCHA, L. O. ***Cymbopogon citratus* (DC) Stapf e *Allium sativum* L.: Avaliação da Atividade Nematicida, Toxicidade e Alterações Morfológicas e Ultraestruturais sobre Nematoides Gastrintestinais**. 2016.

ROEBER, F.; JEX, A. R.; GASSER, R. B. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1135–1152, 2013.

ROMERO, J.; BOERO, C. Dirección para correspondencia: Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la Argentina. **Analecta Veterinaria**, v. 21, n. 1, p. 21–37, 2001.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 25, n. 1, p. 3–17, 2016.

SANDOVAL JR, P.; OLIVERIA, R. V.; HENRIQUE, F.; XIMENES, B.; QUIRINO, C. M.; FIGUEIREDO, R. R.; PASSOS, F. **Manual de Criação de Caprinos e Ovinos**. 1. ed. Brasília-DF. p. 87-89.

SCHMIDT, G. D.; ROBERTS, L. S. **Foundations of parasitology (4th edn)**. 8th ed. ed. The McGraw-Hill Companies. v. 6. p. 371.

SHAH, G.; SHRI, R.; PANCHAL, V.; SHARMA, N.; SINGH, B.; MANN, A.S. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 1, p. 3–8, 2011.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

SILVA, W. W.; FLORA, A.; BRITO, S.; MARINHO, F. A.; ANDRADE, F.; RODRIGUES, O. G.; ATHAYDE, A. C. R. Agropecuária Científica no Semi-Árido Ação do extrato alcoólico do Capim Santo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) sobre nematóides gastrintestinais de ovinos Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) alcoholic extract action on gastrointestinal ne. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 1, p. 46–49, 2005.

SOUSA, R. G.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; MELO DINIZ, M. F. F.; BATISTA, L. M. Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: Uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 287–292, 2013.

SUTER, R. J.; BESIÉ, R. B.; PERKINS, N. R.; ROBERTSON, I. D.; CHAPMAN, H. M. Sheep-farm risk factors for ivermectin resistance in *Ostertagia circumcincta* in Western Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, n. 3–4, p. 257–269, 2004.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes** Japan International Cooperation Agency., 1998.

VAN WYK, J. A. Refugia - Overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. April 2001, p. 55–67, 2001.

VARGAS JÚNIOR, F. M.; LEÃO, A.G.; LONGO, M.L.; OSÓRIO, J.C. S.; OSÓRIO, M.T.M. LEONARDO, A.P. A Situação Dos Pequenos Ruminantes Na América Latina: Mercado E Potencial Futuro. **palestras do VIII Congresso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos**, p. 79–87, 2013.

VIANA, G. S.; VALE, T.G.; PINHO, R.S.N.; MATOS, F.J.A. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 3, p. 323–327, 2000.

VIEIRA, L. DA S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 22, p. 49–56, 2008.

VILLASEÑOR, I. M.; ANGELADA, J.; CANLAS, ARLYN P.; ECHEGOYEN, D. Bioactivity studies on beta-sitosterol and its glucoside. **Phytotherapy research : PTR**, v. 16, n. February 2001, p. 417–21, 2002.

WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M.; RHODES, A. P.; LAWRENCE, K. E.; JACKSON, R. POMROY, W. E.; WEST, D. M.; MOFFAT, J. R. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep farms in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, n. 6, p. 271–277, 2006.

ZEN, S. DE; SANTOS, M. C. DOS; MONTEIRO, C. M. Evolução Da Caprino E Ovinocultura. **Ativos da Pecuária de Caprino e Ovinocultura**, n. 1, p. 8–11, 2014.

