



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

EIDI YOSHIHARA

**EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DE TANINOS CONDENSADOS  
EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS (*OVIS  
ARIES*)**

EIDI YOSHIHARA

**EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DIRETO DE TANINOS  
CONDENSADOS EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE  
OVINOS (*OVIS ARIES*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Área de concentração: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

Y65e Yoshihara, Eidi.

Efeito anti-helmíntico direto de taninos condensados em nematódeos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aries*) / Eidi Yoshihara. - Londrina, 2012.  
66 f.: il.

Orientador: Milton Hissashi Yamamura.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Ovino - Doenças - Tratamento - Teses. 2. Ovino - Parasito - Teses. 3. Taninos -Uso terapêutico - Teses. 4. Matéria médica vegetal - Teses. 5. Parasitologia veterinária - Teses. I. Yamamura, Milton Hissashi. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.3

EIDI YOSHIHARA

**EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DIRETO DE TANINOS CONDENSADOS  
EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS (*OVIS ARIES*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Ademir Benedito da Luz Pereira  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Odilon Vidotto  
UEL – Londrina – PR

---

Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do  
Amarante  
UNESP – Botucatu – SP

---

Dr. Alessandro Pelegrine Minho  
Embrapa – Bagé – RS

Londrina, 25 de maio de 2012.

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Parasitologia, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, sob orientação do Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto à agência de fomento FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e o Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

## **DEDICO**

Aos meus familiares, em especial aos meus pais: Takashi e Rosa, que me apoiaram em todos os momentos e me incentivaram a prosseguir na jornada.

***"COM VOCÊS, DIVIDO MAIS ESTE SONHO REALIZADO".***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS, pela minha vida, por guiar e iluminar meus caminhos...

À minha família, pelo incentivo e dedicação em todos os momentos, sem os quais nada seria possível.

À Universidade Estadual de Londrina, ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela oportunidade da realização da Graduação em Medicina Veterinária, Mestrado e Doutorado em Ciência Animal.

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, pela oportunidade de realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura, agradeço pelo apoio, confiança e a transmissão de conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pelo trabalho como Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UEL pela formação acadêmica e científica, e aos colegas mestrados e doutorandos por compartilharem experiências.

À secretária Helenice Kieski por sua dedicação, atenção e extrema eficiência. Aos colaboradores deste trabalho:

Dr. Alessandro Pelegrine Minho, Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, Dra. Lílian Gregory, Mestrando Sérgio Tosi Cardim, Residente Víctor B. D. Tabacow, Dra. Andréia Lucianne Moreira e Dr. Vander Bruno dos Santos.

Ao Dr. Ademir Benedito da Luz Pereira, Dra. Roberta Lemos Freire e Dra. Célia G. T. J. Andrade, membros da banca de qualificação, que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos Doutores Ademir Benedito da Luz Pereira, Odilon Vidotto, Alessandro Francisco Talamini do Amarante e Alessandro Pelegrine Minho, membros da banca examinadora, que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Dr. Nobuyoshi Narita, diretor do Pólo Regional Alta Sorocabana, pela compreensão e incentivo para a conclusão do trabalho.

Aos Pesquisadores Científicos e equipe de apoio do Pólo Regional Alta Sorocabana, pelo companheirismo nos momentos das dificuldades.

Ao Dr. Alessandro Pelegrine Minho, que além de colaborador, é um grande amigo que sempre esteve presente nas horas das dificuldades.

À Profa. Dra. Ângela Teresa Silva e Souza, pela amizade de todas as horas, por compartilhar seus sonhos, seus projetos e suas conquistas.

À Dra. Lucienne Garcia Pretto Giordano, pela amizade e por não me deixar desistir nunca deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório José Aldevino, Dalva e Osvaldo pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos Pós-graduandos e Residentes que sempre estiveram presentes, independentemente do momento. Foram pessoas fundamentais, sendo muito atenciosos e sempre dando força para continuar nessa caminhada.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública do DMVP/CCA/UEL que estiveram ligados, direta ou indiretamente, à realização deste trabalho.

Aos amigos de sempre Thiago Moro Ueno e Rodrigo dos Reis Oliveira, que foram pontos de apoio nessa minha jornada em Londrina.

A todos aqueles que em algum momento passaram pela minha vida, deixando sempre palavras de amizade e incentivo.

***A VOCÊS, MINHA ETERNA GRATIDÃO!***

YOSHIHARA, Eidi. **Efeito anti-helmíntico direto de taninos condensados em nematódeos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aries*)**. 2012. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

As helmintoses gastrintestinais representam um dos principais problemas sanitários para o rebanho ovino. O uso intensivo de anti-helmínticos nestas criações, muitas vezes, em subdoses, aliado a problemas de manejo, tem selecionado isolados de helmintos resistentes a vários produtos comerciais. A fitoterapia tem sido indicada principalmente para reduzir os custos dos tratamentos e prolongar a vida útil dos produtos anti-helmínticos disponíveis no mercado. O uso de plantas ricas em taninos condensados (TC) para reduzir uso de produtos químicos, pode ser indicado como uma alternativa no controle de helmintos em ovinos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito anti-helmíntico dos TC sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos. Durante o período de testes foram realizados dois ensaios experimentais: Experimento 1 - Efeito anti-helmíntico de taninos condensados em nematódeos gastrintestinais de ovinos, para avaliar *in vitro* o efeito anti-helmíntico dos TC proveniente do extrato de acácia (*Acacia mearnsii*) (EA) sobre ovos e larvas de terceiro estágio. O EA na concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup> inibiu 100% da eclosão de ovos e a concentração letal capaz de inibir 50% (CL<sub>50</sub>) da eclosão foi de 2,85 mg mL<sup>-1</sup>. No teste de inibição da migração larval, também na concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup>, a inibição foi de 97,1% e a CL<sub>50</sub> foi de 12,45 mg mL<sup>-1</sup>. Experimento 2 - Alterações ultraestruturais da cutícula de *Haemonchus contortus* tratados com EA. No teste *in vitro* os parasitos foram expostos ao extrato de acácia (100 mg mL<sup>-1</sup>) por duas horas. Ocorreram alterações ultraestruturais na cutícula, representado por rugas transversais e rupturas da cutícula com aumento de volume e distorções das estrias cuticulares e possível extravasamento de material interno. No teste *in vivo*, o ovino recebeu via oral o EA diluído em água morna (1,6 g kg<sup>-1</sup> PV) durante três dias. Foi observada a presença de rupturas da cutícula com aumento de volume com distorções das estrias cuticulares e aparentemente extravasamento de material interno. Na região cefálica ocorreram alterações ultraestruturais com perda da integridade da cutícula. A ação direta dos TC sobre ovos, larvas de terceiro estágio e adultos foi demonstrada no presente estudo, porém mais estudos são necessários para a indicação de um controle de parasitos baseado no uso de fontes de TC.

**Palavras-chave:** Helmintos gastrintestinais. Taninos. Teste *in vitro*. Ação direta. Microscopia eletrônica.

YOSHIHARA, Eidi. **Direct Anthelmintic effect of condensed tannins in gastrointestinal nematodes of sheep (*Ovis aries*)**. 2012, 66 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

### ABSTRACT

Gastrointestinal helminthosis are one of the main sanitary problems in sheep. The inadequate intensive usage of anthelmintics on these animals, added to management problems, causes the selection of isolates which are resistant to many commercial products. Phytotherapy is being prescribed mainly to reduce treatment costs and to increase the lifetime of commercial anti-helminthic. The usage of plants rich in condensed tannins (CT) to reduce the use of chemical products can be indicated as an alternative in sheep helminths control. The objective of this study was to evaluate the antihelminthic effect of CT from *Acacia mearnsii* extract (AE) on sheep gastrointestinal nematodes. During the experimental assays were performed: Experiment 1 - Were carried out to evaluate *in vitro* antihelminthic effect of the CT from the AE on eggs and third larvae stage of sheep gastrointestinal nematodes. The AE in concentration of 100 mg mL<sup>-1</sup> inhibited the eggs hatching at 100% and the letal concentration that inhibit 50% (LC<sub>50</sub>) of the hatching was 2.85 mg mL<sup>-1</sup>. In larval migration the inhibition was 97.1% in concentration of 100 mg mL<sup>-1</sup> and the LC<sub>50</sub> was 12.45 mg mL<sup>-1</sup>. Experiment 2 - *Haemonchus contortus* were exposed to AE (100 mg mL<sup>-1</sup>) for two hours. After this period, was observed ultrastructural alterations in the larval cuticle, represented by transverse wrinkles and cuticle rupture with volume increase and cuticle strial distortions and possible extravasation of internal material. In *in vivo* test, were drench with AE (1.6 g kg<sup>-1</sup> BW) diluted with warm water during three days. It was observed cuticle rupture with volume increase, cuticle strials distortions and probable extravasation of internal material. In the cephalic region it was observed ultrastructural alterations with loss of the cuticle integrity. Direct action of CT in eggs, third stage larval and adults was evidenced in this study, however more studies are necessary to indicate the uses of CT in parasite control.

**Key words:** Gastrointestinal helminthes. Tannins. *In vitro* test. Direct action. Electron microscopy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 3.1 EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DE TANINOS CONDENSADOS EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS (*Ovis aries*).

**FIGURA 1** – Curva dose-resposta de eficácia do extrato de *Acacia mearnsii* em concentrações crescentes, em teste de inibição da eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos.....51

**FIGURA 2** – Curva dose-resposta de eficácia do extrato de *Acacia mearnsii* em concentrações crescentes, em teste de inibição da migração de larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais de ovinos.....52

Artigo 3.2 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DA CUTÍCULA DE *Haemonchus contortus* TRATADOS COM *Acacia mearnsii*.

**FIGURA 1** – Eletromicrografia de varredura mostrando a ultraestrutura externa de *Haemonchus contortus* que foram expostos a solução fisiológica (C) e ou expostos ao extrato de *Acacia mearnsii* (T). C<sub>1a</sub> e C<sub>2a</sub>: Cutícula normal.....62

**FIGURA 2** – Eletromicrografia de varredura de *Haemonchus contortus* obtidos de animais alimentados com dieta livre de fontes de taninos (C) e submetidos ao tratamento com extrato de *Acacia mearnsii* (T). C<sub>1b</sub>: cutícula normal, C<sub>2b</sub>: região cefálica normal. (\* Lanceta dorsal) .....62

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Média de inibição de eclosão de ovos e de migração de larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais de ovinos (porcentagem $\pm$ DP) após contato prévio com extrato de <i>Acacia mearnsii</i> em concentrações crescentes .....	51
--	----

## LISTA DE SIGLAS

B.O.D	Demanda bioquímica de oxigênio
CL	Concentração letal
DP	Desvio padrão
EA	Extrato de <i>Acacia mearnsii</i>
EQ	Extrato de quebracho
h	Hora
IEO	Inibição da eclosão de ovos
IAL	Inibição da alimentação larval
IC	Intervalo de confiança
IML	Inibição da migração larval
L1	Larva de primeiro estágio
L3	Larvas de terceiro estágio
ME	Microscopia eletrônica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Min	Minutos
NGI	Nematódeos gastrintestinais
OPG	Ovos por grama de fezes
TC	Taninos condensados
TD	Teste de desembainhamento
TDL	Teste de desenvolvimento larval
TMA	Teste de motilidade de adultos
Vol	Volume

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
mL	mililitro
$\mu\text{L}$	microlitro
kg	kilograma
$\text{MQ mL}^{-1}$	Micrograma por mililitro
$\text{mg mL}^{-1}$	Miligrama por mililitro
%	porcentagem
pH	Potencial de hidrogeniônico
$\text{g kg}^{-1} \text{PV}$	gramas por quilo de peso vivo
g	grama
kg	kilograma
Mm	micrômetro
NaCl	Cloreto de sódio
GL	Gay Lussac
x g	gravidade

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
1.1 PARASITISMO EM OVINOS.....	15
1.2 CONTROLE DO PARASITISMO GASTRINTESTINAL E RESISTÊNCIA.....	17
1.3 PLANTAS COM ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA.....	19
1.4 TANINOS CONDENSADOS .....	21
1.5 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTI-HELMÍNTICAS DE PLANTAS .....	23
1.6 PESQUISAS NO BRASIL.....	26
1.7 AÇÃO DIRETA NO PARASITO .....	28
1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	30
REFERÊNCIAS.....	32
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	39
2.1 GERAL.....	39
2.2 ESPECÍFICOS .....	39
<b>3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	40
3.1 EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DIRETO DE TANINOS CONDENSADOS EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS.....	40
3.1.1 Introdução .....	41
3.1.2 Material e Métodos .....	42
3.1.2.1 Animais.....	42
3.1.2.2 Fonte de taninos condensados.....	42
3.1.2.3 Isolamento de ovos e larvas de terceiro estágio.....	42
3.1.2.4 Teste de eclodibilidade de ovos (IEO) .....	43
3.1.2.5 Teste de inibição da migração larval (IML) .....	43
3.1.3 Análise Estatística.....	44
3.1.4 Resultados .....	44
3.1.4.1 Inibição da eclosão de ovos .....	44
3.1.4.2 Inibição da migração larval .....	45
3.1.5 Discussão .....	45
3.1.6 Conclusões .....	47
REFERÊNCIAS.....	48

3.2 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DA CUTÍCULA DE <i>HAEMONCHUS CONTORTUS</i> TRATADOS COM <i>ACACIA MEARNsii</i> .....	53
3.2.1 Introdução .....	54
3.2.2 Material e Métodos .....	55
3.2.2.1 Fonte de taninos condensados.....	55
3.2.2.2 Teste <i>in vitro</i> .....	55
3.2.2.3 Adultos de <i>Haemonchus contortus</i> .....	55
3.2.2.4 Exposição dos parasitos ao extrato.....	55
3.2.2.5 Teste <i>in vivo</i> .....	56
3.2.2.6 Processamento do material para microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	56
3.2.3 Resultados.....	57
3.2.3.1 Estudo <i>in vitro</i> .....	57
3.2.3.2 Estudo <i>in vivo</i> .....	57
3.2.4 Discussão .....	58
3.2.5 Conclusões .....	59
REFERÊNCIAS.....	60
<b>4 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>63</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>64</b>
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação .....	65
Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação.....	66

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### EFEITO ANTI-HELMÍNTICO DE TANINOS CONDENSADOS EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS (*OVIS ARIES*): REVISÃO

**RESUMO:** As helmintoses gastrintestinais constituem um dos principais fatores limitantes na produção de ovinos em todo o mundo. O desenvolvimento da resistência dos parasitos aos anti-helmínticos tem gerado grandes perdas na produção de pequenos ruminantes. Na busca por novas alternativas de controle efetivo de nematódeos gastrintestinais em pequenos ruminantes, a fitoterapia constitui um campo promissor de pesquisas na tentativa de reduzir a utilização de tratamentos químicos, visando uma produção agroecológica. O presente artigo apresenta uma revisão dos estudos realizados com plantas taniníferas cientificamente testadas em todo o mundo para o controle das parasitoses gastrintestinais em pequenos ruminantes.

**Palavras-chave:** Fitoterapia. Helmintos gastrintestinais. Pequenos ruminantes. Taninos.

### ANTHELMINTIC EFFECT OF CONDENSED TANNINS IN GASTROINTESTINAL NEMATODES OF SHEEP (*OVIS ARIES*): A REVIEW

**ABSTRACT:** The gastrointestinal helminthiasis are one of the main limiting factor in sheep production worldwide. The development of parasite resistance to anthelmintics has caused high losses in production of small ruminants. In the search for new alternatives for effective control of gastrointestinal nematodes in small ruminants, phytoterapy is a promising field of research in an attempt to reduce the usage of chemical treatments, aimed at ecological production. This article presents a review of studies with plants tanniniferous scientifically tested worldwide for the control of gastrointestinal parasites in small ruminants.

**Key words:** Phytoterapy. Helminthiasis. Small ruminants. Tannins.

#### 1.1 PARASITISMO EM OVINOS

Um dos principais problemas encontrados na ovinocultura, limitando a criação destes animais, são os problemas parasitários, sendo os nematódeos gastrintestinais (NGI) os de maior importância. Dentre os NGI destacam-se *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Strongyloides* spp., *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum* (AMARANTE et al. 2004). Os ovinos são parasitados em todas as faixas etárias e os cordeiros desmamados constituem a

categoria etária mais acometida pela verminose (ECHEVARRIA; PINHEIRO; CORRÊA, 1989), acarretando não somente atraso no desenvolvimento corporal, mas também na produção e qualidade da carne, lã e, até mesmo, aumento da mortalidade dos animais jovens (MOLENTO e PRICHARD, 1999).

Os helmintos acarretam altas perdas econômicas, seja em criações extensivas (KOHLENER, 2001) ou intensivas como observado por Niezen et al. (1998) na Nova Zelândia, que consideram os parasitos gastrintestinais o maior impedimento ao aumento da taxa de crescimento animal.

Segundo Amarante (2001) não se pode relacionar parasitismo com doença, visto que grande parte dos animais infectados de uma propriedade encontra-se em boas condições de saúde. A capacidade de apresentar boas condições está relacionado à capacidade imunológica do hospedeiro em manter o número de parasitos gastrintestinais em níveis aceitáveis, e quando isso ocorre pode-se afirmar que a relação parasito-hospedeiro está em equilíbrio.

*H. contortus* é o parasito mais patogênico para pequenos ruminantes em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, inclusive no Brasil. O parasito adulto é hematófago, causando problemas gástricos e perdas de proteínas, tendo seu efeito agravado pela anemia (STRAIN e STEAR, 2001). Nos países tropicais, as infecções causadas por *T. colubriformis* também estão entre as de grande importância na criação de ovinos, logo após a hemoncose. Mesmo as infecções parasitárias consideradas por alguns autores como subclínicas, diminuem o ganho de peso, o consumo voluntário, a produção de leite e lã dos ovinos, podendo ainda prejudicar a deposição de tecidos moles e crescimento esquelético (BUTTER et al., 2000).

Os nematódeos da Família Trichostrongylidae apresentam duas fases distintas no seu desenvolvimento, uma fase de vida livre, na qual o hospedeiro infectado elimina ovos no ambiente, onde ocorre o desenvolvimento embrionário, com a formação da larva de terceiro estágio (L<sub>3</sub>). A fase de vida parasitária se inicia com a ingestão da L<sub>3</sub> e se completa com a presença do parasito adulto no trato digestório.

## 1.2 CONTROLE DO PARASITISMO GASTRINTESTINAL E RESISTÊNCIA

O controle parasitário dos nematódeos gastrintestinais é baseado em tratamentos repetidos do animal com drogas anti-helmínticas (AMARANTE et al., 1997). Segundo Torres-Acosta e Hoste (2008), para o controle de NGI dois pontos primordiais devem ser abordados: (i) nos hospedeiros, melhorando a resistência, a resiliência e a redução da carga parasitária, (ii) no ambiente, com a redução da contaminação das pastagens por L3.

A prática de tratamentos repetidos favorece o surgimento de populações de helmintos resistentes às drogas existentes (TORRES-ACOSTA e HOSTE, 2008). Segundo Sangster e Gill (1999) a resistência aos anti-helmínticos é o declínio da eficiência de uma droga contra uma população de parasitos, anteriormente suscetível àquele tratamento. A resistência contra todos os grupos de fármacos utilizados é uma realidade mundial (MOLENTO e PRICHARD, 1999), sendo um importante problema, principalmente em ovinos e caprinos (GOPAL; POMROY; WEST, 1999).

O primeiro relato de resistência a anti-helmínticos utilizados contra nematóides gastrintestinais de ovinos foi com o tiabendazol (Drudge et al., 1964). Este problema disseminou-se pelo mundo inteiro. No Quênia, Waruiru (1997) avaliou a eficácia do closantel, albendazole e levamisole em ovinos e relatou a presença da resistência múltipla de *H. contortus* a todas as drogas testadas.

Em pesquisa realizada por Bartley et al. (2003) em 90 propriedades da Escócia, os autores detectaram que 64% das localidades apresentaram resistência ao tiabendazole.

O primeiro caso de resistência de nematódeos gastrintestinais para lactonas macrocíclicas em pequenos ruminantes na Suíça, foi relatado por Schnyder et al. (2005), onde encontraram isolados de *H. contortus* resistentes à ivermectina.

Na Espanha, Alvarez-Sanchez et al. (2006) relataram a presença da resistência para benzimidazois, imidazotiazoles e lactonas macrocíclicas.

Em estudo realizado na Nova Zelândia, Southerland et al. (2008) encontraram isolados de *Teladorsagia*, *Trichostrongylus* e *Haemonchus* resistentes à ivermectina, relatando o primeiro caso de resistência à ivermectina em *T. colubriformis*.

George et al. (2011), avaliaram a eficácia de anti-helmínticos em diferentes estados de Trinidad, concluíram que os nematódeos desenvolveram resistência para albendazole, fenbendazole e levamisole, fato esse não observado para ivermectina.

Na Argentina, Fiel et al. (2011) avaliaram a eficácia dos anti-helmínticos, triclorfon, ivermectina, febendazole, levamisole e o closantel e encontraram resistência múltipla aos produtos testados, uma vez que não foi relatada redução na contagem de ovos por grama de fezes (OPG).

No Brasil, após o primeiro relato de resistência aos anti-helmínticos em ovinos no Rio Grande do Sul (Dos Santos & Gonçalves, 1967), não faltaram relatos de isolados resistentes aos fármacos. Echevarria, Pinheiro e Corrêa (1989) examinando rebanhos no município de Bagé-RS, encontraram rebanhos com helmintos resistentes aos benzimidazóis, ao tetramisole e rebanhos com resistência múltipla.

Ramos et al. (2002) avaliaram a resistência em propriedades do Estado de Santa Catarina e relataram a presença de resistência a ivermectina, ao albendazole, ao closantel e ao levamisole. De acordo com os autores, a multirresistência está presente na maioria dos rebanhos.

No Paraná, Souza e Thomaz-Soccol (1997) verificaram que rebanhos ovinos apresentaram resistência anti-helmíntica ao oxfendazol, levamisole, tetramisol, ivermectina, moxidectina, closantel e as associações tetramisol + disofenol e oxfendazol + closantel. Em outro trabalho, também no Paraná, Thomaz-Soccol et al. (2004), avaliaram a eficiência dos anti-helmínticos em diferentes propriedades e também verificaram que a prevalência de resistência foi alta para todos os antihelmínticos avaliados, onde relataram que todas as propriedades apresentaram resistência múltipla.

No estado da Bahia, Barreto et al. (2008) detectaram resistência aos antihelmínticos ivermectina, albendazole e levamisole e relataram também a presença de resistência múltipla aos anti-helmínticos.

Estudo realizado no Rio Grande do Sul por Cezar et al. (2010) demonstrou que nos testes de eficácia anti-helmíntica não ocorreu a redução na contagem de OPG, concluindo então a presença da resistência a levamisole, moxidectina, albendazole, ivermectina, nitroxil, disofenol, triclorfon, closantel e

combinação de ivermectina + levamisole + albendazole no Estado do Rio Grande do Sul.

Sczesny-Moraes et al. (2010), também avaliaram a eficácia anti-helmíntica em propriedades produtoras de ovinos no Estado do Mato Grosso do Sul. De acordo com os autores, a resistência aos fármacos albendazole, closantel, ivermectina, levamisole, moxidectina, triclorfon e associação albendazole + ivermetina + levamisole está instalada na maioria dos rebanhos do Estado de Mato Grosso do Sul.

A resistência múltipla no Estado de São Paulo foi avaliada por Almeida et al. (2010), quando testaram os produtos químicos moxidectina, closantel, triclorfon, fosfato de levamisole, albendazole e ivermectina, concluindo que isolados de *H. contortus* e *T. colubriformis* apresentam múltipla resistência a todas as drogas testadas.

O desenvolvimento de isolados de parasitos resistentes às várias classes de anti-helmínticos é um fenômeno comum em muitos países e identificado em muitas espécies de nematódeos (Kaplan, 2004). Além disso, os anti-helmínticos disponíveis no mercado possuem algumas limitações, tais como alto custo, presença de resíduos nos alimentos, riscos de poluição ambiental e redução na produção de ovinos, devido a sua baixa eficácia (WALLER, 1997).

Na busca de novas alternativas de controle efetivo de NGI em pequenos ruminantes, vários pesquisadores têm se empenhado em testar plantas com compostos bioativos que possam ser empregados no manejo integrado de parasitoses, com menos efeitos deletérios ao meio ambiente.

### 1.3 PLANTAS COM ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA

Em todo o mundo, é crescente o número de pesquisas com fitoterápicos que apresentam atividade contra vírus, bactérias, fungos e parasitos, não sendo diferente na medicina veterinária, onde pesquisas com plantas medicinais objetivam a redução de problemas sanitários no controle de várias doenças que comprometem a produtividade dos animais (NIEZEN et al., 1996). No Brasil, plantas medicinais são largamente utilizadas tanto nas áreas rurais como urbanas. As plantas são utilizadas em formulações de remédios caseiros como chás, xaropes,

pós, ou com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, em cápsulas e pílulas (MATOS, 1997).

Várias causas levam ao aumento da procura por produtos alternativos, entre elas destacam-se o uso incorreto e/ou abusivo das drogas sintéticas, que pode desencadear reações adversas. Além disso, uma grande parte da população mundial não tem acesso ao tratamento farmacológico convencional (RATES, 2001).

Além da busca por medicamentos fitoterápicos e da tendência de produção orgânica, existe a problemática da resistência apresentada pelos nematódeos aos anti-helmínticos disponíveis em todo o mundo (MELO et al., 2003). Diante destes riscos, as plantas apresentam-se como uma alternativa natural, visto que muitas possuem mecanismos de defesa contra o ataque de patógenos, os quais são baseados na produção de compostos bioativos específicos que lhes conferem relativa resistência (BAR-NUM e MAYER, 1990).

A fitoterapia tem sido indicada, principalmente, para reduzir os custos dos tratamentos químicos e prolongar a vida útil dos produtos anti-helmínticos disponíveis no mercado, pois diminui a pressão de seleção sobre os isolados de nematódeos (VIEIRA et al. 1999). Os extratos brutos obtidos têm largo uso após a constatação de sua eficácia em testes de segurança e em ensaios biológicos.

Quando a natureza química dos compostos envolvidos é conhecida, os métodos de extração do material podem ser baseados no uso da planta na medicina popular ou extrações com solventes de polaridades crescentes (RATES, 2001).

Os primeiros testes para avaliação da propriedade anti-helmíntica de uma planta medicinal são feitos *in vitro*, devido a facilidade de execução, baixo custo e rapidez em relação aos testes *in vivo*. As plantas ou seus compostos são colocados diretamente em contato com os diferentes estágios de desenvolvimento do parasito para avaliar seu efeito sobre a eclosão de ovos, desenvolvimento larval e motilidade de larvas e adultos. É essencial que os primeiros testes sejam direcionados contra os helmintos de maior importância econômica (HAMMOND; FIELDING; BISHOP, 1997). Dentre os testes *in vitro*, aqueles que podem ser usados para avaliar os efeitos anti-helmínticos de uma planta são: teste de inibição da eclosão de ovos (IEO), teste de inibição da migração larval (IML), teste de inibição

da alimentação larval (IAL), teste de desembainhamento (TD), teste de desenvolvimento larval (TDL) e teste de motilidade de adultos (TMA) (JACKSON e HOSTE, 2010). De acordo com os autores, para as primeiras análises de uma planta podem ser realizados os testes IEL, IML E IAL devido a sua praticidade.

Apesar de muitas plantas já terem sido descritas como possuidoras de atividade anti-helmíntica, poucas foram avaliadas cientificamente. Algumas pesquisas científicas conduzidas com diferentes espécies vegetais demonstram propriedades antiparasitárias (NIEZEN et al. 1995; ATHANASIADOU et al., 2001; HOSTE et al.; 2006; MINHO et al., 2008a; MANOLARAKI et al., 2010; ALONSO-DÍAZ et al., 2011; OLIVEIRA et al.; 2011).

Alonso Díaz et al. (2010) relatam que é necessária a definição de muitos aspectos envolvidos tais como a parte da planta, idade e estado fisiológico da planta, aspectos relacionados à extração e dose. Fatores ligados ao animal (espécie, idade, estado fisiológico) também devem ser considerados para que o mesmo possa ser utilizado no controle de nematódeos. É importante salientar que tanto os efeitos benéficos quanto os efeitos negativos que podem provocar os taninos dependem de muitos fatores, sobretudo da concentração e da estrutura dos taninos (Hoste et al. 2006).

#### 1.4 TANINOS CONDENSADOS

De acordo com Niezen et al. (1995) o uso de plantas ricas em taninos condensados (TC) pode ser indicado como uma alternativa no controle de helmintos em ovinos, reduzindo o uso de produtos químicos, assim como os custos de produção. Portanto, além do melhoramento do rebanho, a utilização de fontes de TC na dieta dos animais diminui a pressão de seleção sobre os NGI.

Diversos estudos confirmam que plantas têm sido utilizadas para o controle de NGI em pequenos ruminantes, fazendo uso de extratos, folhas, frutos, ou sementes oriundas de diferentes latitudes do mundo e obtidas com diferentes técnicas (MAKKAR; FRANCIS; BECKER, 2007).

Os taninos compreendem um grande grupo de compostos encontrados principalmente em frutos verdes e plantas da família Leguminosae, muito disseminadas no reino vegetal. Esses compostos fenólicos são classificados conforme sua estrutura molecular em taninos hidrolisáveis ou taninos condensados,

sendo os condensados também conhecidos como proantocianidinas. Os TC são os taninos mais comumente encontrados em plantas forrageiras, árvores e arbustos (BARRY e McNABB, 1999).

Duas hipóteses tem sido sugeridas para explicar o efeito anti-helmíntico dos TC contra uma população de nematódeos gastrintestinais. A primeira é o efeito direto, definido como a capacidade que os taninos têm de agir no parasito, afetando severamente os processos biológicos dos nematódeos (HOSTE et al., 2006). A segunda hipótese poderia ser o efeito indireto, no qual os taninos poderiam atuar indiretamente, melhorando a utilização proteica pelo hospedeiro e conseqüentemente uma melhor resposta imunológica deste aos parasitos (BUTTER et al., 2000; STRAIN e STEAR, 2001). Entretanto, o exato mecanismo de ação é incerto e pode diferir dependendo do parasito e estágio de desenvolvimento da planta (MIN e HART, 2003).

Os TC ligam-se às proteínas da dieta formando complexos (tanino-proteína), fazendo com que as proteínas de maior valor biológico não sejam degradadas e utilizadas pela microbiota ruminal, sendo estes complexos dissociados no intestino delgado, local de absorção dos aminoácidos (MIN et al., 2003; WAGHORN, 2008).

Forrageiras com alto teor de TC, quando fornecidos a ovinos e bovinos, melhoram a digestão proteica e absorção dos aminoácidos. Animais que apresentam uma maior absorção proteica produzem mais lã, carne e leite, assim como melhora na taxa de ovulação das fêmeas. O estado nutricional do animal é considerado um importante fator de equilíbrio na relação parasito-hospedeiro, assim como na patogênese da infecção parasitária (VALDERRÁBANO; DELFA; URIARTE, 2002).

A suplementação dos ovinos com TC, oriundos de plantas forrageiras vem sendo utilizado no controle de nematódeos gastrintestinais de ovinos (IQBAL et al., 2007). TC podem ser utilizados no bloqueio do ciclo de nematódeos em pastagens contaminadas, desenvolvimento larval, reinfecções e reduzindo a viabilidade dos nematódeos (MOLAN et al., 2003).

## 1.5 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTI-HELMÍNTICA DE PLANTAS

Avaliando o efeito de sulla (*Hedysarum coronarium*) em ovinos naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais, Niezen et al. (1995) relatam redução na contagem de OPG. No mesmo trabalho, animais experimentalmente infectados com *T. colubriformis* apresentaram redução no OPG e diminuição da carga parasitária. Em outro experimento, ovelhas que foram alimentadas com sulla (*H. coronarium*), que possui alta concentração de TC, apresentaram redução no número de *T. colubriformis* no intestino (NIEZEN et al., 2002).

Em outro estudo, Niezen et al. (1998) analisaram o efeito de plantas contendo taninos (*H. coronarium*, *Lotus corniculatus* e *Lotus pedunculatus*) e encontraram redução na carga parasitária e na contagem de OPG, concluindo que essas plantas podem ser incorporadas à alimentação de ovinos para reduzir a dependência das drogas anti-helmínticas.

Butter et al. (2000) analisaram o efeito do extrato de quebracho (EQ) como fonte de TC, adicionados na dieta com diferentes níveis de proteína, concluíram que a inclusão do EQ na dieta com baixos índices proteicos, acarretou redução da infestação por *T. colubriformis* baseado na redução da contagem de OPG de cordeiros.

O resultado da suplementação com TC oriundo de sete plantas foi avaliado em larvas de *T. colubriformis* por Molan et al. (2000), onde demonstram que todos os extratos apresentaram efeito inibitório. O impacto dos TC na migração larval sugeriu a possibilidade das plantas serem utilizadas na dieta de ruminantes para reduzir a dependência de anti-helmínticos.

Athanasiadou et al. (2000a) relatam que cordeiros infectados por *T. colubriformis* que receberam uma dieta contendo 8% de EQ por sete dias consecutivos, apresentaram redução da carga parasitária e da contagem de OPG. Em outro estudo, Athanasiadou et al. (2000b) avaliou a ação do EQ através do fornecimento de duas dietas, uma contendo 30 gramas de EQ e outra contendo 60 g de EQ por kg de matéria fresca, durante 10 semanas. Os autores relataram redução na carga parasitária e na fecundidade de *T. colubriformis*, independente da concentração do EQ. De acordo com os autores, o fornecimento de EQ reduz a taxa de estabelecimento e o desenvolvimento da infecção parasitária.

Marley et al. (2003) fornecendo dieta a base de *L. corniculatus* e *Cichorium intybus* para cordeiros naturalmente infectados, relatam redução na carga parasitária e na contagem de OPG, em animais alimentados com *L. corniculatus*, não ocorrendo redução significativa quando alimentados com *C. intybus*.

Dieta baseada no fornecimento de *C. intybus* apresentou diminuição na carga parasitária de *T. circumcincta* e redução na implantação de larvas em ovinos, fato esse observado por Tzamaloukas et al. (2005). No mesmo estudo, avaliaram uma dieta a base de *L. pedunculatus* e *H. coronarium*, não sendo observado redução significativa na implantação de larvas, concluíram então que *C. intybus* pode ser uma espécie promissora na prática de controle da carga parasitária de *T. circumcincta* em ovinos.

A ação *in vitro* do desembainhamento de L3 de *H. contortus* e *T. colubriformis* tratadas com quatro extratos de plantas taniníferas (*Castanea sativa*, *Pinus sylvestris*, *Erica erigena* e *Sarothammus scoparius*), foi avaliada por Bahuaud et al.

(2006). De acordo com os autores os taninos estão envolvidos no processo inibitório de desembainhamento de larvas, visto que ocorreu redução significativa na taxa de desembainhamento de larvas de *H. contortus* frente às plantas *C. sativa*, *P. sylvestris* e *E. erigena*, enquanto larvas de *T. colubriformis* apresentaram redução da taxa de desembainhamento somente para as plantas *C. sativa* e *P. sylvestris*.

Em estudos realizados com monômeros de TC em larvas de *H. contortus* e *T. colubriformis*, Brunet e Hoste (2006) relatam que monômeros de prodelfinidinas são mais potentes que os monômeros de procianidinas no desembainhamento de larvas de terceiro estágio.

Efeitos direto e indireto de TC em ovinos foram avaliados por Iqbal et al. (2007). No teste *in vitro* realizado com fonte de tanino comercial, ocorreu inibição da eclosão de ovos, entretanto, não foi efetivo em adultos de *H. contortus*. O teste *in vivo* indicou redução na contagem de OPG do grupo tratado com TC quando comparado ao controle não tratado. O efeito anti-helmíntico direto de TC foi evidenciado pela inibição da eclosão de ovos, portanto, a redução no OPG em ovinos pode indicar a utilização de TC na alimentação de ovinos.

Brunet et al. (2007) avaliaram a ação de diferentes concentrações de extrato de *Onobrychis viciifolia* em larvas de *H. contortus* e *T. colubriformis*. No teste

*in vitro* as concentrações testadas foram de 150, 300, 600 e 1200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na concentração de 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , não houve diferença significativa na taxa de desembainhamento quando comparado com o controle negativo. A partir de 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ocorreu diferença significativa na taxa de eclosão para ambas as espécies de nematódeos. Com 1200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , observou-se inibição de 100% na taxa de desembainhamento das larvas de *T. colubriformis* e de 83% das larvas de *H. contortus*. No teste *in vivo*, animais receberam dieta com concentrações de 25, 75 e 100% de extrato na dieta.

Através de cânulas, larvas de *H. contortus* foram colocadas em contato com líquido ruminal por 160 minutos, sendo então observada diferença significativa na taxa de desembainhamento nas concentrações de 75% e 100%. De acordo com os autores, ocorreu similaridade de ação entre os testes *in vitro* e *in vivo*.

O efeito anti-helmíntico do extrato de quatro plantas taniníferas foi avaliado utilizando-se o teste de inibição da migração larval (IML) e o teste de desembainhamento (ALONSO-DÍAZ et al., 2008). Neste trabalho relataram que o extrato de *Acacia pennatula*, *Lisyloma latisiliquum* e *Leucaena leucocephala* reduziu a taxa de migração das L<sub>3</sub> e a utilização da *Piscidia piscipula* não acarretou inibição da migração. No teste de desembainhamento, utilizando as mesmas plantas, a redução na taxa de desembainhamento foi significativa para todas as plantas, confirmando o que o efeito anti-helmíntico dessas plantas contra *H. contortus*.

As propriedades anti-helmínticas de quatro plantas taniníferas foram testadas por Alonso-Díaz et al. (2011). Utilizando extratos das plantas *Havardia albicans* e *Acacia gaumeri* no teste *in vitro* de IML ocorreu redução na taxa de migração de *H. contortus* para ambos os extratos, fato esse não observado quando se utilizou extratos de *Brosimum alicastrum* e *L. leucocephala*. No teste de desembainhamento, na dose de 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com os extratos de *A. gaumeri* e *H. albicans*, média de desembainhamento foi de 28,6% e 10,4% respectivamente, enquanto *B. alicastrum* e *L. leucocephala* apresentaram média de 97,5 e 93,3%, respectivamente. Os autores relatam que os taninos são potentes inibidores de desembainhamento de L3 e de sua motilidade.

Azando et al. (2011) avaliaram o efeito dos extratos de *Newbouldia laevis* e *Zanthoxylum zanthoxyloides* como fontes de taninos. No teste *in vitro* de desembainhamento larval observaram que na concentração de 1200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de

extrato, as taxas de IML de *H. contortus* foram de 5,19 e 0,93% para os extratos de *N. laevis* e *Z. zanthoxyloides*, respectivamente. Utilizando larvas de *T. colubriformis* as taxas foram de 4,22 e 0,72% para os extratos de *N. laevis* e *Z. zanthoxyloides*, respectivamente.

Manolaraki et al. (2010) testaram a ação anti-helmíntica dos TC de *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera*, *Ceratonia siliqua*, *Castanea sativa*, *Pyrus spinosa*, *Onobrychis viciifolia* e *Olea europaea*, originárias da região Mediterrânea, observaram a IML de *H. contortus*, exceto para o extrato de *O. europaea*. No teste *in vivo*, ovinos infectados com *H. contortus* e *T. colubriformis* receberam *P. lentiscus*, *Q. coccifera* e *C. siliqua* na forma de farinha dos frutos incorporados à ração e *O. viciifolia* na forma de feno. Foi observada redução na eliminação de ovos, acarretado, principalmente, pela diminuição na fecundidade das fêmeas de ambas as espécies, uma vez que não foi relatada diminuição na carga parasitária dos animais.

Na avaliação da ação da planta *L. latisiliquum* em ovinos experimentalmente infectados com *H. contortus*, Martinez-Ortiz-de-Montellano et al. (2010) relataram que o consumo em um curto período dessa planta na forma de forragem, altera a fecundidade das fêmeas e também diminui a eliminação de ovos nas fezes, mas não reduz a carga parasitária nos animais. De acordo com os autores a redução do número de OPG permite a menor contaminação das pastagens. Por outro lado, Max (2010) avaliou a ação dos TC extraído de *Acacia mearnsii* em ovinos naturalmente infectados e relataram reduções na eliminação de ovos e na carga parasitária.

## 1.6 PESQUISAS NO BRASIL

No Brasil, têm sido realizados testes de eficácia anti-helmíntica com extratos de plantas como fonte de taninos. Pesquisa com o extrato de *A. mearnsii* como fonte de TC na dose de 1,6 g kg<sup>-1</sup> PV, Minho (2006) observou uma redução na contagem de OPG de *H. contortus* e *T. colubriformis* e redução na carga parasitária de *H. contortus*. De acordo com o autor uso dos TC no controle alternativo da hemoncose ovina deve ser estudado e testado em regiões com problemas de resistência às drogas anti-helmínticas ou em fazendas que incorporam o sistema de produção orgânica.

Cenci et al. (2007) avaliaram os efeitos de TC de *A. mearnsii* em ovinos naturalmente infectados com helmintos gastrintestinais e observaram que ocorreu uma queda na contagem de OPG, indicando que o tanino da acácia apresenta eficácia anti-helmíntica, representando uma alternativa para o controle de helmintos em ovinos.

Atividade ovicida e larvicida foi avaliada em *H. contortus* por Maciel et al. (2006) utilizando extrato de *Melia azedarach*. No teste de inibição da eclosão de ovos (IEO) utilizando extrato etanólico da folha observou-se que a mesma apresenta atividade ovicida, o que não foi observado quando se utiliza extrato hexânico da folha. Avaliando os extratos hexânico e etanólico das sementes observaram que os mesmos também apresentam atividade ovicida. No teste de inibição do desenvolvimento larval (TDL) ocorreu efeito inibitório significativo utilizando o extrato etanólico das folhas e o extrato clorofórmio das sementes. Baseado nos resultados, os autores afirmam que folhas e frutos de *M. azedarach* contêm compostos bioativos com ação anti-helmíntica contra *H. contortus*.

A ação ovicida e larvicida de extrato de *Azadirachta indica* em larvas de *H. contortus* foi avaliado por Costa et al. (2008), demonstrando que a inibição foi de 99,77% na eclosão na concentração de 3,12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e inibição no desenvolvimento larvar de 87,11% na concentração de 50  $\text{mg mL}^{-1}$  quando utilizou o extrato etanólico.

O extrato acetato de etila na concentração de 50  $\text{jg mL}^{-1}$  a inibiu 51,31% na eclosão e 68,10% no teste de desembainhamento. Os autores verificaram que o extrato etanólico foi mais efetivo, sugerindo que o extrato de *A. indica* pode ser usado no controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes.

Minho et al. (2008a) avaliaram os efeitos inibitórios do extrato de *A. mearnsii* sobre a alimentação de larvas de primeiro estágio (L1) de *H. contortus*, *T. colubriformis* e *T. circumcincta*. De acordo com os autores, uma dose igual ou superior a 0,155  $\text{jg mL}^{-1}$  do extrato acarretou efeitos deletérios em L<sub>1</sub> de *H. contortus*, *T. colubriformis* e *T. circumcincta*, onde, aproximadamente, 100% das larvas apresentaram-se inviáveis. A dose de 0,08  $\text{jg mL}^{-1}$  inativou aproximadamente 90% das L1. A dose analisada apresenta potencial uso como anti-helmíntico no controle alternativo de parasitos.

Em outro estudo, Minho et al. (2008b), analisaram o efeito dos TC provenientes do extrato de *Acacia molissima* em cordeiros naturalmente infectados com *H. contortus* e *T. colubriformis* e relatam que houve redução na contagem de OPG e na carga parasitária de *H. contortus* no abomaso quando os mesmos receberam  $1,6 \text{ g kg}^{-1}$  PV de extrato, fato esse não observado na carga parasitária de *T. colubriformis* em intestino delgado. O efeito anti-helmíntico dos TC em nematódeos gastrintestinais em cordeiros foi confirmado pelos autores e sugerem o uso de TC como alternativa no controle de endoparasitos na criação de ovinos.

Oliveira et al. (2011) avaliaram a eficácia *in vitro* de *Myracrodrum urundeuva* contra *H. contortus* e relataram que o extrato de folhas mostrou-se efetivo, inibindo 97,73% da eclosão na concentração de  $1,25 \text{ mg mL}^{-1}$ , enquanto o extrato do caule inibiu a eclosão em 83,56% na concentração de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Ao utilizar o extrato de folhas e caule no teste de desembainhamento na concentração de  $0,31 \text{ mg mL}^{-1}$  ocorreu um bloqueio de 100% no processo. De acordo com os autores, *M. urundeuva* pode ser usado para o controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes e a atividade anti-helmíntica da planta é, provavelmente, devido à presença de taninos.

## 1.7 AÇÃO DIRETA NO PARASITO

A redução do OPG em animais que recebem fontes de TC pode ser consequência de redução da carga parasitária, ou por diminuição da fecundidade das fêmeas (MARTINEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO et al., 2010; MINHO et al., 2008b). Segundo Hoste et al. (2006) taninos podem afetar os processos biológicos dos nematódeos dependendo de onde e como os taninos se ligam com várias estruturas dos nematódeos tais como a bainha, cutícula, sistema digestivo ou reprodutivo.

A diferença de susceptibilidade de larvas de *H. contortus* e *T. colubriformis* frente aos diferentes monômeros de taninos condensados pode estar relacionada à espécie de parasito e a composição da bainha e cutícula dos nematódeos (BRUNET e HOSTE, 2006). A habilidade dos TC se ligarem às proteínas e alterar as propriedades físicas e químicas devem ser considerados, especialmente porque a bainha e a cutícula dos nematódeos são compostas de prolina e hidroxiprolina (FETTERER e RHOADS, 1993).

Helmintos parasitos de vida livre ou não, são limitados por uma cutícula verdadeira de material extracelular em forma de ligações cruzadas de colágenos e proteínas insolúveis sintetizadas e secretadas pela hipoderme. A estrutura pode ser relativamente simples, ou muito complexa, variando de um gênero para outro, mostrando diferenças regionais na estrutura dependendo da espécie (HALTON, 2004).

A cutícula dos nematódeos é metabolicamente ativa e morfológicamente especializada para absorção seletiva de nutrientes e osmorregulação. Dessa maneira, a difusão passiva de anti-helmínticos pela cutícula pode, provavelmente, ser responsável pela deformação e destruição da superfície corporal dos nematódeos (ALVAREZ; MOTTIER; LANNSE, 2007).

Desde a década de 70, a microscopia eletrônica (ME) vem sendo utilizada como ferramenta para estudo de taxonomia e o efeito de fármacos em cestódeos e nematódeos. Hoste et al. (2006) descreveram alterações na superfície da cutícula de *T. colubriformis*, com presença de rugas transversais após o contato do parasito com TC. Segundo os autores, a capacidade dos TC se ligarem às proteínas pode explicar as lesões observadas na cutícula pela Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

O efeito direto (*in vitro* e *in vivo*) do extrato de *O. viciifolia* e *L. latisiliquum* foi avaliado por Martinez-Ortiz-de-Montellano (2010) utilizando a MEV. No teste *in vitro* foram observadas presença de rugas longitudinais e transversais na cutícula ao longo do corpo e região cefálica de fêmeas de *H. contortus* quando em contato com o extrato. Também foram observados agregados dos extratos ao redor da cápsula bucal, região da vulva e ânus. No estudo *in vivo*, alterações semelhantes foram observadas, com exceção dos agregados que só foram descritos na região ao redor da cápsula bucal. De acordo com o autor, as alterações estruturais nos parasitos expostos aos extratos das plantas podem afetar a motilidade e nutrição com possíveis consequências na reprodução.

Brunet; Foruquaux e Hoste (2011) comparam a ultraestrutura de larvas de terceiro estágio com bainha e sem bainha de *H. contortus* e *T. colubriformis*, as quais foram colocadas em contato com extrato de *O. viciifolia*. Neste trabalho foram observadas alterações na camada hipodérmica, presença de numerosas vesículas no citoplasma e degeneração das células musculares e intestinais, resultando na morte larval. A frequência das lesões foi diferente, sendo

que as alterações superficiais (camada hipodérmica e células musculares) foram mais frequentes em larvas embainhadas, enquanto que as larvas desembainhadas apresentaram maior incidência de alterações nas camadas mais profundas (células intestinais). Essas diferenças sugerem que as ações do extrato em diferentes tipos celulares dependem da presença ou não da bainha. Nas larvas embainhadas, as lesões podem estar associadas com a cutícula, provavelmente devido a um bloqueio de trocas através da cutícula com o meio ambiente, podendo resultar em asfixia ou toxicidade devido ao acúmulo de metabólitos do produto. As lesões das células intestinais das larvas desembainhadas podem ser em decorrência da ingestão dos metabólitos presentes no extrato, podendo interferir com os processos de digestão e afetar a nutrição. Esse estudo mostrou que a ultraestrutura de larvas dos nematódeos gastrintestinais pode ser alterada após o contato *in vitro* com extratos de plantas.

Os efeitos anti-helmínticos das plantas ricas em TC podem ser atribuídos a diferentes mecanismos: redução na contagem de OPG, inibição da eclosão, inibição da alimentação larval, inibição do desenvolvimento larval, inibição da motilidade de L3 e inibição da sobrevivência e redução na carga parasitária de NGI adultos (MINHO et al., 2008a; COSTA et al., 2008; MARTINEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO et al., 2010; AZANDO et al., 2011; DASGUPTA et al., 2010).

Diversos trabalhos relatam o potencial promissor de plantas ricas em taninos no controle de nematódeos e esse metabólito está presente em muitas plantas nativas, indicando um amplo campo de pesquisa de fitoterápicos com ação antihelmíntica.

## 1.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse no efeito dos TC sobre ruminantes traz grandes perspectivas para o controle de nematódeos e redução na ocorrência de isolados resistentes às drogas anti-helmínticas, assim como um grande avanço na cadeia de produção dos animais criados em sistemas de produção orgânica.

Além da possibilidade da utilização em sistemas de produção onde os quimioterápicos são restringidos ou proibidos, os TC podem ainda ser utilizados no controle alternativo, concomitantemente ao controle parasitário tradicional, com a finalidade de diminuir e espaçar as administrações das drogas anti-helmínticas

convencionais. O conhecimento da epidemiologia dos nematódeos é primordial, já que os TC agem na descontaminação das pastagens, diminuindo a incidência de manifestações clínicas da doença e, principalmente, diminuindo a pressão de seleção sobre os isolados de NGI. Com isso, podemos minimizar o aparecimento do fenômeno da multirresistência às drogas anti-helmínticas e, até mesmo, prolongar a eficácia das drogas em uso na atualidade e das que serão lançadas no futuro. Estes resultados demonstram o potencial de utilização de plantas taniníferas no controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes. Portanto, a bioprospecção de compostos bioativos e o desenvolvimento de um produto anti-helmíntico contendo TC teriam um grande potencial comercial.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.A.; GARCIA, K.C.O.D.; TORGERSON, P.R.; AMARANTE, A.F.T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v.59, p.622-625, 2010.
- ALONSO-DÍAZ, M.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; HOSTE, H. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.360-364, 2011.
- ALONSO-DÍAZ, M.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; HOSTE, H. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.313-319, 2008.
- ALONSO-DÍAZ, M.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; HOSTE, H. Tannins and tropical tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe?. **Small Ruminant Research**, v.89, p.164-173, 2010.
- ALVAREZ, L.L.; MOTTIER, M.L.; LANNASSE, C.E. Drugs transfer into target helminth parasites. **Trends in Parasitology**, v.23, p.97-104, 2007.
- ALVAREZ-SÁNCHEZ, M.A.; PÉREZ-GARCÍA, J.; CRUZ-ROJO, M.A.; ROJO-VÁZQUEZ, F.A. Anthelmintic resistance in trichostrongylid nematodes of sheep farms in Northwest Spain. **Parasitology Research**, v.99, p. 78-83, 2006.
- AMARANTE, A.F.T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: Sociedade Brasileira de Zootecnia. **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001. p.461-473.
- AMARANTE, A.F.T.; BAGNOL JUNIOR, J.; AMARANTE, M.R.V.; BARBOSA, M.A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.89-104, 1997.
- AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.91-106, 2004.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, S.; COOP, R.L. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Record**, v.146, p.728-732, 2000a.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, S.; COOP, R.L. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasited with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1025-1033, 2000b.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, S.; COOP, R.L. Direct anthelmintic effect of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: In vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.205-219, 2001.

AZANDO, E.V.B.; HOUNZANGBÉ-ADOTÉ, M.S.; OLOUNLADE, P.A.; BRUNET, S.; FABRE, N.; VALENTIN, A.; HOSTE, H. Involvement of tannins and flavonoids in the *in vitro* effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes.

**Veterinary Parasitology**, v.180, p.292-297, 2011.

BAHUAUD, D.; MARTINEZÓRTIZ DE MONTELLANO, C.; CHAUVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage of parasitic nematodes. **Parasitology**, v.132, p.545-554, 2006.

BAR-NUM, N.; MAYER, A.M. Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinera*. **Phytochemistry**, v.29, p.787-791, 1990.

BARRETO, M.A.; ORNELAS-ALMEIDA, M.A.; SILVA, A.; MENDONÇA, L.R. Situação da resistência de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes aos anti-helmínticos no estado da Bahia. In: XV Congresso Brasileiro de Parasitologia

Veterinária, II Seminário de Parasitologia Veterinária dos Países do Mercosul, 2008, Curitiba - PR, **Anais...**Curitiba: CBPV, 2008. 1CD-ROM.

BARRY, T.N.; McNABB, W.C. The implication of condensed tannins on the nutritive value of temperature forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p.263-272, 1999.

BARTLEY, D.J.; JACKSON, E.; JOHNSTON, K.; COOP, R.L.; MITCHELL, G.B.B.; SALES, J.; JACKSON, F. A survey of anthelmintic resistant nematode parasites in Scottish flocks. **Veterinary Parasitology**, v.117, p.61-71, 2003.

BRUNET, S.; AUFRERE, J.; BABILI, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. **Parasitology**, v.134, p.1253-1262, 2007.

BRUNET, S.; FORUQUAUX, 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.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7481-7487, 2006.

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

CENCI, F.B.; LOUVANDINI, H.; MCMANUS, C.M.; DELL'PORTO, A.; COSTA, D.M.; ARAÚJO, S.C.; MINHO, A.P.; ABDALLA, A.L. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.132-137, 2007.

- CEZAR, A.S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L.A.; RIBAS, H.O.; VOGEL, F.S.F. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine different drugs in sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.173, p.157-160, 2010.
- COSTA, C.T.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.;
- MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; CASTRO, C.M.S.; BRAGA, R.R.; OLIVEIRA, L.M.B. *In vitro* ovicidal larvicidal activity of *Azadiractha indica* extracts on *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, v.74, p.284-287, 2008.
- 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.
- DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe resistente de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, v.9, p.201-209, 1967.
- DRUDGE, J. H., SZANTO, J., WYATT, 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.
- ECHEVARRIA, F.A.M.; PINHEIRO, A.C.; CORRÊA, M.B.C. Controle estratégico da verminose ovina no Rio Grande do Sul. In: **Curso de Parasitologia Animal**, 2, 1988, Bagé:CBPV, p.159-163, 1989.
- FETTERER, R.H.; RHOADS, M.L. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. **Veterinary Parasitology**, v.46, p. 103-111, 1993.
- FIEL, C.; GUZMAN, M.; STEFFAN, P.; RODRIGUEZ, E.; PRIETO, O.; BHUSHAN, C. The efficacy of Trichlorphon and Naphthalophos against multiple anthelmintic resistant nematodes of naturally infect sheep in Argentina. **Parasitology Research**, v.109, p.S139-S148, 2011.
- GEORGE, N.; PERSAD, K.; SAGAM, R.; OFFIAH, V.N.; ADESIYUN, A.A.; HAREWOOD, W. Efficacy of commonly used anthelmintics: First report of multiple drug resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, v.183, p.194-197, 2011.
- GOPAL, R.M.; POMROY, W.E.; WEST, D.M. Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectin. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.781-786, 1999.
- HALTON, D. Microscopy and the helminth parasite. **Micron**, v.35, p.361-390, 2004.
- HAMMOND, J.A.; FIELDING, D.; BISHOP, S.C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, v.21, p.213-228, 1997.
- HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M.; HOSKIN, S.O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v.22, p.253-261, 2006.

IQBAL, Z.; SARWAR, M.; JABBAR, A.; AHMED, S.; NISA, M.; SAJID, M.S.; KHAN, M.N.; MUFTI, K.A.; YASEEN, M. Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.125-131, 2007.

JACKSON, F.; HOSTE, H. In vitro methods for primary screening of plant products direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: VERCOE, P.E.; MAKKAR, H.P.S.; SCHLINK, A.C. **In vitro screening of plants resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies**. London: Springer, 2010. p.25-45.

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

KOHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.336-345, 2001.

MACIEL, M.V.; MORÁIS, S.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; COSTA, C.T.C.; CASTRO, C.M.S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia Azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.98-104, 2006.

MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-know plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, v.1, p.1371-1391, 2007.

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

MARLEY, C.L.; COOK, R.; KEATINGE, R.; BARRET J.; LAMPKIN, N.H. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. **Veterinary Parasitology**, v.112, p.147-155, 2003.

MARTÍNEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C. **Mécanismes d'action de plantes riches em tanins sur les nematodes gastrointestinaux adultes des petits ruminants**.

145 p. Thèse (Doctorado) - Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, 2010. Disponível em:[http://ethesis.inptoulouse.fr/archive/00001490/01/martinez\\_ortiz\\_de\\_montellano.pdf](http://ethesis.inptoulouse.fr/archive/00001490/01/martinez_ortiz_de_montellano.pdf). Acesso em 14 de março de 2012.

MARTÍNEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; VARGAS-MAGAÑA, J.J.; CANUL-KU, H.I.; MIRANDA-SOBERANIS, R.; CAPETILLO-LEAL, C.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F.J. Effect of a tropical tannin-rich plant

*Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.283-290, 2010.

MATOS, A.F.J. Living pharmacies. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**. v.49, p.409-412, 1997.

MAX, R.A. Effect of repeated wattle tannin drench on worm burdens, fecal egg counts and egg hatchability naturally acquired nematode infections in sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.138-143, 2010.

MELO, A.C.F.L.; REIS, I.F.; BEVILÁQUA, C.M.L.; VIEIRA, L.S.; ECHEVARRIA, F.A.; MELO, L.M. Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.339-344, 2003.

MIN, B.R.; BARRY, T.N.; ATTWOOD, G.T.; McNABB, W.C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and technology**, v.106, p.3-19, 2003.

MIN, B.R.; HART, S.P. Tannin for suppression of internal parasites. **Journal of Animal Science**, v.81, E.Suppl.2, E.102-E.109, 2003.

MINHO, A.P. **Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos**. 168 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MINHO, A.P.; BUENO, I.C.S.; GENNARI, S.M.; JACKSON, F.; ABDALLA, A.L. In vitro effect of condensed tannin extract from *Acacia (Acacia mearnsii)* on gastrointestinal nematodes of sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, Supl.1, p.147-151, 2008a.

MINHO, A.P.; BUENO, I.C.S.; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.; GENNARI, S.M.; ABDALLA, A.L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.147, p.172-181, 2008b.

MOLAN, A.L.; WAGHORN, G.C.; MIN, B.R.; MCNABB, C. The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration *in vitro*. **Folia Parasitologica**, v.47, p.39-44, 2000.

MOLAN, A.L.; MEAAGHER, L.P.; SPENCER, P.A.; SIKAKUMARAN, S. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v.33, p. 1691-1698, 2003.

MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R.K. Nematode control and the possible development of anthelmintic resistance. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.8, n.1, p.75-86, 1999.

NIEZEN, J.H.; CHARLESTON, W.A.G.; HODSON, J.; MACKAY, A.D.; LEATHWICK, D.M. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. **International Journal for Parasitology**, v.26, p.983-992, 1996.

NIEZEN J.H.; CHARLESTON, W.A.G.; ROBERTSON, H.A.; SHELTON, D.; WAGHORN, G.C.; GREEN, R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, p.229-245, 2002.

NIEZEN, J.H.; ROBERTSON, H.A.; WAGHORN, G.C.; CHARLESTON, W.A. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.15-27, 1998.

NIEZEN J.H.; WAGHORN, T.S.; CHARLESTON, W.A.G.; WAGHORN, G.C. Growth and gastrointestinal parasitism in lambs grazing either lucerne (*Mendicato sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. **Journal Agricultural Science**, v.125, p.281-289, 1995.

OLIVEIRA, L.M.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; MACEDO, I.T.F.; MORAIS, S.M.; MACHADO, L.K.A.; CAMPELLO, C.C.; MESQUITA, M.A. Effects of *Myracrodrum urundeuva* extracts on egg hatching and larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, v.109, p.893-898, 2011.

RAMOS, C.I; BELLATO, V.; ÁVILA, V.S.; COUTINHO, G.C.; SOUZA, A.P. Resistência de parasitos gastrintestinais de ovinos a alguns anti-helmínticos no estado de Santa Catarina, Brasil. **Ciência Rural**, v.32, n.3, p.473-477, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.  
SANGSTER, N.C; GILL, J. Anthelmintic resistance: past, present and future. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.115-124, 1999.

SCHNYDER, M.; TORGERSON, P.R.; SCHÖNMANN, M.; KOHLER, L.; HERTSBERG, H. Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from south African Boer goats in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, v.128, p.185-190, 2005.

SCZESNY-MORAES, E.A.; BIANCHIN, I.; SILVA, K.F.; CATTO, J.B.; HONER, M.R.; PAIVA, F. Resistência anti-helmíntica de nematóides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.229-236, 2010.

SOUTHERLAND, I.A.; DAMSTEEGT, A.; MILLER, C.M.; LEATHWICK, D.M. Multiple species of nematode resistant to ivermectin and benzimidazole-levamisole combination on a sheep farm in New Zealand. **New Zealand Veterinary journal**, v. 56, p. 67-70, 2008.

SOUZA, F.P., THOMAZ-SOCCOL. Contribuição para o estudo da resistência de helmintos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aries*) aos anti-helmínticos, no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.2, suplemento 1, p.217, 1997.

STRAIN, S.A.J.; STEAR, M.J. The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. **Parasite Immunology**, v.23, p.527-531, 2001.

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

TORRES-ACOSTA, J.F.J.; HOSTE, H. Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v.77, p.159-173, 2008.

TZAMALOUKAS, O.; ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKON, F.; COOP, R.L. The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. **International Journal Parasitology**, v.35, p.329-335, 2005.

VALDERRÁBANO, J.; DELFA, R.; URIARTE, J. Effect of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. **Veterinary Parasitology**, v.104, p.327-338, 2002.

VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R.; PEREIRA, M.F.; DANTAS, L.B.; XIMENES, L.J.F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará, North - East Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue Medicine Veterinary**, v.150, n.5, p.447-452, 1999.

WAGHORN, G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed dtannins for sustainable sheep and goat production. Progress and Challenges. **Animal Feed Science and technology**, v.174, p.116-139, 2008.

WALLER, P.J. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.72, p.391-412, 1997.

WARUIRU, R.M. Efficacy of closantel, albendazole and levamisole on an ivermectin resistant strain of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.65-71, 1997.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia anti-helmíntica de taninos condensados (TC) em nematódeos gastrintestinais de ovinos (*Ovis aries*).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito *in vitro* de taninos condensados provenientes da acácia (*Acacia mearnsii*) sobre ovos e larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

Verificar o efeito direto *in vitro* de taninos condensados provenientes da acácia (*Acacia mearnsii*) sobre a estrutura externa de *Haemonchus contortus*.

Verificar o efeito direto *in vivo* do consumo de taninos condensados da acácia (*Acacia mearnsii*) sobre a estrutura externa de *Haemonchus contortus* em ovinos naturalmente infectados.

### 3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

#### 3.1 EFEITO ANTI-HELMINTICO DIRETO DE TANINOS CONDENSADOS EM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS (*OVIS ARIES*).

**RESUMO:** As helmintoses gastrintestinais representam um dos principais problemas de sanidade para o rebanho ovino. O uso de plantas ricas em taninos condensados (TC) apresenta-se como uma alternativa promissora no controle de helmintos em ovinos, reduzindo o uso de produtos químicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* dos TC proveniente da acácia (*Acacia mearnsii*) sobre a eclosão de ovos e a motilidade de larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais de ovinos. Foram realizados os testes de eclodibilidade de ovos e inibição da migração larval em malha de 22  $\mu\text{m}$ . A eclodibilidade foi avaliada com os extratos diluídos em água destilada nas concentrações de 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100  $\text{mg mL}^{-1}$ . No controle negativo utilizou-se água destilada. As inibições das eclosões foram 22,3; 32,3; 39,3; 49,1; 56,7; 59; 62,3; 77,3; 92,7; 98,3 e 100%, respectivamente. O valor da  $\text{CL}_{50}$  foi de 2,85  $\text{mg mL}^{-1}$  (95% IC: 2,45 -3,31  $\text{mg mL}^{-1}$ ). No controle negativo a inibição foi de 7,1%. A inibição da migração larval foi avaliada com os extratos diluídos em água destilada nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100  $\text{mg mL}^{-1}$ . As porcentagens de inibição foram: 16,5; 37; 56,3; 79,4; 91,8 e 97,1% respectivamente. O valor da  $\text{CL}_{50}$  foi de 12,45  $\text{mg mL}^{-1}$  (95% IC: 11,49 -13,47  $\text{mg mL}^{-1}$ ). No controle negativo a inibição foi de 8,5%. Os dados encontrados no presente trabalho indicam a ação anti-helmíntica do extrato de *Acacia mearnsii*, apresentando potencial para sua aplicação no controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes.

**Palavras-chave:** Teste *in vitro*. Helmintos gastrintestinais. Taninos. Fitoterapia. Pequenos ruminantes.

Direct anthelmintic effect of condensed tannins in gastrointestinal nematodes of sheep (*Ovis aries*).

**ABSTRACT:** Gastrointestinal helminthosis are one of the main health problems of sheep flock. The usage of plants rich in condensed tannins (CT) is a promising alternative for the control of sheep helminths, reducing the chemical products use. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* effect of CT from *Acacia mearnsii* extract (AE) on the eggs hatching test and third stage larvae motility. For these analysis egg hatching (EHT) and larval migration inhibition tests (LMIT) were carried out. The EHT were performed with the AE and distilled water in the dilutions 0.09, 0.19, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100  $\text{mg mL}^{-1}$ . Distilled water was used as negative control. The hatch inhibitions were 22.3, 32.3, 39.2, 49.1, 56.7, 59.0, 62.3, 77.3, 92.7, 98.3 and 100%, respectively. The  $\text{LC}_{50}$  value was 2.85  $\text{mg mL}^{-1}$  (95% CI: 2.45 - 3.31  $\text{mg mL}^{-1}$ ). The inhibition at the negative control was 7.06%. Larval migration inhibition was performed with the AE and distilled water in the dilutions 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100  $\text{mg mL}^{-1}$ . The inhibitions were 16.5, 37.0, 56.3, 79.4, 91.8 and 97.1%, respectively. The  $\text{LC}_{50}$  value was 12.45  $\text{mg/ml}$  (95% CI: 11.49 - 13.47  $\text{mg mL}^{-1}$ ). The inhibition at the negative control was 8.53%. These results indicate the anthelmintic action of EA, presenting potential to application for the control of small ruminant gastrointestinal nematodes.

**Keywords:** *In vitro* test. Helminths. Tannins. Phytotherapy. Small ruminants.

### 3.1.1 Introdução

Os nematódeos gastrintestinais são os maiores problemas na produção ovina mundial, sendo o seu controle realizado com o uso de drogas anti-helmínticas. Entretanto, a difusão mundial do fenômeno da resistência aos anti-helmínticos e o surgimento de isolados resistentes (ALMEIDA et al. 2010; GEORGE et al., 2011) e o aumento da preocupação do consumo de resíduos nos alimentos tem estimulado novas pesquisas por alternativas de controle de helmintos (WALLER, 1999).

As alternativas incluem plantas bioativas ricas em metabólitos secundários que representam uma promissora opção para reduzir a intensidade de infecções por nematódeos em pequenos ruminantes e a utilização de drogas anti-helmínticas. O reflexo destes problemas aliado a crescente preocupação com a segurança alimentar resultou na busca por tecnologias para reduzir a presença de resíduos nos produtos de origem animal e a contaminação do meio ambiente (WALLER, 1997).

Várias técnicas *in vitro* são utilizadas com a finalidade de avaliar a ação dos compostos bioativos e sua possível ação anti-helmíntica contra endoparasitos de ruminantes (TAYLOR et al., 2002). Os principais métodos *in vitro* desenvolvidos para se avaliar o efeito de algumas substâncias sobre nematódeos de ruminantes são os testes de inibição da eclosão de ovos (IEO), teste de desenvolvimento larval (TDL), teste de inibição da migração larval (IML) e teste de inibição da alimentação de larvas (IAL) (AMARANTE et al., 1997).

Várias espécies de plantas e extratos têm sido pesquisadas como possuidoras de propriedades anti-helmínticas, focada na ação dos taninos condensados (TC) (HOSTE et al., 2006; ALONSO-DÍAZ et al., 2008). A finalidade desses estudos é comprovar os efeitos direto e indireto dos TC sobre os nematódeos gastrintestinais de ovinos (ATHANASIADOU et al., 2000; ATHANASIADOU et al., 2001; BAHUAUD et al., 2006; AZANDO et al., 2011). O exato mecanismo de ação dos taninos permanece desconhecido e pode ser diferente de acordo com o parasito, estágio de desenvolvimento e características bioquímicas da planta (HOSTE et al., 2006). No Brasil, o extrato da *Acacia mearnsii* foi testado *in vivo* em ovinos com infecção experimental por *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* (MINHO, 2006) e infecção natural (CENCI et al.,

2007). Nos testes realizados os autores relatam a redução na carga parasitária e na contagem de ovos por grama de fezes (OPG). Em teste *in vitro*, utilizando também o EA, MINHO et al. (2008) relatam inibição da alimentação larval de *H. contortus*, *T. colubriformis* e *T. circumcincta*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* de TC provenientes da acácia (*A. mearnsii*) sobre ovos e larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>) de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

### 3.1.2 Material e Métodos

#### 3.1.2.1 Animais

Dois ovinos naturalmente infectados, provenientes da região de Londrina, PR, foram mantidos estabelecidos no Setor de Isolamento do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina e alimentados com dieta livre de taninos. Na cultura fecal o isolamento e identificação revelaram a presença de quatro gêneros de nematódeos frequentes em infecções naturais na região de Londrina. Os gêneros encontrados foram *Haemonchus* (84%), *Trichostrongylus* (13%), *Oesophagostomum* (2%) e *Cooperia* (1%). Esses animais foram utilizados como fonte de ovos e larvas de helmintos.

#### 3.1.2.2 Fonte de taninos condensados

A fonte de TC utilizada foi o extrato comercial da casca de *Acacia mearnsii* (extrato de acácia de uso universal, Seta Sun®. Seta S.A.). Esse extrato possui 15% de TC pelo método HCl-Butanol; segundo metodologia descrita por PORTER et al. (1986).

#### 3.1.2.3 Isolamento de ovos e larvas de terceiro estágio

As fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais, e realizadas o isolamento dos ovos e cultura fecal para obtenção de larvas de terceiro estágio (L<sub>3</sub>). A recuperação dos ovos foi realizada segundo metodologia descrita por Coles et al. (1992) adaptado por Bizimenyera et al. (2006). As fezes foram

homogeneizadas em água destilada e filtradas em um conjunto de peneiras, sendo que na peneira de 25  $\mu\text{m}$  os ovos foram retidos, lavados com água destilada e centrifugados a  $1.100 \times g$  por 5 min. em tubos de 50 mL completados com água. O sobrenadante foi descartado e solução salina saturada adicionada para a ressuspensão do sedimento. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi lavado na peneira de 25  $\mu\text{m}$ . Os ovos coletados foram armazenados em cálice de sedimentação por 2 h. Os ovos após sifonização foram contados em cinco alíquotas de 50  $\mu\text{L}$ .

#### 3.1.2.4 Teste da eclodibilidade de ovos (IEO)

O teste foi baseado no método descrito por Von Samson-Himmelstjerna et al. (2009). Diluições do extrato de *Acacia mearnsii* (EA) foram preparadas usando água destilada. As concentrações finais dos extratos foram 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100  $\text{mg mL}^{-1}$ . Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de ovos, contendo aproximadamente 150 ovos, foram incubados em placas de cultivo celular de 24 poços por 48 horas a  $27^\circ\text{C}$  com 400  $\mu\text{L}$  de cada diluição. O teste foi conduzido com dois controles: o negativo com água destilada e o positivo com Sulfóxido de albendazole ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Ricofarm 10®, Biofarm). O teste foi realizado em seis repetições para cada concentração testada. Após o período de incubação, os ovos e larvas eclodidas foram quantificados para o cálculo da porcentagem de inibição da eclodibilidade larval. A leitura foi realizada em microscópio invertido Motic AE 31 utilizando objetiva de 10x.

#### 3.1.2.5 Teste de inibição da migração larval (IML)

O teste de inibição da migração larval foi realizado segundo metodologia descrita por Rabel et al. (1994). Larvas foram obtidas de cultura fecal de ovinos naturalmente infectados. Aproximadamente 150  $L_3$  foram incubadas a  $27^\circ\text{C}$  em tubos tipo eppendorf contendo 1 mL do extrato vegetal diluído em água destilada nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100  $\text{mg mL}^{-1}$ . O teste foi conduzido com dois controles: o negativo com água destilada e o positivo com Fosfato de levamisol ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , Ripercol®, Fort Dodge). Após 3 horas de incubação, os tubos foram centrifugados a  $1.100 \times g$  por 2 min. e o sobrenadante

descartado deixando-se 200 uL. Adicionou-se 1.800 uL de cada diluição do EA em cada poço da placa de cultivo celular de 24 poços, sendo o teste realizado em sextuplicata. A seguir, foi inserido um filtro de malha 22 um nos poços. Na parte superior do filtro foram adicionados os 200 uL de suspensão de larval nas respectivas concentrações testadas. A placa foi coberta e colocada em câmara incubadora tipo B.O.D. por mais 2 h a 27 °C. A contagem das larvas retidas e que migraram foi realizada em microscópio invertido Motic AE 31 utilizando objetiva de 10x.

### 3.1.3 Análise Estatística

Nos testes de IEO e IML, a eficácia de ambos os tratamentos foi determinada baseando-se na porcentagem de eclosão ou migração, de acordo com a seguinte equação: Inibição (%) =  $100(N_{\text{teste}}/N_{\text{total}})$ , onde  $N_{\text{teste}}$  corresponde ao número de ovos não eclodidos no IEO ou número de larvas não migradas no IML e  $N_{\text{total}}$  corresponde ao número de ovos + L<sub>1</sub> no teste de IEO ou número de larvas migradas + retidas no teste de IML.

A concentração letal 50% (CL<sub>50</sub>), isto é, a concentração efetiva capaz de inibir 50% da eclosão ou migração foi determinada a partir da curva dose-resposta, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa GrandPad Prism for Windows, versão 5.0.

### 3.1.4 Resultados

#### 3.1.4.1 Inibição da eclosão de ovos

As porcentagens de inibição de eclosão de ovos dos nematódeos gastrintestinais utilizando diferentes concentrações do EA estão apresentadas na Tabela 1. A concentração necessária para inibir 100% de eclosão foi de 100 mg mL<sup>-1</sup>.

O valor da CL<sub>50</sub> do EA na inibição da eclosão dos ovos foi de 2,85 mg mL<sup>-1</sup> (95% IC: 2,45 - 3,31 mg mL<sup>-1</sup>) (Figura 1). O controle positivo foi 100% eficaz na inibição da eclosão e no controle negativo a média de inibição foi de 7,1%.

### 3.1.4.2 Inibição da migração larval

No controle negativo, a porcentagem média de migração de L<sub>3</sub> foi de 8,5%. No controle positivo a inibição foi de 100%. As porcentagens médias de inibição da migração larval utilizando o EA estão representadas na Tabela 1. Na concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup> a inibição média foi de 97,1 %. O valor da CL<sub>50</sub> do EA na inibição da migração larval foi de 12,45 mg mL<sup>-1</sup> (95% IC: 11,49 -13,47 mg mL<sup>-1</sup>).

### 3.1.5 Discussão

Nos testes *in vitro* realizados no presente trabalho, a ação anti-helmíntica do EA foi determinada pela inibição da eclosão de ovos e inibição da migração larval de nematódeos gastrintestinais de ovinos naturalmente infectados. A eficácia do EA foi testada *in vivo* por Cenci et al. (2007) e Max (2010), quando utilizaram ovinos naturalmente infectados e demonstraram queda na contagem de OPG e redução na carga parasitária. Minho (2006) também avaliou o efeito anti-helmíntico do EA em animais experimentalmente infectados e relata que a utilização do extrato reduziu a contagem de OPG de *H. contortus* e *T. colubriformis* e a carga parasitária de *H. contortus* em ovinos. Na avaliação *in vitro* do EA, Minho et al. (2008) testaram o efeito inibitório da alimentação de larvas de primeiro estágio (L1) de *H. contortus*, *T. colubriformis* e *T. circumcincta*. De acordo com os autores, o EA inibiu a alimentação das L-L. Os dados encontrados nestes trabalhos também relatam a ação antihelmíntica do EA nos testes *in vitro* e *in vivo*, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

A concentração necessária para inibir 100% da eclosão e a CL<sub>50</sub> (100 mg mL<sup>-1</sup> e 2,85 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente) relatados no presente trabalho apresentam-se elevados em relação aos valores relatados em trabalhos anteriormente realizados, onde Molan et al. (2002) relataram que a inibição total da eclosão de ovos de *T. colubriformis* ocorreu nas concentrações variando entre 200 e 500 ug mL<sup>-1</sup> dependendo da planta analisada. Em outro estudo, Molan et al. (2003) relataram inibição de 100% da eclosão de ovos de *T. colubriformis* na concentração de 1000 ug mL<sup>-1</sup>. Bizimenyera et al. (2006) testaram extratos de diferentes partes de *Beltophorum africanum*, demonstrando que na concentração de 25 ug mL<sup>-1</sup> de todos os extratos ocorreu 100% de inibição da eclosão de ovos de *T. colubriformis* e os

valores das CL<sub>50</sub> foram de 0,619; 0,383 e 0,280 mg mL<sup>-1</sup> para os extratos da folha, casca e raízes, respectivamente. Também na concentração de 25 ug mL<sup>-1</sup>, Maciel et al. (2006) mostraram inibição de 100% da eclosão para ovos de *H. contortus* para o extrato etanólico da folhas enquanto que o extrato hexânico, na concentração de 50 ug mL<sup>-1</sup>, inibiu somente 16,92% da eclosão. Os valores das CL<sub>50</sub> foram de 35,8 e 2,2 ug mL<sup>-1</sup> para o extrato hexânico e etanólico das folhas, respectivamente. No mesmo trabalho testando extrato das sementes, ocorreu inibição total com o extrato etanólico na concentração de 3,12 ug mL<sup>-1</sup>, enquanto que o uso do extrato clorofórmico na concentração de 50 ug mL<sup>-1</sup> a inibição foi de 92,39%. Os valores da CL<sub>50</sub> foram de 0,36 e 7,26 ug mL<sup>-1</sup> para os extratos etanólico e clorofórmico, respectivamente. Oliveira et al. (2011) testaram o extrato de *Myracrodruon urundeuva* em larvas de *H. contortus* e na concentração de 2,5 ug mL<sup>-1</sup> a inibição foi de 100% para o extrato de folhas e de 83,56% para o extrato do caule na concentração de 5 ug mL<sup>-1</sup>.

Os valores de 97,1% de inibição da migração larval na concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup> e a CL<sub>50</sub> de 12,85 mg mL<sup>-1</sup> apresentados neste trabalho são superiores aos relatados na literatura, nos quais Alonso-Díaz et al.(2008) avaliaram a ação de quatro plantas taniníferas em larvas de terceiro estágio de *H. contortus* e relatam diferentes valores de inibição variando de 49,1 a 63,8% quando utilizaram o extrato na concentração de 1200 ug mL<sup>-1</sup>. Em outro estudo, Alonso-Díaz et al. (2011) relataram que as inibições da migração na concentração de 1200 ug mL<sup>-1</sup> foram de 48,5 e 20,9% para *Havardia albicans* e *Acacia gaumeri*, respectivamente. Manolaraki et al. (2010) relatam na concentração de 1200 ug mL<sup>-1</sup>, sete plantas testadas apresentaram inibição da migração que variou de 38,9 a 79,1%.

Os valores de inibição e CL<sub>50</sub> encontrados no presente trabalho foram superiores aos relatados em trabalhos anteriormente realizados utilizando fontes de TC. As diferenças de valores encontradas neste trabalho podem estar relacionadas com a fonte de TC, métodos de extração e isolados de parasitos avaliados.

A principal contribuição deste composto, em longo prazo, seria a diminuição no número de aplicações de anti-helmínticos, aumentando o intervalo entre os tratamentos. Isso diminuiria o risco de desenvolvimento de isolados resistentes às drogas utilizadas.

### 3.1.6 Conclusões

O extrato de *Acacia mearnsii* inibe a eclosão de ovos e migração de larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais de ovinos naturalmente infectados nos testes *in vitro*.

Estudos são necessários para a definição de alguns aspectos envolvidos como métodos de extração e dose para que haja regularidade de produção, a fim de viabilizar a utilização destes compostos no controle de nematódeos em propriedades com relatos de resistência anti-helmíntica e ou propriedades que adotaram sistema de produção orgânica.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F.A.; GARCIA, K.C.O.D.; TORGERSON, P.R.; AMARANTE, A.F.T. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. **Parasitology International**, v.59, p.622-625, 2010.
- ALONSO-DÍAZ, M.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; HOSTE, H. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. **Veterinary Parasitology**, v.153, p.313-319, 2008.
- ALONSO-DÍAZ, M.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; HOSTE, H. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.360-364, 2011.
- AMARANTE, A.F.T.; BAGNOL JUNIOR, J.; AMARANTE, M.R.V.; BARBOSA, M.A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.89-104, 1997.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, S.; COOP, R.L. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Record**, v.146, p.728-732, 2000.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, S.; COOP, R.L. Direct anthelmintic effect of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: In vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.205-219, 2001.
- AZANDO, E.V.B.; HOUNZANGBÉ-ADOTÉ, M.S.; OLOUNLADE, P.A.; BRUNET, S.; FABRE, N.; VALENTIN, A.; HOSTE, H. Involvement of tannins and flavonoids in the in vitro effects of *Newbouldia laevis* and *Zanthoxylum zanthoxyloides* extracts on the exsheathment of third-stage infective larvae of gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.292-297, 2011.
- BAHUAUD, D.; MARTINEZÓRTIZ DE MONTELLANO, C.; CHAUVEAU, S.; PREVOT, F.; TORRES-ACOSTA, F.; FOURASTE, I.; HOSTE, H. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage of parasitic nematodes. **Parasitology**, v.132, p.545-554, 2006.
- 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, p.336-343, 2006.
- CENCI, F.B.; LOUVANDINI, H.; MCMANUS, C.M.; DELL'PORTO, A.; COSTA, D.M.; ARAÚJO, S.C.; MINHO, A.P.; ABDALLA, A.L. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.132-137, 2007.

- COLES, G.C.; BAUER, C.; BOTGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS S.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v.44, p.35-44, 1992.
- GEORGE, N.; PERSAD, K.; SAGAM, R.; OFFIAH, V.N.; ADESIYUN, A.A.; HAREWOOD, W. Efficacy of commonly used anthelmintics: First report of multiple drug resistance in gastrointestinal nematodes of sheep in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, v.183, p.194-197, 2011.
- HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S.M.; HOSKIN, S.O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, v.22, p.253-261, 2006.
- MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M.; BEVILÁQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; COSTA, C.T.C.; CASTRO, C.M.S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia Azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.98-104, 2006.
- MANOLARAKI, F.; SOTIRAKI, S.; STEFANAKIS, A.; SKAMPARDONIS.; VOLANIS, M.; HOSTE, H. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. **Parasitology**, v.137, p.685-696, 2010.
- MAX, R.A. Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.138-143, 2010.
- MINHO, A.P. **Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos**. 168 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.
- MINHO, A.P.; BUENO, I.C.S.; GENNARI, S.M.; JACKSON, F.; ABDALLA, A.L. In vitro effect of condensed tannin extract from *Acacia (Acacia mearnsii)* on gastrointestinal nematodes of sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, Supl.1, p.147-151, 2008.
- MOLAN, A.L.; MEAGHER, L.P.; SPENSER, P.A.; SIVAKUMARAN, S. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.1691-1698, 2003.
- MOLAN, A.L.; WAGHORN, G.C.; McNABB, W.C. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis in vitro*. **Veterinary Record**, v.150, p.65-69, 2002.
- OLIVEIRA, L.M.B.; BEVILAQUA, C.M.L.; MACEDO, I.T.F.; MORAIS, S.M.; MACHADO, L.K.A.; CAMPELLO, C.C.; MESQUITA, M.A. Effects of *Myracrodrum urundeuva* extracts on egg hatching and larval exsheathment of *Haemonchus contortus*. **Parasitology Research**, v.109, p.893-898, 2011.
- PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v.25, p.223-230, 1986.

RABEL, B.; MCGREGOR, R.; DOUCH, P.G. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. **International Journal for Parasitology**, v.24, n.5, p.671-676, 1994.

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

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; COLES, G.C.; JACKSON, F. Standardization of egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. **Parasitology Research**, v.105, p.825-834, 2009.

WALLER, P.J. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.72, 391-412, 1997.

WALLER, P.J. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.155-164, 1999.

**Tabela 1** – Média de inibição de eclosão de ovos e de migração de larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais de ovinos (porcentagem  $\pm$  DP) após contato prévio com extrato de *Acacia mearnsii* em concentrações crescentes.

Concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	Média de Inibição de eclosão (%)	Media de inibição de migração (%)
0,09	22,3 $\pm$ 4,4	NT
0,19	32,3 $\pm$ 3,7	NT
0,39	39,3 $\pm$ 1,4	NT
0,78	49,1 $\pm$ 4,1	NT
1,56	56,7 $\pm$ 2,8	NT
3,12	59,0 $\pm$ 2,2	16,5 $\pm$ 2,8
6,25	62,3 $\pm$ 3,7	37 $\pm$ 3,2
12,5	77,3 $\pm$ 1,9	56,3 $\pm$ 9,1
25	92,7 $\pm$ 1,3	79,4 $\pm$ 5,9
50	98,3 $\pm$ 0,7	91,8 $\pm$ 2,0
100	100	97,1 $\pm$ 0,8
Sulfóxido de albenzazole (40 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	100	NT
Fosfato de levamisol (50 $\mu$ g mL <sup>-1</sup> )	NT	100
Água destilada	7,1 $\pm$ 0,9	8,5 $\pm$ 1,5

DP - Desvio padrão NT - Não testado

**Figura 1** – Curva dose-resposta de eficácia do extrato de *Acacia mearnsii* em concentrações crescentes, em teste de inibição da eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de ovinos.

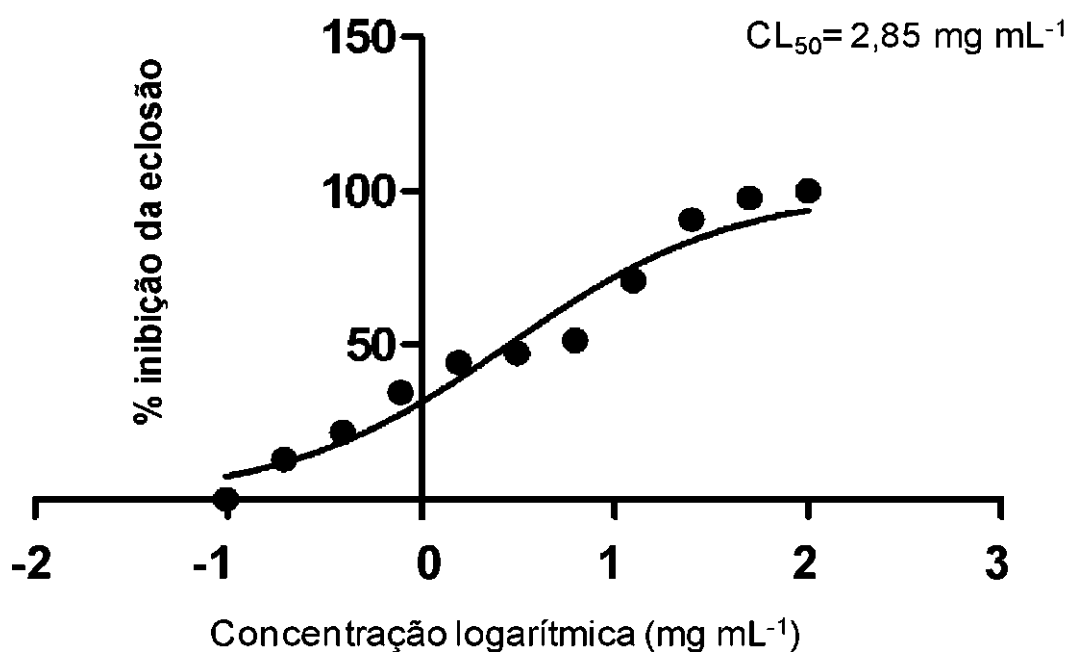
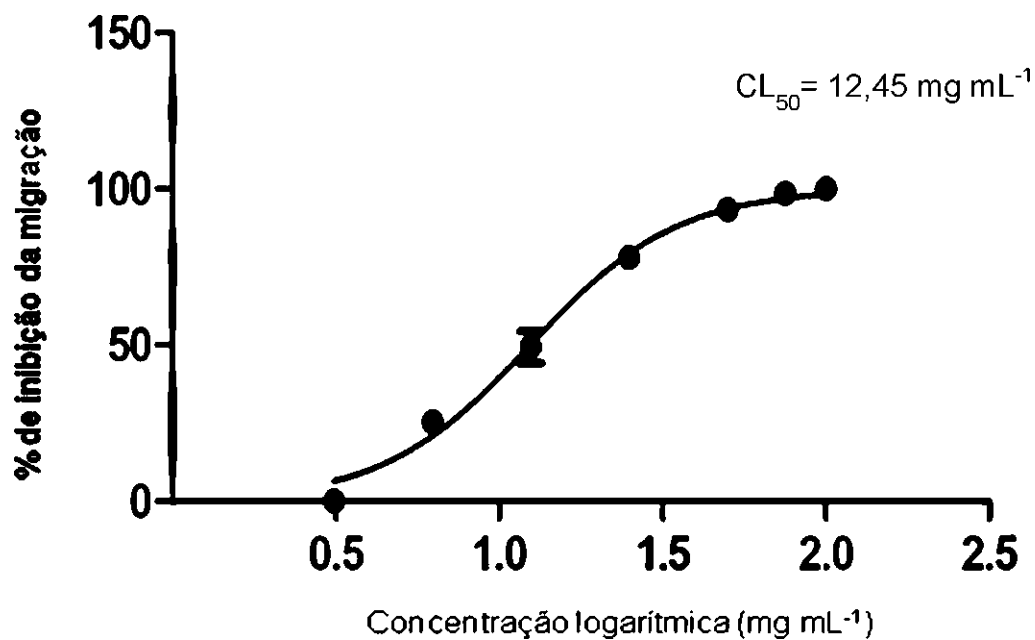


Figura 2 – Curva dose-resposta de eficácia do extrato de *Acacia mearnsii* em concentrações crescentes, em teste de inibição da migração de larvas de terceiro estágio de nematódeos gastrintestinais de ovinos.



ARTIGO 3.2 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS DA CUTÍCULA DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*  
EXPOSTOS AO EXTRATO DE *ACACIA MEARNsii*.

**RESUMO:** As helmintoses gastrintestinais representam um dos principais problemas DE sanidade para o rebanho ovino. *Haemonchus contortus* é o parasito mais patogênico para os pequenos ruminantes em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, inclusive no Brasil. Estudos realizados com fitoterápicos demonstram a presença de alterações cuticulares em diversas espécies de trematódeos, cestódeos e nematódeos. O objetivo do trabalho foi analisar a ação do extrato de *Acacia mearnsii* (EA) na cutícula de *H. contortus*. No teste *in vitro*, adultos de *H. contortus* foram coletados de um ovino naturalmente infectado, e os parasitos foram colocados em contato com o EA ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), durante duas horas à  $37^{\circ}\text{C}$ . No teste *in vivo*, um ovino naturalmente infectado recebeu EA ( $1,6 \text{ g kg}^{-1}$  PV), durante três dias consecutivos. Após 24 horas, o animal foi eutanasiado para coleta dos *H. contortus* presentes no abomaso. Os parasitos expostos ao EA e os controles negativos foram analisados ao microscópio eletrônico de varredura. Alterações morfológicamente semelhantes foram observadas em toda a extensão da cutícula dos exemplares que permaneceram em contato com o EA *in vitro* e *in vivo*. As alterações morfológicas não foram observadas nos controles negativos. Estes resultados indicam a ação direta do EA na cutícula de *H. contortus* nos testes *in vitro* e *in vivo*.

**Palavras-chave:** Nematódeos gastrintestinais. Taninos. Microscopia eletrônica. Fitoterapia.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN THE *HAEMONCHUS CONTORTUS* CUTICLE  
EXPOSED TO *ACACIA MEARNsii* EXTRACT.

**ABSTRACT:** The gastrointestinal helminthiasis represent a major health problem for the sheep flock. The parasite *Haemonchus contortus* is the most pathogenic for small ruminants in tropical and subtropical regions worldwide, including Brazil. Studies performed with phytomedicines show the presence of cuticular lesions in several species of trematodes, cestodes and nematodes. The objective of this study was to evaluate the activity of *Acacia mearnsii* extract (AE) in the cuticle of *H. contortus*. In *in vitro* test, adults nematodes were collected from a naturally infected lamb. The parasites were placed in contact with AE ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), for two hours at  $37^{\circ}\text{C}$ . In *in vivo* test, one naturally infected sheep received EA ( $1.6 \text{ g kg}^{-1}$  BW) for three consecutive days. After 24 hours the lamb was euthanized and the *H. contortus* were collected from the abomasum. The parasites used in tests and the negative controls were analysed using a Scanning electron microscope. Similar morphological alterations were observed on the entire extension of the cuticle of the specimens that remained in contact with the EA *in vitro* and *in vivo* assays. The alterations were not observed in negative controls. These results indicate the direct action of EA on the cuticle of *H. contortus* in *in vitro* and *in vivo* tests.

**Keywords:** Gastrointestinal nematodes. Tannins. Electron microscopy. Phytotherapy

### 3.2.1 Introdução

Dentre as parasitoses na ovinocultura, os nematódeos gastrintestinais (NGI) são os responsáveis pelos maiores prejuízos na cadeia de produção. O controle dos NGI de pequenos ruminantes tem se baseado na administração repetida de antihelmínticos (AMARANTE et al., 1997) .

O uso frequente desses anti-helmínticos tem levado ao surgimento de populações resistentes a muitos fármacos. Outro fator a ser considerado é a presença de resíduos na carne e a contaminação ambiental o que tem estimulado a pesquisa em busca de novas alternativas mais sustentáveis de controle do parasitismo (WALLER et al., 2006).

Nos últimos dez anos vários trabalhos têm sido realizados com plantas ricas em taninos condensados (TC), com o objetivo de avaliar sua utilização no controle dos NGI de pequenos ruminantes (BUTTER et al., 2000; MARLEY et al., 2003; TZAMALOUKAS et al., 2005; IQBAL et al., 2007; MINHO et al., 2008a; ALONSO-DIAZ et al., 2011).

Os TC são metabólitos secundários de plantas e apresentam atividades antihelmínticas contra infecção natural ou experimental de NGI de ovinos. Duas hipóteses tem sido sugeridas para explicar o potencial anti-helmíntico dos taninos. O efeito direto pode ser explicado pela interação do tanino com os parasitos, baseado na afinidade dos taninos com as proteínas. A segunda hipótese baseia no efeito indireto, ou seja, aumento na resposta imune do animal frente aos helmintos, em consequência do aumento na absorção de proteínas e aminoácidos no intestino delgado devido à capacidade que os taninos apresentam em proteger as proteínas presentes na dieta contra degradação ruminal (HOSTE et al., 2006).

Estudos com o extrato de *Acacia mearnsii* (EA) como fonte de TC vêm sendo realizados para avaliar a ação no controle de NGI em ovinos. Resultados *in vitro* e *in vivo* demonstraram efeitos associados com essa planta contra larvas e parasitos adultos, tais como redução na contagem de ovos por grama de fezes, inibição na alimentação de larvas de primeiro estágio e redução na carga parasitária, indicando que o extrato de acácia contém substâncias ativas responsáveis pela ação antihelmíntica (MINHO, 2006; CENCI et al., 2007; MINHO et al., 2008b; MAX, 2010).

Alterações ultraestruturais da cutícula foram descritas por Hoste et al. (2006) quando avaliaram a ação direta dos TC em *Trichostrongylus colubriformis*,

onde descrevem a presença de rugas transversais na superfície dos nematódeos. Também avaliando as alterações ultraestruturais na cutícula, Martinez-de-Montellano (2010) descreve a presença de rugas transversais e longitudinais na cutícula de *Haemonchus contortus* após contato com fontes de TC.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar alterações morfológicas ultraestruturais em adultos de *Haemonchus contortus* após contato com EA em condições *in vitro* e *in vivo*.

### 3.2.2 Material e Métodos

#### 3.2.2.1 Fonte de taninos condensados

A fonte de TC utilizada foi o extrato comercial da casca de *Acacia mearnsii* (extrato de acácia de uso universal, Seta Sun®. Seta S.A.). Esse extrato possui 15% de TC pelo método HCl-Butanol; segundo metodologia descrita por PORTER et al. (1986).

#### 3.2.2.2 Teste *in Vitro*

#### 3.2.2.3 Adultos de *haemonchus contortus*

Os parasitos adultos utilizados no teste *in vitro* foram coletados de um ovino naturalmente infectado oriundo da região de Londrina e mantido no Setor de Isolamento do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina - PR, alimentado com dieta livre de taninos. O ovino foi eutanasiado e o abomaso coletado, transferido para o laboratório e aberto para coleta dos parasitos adultos do abomaso.

#### 3.2.2.4 Exposição dos parasitos ao extrato

Os parasitos foram colocados em placas de Petri contendo 5 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9% a 37 °C) para eliminar possíveis resíduos do conteúdo abomasal. A partir desse momento, todos os procedimentos com os parasitos foram realizados a 37 °C. Os parasitos do grupo controle foram submersos

em solução fisiológica e o grupo tratado colocado em contato com o extrato diluído em água destilada na concentração de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ . No teste, quatro parasitos foram utilizados por tratamento e incubados por duas horas. Após o período de incubação, os parasitos permaneceram em solução fisiológica por duas horas, sendo realizada a substituição da solução a cada 30 minutos, para retirada do excesso da solução contendo extrato.

#### 3.2.2.5 Teste *in vivo*

Dois ovinos naturalmente infectados, oriundos da região de Londrina e mantidos no Setor de Isolamento do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR, foram utilizados para recuperação de adultos de *Haemonchus contortus*. Um ovino recebeu uma dose diária do EA ( $1,6 \text{ g kg}^{-1} \text{ PV}$ ) durante três dias consecutivos, diluído em água morna ( $\pm 37^\circ \text{ C}$ ). A dose foi baseada em estudos realizados por Minho (2006) e Max (2010), onde relatam que dieta à base de EA na concentração de  $1,6 \text{ g kg}^{-1} \text{ PV}$ , apresentaram ação anti-helmíntica em testes *in vivo*, sendo observadas redução na contagem de OPG e na carga parasitária.

Como controle negativo, utilizou-se um ovino, o qual recebeu dieta livre de taninos durante todo o período experimental. Após 24 horas do último fornecimento, os animais foram eutanasiados e o abomaso coletado foi transferido imediatamente para o laboratório e aberto para coleta dos parasitos adultos. Na observação pela MEV, quatro parasitos foram utilizados por tratamento. Os parasitos utilizados no teste foram lavados em solução fisiológica. Após a lavagem para retirada de excesso de conteúdo abomasal, os adultos foram imediatamente fixados como descrito a seguir.

#### 3.2.2.6 Processamento do material para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a fixação dos parasitos obtidos de ambos os testes (*in vitro* e *in vivo*), utilizou-se o fixador Karnovsky modificado, composto por glutaraldeído a 5% em tampão fosfato, 0,1M pH 7,4 (Karnovsky et al. 1965). Após 24 horas de fixação a  $4^\circ \text{ C}$ , foram lavados por três vezes em tampão fosfato. A seguir os parasitos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato (pH 7,4 durante 1 hora).

As amostras foram lavadas e desidratadas em uma série de etanol em concentrações crescentes (70 a 100 °GL).

As amostras foram secas ao ponto crítico utilizando o Critical Point Dryer CPD 030 (Baltec), montadas em "stubs" e recobertas com ouro utilizando o Sputter Coater

SCD 050 e observadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200, no laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises da Universidade Estadual de Londrina.

### 3.2.3 Resultados

#### 3.2.3.1 Estudo *in vitro*

A Figura 01 mostra as alterações ultraestruturais encontradas em adultos de *H. contortus* após exposição *in vitro* por duas horas, ao extrato de *A. mearnsii* na concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup>. As alterações encontradas no grupo tratado estavam presentes em todos adultos analisados, estando limitadas à cutícula, onde podem ser observadas rupturas da cutícula, com aumento de volume que distorcem as estriações cuticulares e aparentemente há extravasamento de material interno (T1A). Quando comparados com a superfície corporal do parasito controle (C1A e C2A), observa-se a presença de rugas transversais na cutícula em toda a extensão corporal (T2A).

#### 3.2.3.2 Estudo *in vivo*

A Figura 2 mostra as alterações ultraestruturais encontradas em adultos de *H. contortus* após o animal receber dose diária única de 1,6 g kg<sup>-1</sup> PV do EA dieta durante três dias consecutivos. As alterações observadas no grupo tratado (T1B e T2B) estavam presentes em todos os parasitos analisados, estando limitadas à cutícula e à região cefálica, observando-se rupturas da cutícula, notando-se aumento de volume que distorcem as estriações cuticulares e aparentemente extravasamento de material interno (T1B). Alterações semelhantes foram observadas nas condições *in vitro*. Na região cefálica podem ser observadas

alterações estruturais com perda da integridade (T<sub>2B</sub>) quando comparado com o parasito não tratado (C<sub>2B</sub>).

### 3.2.4 Discussão

A ação anti-helmíntica de diferentes extratos utilizados como fonte de TC foram avaliados em ovinos, sendo observados a redução na eliminação de ovos (NIEZEN et al., 1998; BUTTER et al., 2000; ATHANASIADOU et al., 2001; MARLEY et al., 2003; MIN et al., 2004), redução na carga parasitária (TZAMALOUKAS et al., 2005; MINHO, 2006; HECKERNDORN et al., 2007; MARTINEZ-ORTÍZ-DE-MONTELLANO et al., 2010) e na fertilidade das fêmeas quando esses parâmetros foram avaliados (ATHANASIADOU et al., 2001; LANGE et al., 2006; HECKERNDORN et al., 2007). Os resultados apresentados nestes trabalhos demonstram a ação anti-helmíntica de diferentes extratos utilizados como fonte de TC.

No presente trabalho, a ação anti-helmíntica do extrato de *Acacia mearnsii* foi demonstrada por alterações ultraestruturais na cutícula de adultos de *Haemonchus contortus*, através da MEV, quando os mesmos foram colocados em contato com o extrato em condições *in vitro* e *in vivo*. A ação anti-helmíntica utilizando o mesmo extrato também foi avaliada em outros trabalhos (MINHO, 2006; CENCI et al., 2007; MINHO et al., 2008b; MAX, 2010), onde foram relatados redução na carga parasitária, redução na contagem de OPG e inibição da alimentação de larvas de primeiro estágio. Os resultados encontrados nestes trabalhos corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho, confirmando a ação direta do extrato de *Acacia mearnsii*.

As alterações ultraestruturais encontradas em adultos de *H. contortus* após exposição *in vitro* estão limitadas à cutícula, onde podem ser observadas rupturas, com aumento de volume que distorcem as estriações cuticulares e aparentemente há extravasamento de material. Observa-se também a presença de rugas transversais. Modificações na cutícula foram descritas por Hoste et al. (2006), onde descrevem alterações em adultos de *Trichostrongylus colubriformis* com a presença de rugas longitudinais e transversais, observadas na cutícula através da MEV, após exposição *in vitro* ao extrato de castanha rico em taninos condensados. A presença de rugas na cutícula também foi descrita por

Martínez-Ortíz-de-Montellano (2010) através de MEV em adultos de *H. contortus* quando em contato *in vitro* com extratos de plantas ricas em taninos. Estes estudos também demonstraram a ação dos TC na cutícula no teste *in vitro*, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

No estudo *in vivo*, alterações foram observadas na cutícula e região cefálica. Alterações na cutícula estão representadas por rugas transversais, fato também observado por Martínez-Ortíz-de-Montellano (2010). Rupturas da cutícula com aumento de volume que distorcem as estriações cuticulares com extravasamento de material interno foram observadas, sendo estas semelhantes às observadas no teste *in vitro* e na região cefálica pode ser observadas alterações na conformação estrutural da superfície externa com perda da integridade, fatos esses não relatados anteriormente.

A função da cutícula nos nematódeos é manter a conformação estrutural, permitindo a sua motilidade e absorção seletiva de nutrientes e osmorregulação com o sistema digestório do hospedeiro (PAGE e WINTER, 2003). Baseado nas funções da cutícula, as lesões descritas no presente trabalho podem interferir na motilidade e causar desequilíbrio osmótico, podendo comprometer as funções de troca com o meio em que vive. As alterações descritas na região cefálica podem provocar distúrbios mecânicos, afetando com isso a função de nutrição do nematódeo.

Futuros trabalhos para avaliar possíveis alterações em estruturas internas podem ser realizados para avaliar o efeito de extratos contendo taninos.

### 3.2.5 Conclusões

As observações pela MEV revelaram alterações ultraestruturais nos parasitos adultos de *H. contortus* após contato *in vitro* e *in vivo* com o extrato de *Acacia mearnsii* quando comparados com o grupo controle. As alterações se concentraram na cutícula e na região cefálica demonstrando a ação direta dos TC sobre os parasitos estudados. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a ação em estruturas internas dos nematódeos e a interação dos taninos condensados com estruturas presentes dos nematódeos.

## REFERÊNCIAS

ALONSO-DÍAZ, M.A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; HOSTE, H. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.360-364, 2011.

AMARANTE, A.F.T.; BAGNOLA JUNIOR, J.; AMARANTE, M.R.V.; BARBOSA, M.A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.73, p.89-104, 1997.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, S.; COOP, R.L. The effects of condensed tannins supplementation of foods with different protein content on parasitism, food intake and performance of sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis*. **Journal of Nutrition**, v.86, p.697-706, 2001.

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

CENCI, F.B.; LOUVANDINI, H.; MCMANUS, C.M.; DELL'PORTO, A.; COSTA, D.M.; ARAÚJO, S.C.; MINHO, A.P.; ABDALLA, A.L. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.132-137, 2007.

HECKENDORN, F.; HARING, D.A.; MAURER, V.; SENN, M.; HERTZBERG, H. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.123-134, 2007.

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

IQBAL, Z.; SARWAR, M.; JABBAR, A.; AHMED, S.; NISA, M.; SAJID, M.S.; KHAN, M.N.; MUFTI, K.A.; YASEEN, M. Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.125-131, 2007.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixate of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v.27, p.137A-138A, 1965.

LANGE, K.C.; OLCOTT, D.D.; MILLER, J.E.; MOSJIDIS, J.A.; TERRIL, T.H.; BURKE, J.M.; KEARNEY, M.T. Effect of *sericea lespedeza* (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lamb. **Veterinary Parasitology**, v.141, p.273-178, 2006.

MARLEY, C.L.; COOK, R.; KEATINGE, R.; BARRETT J.; LAMPKIN, N.H. The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. **Veterinary Parasitology**, v.112, p.147-155, 2003.

MARTÍNEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C. **Mécanismes d'action de plantes riches en tanins sur les nematodes gastrointestinaux adultes des petits ruminants.** 145 p. Thèse (Doctorado) - Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse, 2010.

Disponível em:

<[http://ethesis.inptoulouse.fr/archive/00001490/01/martinez\\_ortiz\\_de\\_montellano.pdf](http://ethesis.inptoulouse.fr/archive/00001490/01/martinez_ortiz_de_montellano.pdf)>.

Acesso em 14 de março de 2012.

MARTÍNEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, C.; VARGAS-MAGAÑA, J.J.; CANUL-KU, H.I.; MIRANDA-SOBERANIS, R.; CAPETILLO-LEAL, C.; SANDOVAL-CASTRO, C.A.; HOSTE, H.; TORRES-ACOSTA, J.F.J. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.283-290, 2010.

MAX, R.A. Effect of repeated wattle tannin drenches on worm burdens, faecal egg counts and egg hatchability during naturally acquired nematode infections in sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v.169, p.138-143, 2010.

MIN, B.R.; POROY, W.E.; HART, S.P.; SAHLU, T. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections oin grazing wether goats. **Small Ruminant Research**, v.51, p.279-283, 2004.

MINHO, A.P. **Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos.** 168 p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MINHO, A.P.; BUENO, I.C.S.; LOUVANDINI, H.; JACKSON, F.; GENNARI, S.M.; ABDALLA, A.L. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.147, p.172-181, 2008a.

MINHO, A.P.; BUENO, I.C.S.; GENNARI, S.M.; JACKSON, F.; ABDALLA, A.L. In vitro effect of condensed tannin extract from *Acacia (Acacia mearnsii)* on gastrintestinal nematodes of sheep. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, Supl.1, p.147-151, 2008b.

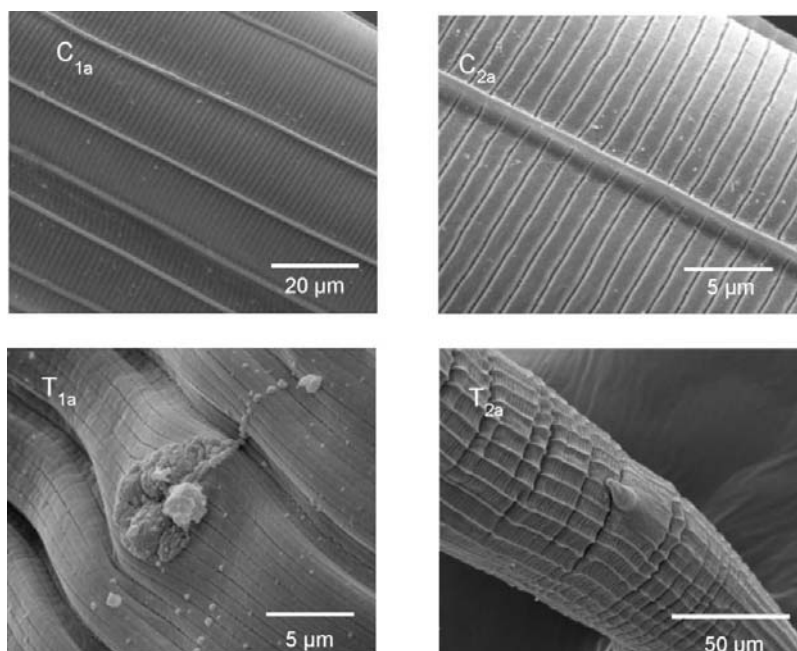
NIEZEN, J.H.; ROBERTSON, H.A.; WAGHORN, G.C.; CHARLESTON, W.A. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. **Veterinary Parasitology**, v.80, p.15-27, 1998. PAGE, A.P.; WINTER, A.D. Enzymes involved in the biogenesis of the nematode cuticle. **Advances in Parasitology**, v.53, p.85-148, 2003.

PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v.25, p.223-230, 1986.

TZAMALOUKAS, O.; ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKON, F.; COOP, R.L. The consequences of short-term grazing of bioactive forages on established adult and incoming larvae populations of *Teladorsagia circumcincta* in lambs. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.329-335, 2005.

WALLER, P.J. sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science and Technology**, v.126, p.277-289, 2006.

**Figura 1** – Eletromicrografia de varredura mostrando a ultraestrutura externa de *Haemonchus contortus* que foram expostos a solução fisiologia (C) e ou expostos ao extrato de *Acacia mearnsii* (T).

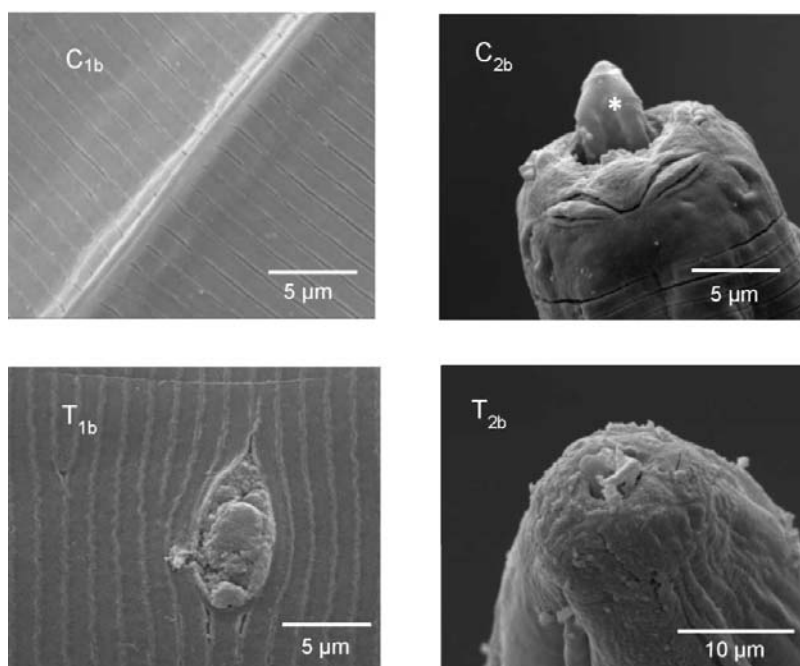


C<sub>1a</sub> e C<sub>2a</sub>: Cutícula normal.

T<sub>1a</sub>: Observa-se área de ruptura da cutícula com aumento de volume que distorcem as estriações cuticulares e aparentemente há extravasamento de material interno.

T<sub>2a</sub>: Superfície corporal com presença de rugas transversais.

**Figura 2** – Eletromicrografia de varredura de *Haemonchus contortus* obtidos de animais alimentados com dieta livre de fontes de taninos (C) e submetidos ao tratamento com extrato de *Acacia mearnsii* (T).



C<sub>1b</sub>: Cutícula normal, C<sub>2b</sub>: Região cefálica normal. (\* Lanceta dorsal)

T<sub>1b</sub>: Observa-se área de ruptura da cutícula com aumento de volume que distorce as estriações cuticulares e aparentemente há extravasamento de material interno, T<sub>2b</sub>: Região cefálica apresentando alterações na conformação ultraestrutural da cutícula.

#### 4 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados encontrados mostraram-se promissores, indicando que os taninos condensados podem auxiliar no controle das infecções parasitárias agindo em dois pontos do desenvolvimento dos nematódeos gastrintestinais: (i) agindo sobre ovos e larvas, desta forma evitando ou minimizando a contaminação das pastagens, já que em elevadas concentrações inibiram a eclosão de ovos e migração das larvas de terceiro estágio e (ii) agindo sobre formas adultas de nematódeos, pois o contato do extrato com os parasitos adultos causaram alterações ultraestruturais na cutícula, representado por rupturas com possível extravasamento de material interno e rugas transversais causando distorções nas estrias cuticulares. Esses fatores podem alterar a função motora e consequentemente ser um fator limitante na sobrevivência dos mesmos.

## **ANEXOS**

## ANEXO A



## COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 211/2009

Londrina, 16 de dezembro de 2009.

Prezado Pesquisador

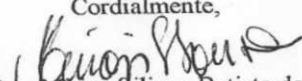
O CEEA/UEL, reunido aos 13 de outubro do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Efeito *in vitro* de taninos condensados (TC) sobre larvas de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis***", registrado no CEEA sob o nº 87/09, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 05 ovinos machos divididos em dois grupos de 2-3 animais com procedência de produtores da região, como doadores de ovos e larvas. Inicialmente os animais receberão anti-helmintico via oral à base de Levamisol e Albendazole por dois dias consecutivos para a completa eliminação de parasitos intestinais. Após a completa eliminação de qualquer tipo de parasito intestinal, os animais serão inoculados via oral com larvas de *H. contortus* e *H. colubriformis*. Serão feitos testes *in vitro* para pesquisa da ação dos TC sobre os parasitas. O projeto está previsto para ser executado entre fevereiro de 2010 e novembro de 2011.

Cumprе orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

  
Prof. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza  
Coordenadora do CEEA/UEL

**Ilmo. Sr.**  
**Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura**  
**Coordenador do Projeto**  
**Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**  
**Centro de Ciências Agrárias**

## ANEXO B



## COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 17/2010

Londrina, 14 de fevereiro de 2010.

Prezado Pesquisador

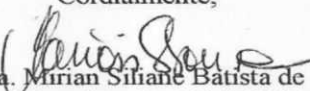
O CEEA/UEL, reunido aos 09 de fevereiro do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* em ovinos**", registrado no CEEA sob o nº 115/09, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 41 ovinos, SRD, divididos em 7 grupos, com procedência de produtores da região de Londrina-PR. Em um grupos será realizada a avaliação *in vitro* de fontes de tanino sobre H. contortus e T. colubriformes, e em seis grupos será estudados o efeito direto dos taninos condensados sobre H. contortus e T. colubriformis em ovinos experimentalmente infectados. O projeto está previsto para ser executado entre abril de 2010 a junho de 2011.

Cumprе orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

  
Prof. Dra. Mirian Siliane Batista de Souza  
Coordenadora do CEEA/UEL

Ilmo. Sr.  
**Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura**  
Coordenador do Projeto  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
Centro de Ciências Agrárias