



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**Eficácia de extratos vegetais em nematódeos parasitas:
avaliação *in vitro* em *Haemonchus contortus* e avaliação *in vivo* em *Strongyloides venezuelensis***

Camila Olivo de Carvalho

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

*Prof. Adj. Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Orientador*

BOTUCATU-SP

2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Eficácia de extratos vegetais em nematódeos parasitas:
avaliação *in vitro* em *Haemonchus contortus* e avaliação *in vivo* em *Strongyloides venezuelensis***

CAMILA OLIVO DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Microorganismos.

Prof. Adj. Alessandro Francisco Talamini do Amarante
Orientador

Dra. Ana Carolina de Souza Chagas
Co-orientadora

BOTUCATU-SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Carvalho, Camila Olivo de.

Eficácia de extratos vegetais em nematódeos parasitas: avaliação *in vitro*
em *Haemonchus contortus* e avaliação *in vivo* em *Strongyloides venezuelensis*
/ Camila Olivo de Carvalho. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Botucatu, 2011

Orientador: Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Co-orientadora: Ana Carolina de Souza Chagas

Capes: 21302022

1. Ovinos – Parasito. 2. Parasitologia veterinária. 3. *Haemonchus contortus*. 4. Medicina popular.

Palavras-chave: Controle; Extratos vegetais; Medicina popular; Nematódeos
gastrintestinais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me abençoado e me dado forças para concluir mais essa etapa da minha vida.

Aos orientadores, em especial, os quais foram responsáveis pelo início de todo este trabalho, a Dra. Ana Carolina Souza Chagas por sempre estimular a jovem pesquisadora que ela enxerga em mim e ao Prof. Adj. Alessandro F. T. do Amarante por me acolher e incentivar nesse caminho.

A todos os colegas de trabalho que desde o início me apoiaram e estimularam quando preciso. Dentre estes não posso deixar de citar os antigos colegas da Embrapa, Rodrigo Giglioti, Carolina Giglioti, Jenifer Ferrezini, Daniela Schiavone, Cinthia S. Georgetti e Leticia Boschini, e os atuais colegas da UNESP, Bruna F. Silva, César C. Bassetto, Fabiana A. Almeida e Maurícia B. Silva, com os quais pude partilhar muitos momentos de aprendizado e alegria. Além destes, tenho que mencionar também Andrine M.C. Navarro que me deu uma ajuda “arretada” nos testes realizados com os ratos e Maria Regina Silva que sempre se mostrou muito interessada nos trabalhos do laboratório e sempre pronta para ajudar no que fosse preciso. Aproveito para agradecer aos funcionários do departamento de Parasitologia, em especial a Valdir e Roberto e Nilza que me receberam com carinho e estiveram sempre prontos a me auxiliar.

Aos meus pais, avós e a todos os familiares que me apoiaram e acreditaram na realização de mais esta etapa da minha vida.

Ao Marcos Vinícios pela compreensão em todos os momentos difíceis e principalmente por contribuir com meu crescimento pessoal e incentivar meu crescimento profissional.

À Maria Zeza, por ter me acolhido em Botucatu e pela agradável companhia nas horas em que passamos juntas.

Aos colegas das instituições parceiras, Fernando Cotinguiba, Francisco Célio M. Chaves, Luciana G. Brito que forneceram os extratos vegetais utilizados nesse trabalho.

Ao Humberto Bizzo e à Marillia P. Stephan pela análise dos constituintes dos extratos.

Ao Waldomiro Barioni-Junior pela paciência e auxílio com as análises estatísticas.

À profa. Fernanda de Freitas Anibal pela concessão dos animais utilizados neste estudo.

À FAPESP (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa que me foi concedida e à EMBRAPA pelo apoio financeiro ao trabalho.

Agradeço finalmente a todos que aqui não foram citados, mas que de alguma forma estiveram envolvidos na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
CAPÍTULO 1	5
1. Características dos estágios de vida-livre de <i>Haemonchus contortus</i>	6
2. Características estruturais e biológicas dos envoltórios de <i>Haemonchus contortus</i>	11
2.1. Membrana do ovo.....	11
2.2. Cutícula.....	12
3. Pesquisa da atividade de extratos vegetais <i>in vitro</i> sobre nematódeos gastrintestinais.....	14
4. Considerações finais.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO 2.....	27
THE ANTHELMINTIC EFFECT OF FIVE PLANT EXTRACTS ON <i>Haemonchus contortus</i> AND <i>Strongyloides venezuelensis</i>	28
Abstract	28
1. Introduction	29
2. Materials and methods.....	31
2.1. Plant material.....	31

2.2. Chemical analyzes.....	31
2.3. <i>In vitro</i> assays.....	33
2.3.1. Egg Hatch Test.....	33
2.3.2. Larval Development Test.....	34
2.4. <i>In vivo</i> assay.....	34
2.5. Statistical analysis.....	35
3. Results.....	35
4. Discussion.....	40
Acknowledgements.....	43
References.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO – Dimethyl sulfoxide

EPG – Eggs per gram feces

EHT – Egg Hatch Test

GC-MS – Gas Chromatography/Mass Spectrometry

h – hora

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LC – Letal Concentration

LDT – Larval Development Test

L₁ – Larva de primeiro estágio

L₂ – Larva de segundo estágio

L₃ – Larva de terceiro estágio

LAP – Leucinaminopeptidase

OPG – Ovos por grama de fezes

P-gp – Glicoproteína P

TDL – Teste de desenvolvimento larvar

SUMÁRIO DE TABELAS

Capítulo 2	Página
Table 1 - LC ₅₀ and LC ₉₀ obtained in the egg hatch test (EHT) for <i>Piper tuberculatum</i> , <i>Lippia sidoides</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Hura crepitans</i> and <i>Carapa guianensis</i> extracts on <i>Haemonchus contortus</i>	36
Table 2 - LC ₅₀ and LC ₉₀ obtained in the larval development test (LDT) for <i>Piper tuberculatum</i> , <i>Lippia sidoides</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Hura crepitans</i> and <i>Carapa guianensis</i> extracts on <i>Haemonchus contortus</i>	37
Table 3 - Percentage composition of <i>Lippia sidoides</i> , <i>Mentha piperita</i> essential oils and <i>Carapa guianensis</i> seed oil obtained by gas chromatography/mass spectrometry.....	38

SUMÁRIO DE FIGURAS

Capítulo 1	Página
Figura 01 - Estágios larvais de <i>Haemonchus contortus</i> (Aumento de 400x). (A) Primeiro estágio (L ₁): esôfago rãbitiforme. (B) Segundo estágio (L ₂): acúmulo de grânulos lipídicos nas células da parede intestinal (seta). (C) Terceiro estágio (L ₃): células intestinais e cutícula que permanece retida após a segunda muda.....	10
Capítulo 2	
Figure 1 – Mean percentage of inhibition of <i>Haemonchus contortus</i> in the egg hatch test (EHT) performed with extracts of <i>Piper tuberculatum</i> , <i>Lippia sidoides</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Hura crepitans</i> and <i>Carapa guianensis</i>	36
Figure 2 – Mean percentage inhibition of <i>Haemonchus contortus</i> in the larval development test (LDT) carried out with extracts of <i>Piper tuberculatum</i> , <i>Lippia sidoides</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Hura crepitans</i> and <i>Carapa guianensis</i>	37
Figure 3 – Mean number of eggs per gram of faeces (EPG) of rats infected with <i>S. venezuelensis</i> and treated with extract of <i>P. tuberculatum</i> (PT1 – dose 150 mg.Kg ⁻¹ and PT2- dose 250 mg.Kg ⁻¹). D1, D2, D3, D4 and D6 indicate the collection days after the first day of treatment.....	39
Figure 4 – Mean number of <i>Strongyloides venezuelensis</i> adult worms recovered from the initial third of intestine of rats treated with <i>Lippia sidoides</i> essential oil (LS1 - 150 mg.Kg ⁻¹ and LS2 – 250 mg.Kg ⁻¹) and <i>Piper tuberculatum</i> extract (PT1 – 150 mg.Kg ⁻¹ and PT2 - 250 mg.Kg ⁻¹). Means with different letters are significantly different by the Tukey test (P<0.05).....	40

RESUMO

O uso indiscriminado de anti-helmínticos tem resultado no surgimento de parasitas com resistência aos princípios ativos existentes no mercado. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar *in vitro* o potencial antiparasitário de extratos vegetais sobre ovos e larvas do parasita gastrointestinal de ovinos, *Haemonchus contortus* e do parasita de ratos *Strongyloides venezuelensis*. Os extratos vegetais de *Carapa guianensis*, *Hura crepitans*, *Lippia sidoides*, *Mentha piperita* e *Piper tuberculatum*, produzidos em diferentes instituições de pesquisa, foram analisados quimicamente e testados *in vitro* pelos testes de inibição de eclodibilidade (EHT) e de desenvolvimento larvar (TDL) em *H. contortus*. A ação anti-helmíntica do extrato de *P. tuberculatum* (150 e 250 mg.Kg⁻¹ de peso corporal) foi avaliada em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente com *S. venezuelensis*. No EHT, as CL₅₀ e CL₉₀ (concentrações letais que matam 50 e 90% dos ovos) dos extratos foram as seguintes: 0,031 e 0,09 mg.ml⁻¹ para *P. tuberculatum*, 0,04 e 0,13 mg.ml⁻¹ para *L. sidoides*, 0,037 e 0,10 mg.ml⁻¹ para *M. piperita*, 2,16 e 17,13 mg.ml⁻¹ para *H. crepitans* e 2,03x10⁻⁶ e 1,22x10⁻¹² mg.ml⁻¹ para *C. guianensis*. No TDL, as CL₅₀ e CL₉₀ (concentrações letais que matam 50 e 90% das larvas) foram respectivamente: 0,02 e 0,031 mg.ml⁻¹ para *P. tuberculatum*, 0,002 e 0,04 mg.ml⁻¹ para *L. sidoides*, 0,018 e 0,03 mg.ml⁻¹ para *M. piperita*, 0,36 e 0,91 mg.ml⁻¹ para *H. crepitans* e 17,65 e 1,890 mg.ml⁻¹ para *C. guianensis*. O extrato de *P. tuberculatum* apresentou as seguintes substâncias: (Z)-piplartina, (E)-piplartina, 8,9-dihidropiplartina, piperina, 10,11-dihidropiperina; 5,6 dihidropiperlongumina e pelitorina. Os principais compostos dos óleos essenciais foram: timol (76,6%) para *L. sidoides*, mentol (27,5%) para *M. piperita* e ácido oléico (46,8%) para *C. guianensis*. Em relação ao teste *in vivo*, ambas as doses do extrato de *P. tuberculatum* não causaram redução significativa (P>0.05) na carga parasitária e na contagem de ovos por grama de fezes. Em conclusão, os extratos de *P. tuberculatum*, *L. sidoides* e *M. piperita* tiveram atividade eficaz quando testados *in vitro*; enquanto, as doses do extrato de *P. tuberculatum* quando empregadas no teste *in vivo* não apresentaram efeito.

ABSTRACT

The indiscriminate use of anthelmintics has resulted in the establishment of parasite resistance. Thus, this study aimed to evaluate the *in vitro* antiparasitic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* of sheep and *in vivo* on rats infected with *Strongyloides venezuelensis*. The plant extracts from *Piper tuberculatum*, *Lippia sidoides*, *Mentha piperita*, *Hura crepitans* and *Carapa guianensis*, produced in different research institutions, were chemically analyzed and evaluated through the egg hatch test (EHT) and larval development test (LDT) in *H. contortus*. *P. tuberculatum* (150 and 250 mg.Kg⁻¹ of body weight) was evaluated for its anthelmintic action in *Rattus norvegicus* experimentally infected with *S. venezuelensis*. In the EHT, the LC₅₀ and LC₉₀ (lethal concentration that kill 50 and 90% of the eggs) from extracts were respectively as follow: 0.031 and 0.09 mg.ml⁻¹ for *P. tuberculatum*, 0.04 and 0.13 mg.ml⁻¹ for *L. sidoides*, 0.037 and 0.10 mg.ml⁻¹ for *M. piperita*, 2.16 and 17.13 mg.ml⁻¹ for *H. crepitans* and 2.03x10⁻⁶ and 1.22x10⁻¹² mg.ml⁻¹ for *C. guianensis*. In the LDT, the LC₅₀ and LC₉₀ (lethal concentration that kill 50 and 90% of the larvae) were respectively: 0.02 and 0.031 mg.ml⁻¹ for *P. tuberculatum*, 0.002 and 0.04 mg.ml⁻¹ for *L. sidoides*, 0.018 and 0.03 mg.ml⁻¹ for *M. piperita*, 0.36 and 0.91 mg.ml⁻¹ for *H. crepitans* and 17.65 and 1890 mg.ml⁻¹ for *C. guianensis*. The extract from *P. tuberculatum* showed the following substances: piperamides as (Z)-piplartine, (E)-piplartine, 8.9-dihydropiplartine, piperine, 10.11-dihydropiperine; 5.6 dihydropiperlongumine and pellitorine. The major compounds of the essential oils were thymol (76.6%) for *L. sidoides*, menthol (27.5%) for *M. piperita* and oleic acid (46.8%) for *C. guianensis*. Regarding the *in vivo* test, both doses of *P. tuberculatum* extract did not cause any significant reduction (P>0.05) in worm burden and egg count per gram of feces, compared with the control group. We conclude that the extracts from *P. tuberculatum*, *L. sidoides* and *M. piperita* have an effective activity when tested *in vitro*; however, the doses of the extract from *P. tuberculatum* had no effect when employed *in vivo* tests.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura é das atividades mais antigas, considerando-se que os ovinos foram uma das primeiras espécies domesticada pelo homem. Esses animais estão amplamente distribuídos pelo mundo, devido ao seu grande poder de adaptação aos mais diversos climas, relevos e vegetações (VIANA, 2008).

O Brasil ocupa a oitava posição em relação ao tamanho do rebanho, o qual está distribuído em sua grande maioria pelas regiões Sul e Nordeste. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009), houve crescimento de cerca de 11,7% no período entre 1997 a 2007 no número efetivo de cabeças de ovinos. No ano de 2009, o aumento do rebanho foi de 1,1% quando comparado ao ano anterior, resultando em um total de 16 812 105 milhões de cabeças. A região Sudeste ocupa posição de destaque nesse crescimento, apresentando um aumento de 79% no efetivo de seu rebanho.

Os ovinos, antes da domesticação, apresentavam hábitos migratórios, que de certa forma os mantinham livres de altas infecções por parasitas gastrintestinais, pois por estarem dispersos, tinham diminuídas as chances de re-infecção. O desenvolvimento de forragens mais nutritivas possibilitou a criação de um maior número de cabeças por hectare, quebrando o equilíbrio do sistema hospedeiro-parasita (SANTIAGO et al., 1976) e desde então, os ovinocultores enfrentam graves problemas relacionados às verminoses.

Os rebanhos brasileiros, em geral, são acometidos por infecções mistas, nas quais se observa a seguinte ordem de prevalência de três espécies de helmintos: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformes* e *Oesophagostomum columbianum*. Eventualmente, os animais parasitados não apresentam sinais clínicos da infecção devido a fatores relacionados ao manejo, à condição nutricional, à idade e ao estado fisiológico (CHAGAS et al., 2007).

Dentre os parasitas, *H. contortus* é o que tem apresentado maior importância devido à sua ampla distribuição e alta intensidade nos rebanhos em países de clima tropical (CHAGAS et al., 2007). Este provoca grandes perdas econômicas aos produtores, devido ao seu hábito hematófago que acarreta anemia nos animais. Outros sinais clínicos dessa parasitose são perda de peso e edema submandibular. Animais

parasitados apresentam perda de peso devido à diminuição do apetite, danos às funções gástricas e alterações no conteúdo de proteínas totais (hipoproteinemia) (FOX, 1993).

A principal forma de controle dessa parasitose é por meio do uso de anti-helmínticos. Contudo, seu uso indiscriminado tem resultado na seleção de parasitas resistentes aos princípios ativos disponíveis no mercado. A primeira ocorrência de resistência a antiparasitários foi descrita por Drudge et al. (1964) e, desde então, os registros sobre a diminuição da eficácia desses medicamentos têm aumentado. No Brasil, há relatos, a partir da década de 60, da ineficácia em nematódeos de ovinos em vários estados. No Rio Grande do Sul, thiabendazol não se mostrou eficiente contra *H. contortus* (SANTOS & FRANCO, 1967). Em Santa Catarina, foi registrada resistência à ivermectina, levamisol, closantel, albendazol (RAMOS et al., 2002) e moxidectina (ROSALINSK-MORAES et al., 2007). No Paraná, além de resistência aos anti-helmínticos citados anteriormente, foi revelada a ineficácia de associações como closantel + oxfendazol (THOMAZ-SOCCOL et al., 2004). Ceará e São Paulo também descreveram ineficiência de três classes de antiparasitários: benzimidazóis, levamisóis e ivermectinas (AMARANTE, 1992; MELO, 2004).

A partir desse cenário, anti-helmínticos derivados de plantas podem ser uma alternativa no tratamento de infecções parasitárias. Sendo assim, vários estudos dedicaram-se a avaliar a atividade de plantas sobre parasitas (AKHTAR et al., 2000). Na área veterinária, as plantas medicinais são usadas para curar os mais variados tipos de enfermidades que vão desde uma cicatrização até cardiopatias (MARINHO et al., 2007).

Atualmente, tem-se feito uso dos testes *in vitro* para a análise da ação ovicida e larvicida de extratos vegetais, por serem métodos rápidos, possibilitam a avaliação preliminar da existência de propriedades anti-helmínticas, sendo considerado o primeiro passo para caracterização dos possíveis compostos ativos presentes nos extratos vegetais (COSTA et al., 2006).

CAPÍTULO 1

1. Características dos estágios de vida-livre de *Haemonchus contortus*

Os testes *in vitro*, atualmente adotados para o diagnóstico da resistência e prospecção de plantas com atividade anti-helmíntica, recorrem a avaliações sobre diferentes estágios da fase de vida-livre dos nematóides gastrintestinais. Vários trabalhos dedicaram-se a estudar o ciclo de vida de *H. contortus*, os quais elucidaram em grande parte sua biologia, ecologia e epidemiologia. Veglia (1915) realizou um trabalho clássico sobre a biologia e anatomia deste parasita, o qual serviu de base para as descrições, a seguir, sobre cada estágio de vida desse nematódeo.

H. contortus é um parasita monoxeno, ou seja, não necessita de hospedeiro intermediário para completar seu ciclo vital. Os parasitas adultos alojam-se no abomaso de pequenos ruminantes e apresentam período pré-patente da infecção de aproximadamente 28 dias. A fêmea realiza postura média de 5.000 ovos por dia, os quais são eliminados nas fezes (LE JAMBRE, 1995). Veglia (1915) observou que os ovos desenvolvem-se, durante o percurso no sistema digestivo, até o estágio de mórula, pois a ausência de oxigênio no intestino impede qualquer desenvolvimento posterior a esse estágio. Além do oxigênio, a umidade e temperatura são fatores abióticos que estão intrinsecamente relacionados ao período de desenvolvimento do ovo. Dessa forma, em condições propícias, após 6 h de incubação (estufa BOD a 26 °C), o embrião apresenta a extremidade anterior duas vezes mais espessa que o resto do corpo e alguns movimentos já são notados. Em 10 h, a larva, com o tamanho de três a quatro vezes o comprimento do ovo, mantém-se enrolada no formato de um oito (8). Várias estruturas podem ser observadas como a boca, o esôfago e o intestino. A casca do ovo ainda é bem resistente. Após 14 h de incubação, 25% das larvas eclodiram, 50% em 17 h e o restante vai eclodindo lentamente sendo que em 48 h somente alguns ovos são observados. Em meio de cultura, entre 14 e 17 h, a maioria das larvas eclodiu, provavelmente pela prevalência de condições mais uniformes.

Ransom (1906) realizou estudos nos Estados Unidos (EUA) com culturas mantidas em temperaturas entre 16-20 °C e observou que as mesmas apresentavam larvas após dois dias de incubação. Em outro experimento, Ransom (1907), notou que ovos mantidos em temperaturas abaixo de 4 °C permaneciam em latência, por até três meses, retomando a atividade quando as condições tornavam-se favoráveis. Veglia

(1915), na África do Sul, observou que em temperaturas variando entre 15 e 18 °C, o processo embrionário seguido pela eclosão das larvas ocorre após um período de 4 dias. Silverman e Campbell (1959) investigaram o processo de desenvolvimento embrionário e larvar de *H. contortus* e obtiveram resultados que semelhantes ao de Veglia (1915). Em relação à temperatura, notaram que culturas de ovos mantidas a 7,2 °C tiveram seu desenvolvimento inibido ou prejudicado, tendo somente 10% de larvas eclodidas, após 16-24 dias. A incubação de ovos não embrionados em temperaturas de -2,2 a 1 °C demonstrou que os ovos resistem a condições adversas por curto período de tempo (3-7 dias). No que se refere à umidade, quando os cíbalos fecais secam antes que os ovos atinjam um estágio mais avançado, eles se tornam inviáveis. Quando a perda de umidade é mais tardia, os ovos permanecem viáveis e em um estado de latência. Assim que são umedecidos, as larvas eclodem.

Durante seu ciclo, *H. contortus* passa por cinco estágios larvais separados por mudanças estruturais. Os dois primeiros estágios e parte do terceiro ocorrem fora do hospedeiro sendo considerado como a fase de vida-livre do ciclo. A outra parte do terceiro, o quarto e o quinto estágios ocorrem no interior do hospedeiro, denominada fase parasitária. Dentro de cada estágio há uma subdivisão em dois subestágios: o primeiro no qual as larvas movimentam-se mais ativamente, se alimentam e se desenvolvem e no segundo em que as larvas são encontradas em um estado letárgico, no qual não se movem e nem se alimentam, mas passam por mudanças estruturais. As larvas de primeiro estágio (L₁) (Figura 01 A) que eclodem dos ovos apresentam tamanho entre 340-350 µm de comprimento e 15-20 µm de espessura (espessura medida na base do esôfago). O esôfago tem a forma rãbitóide, dividido em três porções, sendo uma anterior, cilíndrica e alongada (corpo), uma intermediária estreitada (istmo) e uma posterior globulosa (bulbo). O intestino se estende ao longo do corpo, do esôfago até o reto, seguindo um curso em zigue-zague. O protoplasma das células intestinais contém finos grânulos que aumentam em número com o crescimento da larva (VEGLIA, 1915).

Após a eclosão, as larvas iniciam uma série de movimentos de contorção seguidos por períodos de descanso. Depois de aproximadamente uma hora de movimentos estáveis, começam a se alimentar e observa-se a contração do intestino, causando um abaulamento da extremidade posterior. As larvas apresentam movimentos lentos e muito típicos, que servem para distinguir entre o 1º e 2º estágio. Quando as

células intestinais estão preenchidas com grânulos (reserva de lipídios), as larvas param de se alimentar e inicia-se o primeiro período letárgico, por volta de 24-27 h após a liberação dos ovos nas fezes do hospedeiro. As larvas mantêm-se rígidas com o formato de vírgula, aparentando estar mortas, porém, quando analisadas posteriormente, estão em estágio mais avançado e desenvolvido. Depois de 8-10 h, quando as larvas saem da letargia, as mudanças estruturais são reconhecíveis (VEGLIA, 1915).

Ao término das primeiras mudanças estruturais, as larvas entram no segundo estágio (L₂) (Figura 01 B), no qual nota-se um crescimento marcante, com as larvas alcançando 500 µm de comprimento. No segundo período de atividade, a L₂ apresenta movimentos natatórios, retoma a alimentação e as células do lúmen intestinal apresentam-se enfileiradas e com maior tamanho, enquanto as células da parede do intestino tornam-se mais achatadas. Ocorre um aumento nos grânulos da parede e as células retornam ao formato normal. Uma vez obtido alimento suficiente, a L₂ entra no segundo período letárgico, que pode ser desencadeado por fatores externos ou individuais. Neste período, as larvas permanecem esticadas e as mudanças mais pronunciadas são: a abertura bucal perde seu formato cônico e a cavidade bucal torna-se mais estreita, a constrição do esôfago torna-se menos marcada e perde a forma rãbitóide, adquirindo o formato de uma alça. A aparência final é de uma larva com corpo medindo 715 µm, 27 µm de diâmetro e cauda com 130 µm de comprimento. A cutícula anterior é conservada e apresenta-se como uma bainha envolvendo a larva. A região onde estava localizada a abertura bucal é fechada pela cutícula externa, o esôfago assemelha-se a uma chave, o intestino apresenta 16 células de formato triangular (Figura 01 C). Entre 8 e 12 h, o período letárgico é finalizado e as larvas tornam-se ativas, contudo, se as condições externas são desfavoráveis, haverá um retardo nesse processo. Nas regiões com temperaturas médias acima de 25 °C, o tempo de desenvolvimento larvar de *H. contortus* em geral é menor e as larvas de terceiro estágio (L₃), forma infectante, são observadas no 3º dia após a eclosão. Nas regiões com médias de temperatura mais baixas, há um retardo no tempo de desenvolvimento, sendo que em locais de baixa temperatura (4 °C) pode ocorrer inibição por completo do desenvolvimento (VEGLIA, 1915).

A ativação da L₃ é sucedida por movimentos espirais, os quais possibilitam a eliminação da cutícula externa. Os movimentos são mais rápidos e caracterizados como

natatórios. No ambiente natural, estes movimentos possibilitam a migração das larvas na pastagem, o que aumenta a chance de serem ingeridas por um hospedeiro. Vários trabalhos foram realizados com o intuito de descreverem a dinâmica das migrações das L₃ na pastagem. Um dos estudos pioneiros, desenvolvido por Rogers (1940), na Austrália, comparou a migração de larvas de várias espécies em temperaturas diferentes (5 a 45 °C). Observou que em temperaturas mais altas (45 °C) recuperou-se em torno de 80% de L₃ de *H. contortus* e a 15 °C somente 15%. Outros trabalhos demonstraram que além da temperatura, a umidade proveniente da chuva ou da irrigação pode influenciar positivamente na atividade das L₃ (OKON & ENYENIHI, 1977; BULLICK & ANDERSEN, 1978). No Brasil, Silva et al. (2008) observaram que as condições de temperatura e umidade nos diferentes meses do ano influenciaram na migração das larvas das fezes para a pastagem, sendo que o número de larvas recuperadas foi mais elevado nos meses com maior pluviosidade e temperatura.

As características morfológicas das L₃ são similares às das L₂, sendo que a distinção entre os dois estágios é realizada por algumas características específicas como: esôfago em formato claviforme, com uma ligeira constrição e presença da cutícula anterior envolvendo a larva. Após a ingestão pelos pequenos ruminantes, a L₃ sofre duas mudanças de estágio e transforma-se em parasita adulto, que vive na luz do abomaso (VEGLIA, 1915).



Fotos: Camila Olivo de Carvalho

Figura 01 – Estágios larvais de *Haemonchus contortus* (Aumento 400x). (A) Primeiro estágio (L₁): esôfago rabadiforme. (B) Segundo estágio (L₂): acúmulo de grânulos lipídicos nas células da parede intestinal (seta). (C) Terceiro estágio (L₃): células intestinais e cutícula que permanece retida após a segunda muda.

2. Características estruturais e biológicas dos envoltórios de *H. contortus*

O estudo das características estruturais da membrana do ovo e da cutícula de nematódeos pode fornecer dados para o entendimento dos processos de desenvolvimento desse grupo. Essas informações também podem ser importantes para o entendimento da penetração de substâncias antiparasitárias, bem como de seu modo de ação e mecanismos de desenvolvimento da resistência.

- **Membrana do ovo**

A membrana do ovo de *H. contortus* é constituída por três camadas: vitelínica (externa), quitinosa (medial) e uma porção basal formada por lipídios e proteínas (MANSFIELD et al., 1992). O principal constituinte estrutural da camada basal é o colesterol, o qual está estreitamente relacionado com a fluidez e a permeabilidade da membrana. Proteínas estão dispersas na membrana, desempenhando diversas funções relacionadas como: a respiração celular, a comunicação entre células, o crescimento, o transporte através da membrana e o reconhecimento celular. Dentro do grupo das proteínas transmembranares estão as Glicoproteínas-P (P-gp) que apresentam papel importante no transporte de xenobióticos (ROTHNIE et al., 2001). Alguns estudos têm investigado o papel das P-gp nos mecanismos de aquisição de resistência aos anti-helmínticos. Xu et al. (1998) observaram elevados níveis de expressão de RNAm para P-gp em uma cepa de *H. contortus* resistente à ivermectina. Riou et al. (2003) demonstraram que a concentração de colesterol pode modular a atividade das P-gp em ovos de *H. contortus*, tornando-os mais ou menos resistentes aos anti-helmínticos. A embriogênese é um processo natural que provoca mudanças bioquímicas na casca do ovo, devido à ação do fluido de eclosão, o qual altera a organização lipídio/lipídio e lipídio/proteínas resultando em instabilidade na atividade das P-gps e na resistência a anti-helmínticos. Kerbouf et al. (1999), avaliando a relação da P-gp com a resistência em dois isolados (um susceptível e outro resistente), observaram diminuição da resistência quando incubaram ovos dos isolados com verapamil (inibidor da atividade de P-gp).

Durante a evolução do desenvolvimento ocorrem alterações na membrana do ovo a fim de permitir a liberação da larva. Em geral, o processo de eclosão é iniciado por um sinal apropriado, o qual pode ser fornecido pelo hospedeiro ou pelo ambiente. Em Nematoda, a eclosão é iniciada por estímulos ambientais que levam à liberação, pelo embrião, das denominadas enzimas da eclosão. A inibição de algumas destas enzimas causa redução na taxa de eclosão ou em inibição total do processo (SOMMERVILLE & ROGERS, 1987). Estas enzimas foram identificadas no fluido de eclosão de *H. contortus* e estão inclusas nos grupos das proteases, lipases, quitinases, α e β - glicosidases e leucinas aminopeptidases (ROGERS & BROOKS, 1977).

- **Cutícula**

A cutícula dos nematódeos é uma fina membrana externa composta principalmente por proteínas e uma pequena quantidade de lipídios e carboidratos. O arranjo estrutural dessa membrana apresenta-se organizado em três camadas distintas pela sua composição: camada composta principalmente por colágeno - região basal e medial; camada constituída por outras proteínas (ausência de colágeno) - região epicuticular e cortical externa; e camada formada por proteínas não-estruturais - superfície externa (FETTERER & RHOADS, 1993).

O principal constituinte da cutícula dos nematódeos é o colágeno, proteína estrutural formada pela associação de três cadeias polipeptídicas que se entrelaçam formando uma tripla-hélice. Para a formação de tal arranjo é necessário que todo terceiro aminoácido da cadeia polipeptídica seja uma glicina. O colágeno da cutícula apresenta estrutura única, na qual ocorrem unidades repetidas de Gly-Pro-X (denominada domínio colágeno) intercaladas com áreas que não contem as unidades repetidas. As funções do colágeno na membrana basal são: crescimento e diferenciação celular, manutenção da arquitetura tecidual e regulação do fluxo de macromoléculas dentro dos tecidos (COX, 1992). Outra característica do colágeno da cutícula é sua composição que contém uma mistura de proteínas que variam em tamanho, entre as espécies e até mesmo entre as fases de desenvolvimento. A cutícula de *H. contortus* contém 2-mercaptoetanol (solúveis e insolúveis) e aminoácidos (glicina, prolina e hidroxiprolina). A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) das

proteínas demonstrou altas concentrações de tirosina e seus derivados, provenientes do 2-mercaptoetanol (FETTERER & RHOADS, 1990).

As proteínas da região epicuticular e cortical externa (camada não-colágeno), denominadas cuticlin, foram primeiramente identificadas em *Ascaris suum*. Apresentam propriedades químicas que as tornam extremamente resistentes à solubilização mesmo sob condições fortemente desnaturantes. Sugere-se que elas podem atuar na proteção dos parasitas contra o estresse ambiental. Em *A. suum* foram encontradas proteínas compostas por tirosina, ditirosina e isotritirosina (FUJIMOTO & KANAYA, 1973). Essas proteínas apresentam forte resistência à degradação por proteinases e podem ser formadas pela ligação entre proteínas não-colágenas e colágenas. A síntese dessas ligações é realizada pela enzima peroxidase. Alguns trabalhos registraram a presença de ditirosina nas proteínas não-colágenas da cutícula da L₂ de *H. contortus* (FETTERER & RHOADS, 1990).

O processo de ecdise ou mudança de cutícula ocorre durante a fase letárgica, no qual a larva permanece imóvel. Nesse período, acontecem simultaneamente mudanças na morfologia da larva, a síntese da nova cutícula, a partir da hipoderme, e a degradação da antiga (VEGLIA, 1915).

A L₃ é revestida por duas cutículas: a terceira que foi sintetizada antes da segunda muda e que permanece aderida ao corpo da larva e a segunda que é retida envolvendo-a. Entre as duas cutículas há um espaço que é preenchido por um líquido, rico em glicoproteínas, ao qual é atribuída função lubrificante, impedindo assim a abrasão entre as cutículas (BIRD, 1990).

Rogers e Sommerville (1962) sugerem que o fluido do desembainhamento é liberado na região próxima à base do esôfago. A secreção desse fluido é desencadeada por estímulos físico-químicos vindos do hospedeiro, tais como os gases dióxido de carbono e ácido carbônico não dissociado, temperatura e pH apropriado.

O fluido de desembainhamento é produzido por glândulas e secretado para o espaço entre as cutículas externa e interna (WHARTON & SOMMERVILLE, 1984). Rogers (1982), ao analisar o fluido de desembainhamento, quantificou a atividade de algumas enzimas, tais como leucinaminopeptidase (LAP), lipase e pseudocolagenase. A presença de LAP, tanto no fluido de eclosão quanto no fluido de desembainhamento e

em determinados locais durante o ciclo de muda, sugere uma ação biológica em nematódeos (DAVEY & KAN, 1967).

3. Pesquisas da atividade de extratos vegetais sobre nematódeos gastrintestinais

Nos últimos anos tem sido observado um crescente interesse pelas práticas etnomédicas e etnoveterinárias, especialmente aquelas relacionadas ao uso das plantas no tratamento de doenças (BIZIMENYERA et al., 2006). Considerando os problemas de resistência parasitária e de resíduos nos alimentos, a busca por novas alternativas para o controle dos parasitas se faz necessária. A presença de resíduos de drogas veterinárias nos alimentos, ou de seus metabólitos, pode afetar a saúde pública e conseqüentemente o comércio internacional dos produtos alimentícios (AERTS et al., 1995). Assim, a fitoterapia pode ser uma ferramenta na redução desses problemas, possibilitando também prolongar a vida útil dos produtos químicos comerciais utilizados no controle de parasitas. O desenvolvimento de novos antiparasitários tem sido um processo lento e caro para a indústria farmacêutica. Além disso, produtos a base de plantas não atraem este segmento porque as chances de patenteamento são menores do que para compostos com moléculas sintéticas (CHAGAS, 2008).

Recentemente, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos em diferentes países com o objetivo de investigar, por meio de testes *in vitro*, a ação de princípios ativos naturais contra nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. O teste *in vitro* de inibição da eclodibilidade larvar tem sido amplamente usado com o parasita *Haemonchus contortus* e bons resultados têm sido obtidos. A inibição completa de eclodibilidade foi verificada para o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (manjeriço) e o eugenol 0,5% (PESSOA et al., 2002); produtos patenteados a base de *Eucalyptus citriodora*, *E. globulus* e *E. staigeriana* (eucaliptos) a 5% (CHAGAS, 2004); extrato *Spigelia anthelmia* (erva-lombrigueira) a 50 mg.ml⁻¹ (ASSIS et al., 2003); nesta mesma concentração, o extrato de *Mangifera indica* (manga) inibiu em 95,7% (COSTA et al., 2002).

Maciel et al. (2006) realizaram estudos com extratos etanólico e hexânico das sementes e extratos clorofórmico e etanólico das folhas de *Melia azedarach* (cinamomo) e observaram melhor eficácia dos extratos etanólico da semente (100% de inibição na concentração 1,56 mg.ml⁻¹) e da folha (98,24% na concentração 12,5 mg.ml⁻¹) sobre

ovos de *H. contortus* e do extrato etanólico das folhas (91,64% na concentração 50 mg.ml⁻¹) sobre as larvas dessa mesma espécie. A avaliação da atividade anti-helmíntica de *Cocos nucifera* (coqueiro) sobre nematódeos gastrintestinais apresentou resultados significantes para as maiores concentrações testadas (5 mg.ml⁻¹ no teste de eclodibilidade e 80 mg.ml⁻¹ no teste de desenvolvimento larvar) (OLIVEIRA et al., 2009). Macedo et al. (2010) analisaram o efeito do óleo essencial de *E. staigeriana* sobre *H. contortus* e observaram ação inibitória sobre ovos (99,27% na concentração 1,35 mg.ml⁻¹) e larvas (99,20% na concentração 5.4 mg.ml⁻¹). A potencial atividade larvicida dos extratos aquoso (97,3% de inibição a 150 mg.ml⁻¹) e etanólico (99,6% de inibição a 60 mg.ml⁻¹) das folhas de *Anacardium humile* (cajuzinho-do-cerrado) sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos foi relatada por Nery et al. (2010).

Akhtar et al. (2000) realizaram revisão sobre o uso de algumas plantas nativas, da Índia e do Paquistão, como anti-helmínticos. Waller et al. (2001), por sua vez, fizeram um relato abrangente das plantas com atividade antiparasitária na região Nórdica. Em revisão de literatura, Furtado (2006) discorre sobre plantas usadas como vermífugo em humanos e animais, relatando o uso de 106 espécies vegetais pertencentes a 83 gêneros e 40 famílias. Deste total, somente 17,9% eram indicadas para o uso contra parasitas de ruminantes. Em relação à comprovação clínica experimental, 16,03% das espécies vermífugas apresentaram eficácia e em teste *in vitro* 5,7% das espécies se mostraram ineficazes.

Neste trabalho, avaliamos, *in vitro*, a ação de cinco espécies vegetais sobre *H. contortus* (resultados expostos no capítulo 2). Estas plantas, descritas a seguir, já continham relatos anteriores de atividade biológica.

Lippia sidoides, nativa do nordeste brasileiro, conhecida popularmente como alecrim-pimenta, teve seu óleo essencial investigado contra *H. contortus* e demonstrou inibição da eclodibilidade larvar de 90,9% na concentração de 1% (PESSOA, 2001); e de 98% a 1,25 mg.ml⁻¹ (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007).

Carapa guianensis (andiroba) mostrou atividade ovicida *in vitro* sobre nematóides gastrintestinais de caprinos (OLIVEIRA et al., 2005). Testes realizados com fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* e *Rhipicephalus microplus* demonstraram 100% de eficácia em testes realizados com o óleo de *C. guianensis* a 10% (SOUSA et al.,

2005; FARIAS et al., 2007). Estudos realizados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) demonstraram eficácia no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho (SARRIA et al., 2007).

Mentha piperita (hortelã-pimenta), originário da região Mediterrânea, apresentou ação contra microorganismos humanos e plantas (ISCAN et al., 2002; YADEGARINIA et al., 2006, MIMICA-DUKIC et al., 2003) e nematóides parasitas de plantas (NASCIMENTO et al., 2009). Experimentos realizados *in vivo*, com este óleo, demonstraram eficácia de 76,7% para *Ascaridia galli* e de 62,9% para *Raillietina* sp após necropsia (GOLYNSKI, 2003).

O látex de *Hura crepitans* (assacú) foi avaliado por Brondani (2006) quanto a atividade contra larvas infestantes de carrapatos (*Boophilus microplus* e *R. sanguineus*) sendo observado mortalidade acima de 95% para todas as concentrações testadas.

Piper tuberculatum (pimenta-longa) pertencente à família Piperaceae apresenta várias plantas com potencial inseticida, principalmente o gênero *Piper* que contem espécies que apresentam metabólitos secundários, como lignanas e amidas, que são utilizadas na sua defesa contra a herbivoria. Piplartina, identificada por Duh & Wu (1990) como um dos componentes tóxicos de *P. arborescens*, tem demonstrado ação citotóxica sobre células. Bezerra et al. (2005) compararam a atividade antimitótica de Piperina e Piplartina em diferentes células e observaram um efeito mais potente da Piplartina.

Os testes *in vivo* são necessários para a avaliação do efeito do extrato vegetal sobre o parasita alvo e também sobre o hospedeiro. Alguns trabalhos analisaram a ação antiparasitária de alguns extratos vegetais sobre parasitas de ratos ou camundongos. Dentre estes podem ser citados Borba & Amorim (2004) que estudaram a ação de extratos de *Chenopodium ambrosioides* L. (conhecida popularmente como erva-de-Santa-Maria ou mastruço) sobre os oxiurídeos *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*, obtendo resultados negativos para todas as concentrações avaliadas. Essa mesma espécie foi avaliada contra *Strongyloides venezuelensis* em ratos e apresentou eficácia na redução de OPG (75,89%) e no número de parasitas adultos (86,31%) (BERNARDES, 2006).

Trabalhos relevantes foram realizados com proteases das seguintes espécies vegetais: *Carica papaya* (mamão), *Ficus carica* e *F. benjamica* (figo), *Ananas comosus* (abacaxi) e *Acinidia chinensis* (kiwi), apresentaram atividade anti-helmíntica sobre os parasitas de ratos, *Helymossomoides polygyrus*, encontrado no intestino delgado (STEPEK et al., 2005), *Trichuris muris*, alojado no intestino grosso (STEPEK et al., 2006) e *Protospirura muricola*, (estômago) (STEPEK et al., 2007). Foram observados danos na cutícula dos parasitas adultos e redução na contagem de ovos por grama de fezes (OPG), contudo não houve eficácia contra as larvas de segundo estágio. A ação das cisteínas proteases sobre o parasita do estômago somente foi notada com a neutralização da acidez estomática antes do tratamento.

Dessa forma, a validação de um fitoterápico é realizada após a conclusão de algumas etapas: escolha e identificação da espécie vegetal, realização de testes (*in vitro* e *in vivo*) para a comprovação da eficácia contra o organismo alvo e avaliação de toxicidade. É recomendável a realização de teste *in vitro*, a priori, que tem custo mais baixo e que apresenta resultados mais rápidos (BORGES, 2003). Além disso, possibilita uma indicação inicial da atividade estudada, diminuindo os gastos e o uso indiscriminado de animais de experimentação (CAMURÇA-VASCONCELO et al., 2007). Os testes pré-clínicos, assim denominados os testes com os animais de laboratório são muito empregados antes do teste clínico (testes com a espécie alvo). O parasita de roedores *Strongyloides venezuelensis* tem sido utilizado como um bom modelo de relação parasita/hospedeiro para os casos de estrogiloidíases devido à facilidade de manutenção da cepa em animais de laboratório, ao grande número de ovos e larvas obtidos para a realização de experimentos (TAIRA et al., 1994). Os testes *in vivo* são de grande importância para a conclusão do estudo, pois revelam se a planta medicinal apresentará eficácia contra o seu alvo, sofrendo as influências do hospedeiro e também se provocará algum efeito adverso ou até mesmo tóxico.

Considerações finais

O parasita *H. contortus* apresenta ampla distribuição mundial. Devido aos prejuízos que provoca na ovinocaprinocultura, tem-se grande interesse no seu controle, o qual é realizado principalmente por meio do uso de anti-helmínticos. Contudo, o uso indiscriminado desses medicamentos tem resultado na aquisição de resistência pelos parasitas aos princípios químicos existentes.

No panorama atual, com a diminuição da eficácia dos produtos antiparasitários disponíveis, muitas são as pesquisas que buscam novos compostos ou moléculas com atividade contra os parasitas. Dessa forma, as espécies vegetais podem ser uma rica fonte de material para prospecção de atividade sobre os parasitas, na qual os testes *in vitro* realizados com as fases de vida-livre são utilizados como instrumento de investigação.

Dessa forma, o conhecimento da biologia, bem como da ecologia e epidemiologia dos parasitas se faz necessário para o entendimento de suas particularidades e elaboração de possíveis mecanismos de controle. O estudo de características estruturais e biológicas dos estágios de vida-livre se mostra relevante, uma vez que pode oferecer informações úteis com relação à sobrevivência das espécies, à interferência das alterações climáticas na epidemiologia das doenças parasitárias, além de auxiliar no desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e de controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AERTS, M.M.L.; HOGENBOOM, A.C.; BRINKMAN, U.A.T. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **J. Chromatog. B**, v. 667, p. 1-40, 1995.

AKHTAR, M.S., et al. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in Indo-Pakistan subcontinent. **Small Rumin. Res.** v.38, p. 99–107, 2000.

AMARANTE, A.F.T. et al. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamizol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 29, p. 31-38, 1992.

ASSIS, L.M. et al. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.**, v.117, p. 43-49, 2003.

BERNARDES, H.M.D. **Estudodo efeito anti-helmínticodo extrato hidroalcoólico e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. sobre *Strongyloides venezuelensis* (BRUMPT,1934).** 2006. 98 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BEZERRA, D.P. et al. Antiproliferative effects of two amides, piperine and pipartine, from *Piper* species. **Z Naturforsch.**v.60, p. 539-543, 2005.

BIRD, A.F. Vital staining of glycoprotein secreted by infective third stage larvae of *Haemonchus contortus* prior to exsheathment. **Int. J. Parasitol**, v.20, n. 5, p. 619-623, 1990.

BIZIMENYERA, E.S. et al. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabacea) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Vet. Parasitol.**, v. 142, p. 336-343, 2006.

BORBA, H.R.; AMORIM, A. Ação anti-helmíntica de plantas XVI. Avaliação da atividade de extratos aquosos de *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-Santa-Maria)

¹ ABNT (NBR 6023/2002)

em camundongos naturalmente infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, n.4, p.133-136, 2004.

BORGES, C.CL. Atividade in vitro de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). **Parasitol. Latinoam.**, v.58, n.1, p. 42-47, 2003.

BRONDANI, F.M.M. **Atividade carrapaticida do látex da planta *Hura crepitans* L. e do extrato etanólico da planta *Rinorea pubiflora* (Benth.) Sprague & Sandwith em larvas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus***. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Programa de Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Rondônia, 2006.

BULLICK, G.R.; ANDERSEN, F.L. Effect of irrigation on survival of third-stage *Haemonchus contortus* larvae (Nematoda: Thichostrongylidae). **Great Basin Nat.**, v.38, n.4, p. 369-378, 1978.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Vet. Parasitol.**, v.148, p. 288-294, 2007.

CHAGAS, A.C.S. Natural antiparasitics have potential to extend product life. **Animal Pharm.**, Londres, p. 12-13, 12 dez. 2008.

CHAGAS, A.C.S. Ação ovicida de produtos a base de eucalipto sobre helmintos de caprinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, n.1, v.13, p. 268, 2004.

CHAGAS, A.C.S. et al. **Ovinocultura: controle de verminose, mineralização, reprodução e cruzamentos na Embrapa Pecuária Sudeste**. Embrapa Pecuária Sudeste, documentos, 65. São Carlos. 2007.

COSTA, C.T.C. et al. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 11, p. 57-60, 2002.

COSTA, C.T.C. et al. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. **Vet. Parasitol.**, v.137, p.306-10, 2006.

COX, G.N. Molecular and biochemical aspects of nematode collagens. **J. Parasitol.**, v.78, n.1, p.1-15, 1992.

DAVEY, K.G.; KAN, S. D. Endocrine basis for ecdysis in a parasitic nematode. **Nature**, v.214, p.737-738, 1967.

DRUDGE, J.H.; SZANTO, J.; WYATT, Z.N. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **Am. J. Vet. Res.**, v. 25, p.1512-1518, 1964.

DUH, C.; WU, Y. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. **J. Nat. Prod.**, v.53, n.6, p.1575-1577, 1990.

FARIAS, M.P.O.; et al. Eficácia in vitro da *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu**, v. 9, n. 4, p. 68-71, 2007.

FETTERER, R.H.; RHOADS, M.L. Tyrosine-derived cross-linking amino acids in the sheath of *Haemonchus contortus* infective larvae. **J. Parasitol.**, v.76, n.5, p. 619–624. 1990.

FETTERER, R.H.; RHOADS, M.L. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. **Vet. Parasitol.**, v.46, n.1-4, p. 103–111, 1993.

FOX, M.T. Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. **Vet. Parasitol.**, v. 46, p. 143-158, 1993.

FUJIMOTO, D.; KANAYA, S. Cuticlin: a noncollagen structural protein from *Ascaris* cuticle. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.157, n.1, p. 1–6, 1973.

FURTADO, S.K. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. Curso de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Paraná (Tese de Doutorado), 2006, 127p.

GOLYNSKI, A. A. **Controle de helmintos de frangos de corte utilizandoas plantas *Mentha piperita*, *Carapa guianensis*, *Artemisia absinthium* e *Chenopodium ambrosioides***. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, 2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab17.pdf> Acesso em: 15 dez. 2010.

ISCAN, G. et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **J. Agr. Food Chem.**, v.50, p. 3943-3946, 2002.

KERBOEUF, D. et al. Flow cytometry analysis of drug transport mechanisms in *Haemonchus contortus* susceptible or resistant to anthelmintics. **Parasitol. Res.**, v.85, p. 118-123, 1999.

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

MACEDO, I.T.F. et al. Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. **Vet. Parasitol.**, v.173, n.1-2, p.93-98, 2010.

MACIEL, M.V. et al. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extract on *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.**, v.140, n. 1-2, p. 98-104, 2006.

MANSFIELD, L.S., GAMBLE, H.R., FETTERER, R.H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus*. I. Structural components. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v.103, p. 681-686, 1992.

MARINHO, M.L. et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

MELO, A.C.F.L. et al. Desenvolvimento da resistência ao oxfendazol em propriedades rurais de ovinos na região do baixo e médio Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, n. 4, p. 137-141, 2004.

MIMICA-DUKIC, N. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta Med.**, v.69, n.5, p. 413-419, 2003.

NASCIMENTO, E.M. et al. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos. **Ciênc. Rural**, v.39, n.3, p.817-824, 2009.

NERY, P.S. et al. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. **Vet. Parasitol.**, v.171, n.3-4, p. 361-364, 2010.

OKON, E.D.; ENYENIHI, U.K. Development and survival of *Haemonchus contortus* larvae on pasture in Ibadan. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, v.9, p.7-10, 1977.

OLIVEIRA, M.P.B. et al. Avaliação in vitro da ação ovicida do extrato de andiroba (*Carapa guianensis*) sobre cultura de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. In: Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 5. 2005, Recife. **Anais...Recife**, 2005. CD ROM.

OLIVEIRA, L.M.B. et al. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Vet. Parasitol.**, v.159, n.1, p. 55-59, 2009.

PESSOA, L.M. **Atividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus***. 2001. 68f. Dissertação de Mestrado - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza/CE.

PESSOA, L.M. et al. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Vet. Parasitol.**, v. 109, p.59-63, 2002.

RAMOS, C.I.; BELLATO, V.; AVILA, V.S. Gastrointestinal parasites resistance in sheep to some anthelmintics in Santa Catarina State, Brasil. **Ciênc. Rural**, v. 32, n. 3, p. 473-477, 2002.

RANSOM, B.H. **Life history of the twisted wireworm (*Haemonchus contortus*) of sheep and other ruminants**. USDA Bureau Animal Industry, Cir.93, 7. Washington, 1906.

RANSOM, B.H. **Stomach worms (*Haemonchus contortus*) in sheep**. USDA Bureau Animal Industry, Cir.102, 7. Washington 1907.

RIOU, M.; et al. Modulation of the multidrug resistance (MDR) system in the nematode *Haemonchus contortus* by changing cholesterol content: effects on resistance to anthelmintics. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.52, p.180–187, 2003.

ROGERS, W.P. The effects of environmental conditions on the accessibility of third stage trichostrongyle larvae to grazing animals. **Parasitology**, v.32, p.208-225, 1940.

ROGERS, W. P. Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. **Int. J. Parasitol.**, v.12, p. 495–502, 1982.

ROGERS, W.P.; BROOKS, F. The mechanism of hatching of eggs of *Haemonchus contortus*. **Int. J. Parasitol.**, v.7, p. 61–65, 1977.

ROGERS, W.P.; SOMMERVILLE, R.I. The physiology of the second ecdysis of parasitic nematodes. **Parasitology**, v.50, p. 329-348, 1962.

ROSALINSK-MORAIS, F., et al. Resistência anti-helmíntica em rebanhos ovinos da região da associação dos municípios do Alto Irani (AMAI) oeste de Santa Catarina. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 8, n. 3, p. 559-565, 2007.

ROTHNIE, A., et al. The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence. **Eur. Biophys. J.**, v.30, p. 430–442, 2001.

SANTIAGO, M.A.M.; BENEVENGA, S.F.; COSTA, U.C. Epidemiologia e controle da helmintose ovina no município de Itaqui, Rio Grande do Sul. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v.10, n. 1, p.1-7, 1976.

SANTOS, V.T.; FRANCO, E.B.O. O aparecimento de *Haemonchus* resistente ao radical benzimidazole em Uruguaiana. In: LATIN AMERICAN CONGRES OF PARASITOLOGY, 1, 1967, Santiago. **Anais...** Santiago: p. 105-106.

SARRIA, A.L.F.; et al. Atividade inseticida de limonóides isolados de *Carapa guianensis* sobre a lagarta-do-cartucho-do-milho e a formiga cortadeira. In: Reunião Anual da SBQ, 30. 2007, Águas de Lindóia. **30ª. Reunião Anual da SBQ**. São Paulo: SBQ, 2007. v. 30. p. 112

SILVA, B.F.; et al. Vertical migration of *Haemonchus contortus* third stage larvae on *Brachiaria decumbens* Grass. **Vet. Parasitol.**, v.158, n.1-2, pp. 85-92, 2008.

SILVERMAN, P.H.; CAMPBELL, J.A. Studies on parasitic worms of sheep in Scotland. I. Embryonic and larval development of *Haemonchus contortus* at constant conditions. **Parasitology**, v.49, p. 23-38, 1959.

SOMMERVILLE, R.I.; ROGERS, W.P. The nature and action of host signals. **Adv. Parasitol.**, v.26, p. 239–293, 1987.

SOUSA, D.P.; et al. Avaliação “in vitro” da atividade do extrato de andiroba (*Carapa guianensis*) sobre fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE, 5. 2005, Recife. **Anais...Recife**, 2005. CD ROM.

STEPEK, G.; et al. Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, in vitro. **Parasitology**, v.130, p. 203–211, 2005.

STEPEK, G.; et al. In vitro and in vivo anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. **Parasitology**, v.132, p. 681–689, 2006.

STEPEK, G.; et al. Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, in vitro and in vivo. **Parasitology**, v.134, p. 103-112, 2007.

TAIRA, N.; HIROOKA, M.; SAEKI, H. Isolation of *Strongyloides venezuelensis* from *Rattus norvegicus* in Kagoshima Prefecture. **Jap. J. Vet. Med. Sci.** v. 56, p. 255 – 258, 1994.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 47, n.1, p. 41-47, 2004.

VEGLIA, F. The anatomy and life-history of the *Haemonchus contortus* (Rud). **Third and Fourth Annual Reports of the Director of Veterinary Research, Union of South Africa, Pretoria**, p. 349-500, 1915.

VIANA, J.G.A. **Governança da cadeia produtiva da ovinocultura no rio grande do sul: estudo de caso à luz dos custos de transação e produção.** 2008. 137 fs.

Dissertação (Mestrado em Extensão Rural). Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS, 2008.

XU, M., et al. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. **Mol. Bioc. Parasitol.**, v.91, p.327–335, 1998.

WALLER et al. Plants as de-worming agents of livestock in the Nordic Countries: historical perspective, popular beliefs and the prospect for the future. **Acta Vet. Scan.**, 42, p. 31-44, 2001.

WHARTON, D.A.; SOMMERVILLE, R.I. The structure of the excretory system of the infective larva of *Haemonchus contortus*. **Int. J. Parasitol.**, v.14, n.6, p. 591-600, 1984.

YADEGARINIA, D. et al. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochemistry**, v.67, n.12, p. 1249-1255, 2006.

CAPÍTULO 2²

² Neste capítulo consta o artigo “The anthelmintic effect of five plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*” que foi enviado para publicação no periódico Veterinary Parasitology.

The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*

Camila O. Carvalho^{a*}, Alessandro F.T. Amarante^a, Ana Carolina S. Chagas^b, Humberto Bizzo^c and Marília P. Stephan^c

^aDepartamento de Parasitologia, Instituto de Biociências, Caixa Postal 510, UNESP/Botucatu, SP, CEP 18618-000, Brazil

^bEmbrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, CEP 13560-970, Brazil

^cEmbrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, CEP 23020-470

*Corresponding author. Tel: +55 14 3811 6239 Fax: + 55 14 3815 3744

E-mail addresses: cocarvalho@ibb.unesp.br, cocarvalho_bio@yahoo.com.br

ABSTRACT

The indiscriminate use of anthelmintics has resulted in the establishment of parasite resistance. Thus, this study aimed to evaluate the *in vitro* antiparasitic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* of sheep and *in vivo* on *Strongyloides venezuelensis* of rats. The plant extracts from *Piper tuberculatum*, *Lippia sidoides*, *Mentha piperita*, *Hura crepitans* and *Carapa guianensis*, produced in different research institutions, were chemically analyzed and evaluated through the egg hatch test (EHT) and larval development test (LDT) in *H. contortus*. *P. tuberculatum* (150 and 250 mg.Kg⁻¹ of body weight) was evaluated for its anthelmintic action in *Rattus norvegicus* experimentally infected with *S. venezuelensis*. In the EHT, LC₅₀ and LC₉₀ from extracts were respectively as follow: 0.031 and 0.09 mg.ml⁻¹ for *P. tuberculatum*, 0.04 and 0.13 mg.ml⁻¹ for *L. sidoides*, 0.037 and 0.10 mg.ml⁻¹ for *M. piperita*, 2.16 and 17.13 mg.ml⁻¹ for *H. crepitans* and 2.03x10⁻⁶ and 1.22x10⁻¹² mg.ml⁻¹ for *C. guianensis*. In the LDT, LC₅₀ and LC₉₀ were respectively: 0.02 and 0.031 mg.ml⁻¹ for *P. tuberculatum*, 0.002 and 0.04 mg.ml⁻¹ for *L. sidoides*, 0.018 and 0.03 mg.ml⁻¹ for *M. piperita*, 0.36 and 0.91

mg.ml⁻¹ for *H. crepitans* and 17.65 and 1890 mg.ml⁻¹ for *C. guianensis*. The extract from *P. tuberculatum* showed the following substances: piperamides as (Z)-piplartine, (E)-piplartine, 8.9-dihydropiplartine, piperine, 10.11-dihydropiperine; 5.6 dihydropiperlongumine and pellitorine. The major compounds of the essential oils were thymol (76.6%) for *L. sidoides*, menthol (27.5%) for *M. piperita* and oleic acid (46.8%) for *C. guianensis*. Regarding the *in vivo* test, both doses of *P. tuberculatum* extract did not cause any significant reduction ($P>0.05$) in worm burden and fecal egg counts. We conclude that the extracts from *P. tuberculatum*, *L. sidoides* and *M. piperita* have an effective activity when tested *in vitro*; however, the doses of the extract from *P. tuberculatum* had no effect when employed *in vivo* tests.

Keywords: gastrointestinal nematodes, folk medicine, plant extracts, control.

1. Introduction

Largely distributed around the world, *Haemonchus contortus*, a nematode gastrointestinal usually found in small ruminants, is a parasite that causes immense economical losses on livestock by causing appetite depression, damages in gastric function and alterations in total protein content, energy and mineral metabolism (Fox, 1993). The main prophylactic method employed against this parasite has been the use of anthelmintic treatments. However, the widespread and indiscriminate administration of anthelmintics has resulted in parasite resistance. The first case of resistance to anthelmintics, reported to thiabendazole, was accurately described by Drudge et al. (1964). Thenceforth, a large number of researches reporting the decrease in anthelmintics' effectiveness have been published.

Anthelmintics derived from plants can be an alternative to the treatment of parasitic infections (Akhtar et al., 2000). The field of medicinal plants has witnessed an impressive development in research related to human and animal health. There are reports indicating antiparasitic effect of some plant species such as *Piper tuberculatum*, *Lippia sidoides*, *Mentha piperita*, *Hura crepitans* and *Carapa guianensis*. The main characteristics of these plants are described in the following paragraphs.

The ordinary name of *P. tuberculatum* (Piperaceae) is “pimenta longa” and the genus *Piper* is distributed in both hemispheres in tropical and subtropical regions (Jaramillo and Manos, 2001). It has been subject of studies, which highlighted its insecticidal, fungicidal, and trypanocidal actions (Miranda et al., 2002; Scott et al., 2008; Freire-de-Lima et al., 2008). The toxicity of *Piper aduncum* in cattle ticks *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* was also reported (Silva et al., 2009).

Native from the Northeast of Brazil, *L. sidoides* (Verbenaceae) is popularly known as “alecrim-pimenta”, “estrepa-cavalo” and “alecrim-bravo”. Scientific studies have revealed its effects against some bacteria (Aguiar et al., 1984; Bara and Vanetti, 1998), *Leishmania* (Oliveira et al., 2009), and *Aedes aegypti* larvae (Carvalho et al., 2003).

By its turn, *M. piperita* (Lamiaceae), which comes from the Mediterranean region and is known as “hortelã” (peppermint), is cultivated as a hybrid of *M. aquatica* L. and *M. spicata* L. across the world. It exhibits antiseptic, antibacterial, fungicidal, antispasmodic and stimulant actions (Mimica-Dukić et al, 2003; McKay and Blumberg, 2006).

H. crepitans (Euphorbiaceae) is naturally distributed throughout the Central America and South America, from Costa Rica to the Amazon. In Brazil, it is popularly known as “assacu” or “açaçu” (Brondani, 2006). Its seeds and sap were formerly used as a purgative and also as a popular medicine to treat elephantiasis, leprosy, rheumatic fever, swelling and intestinal parasites (Francis, 1990). The latex had effect on infesting larvae of ticks (Brondani, 2006).

Finally, *C. guianensis* (Meliaceae) is a tree that is generally found both in the Central America and in the South America, popularly known as “andiroba”. The essential oil extracted from this plant has been used industrially in the production of candles, shampoos, soaps and repellents (Pastore Junior and Borges, 1998; 1999). Some studies have pointed out several effects produced by this plant, such as, anti-allergic and analgesic effects (Penido et al., 2006a), acaricide (Farias et al., 2009), anti-inflammatory (Penido et al., 2006b) and insect repellent actions (Miot et al., 2004, Mendonça et al., 2005). Furthermore, the tea prepared with *C. guianensis*'s bark and flowers are used both as anthelmintic and healing agent in humans (Boufleuer, 2004).

Considering the advances made in this research field in the last years, this study aimed to evaluate *in vitro* the antiparasitic action of five plants (*P. tuberculatum*, *L. sidoides*, *M. piperita*, *H. crepitans* and *C. guianensis*) against *H. contortus*, and *in vivo* against *Strongyloides venezuelensis* in rats.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The extracts from five plant species were produced in laboratories of several institutions. The Institute of Chemistry from the Universidade Estadual Paulista, São Paulo State, provided the crude extract prepared from the leaves of *P. tuberculatum* cultivated at Araraquara, São Paulo. The fresh leaves were dried in greenhouse for 4 days at 40 °C. After grinding them, the resulting material was subjected to extraction with ethyl acetate and ethanol (3:1), using nine liters of this mixture to each extraction. This process was repeated four times with an interval of 7 days.

The essential oils from *L. sidoides* and *M. piperita* were obtained at Embrapa Amazônia Ocidental from plants cultivated in Manaus, Amazonas State, Brazil. The leaves of *L. sidoides* and *M. Piperita* were cut at the ground level and placed in freezer until extraction. After separation of leaves, two samples of 20 g were used to the determination of moisture, being kept in an oven at 65 °C for three days. Two other samples of 100 g each were used to the extraction of essential oil by hydrodistillation in a Clevenger type apparatus for three hours.

H. crepitans latex was collected in the trees located at Porto Velho city, Rondônia State by collaborators of Embrapa Rondônia. The seed oil of *C. guianensis* was produced and acquired in the local market of Porto Velho city.

2.2. Chemical analyzes

The active substances from *P. tuberculatum* used in the present trial were previously described by Cotinguiba et al. (2009), indicating piperamides, such as (Z)-piplartine, (E)-piplartine, 8,9-dihydropiplartine, piperine, 10,11-dihydropiperine, 5,6-

dihydropiperlongumine and pellitorine. Essential oils of *L. sidoides* and *M. piperita* were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry and presented as its main components thymol (76.6%) and menthol (27.5%), respectively. *C. guianensis* extract was evaluated and presented as its major constituent oleic acid (46.8%) and palmitic acid (39.0%) (Table 3).

Chemical analyses of the *L. sidoides* and *M. piperita* essential oils, *C. guianensis* oil and *H. crepitans* latex were performed at Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA). The identification of the oils components was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in an Agilent 5973N system (Agilent Technologies, Delaware, USA) equipped with a capillary column HP-5MS (5% diphenyl, 95% dimethylsilicone, 30 m x 0.25 mm; film thickness 0.25 μm). Helium was used as the carrier gas (1.0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$). It was injected 1.0 ml of a 1% solution of the essential oil in dichloromethane in an injector heated to 250°C, operating in split mode (split ratio 1:100). Oven temperature ranged from 60 to 240 °C at a rate of 3 °C $\cdot\text{min}^{-1}$. The mass detector was operated in electron ionization (70 eV) with the mass analyzer maintained at 150 °C, the ionization source at 220°C and transfer line at 260°C. In order to obtain the quantification, the essential oils were also analyzed in an Agilent 7890A chromatograph (Agilent Technologies, Delaware, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) kept at 280 °C and fitted with a capillary column HP-5 (5% diphenyl-95%-dimethyl silicone; 30 m x 0.32 mm; film thickness 0.25 μm). Same injection and chromatographic conditions above were applied, but hydrogen was used as carrier gas, at 1.5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. The results were indicated through relative area (% area). Linear retention indices were calculated by injection of a series of n-alkanes (C₇-C₂₆) in the same column and conditions stated for GC-FID analyses. Identification of essential oils components was done by comparison of both mass spectra and retention indices with Wiley 6th edition spectral database and literature data.

For the *H. crepitans* latex analyze protein electrophoresis in polyacrylamide gel was performed, using the system PROTEAN II xi Cell from BIORAD according to the methodology proposed by Laemmli (1970). The electrophoresis was performed over a period of seven hours and a voltage of 100V. Proteins from gels remained overnight in staining solution of acetic acid 10% (v/v), methanol 40% (v/v) and Coomassie Brilliant Blue R250 1% (v/v). The gel was destained in a solution containing acetic acid 10%

(v/v) and methanol 40% (v/v), being the solution renewed every 30 minutes until obtaining a clear revelation. The calculation of molecular weight protein fractions was performed by the construction of standard curves, with molecular markers against their respective distances in the gel.

2.3. *In vitro* assays

2.3.1. Egg Hatch Test

H. contortus eggs were obtained from feces, directly collected from the rectum of two lambs (*Ovis aries*) experimentally infected with the a *H. contortus* isolate, which showed anthelmintic resistance to all classes of drugs available commercially in Brazil (Almeida et al., 2010). The eggs were taken from feces according to the methodology described by Bizimenyera et al. (2006), which was published as an adaptation of Coles et al. (1992) original methodology. Based upon this methodology, feces were mixed with distilled water and filtered through 100, 56, 30 e 25 μm aperture sieve. In the last sieve, the eggs were retained and washed with distilled water and centrifuged in Falcon tubes (50 ml) at 3.000 rpm/5 min filled with water. Then, the supernatant was removed and a NaCl saturated solution added. This solution was once again centrifuged under the same conditions and the supernatant was washed through a sieve of 25 μm . The eggs collected were put inside a wine glass to sedimentation for 30 min. Egg counting was performed in five aliquots, and then 100 eggs in suspension were distributed in plates of 24 wells. The plant extracts were diluted in solution of tween 80 (3%), in order to obtain the concentrations, and incubated in wells (0.3 ml per well) for 48 h at 25 °C. The concentrations were determined following the ratio of 2 at least in six replicates for each concentration. The highest and the lowest concentrations evaluated for each plant extract were as follows: 0.313-0.0195 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *P. tuberculatum*, 1.25-0.039 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *L. sidoides*, 0.156-0.0098 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *M. piperita*, 2.5-0.156 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *H. crepitans* and 10-0.625 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *C. guianensis*. After incubation, Lugol's iodine solution was added in the wells to stop the hatching egg process. The number of L₁ larvae and egg per well was then counted using a reverse microscope under 100x magnification (Olympus, model CK-2, Japan). The negative control contained 3%

tween 80 and the positive control was prepared with 0.025 mg.ml⁻¹ of ricobendazole at six replicates.

2.3.2. Larval Development Test

Eggs were recovered according the procedures above and the LDT was performed following the method described by Hubert and Kerbouef (1992). In summary, 0.2 ml of egg suspension, containing approximately 100 eggs were add per well, in plates of 24 wells. They were incubated for 24 h at 27 °C to obtain L₁. After egg hatching, 90 µl of medium culture (containing *Escherichia coli* and yeast extract) was added to each one of the wells, followed by each concentration of the extracts. The concentrations were determined following the ratio of 2 from 5 µg.ml⁻¹ to 0.0003 µg.ml⁻¹ at least in six replicates for each concentration. The highest and the lowest concentrations evaluated for each plant extract were as follow: 0.313-0.0195 mg.ml⁻¹ for *P. tuberculatum*, 0.0195-0.0003 mg.ml⁻¹ for *L. sidoides*, 0.156-0.0098 mg.ml⁻¹ for *M. piperita*, 2.5-0.0078 mg.ml⁻¹ for *H. crepitans* and 5-0.039 mg.ml⁻¹ for *C. guianensis*. Plates were incubated for six days at 25 °C, and then the differential count from L₃, L₂ and L₁ was performed. It was prepared 0.5% DMSO as negative control and 0.64 mg.L⁻¹ ivermectin as positive control at six replicates.

In both *in vitro* tests, the lowest concentration was determined when the hatch and larval development were similar to the control. The highest concentration was based on the solubility or on the turbidity of the solution that still allowed for reading of results.

2.4. In vivo assay

Sixty Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were infected by subcutaneous inoculation with 2,000 infective larvae of *S. venezuelensis*. The production of infective larvae, animal inoculation and determination of parasite load followed the descriptions of Nakai and Amarante (2001). Seven days after infection, the animals were divided into six groups (n = 10) according to the treatment: G1 - positive control (ivermectin); G2 - negative control (Sorbitol); G3 - *P. tuberculatum* extract (150 mg.Kg⁻¹); G4 - *P. tuberculatum* extract (250 mg.Kg⁻¹); G5 - *L. sidoides* essential oil (150 mg.Kg⁻¹) and G6 - *L. sidoides* essential oil (250 mg.Kg⁻¹). Infection intensity was determined by counting the number of eggs per gram of feces (EPG) on days 1, 2, 3, 4 and 6 after the

first day of treatment and by counting the number of parthenogenetic female worms found in the first third portion of the small intestine. To obtain adult worms, upper one-third of the small intestine was removed from rats, thirteen days after infection, cut longitudinally, and incubated in saline solution (0.9% NaCl) for 4 h at 39 °C (Nakai and Amarante, 2001).

The aim of this test was to evaluate in rats the extracts that showed greater activity *in vitro* tests. Thus it would be possible to obtain an indication of the most active extract in an *in vivo* model for future testing in sheep. Despite the essential oil of *M. piperita* have shown good results in *in vitro* tests, it was not possible to perform the *in vivo* test with it, due to the small amount of extract that was provide by the partner institution.

2.5. Statistical analysis

In the EHT and LDT, the efficacy of each treatment was determined based on hatching or development percentage according to the following equation: Inhibition (%) = 100 (Ptest/Ptotal), where, Ptest refer to the number of eggs in the EHT or number of larvae that did not develop until L₃ in the LDT and Ptotal corresponds to the number of egg + L₁ (EHT) or number of L₁ + L₂ + L₃ (LDT).

The lethal concentration 50 (LC₅₀), i.e., effective concentration to kill 50% of the eggs or larvae, was determined by Probits analysis (SAS Institute, 2003).

For *in vivo* tests, the values were log transformed (log (x+1)) and subjected to analysis of variance. The averages were compared by Tukey test at 5% using the statistical software Minitab®.

3. Results

Three of the five extracts tested, *M. piperita*, *L. sidoides* and *P. tuberculatum*, exhibited satisfactory results by the EHT (Fig. 1) with low values of LC₅₀ (Table 1). The positive control inhibited the egg hatch in 100% and the negative control in 3.5%.

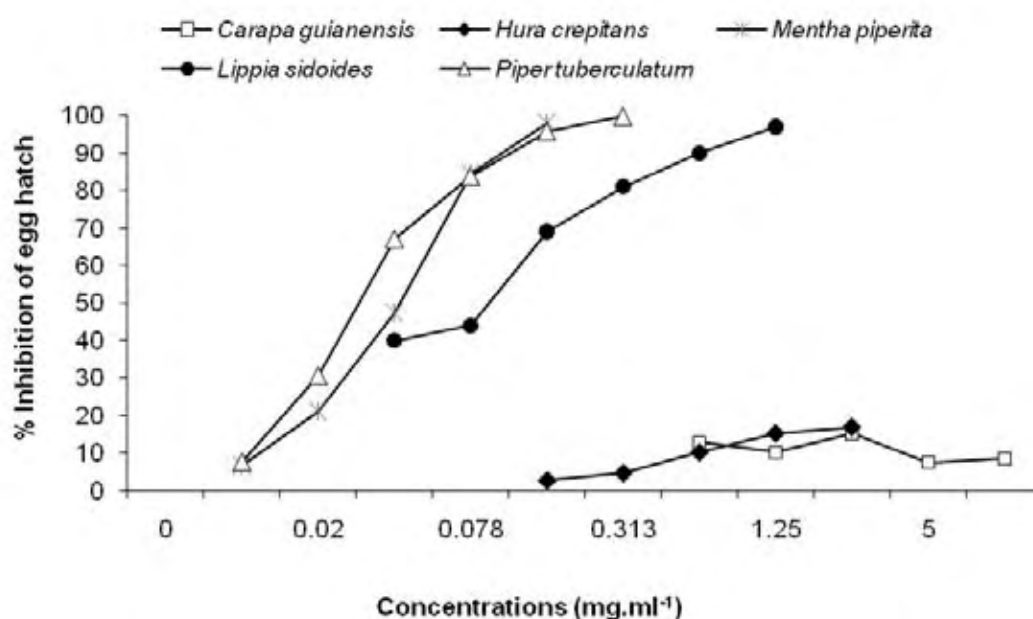


Figure 1 – Mean percentage of inhibition of *Haemonchus contortus* in the egg hatch test (EHT) performed with extracts of *Piper tuberculatum*, *Lippia sidoides*, *Mentha piperita*, *Hura crepitans* and *Carapa guianensis*.

Table 1

LC₅₀ and LC₉₀ obtained in the egg hatch test (EHT) for *Piper tuberculatum*, *Lippia sidoides*, *Mentha piperita*, *Hura crepitans* and *Carapa guianensis* extracts on *Haemonchus contortus*.

Species	LC ₅₀ (mg.ml ⁻¹)	LC ₉₀ (mg.ml ⁻¹)
<i>P. tuberculatum</i>	0.031 (0.029 - 0.033)	0.09 (0.08 - 0.10)
<i>L. sidoides</i>	0.04 (0.038 - 0.053)	0.13 (0.12 - 0.14)
<i>M. piperita</i>	0.037 (0.035 - 0.039)	0.10 (0.09 - 0.11)
<i>H. crepitans</i>	2.16 (1.60 - 3.40)	17.13 (8.61 - 57.21)
<i>C. guianensis</i>	2.03x10 ⁻⁶ (3.78x10 ⁻¹⁷ - 4.86x10 ⁻⁴)	1.22x10 ⁻¹² (2.53x10 ⁻³⁴ - 7.66x10 ⁻⁸)

The numbers in parentheses refer to values of upper and inferior confidence limits 95%.

According to the LDT, all extracts provided satisfactory results with the exception of the *C. guianensis* extract, which did not provide effective inhibition (Fig. 2). The data of the LC₅₀ are shown in Table 2. The positive control presented 100% of inhibition of larval development and 5.43% in the negative control.

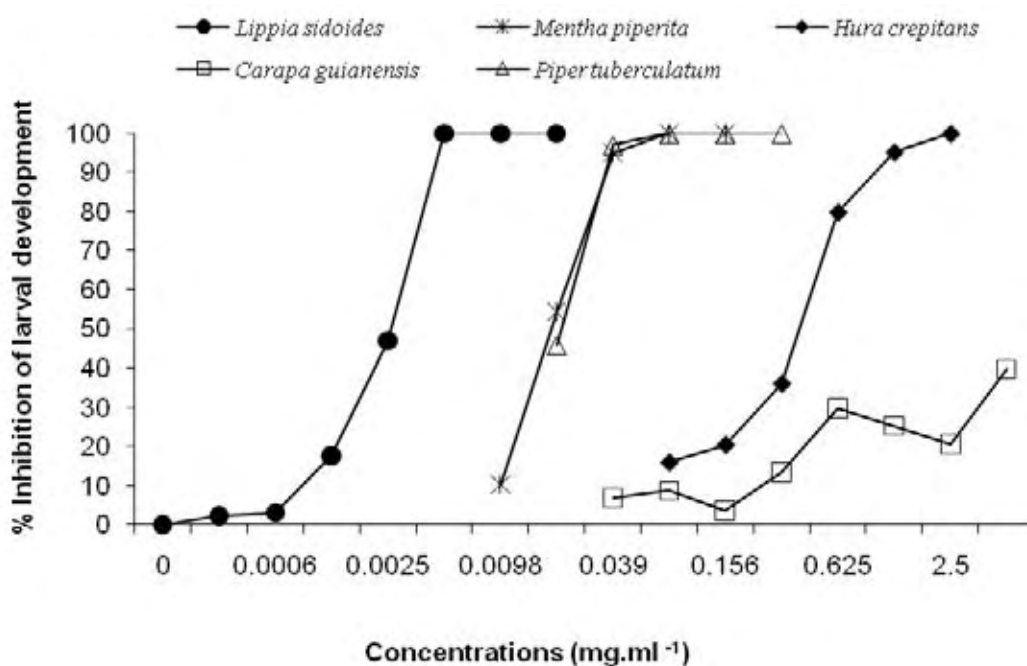


Figure 2 – Mean percentage inhibition of *Haemonchus contortus* in the larval development test (LDT) carried out with extracts of *Piper tuberculatum*, *Lippia sidoides*, *Mentha piperita*, *Hura crepitans* and *Carapa guianensis*.

Table 2

LC₅₀ and LC₉₀ obtained in the larval development test (LDT) for *Piper tuberculatum*, *Lippia sidoides*, *Mentha piperita*, *Hura crepitans* and *Carapa guianensis* extracts on *Haemonchus contortus*.

Species	LC ₅₀ (mg.ml ⁻¹)	LC ₉₀ (mg.ml ⁻¹)
<i>P. tuberculatum</i>	0.020 (0.0197 - 0.0206)	0.031 (0.029 - 0.033)
<i>L. sidoides</i>	0.002 (0.0016 - 0.0025)	0.004 (0.003 - 0.007)
<i>M. piperita</i>	0.018 (0.0166 - 0.0186)	0.03 (0.03 - 0.04)
<i>H. crepitans</i>	0.36 (0.33 - 0.40)	0.91 (0.80 - 1.05)
<i>C. guianensis</i>	17.65 (7.39 - 93.01)	1890 (257 - 105990)

The numbers in parentheses refer to values of upper and inferior confidence limits 95%.

H. crepitans showed better results in the LDT than in the EHT, 100% inhibition at a concentration of 2.5 mg.ml⁻¹ in the LDT, while none of the tested concentrations reached satisfactory inhibition in EHT.

In contrast, *C. guianensis* did not show inhibitory effect on the development of eggs and larvae. At the highest concentration evaluated (10 mg.ml⁻¹) only 8.52% of inhibition was observed in EHT, while in LDT (5 mg.ml⁻¹) the inhibition was 39.74%.

Table 3

Percentage composition of *Lippia sidoides*, *Mentha piperita* essential oils and *Carapa guianensis* seed oil obtained by gas chromatography/mass spectrometry.

<i>L. sidoides</i>	%	<i>M. piperita</i>	%	<i>C. guianensis</i>	%
α -tujene	0.3	α -tujene	t	Oleic acid	46.8
α -pinene	0.1	α -pineno	0.8	Palmitic acid	39
Mircene	1.1	3-methyl-cyclohexanone	0.1	α -copaene	2.3
α -terpinene	0.7	sabinene	0.4	Steriac acid	1.7
ortho-cimene	6.3	β -pinene	1.3	α -cubebene	0.5
limonene	0.4	mircene	0.6	n.i.	8.7
1.8-cineol	0.7	3-octanol	0.1		
γ -terpinene	2.0	ortho-cimene	0.1		
ipsdienol	0.6	limonene	3.5		
umbelulone	0.2	1,8-cineole	2.1		
4-terpinenol	1.0	<i>cis</i> - β -ocimene	0.1		
α -terpineol	0.2	γ -terpinene	0.1		
timil-methyl-ether	1.0	<i>cis</i> -sabinene hydrate	0.2		
thymol	76.6	terpinolene	0.1		
α -copaene	0.4	linalool	0.1		
β -caryophyllene	5.0	neo-isopulegol	0.1		
aromadendrene	0.4	para-ment-3-en-8-ol	0.1		
α -humulene	0.3	menthone	11.0		
ledene	0.3	menthofuran	22.5		
δ -cadinene	0.3	menthol	27.5		
Caryophyllene oxide	0.7	4-terpineol	1.0		
		iso-menthol	0.2		
		α -terpineol	0.3		
		pulegone	12.8		
		piperitone	0.6		
		Neo-menthyl acetate	0.7		
		Menthytl acetate	12.5		
		trans- β -caryophyllene	0.5		
		Mint lactone	0.1		

t – traces; n.i. – not identified

In the evaluation of the extract of *H. crepitans*, the presence of two bands was observed, a strongly colored corresponding to the polypeptide chain of mass between 36.5 and 49.5 kDa and a weakly stained polypeptide chain that corresponds to a mass between 36.5 and 28.8 kDa. From the mass of 28.8 kDa, there was a diffuse staining

with specific staining for the protein that diffuses through the end of the gel. The presence of protein material with molecular mass above 200 kDa was observed on top of the gel.

In vivo assay was performed with the extracts of *P. tuberculatum* and *L. sidoides*. The first showed that there was no considerable reduction in the EPG (Fig. 3) and in the averages of adult parasites counted in comparison with the control group ($P>0.05$) (Fig. 4). Concerning the extract from *L. sidoides*, it was observed sedative action on rats that received both doses. As a result, it was not possible the administration of the three consecutive doses of this extract and, therefore, fecal exams were also not performed. Considering adult parasites, it was noticed statistical difference of treatment groups in comparison with the control sorbitol group (Fig. 4).

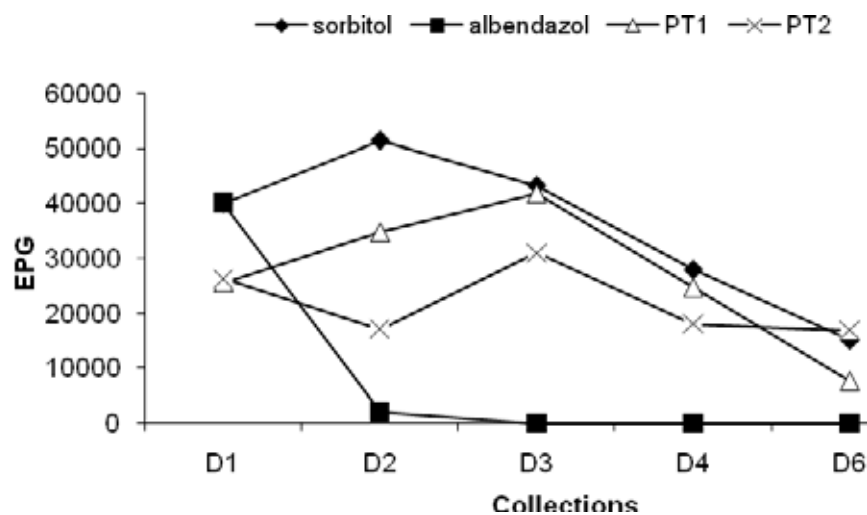


Figure 3 – Mean number of eggs per gram of faeces (EPG) of rats infected with *Strongyloides venezuelensis* and treated with extract of *P. tuberculatum* (PT1 – dose 150 mg.Kg⁻¹ and PT2- dose 250 mg.Kg⁻¹). D1, D2, D3, D4 and D6 indicate the collection days after the first day of treatment.

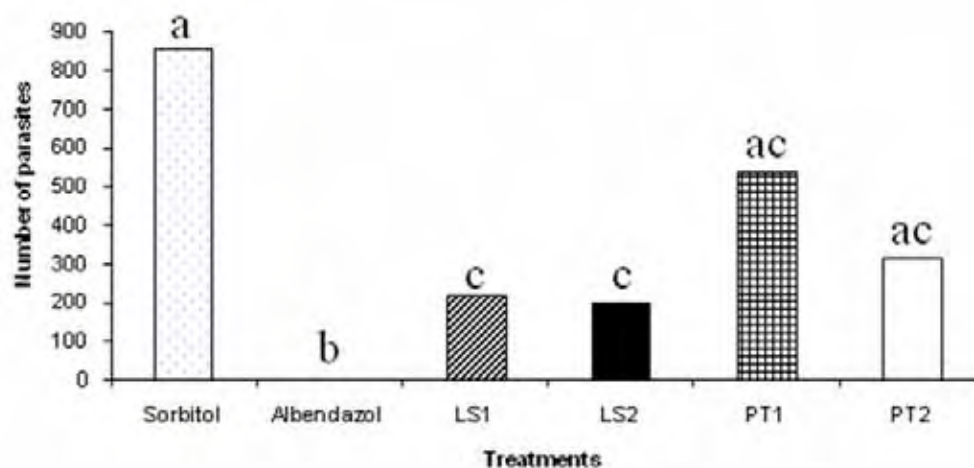


Figure 4 – Mean number of *Strongyloides venezuelensis* adult worms recovered from the initial third of intestine of rats treated with *Lippia sidoides* essential oil (LS1 - 150 mg.Kg⁻¹ and LS2 – 250 mg.Kg⁻¹) and *Piper tuberculatum* extract (PT1 – 150 mg.Kg⁻¹ and PT2 - 250 mg.Kg⁻¹). Means with different letters are significantly different by the Tukey test (P<0.05).

4. Discussion

L. sidoides essential oil presented high efficacy *in vitro* in accordance with other studies. Camurça-Vasconcelos et al. (2007) evaluated *in vitro* the anthelmintic potential of essential oil of the same plant against eggs and larvae of *H. contortus* and obtained meaningful results: in the concentration of 0.62 mg.ml⁻¹, there was an inhibition of egg hatch of 94.88%. The LC₅₀ was 0.40 mg.ml⁻¹ in the EHT and 2.97 mg.ml⁻¹ in the LDT. It was observed 100% of inhibition of egg hatch in the concentration of 0.625 mg.ml⁻¹ and LC₅₀ was 0.04 mg.ml⁻¹ in the EHT and 0.02 mg.ml⁻¹ in the LDT. These differences between the LC₅₀ of the two studies is possibly due to the composition of essential oils. In the present study, the essential oil of *L. sidoides* presented 76.6% of thymol while the oil tested by Camurça-Vasconcelos et al. (2007) contained 59.65% of this substance. The main element of *L. sidoides* essential oil is thymol and there are reports on its antimicrobial activity (Helander et al., 1998; Nostro et al., 2007), molluscicide (Singh et al., 1999) and larvicide (Carvalho et al., 2003). Camurça-Vasconcelos et al. (2007) conducted tests with thymol and obtained results very similar to that found with the essential oil, which suggests that this compound may have ovicidal and larvicidal action.

In field trials with sheep, Camurça-Vasconcelos et al. (2008) administered the essential oil of *L. sidoides* at concentrations of 230 and 283 mg.Kg⁻¹ and observed a reduction in number of EPG on the evaluations conducted 7 and 14 days after treatment: 38% and 30% and 45% and 54% respectively. In our evaluation with rats, significant reduction was observed in the number of adult parasites in both doses tested, (150 and 250 mg.Kg⁻¹), compared to the control group, treated with sorbitol. Due to its sedative effect, observed after the first administration of the oil, we chose not to perform the following two treatments to prevent the animals' death.

The essential oil of *L. sidoides* was also tested against the promastigote form of *Leishmania chagasi*, and inhibited culture growth by 50%, after 72 h of incubation was 75 to 89 µg. ml⁻¹ (Oliveira et al., 2009). In another study with *L. sidoides* essential oil, significant results were achieved, with LC₅₀ of 63 ppm against *A. aegypti* larvae (Cavalcanti et al., 2004).

M. piperita essential oil also provided interesting results *in vitro*. Previous studies have shown its action against human and plants microorganisms (Iskan et al., 2002; Yadegarinia et al., 2006, Mímica-Dukic et al., 2003) and phytonematodes (Nascimento et al., 2009). Menthol, one of the constituents of this oil, included in the class of terpenoids, also had its action reported in some studies. Junior (2003) reported the insecticidal activity of some terpenoids, which may be involved in the inhibition or retardation of growth, maturation damage, reduced reproductive capacity or appetite suppression that can lead the insects to death. Novelino et al. (2007) showed the repellent action of menthol on larvae of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and Miyazawa et al. (1997), in turn, reported the inhibitory effect of monoterpenes on acetylcholinesterase. The activity of *M. piperita* essential oil on eggs and larvae of *H. contortus* should be related to any of the activities described above for the terpenoids.

Regarding the oil extracted from seeds of *C. guianensis*, there was no ovicidal and larvicidal activity in the concentrations tested. One difficulty faced in handling this oil in *in vitro* tests with gastrointestinal nematodes was its solubilization. It would be necessary to increase the amount of solvent, but the parasites are very sensitive, which explains the low concentrations used in this paper. *In vitro* tests with ticks (*Rhipicephalus sanguineus* and *Anocentor nitens*) using high concentrations of oil

(100%, 50%, 30%, 25% and 10%) demonstrated efficacy at all the concentrations tested, but these parasites are not so sensitive to solvents (Farias et al., 2009). The larvicidal activity of *C. guianensis* against *A. aegypti* was 100% with LC₅₀ of 57 mg.L⁻¹ (Mendonça et al., 2005).

The latex extracted from *H. crepitans* did not show any ovicidal activity; however, it was effective in the LDT. In the EHT, it was not possible to assess this latex in higher concentrations because the extract possessed dark color and many particles that made impossible the subsequent visualization and counting of larvae and eggs. Some constituents of latex are lectin, crepitin (both glycoproteins) and hurin (proteolytic enzyme) (Brondani, 2006). There are studies that indicate the harmful action of proteases in the cuticle of some nematodes (Stepek et al., 2004). For instance, Jaffe (1943) compared the action of hurin (from the latex of *H. crepitans*) with papain (coming from the sap of *Ficus*) on *Ascaris lumbricoides* and earthworms. The results showed that papain digested both species, while hurin digested earthworms but not *A. lumbricoides*, although it caused his death. The lectin, which is also present in the latex of *H. crepitans*, acts by binding specifically to carbohydrates and other residues of glycoconjugates on the cell surface. It has been pointed out its potential as an insecticide for some species, by binding to the membrane peritrophic (acellular chitin structure that lines the digestive tract of some Coleoptera and Lepidoptera) interfering in the feeding process (Fitches et al., 2001). Taking into account the action of the lectin, we assumed that it may be consumed by the L₁ leading to inhibition of its development until the L₃ stage. It was noticed an increase in inhibition of development with increasing extract concentration.

In relation to the *P. tuberculatum* extract, satisfactory results were found in both tests, EHT and LDT. Secondary metabolites of the genus *Piper* has shown potential insecticide, as observed in work with fruit extracts of *Piper nigrum*, which presented isobutylamides with activity against *A. aegypti* larvae (Park et al., 2002) and toxicity and effects of the extract on the larvae neuromuscular system (Kumar et al., 2010).

Research carried out with ethanolic extracts derived from some species of *Piper* (*Piper longum*, *Piper ribesoides* and *Piper sarmentosum* showed significant larvicidal effect against *A. aegypti* (Chaithong et al., 2006). Another paper with ethanol extract from *P. tuberculatum* indicates insecticide and repellent activity against *Hypothenemus*

hampei (coffee berry borer) and a fungicide on *Beauveria bassiana* (Sallet, 2006). *P. tuberculatum* was also tested against *Alabama argillacea* (cotton leafworm), showing again insecticidal activity (Miranda et al., 2002). The family Piperaceae has several plants with insecticide effect, especially the genus *Piper* which contains species with secondary metabolites such as lignans and amides, which are used in their defense against herbivory. Piplartine, identified by Duh and Wu (1990) as one of the toxic components of *P. arborescens*, has demonstrated cytotoxic activity on cells. Bezerra et al. (2005) compared the mitotic activity of piperine and piplartine in different cells and observed more potent effect of piplartine. Piperine, in turn, has insecticidal activity as observed by Ribeiro et al. (2004) against epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Freire-de-Lima et al. (2008) noted that piperine caused a delay in cell cycle of that parasite

In conclusion, of the five plant extracts evaluated, *M. piperita*, *P. tuberculatum* and *L. sidoides* showed the best efficacy against *H. contortus* in *in vitro* tests. When tested *in vivo*, the results for *P. tuberculatum* extract were not satisfactory at all doses tested, but *L. sidoides* caused a significant reduction of adult worms and sedative action in rats. Nevertheless, future studies with *P. tuberculatum* extracts and *M. piperita* and *L. sidoides* essential oil will be necessary to understand their absorption and metabolism in rats and sheep.

Acknowledgments

The authors would like to thank the technical assistance of Andrine M.C. Navarro, César C. Bassetto, Letícia Boschini, Waldomiro Barioni Júnior, Fernando Cotinguiba, Francisco C.M. Chaves, Luciana G. Brito. This work received financial support from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and Camila O. Carvalho received scholarship from FAPESP.

References

- Aguiar, M.L.B.A., Matos, F.J.A., Moura, V.R., 1984. A atividade antibiótica de plantas da flora nordestina. *Ciênc. Cult.* 36, 547.
- Akhtar, M.S., Iqbal, Z., Khan, M.N. and Lateef. M., 2000. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in Indo-Pakistan subcontinent. *Small Rumin. Res.* 38, 99–107.
- Almeida, F.A., Garcia, K.C.O.D., Torgerson, P.R., Amarante, A.F.T., 2010. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitol. Int.* 59, 622-625, 2010.
- Bara, M.T.F., Vanetti, M.D., 1998. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. *Rev. Bras. Farmacogn.* 7-8, 22-34.
- Bezerra, D.P., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Lima, M.A., Elmiro, F.J., Costa-Lotufo, L.V., 2005. Antiproliferative effects of two amides, piperine and pipartine, from *Piper* species. *Z. Naturforsch.* 60, 539-543.
- Bizimenyera, E.S., Githiori, J.B., Eloff, J.N., Swan, G.E., 2006. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 142, 336–343.
- Boufleuer, N.T., 2004. Aspectos ecológicos da andiroba (*Carapa guianensis* Aublet. Melicaceae): subsídios para o manejo. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais). Universidade Federal do Acre, Rio Branco.
- Brondani, F.M.M., 2006. Atividade carrapaticida do látex da planta *Hura crepitans* L. e do extrato etanólico da planta *Rinorea pubiflora* (Benth.) Sprague & Sandwith em larvas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Programa de Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Rondônia.
- Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M. Maciel, M.V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Braga, R.R., Silva, R.A., Vieira, L.S., 2007.

Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. Vet. Parasitol. 148, 288-294.

Camurça-Vasconcelos A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Maciel, M.V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Braga, R.R., Silva, R.A., Vieira, L.S., Navarro, A.M.C., 2008. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol. 154, 167-170.

Carvalho, A.F.U., Melo, V.M.M., Craveiro, A.A., Machado, M.I.L., Bantim, M.B., Rabelo, E.F., 2003. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* L.. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 569-571.

Cavalcanti, E.S.B., Morais, S.M., Lima, M.A.A., Santana, E.W.P., 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L., Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 541-544.

Chaithong, U., Choochote, W., Kamsuk, K., Jitpakdi, A., Tippawangkosol, P., Chaiyasit, D., Champakaew, D., Tuetun, B., Pitasawat, B., 2006. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). J. Vector Ecol. 31, 138-144.

Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet. Parasitol. 44, 35-44.

Cotinguiba, F., Regasini, L.O., Bolzani, V.S., Debonsi, H.M., Passerini, G.D., Cicarelli, R.M.B., Kato, M.J., Furlan, M., 2009. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. Med. Chem. Res. 18, 703-711.

Duh, C., Wu, Y., 1990. Cytotoxic pyridone alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. J. Nat. Prod. 53, 1575-1577.

Drudge, J.H., Szanto, J., Wyant, Z.N., Elam, G., 1964. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. Am. J. Vet. Res. 25, 1512-1518.

Farias, M.P.O., Sousa, D.P., Arruda, A.C., Wanderley, A.G., Teixeira, W.C., Alves, L.C., Faustino, M.A.G., 2009. Potencial acaricida do óleo de andiroba *Carapa*

guianensis Aubl. sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61, 877-882.

Fitches, E., Woodhouse, S.D., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A., 2001. *In vitro* and *in vivo* binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. J. Insec. Physiol. 47, 777-787.

Fox, M.T., 1993. Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. Vet. Parasitol. 46, 143-158.

Francis, J.K. 1990. *Hura crepitans* L. Sandbox, molinillo, jabillo. Euphorbiaceae. Spurge family. USDA. For. Serv. So. Res. 5p.

Freire-de-Lima, L., Ribeiro, T.S., Rocha, G.M., Brandão, B.A., Romeiro, A., Mendonça-Previato, L., Previato, J.O., Lima, M.E.D., Carvalho, T.M.U., Heise, N., 2008. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. Parasitol. Res. 102, 1059-1067.

Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agr. Food Chem. 46, 3590-3595.

Hubert, J.; Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. Vet. Rec. 130, 442-446.

Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M., Baser, K.H.C., Demirci, F., 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. J. Agr. Food Chem. 50, 3943-3946.

Jaffé, W.G., 1943. Hurain, a new plant protease from *Hura crepitans*. J. Biol. Chem. 149, 1-7.

Jaramillo, M.A. Manos, P.S., 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). Am. J. Bot. 88, 706-716.

- Júnior, V.C., 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova* 26, 390-400.
- Kumar, S. Warikoo, R., Wahab, N., 2010. Larvicidal potential of ethanolic extracts of dried fruits of three species of peppercorns against different instars of an Indian strain of dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.*, 107, n.4, 901-907.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- McKay, D. L., Blumberg, J. B., 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother. Res.* 20, 619–633. doi: 10.1002/ptr.1936
- Mendonça, F.A.C., Silva, K.F.S., Santos, K.K., Ribeiro-Júnior, .K.A.L., Sant’Ana, A.E.G. 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 76, 629-636.
- Miot, H.A., Batistella, R.F., Batista, K.A., Volpato, D.E.C., Augusto, L.S.T., Madeira, N.G. Junior, V.H., Miot, L.D.B., 2004. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 46, 253-256.
- Mimica-Dukić, N., Bozin, B., Soković, M., Mihajlović, B., Matavulj M., 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.* 69, 413-419.
- Miranda, J.E., Oliveira, J.E.M., Rocha, K.C.G., Bortoli, S.A., Navickiene, H.M.D., Kato, M.J., Furlan, M., 2002. Potencial inseticida do extrato de *Piper tuberculatum* (Piperaceae) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Ol. Fibr.*, 6, n.2, 557-563.
- Miyazawa, M., Watanabe, H., Kameoka, H., 1997. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Monoterpenoids with a *p*-Menthane Skeleton. *J. Agric. Food Chem.* 45, 677-679.

- Nakai, E.S., Amarante, A.F.T., 2001. Experimental infection in mice (*Mus musculus*) and (*Rattus norvegicus*) by *Strongyloides venezuelensis*. Braz. J. Vet. Parasitol. 10, 1-6.
- Nascimento, E.M., Furlong, J., Pimenta, D.S., Prata, M.C.A., 2009. Efeito anti-helmíntico do hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em nematóides gastrintestinais de bovinos. Ciênc. Rural 39, 817-824.
- Nostro, A., Roccaro, A.S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., Blanco, A.R., 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J. Med. Microbiol. 56, 519-523.
- Novelino, A.M.S., Daemon, E., Soares, G.L.G. 2007. Avaliação da atividade do timol, mentol, salicilato de metila e ácido salicílico sobre as larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 700-704.
- Oliveira, V.C., Moura, D.M., Lopes, J.A., de Andrade, P.P., da Silva, N.H., Figueiredo, R.C., 2009. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. Parasitol. Res. 104, 1053-1059.
- Park, I.K., Lee, S.G., Shin, S.C., Park, J.D., Ahn, Y.J., 2002. Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. J. Agric. Food Chem. 50, 1866-1870.
- Pastore Junior, F., Borges, V., 1998. Produtos florestais não-madeireiros: processamento e comercialização. In: IITO/Funatura/UnB - Ibama, 54pp.
- Pastore Junior, F., Borges, V., 1999. Extração florestal não-madeireira na Amazônia: armazenamento e comercialização. In: IITO/Funatura/UnB - Ibama, 73 pp.
- Penido, C., Costa, K.A., Pennaforte, R.J., Costa, M.F.S., Pereira, J.F.G., Siani, A.C., Henriques, M.G.M.O., 2006a. Anti-allergic effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on allergen-induced vascular permeability and hyperalgesia. Inflamm. Res. 54, 295-303.
- Penido, C., Conte, F.P., Chagas, M.S.S., Rodrigues, C.A.B., Pereira, J.F.G., Henriques, M.G.M.O., 2006b. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated

from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm. Res.* 55, 457-464.

Ribeiro, T.S., Freire-de-Lima, L., Previato, J.O., Mendonça, L., Heise, N., Lima, M.E.F., 2004. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 3555-3558.

Sallet, L.A.P., 2006. Bioatividade dos extratos etanólicos de *Momordica charantia* Hitebe e *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari e *Beauveria bassiana* Bals. 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Programa de Biologia Experimental. Universidade Federal de Rondônia, Rondônia.

Scott, I.M, Jensen, H.R., Philogène, B.J.R., Arnason, J.T., 2008. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. *Phytochem. Rev.* 7, 65-75.

Silva, W.C., Martins, J.R.S., Souza, H.E.M., Heinzen, H., Cesio, M.V., Mato, M., Albrecht, F. Azevedo, J.L., Barros, N. M., 2009. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 164, 267-274

Singh, V.K., Singh, S. & Singh, D.K., 1999. Effect of active molluscicidal component of spices on different enzyme activities and biogenic amine levels in the nervous tissue of *Lymnaea acuminata*. *Phytother. Res.* 13, 649 – 654.

Stepek, G.; Behnke, J.M.; Buttle, D.J.; Duce, I.R. 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintic? *Trends Parasitol.* 20, 322–327.

Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I., 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry* 67, 1249-1255.