

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *ARTEMISIA ANNUA* L.,
MELIA AZEDARACH L. E *TRICHILIA CLAUSSENII* C.
SOBRE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS.**

Aida Cristina Cala
Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2010

**D
I
S
S.**

/

**C
A
L
A**

A.

C.

**2
0
1
0**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *ARTEMISIA ANNUA* L.,
MELIA AZEDARACH L. E *TRICHILIA CLAUSSENII* C.
SOBRE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS.**

Aida Cristina Cala

Orientador: Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Alvimar José da Costa

Co-orientadora: Dra. Ana Carolina de Souza Chagas

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal - Parasitologia Veterinária).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Março de 2010

C141a Cala, Aida Cristina
Avaliação da atividade de *Aretnisia annua* L., *Melia azedarach* L. e *Trichilia clausenii* C. sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos / Aida Cristina Cala. --
Jaboticabal, 2010
x, 64 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Gilson Pereira de Oliveira

Banca examinadora: Mario Roberto Hatayde, Carlos Noriyuki Kaneto

Bibliografia

1. Alternativas fitoterápicas. 2. Helmintoses. 3. Pequenos ruminantes. 4. Metabolismo I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616. 98:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *ARTEMISIA ANNUA* L., *MELIA AZEDARACH* L. E *TRICHILIA CLAUSSENII* C. SOBRE NEMATÓDEOS GASTRINTES TINAIS DE OVINOS.

AUTORA: AIDA CRISTINA CALA

ORIENTADOR: Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA

CO-ORIENTADORA: ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS

CO-ORIENTADOR: ALVIMAR JOSE DA COSTA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA

CPPAR / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MARIO ROBERTO HATAYDE

Departamento de Clin e Cir Veterinaria / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. CARLOS NORIYUKI KANETO

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Data da realização: 25 de março de 2010.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

AIDA CRISTINA CALA - nascida em 09 de Abril de 1971, na cidade de Maputo, Moçambique, é Médica Veterinária, graduada pela Universidade Eduardo Mondlane (UEM) – Moçambique, em Setembro de 1996. Atua como pesquisadora do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique, Direção de Ciências Animais, desde Março de 2004. Neste centro de pesquisa, trabalha na área de doenças parasitárias dos animais de produção com atividades e publicações voltadas para o controle e tratamento de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes. Iniciou em Março de 2008 o mestrado no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira, com bolsa do CNPq (programa PEC-PG).

*“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria;
Bem aventurado o homem que acha a sabedoria e o homem que
adquire o conhecimento.”*

Provérbios 1:7; 3:13

DEDICATÓRIA ESPECIAL,

À minha filha Nanci Regina, razão da minha vida.

Dedico,

Aos meus pais Eduardo Augusto Cala (*in memoriam*) e Ana da Conceição Maolela, pelo amor, dedicação e por terem me ensinado a escrever e a ler as primeiras palavras da minha vida,

Aos meus irmãos Casimiro da Conceição, Ana de Lurdes, Maria da Rosário, Francisco Rodolfo, Raul José e Maria Natália pela amizade e companheirismo do dia a dia,

Aos meus primos Omar Amade Daude (*in memoriam*) e Esmeralda Manhiça, pelos ensinamentos que me transmitiram,

Aos meus sobrinhos por vários momentos que eu senti falta de cada um deles para um simples sorriso, Arenal, Casimira, Ivo, Anbrósio, Luisildo, Samira, Ana Maria, Esmeralda, Erica, Edson, Fátima, Salimo e André,

A Ambrósio Costa, Berta Clara e Aida Adelino por fazerem parte de cada vitória alcançada.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** por tudo o que já fez e que irá fazer na minha vida, por ter me levantado em cada queda, ter enxugado as minhas lágrimas em cada choro, ter renovado a minha esperança e força sempre que perdi e pelas bençãos que tem me concedido na vida, fonte de fé e sabedoria.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido;

Ao Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique, pela oportunidade concedida para continuar com os estudos;

Ao Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira, pela sua orientação, dedicação e acompanhamento em todos os momentos da minha estadia no Brasil e na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Alvimar José da Costa, alguém para se espelhar. Agradeço os seus ensinamentos;

À Dr^a Ana Carolina de Sousa Chagas, que se tornou uma pessoa muito especial na minha vida. Agradeço pela oportunidade, apoio, dedicação, compreensão e amizade oferecida neste mestrado e pela co-orientação deste trabalho;

Aos coordenadores do Projeto “Uso de extratos vegetais ativos no controle parasitário de ruminantes” (MP2 02.07.06.009.00.00), de EMBRAPA- Sudeste que permitiram a realização do experimento;

Aos professores que aceitaram compor as bancas de qualificação e defesa, Prof. Dr. Adejair do Nascimento, Prof. Dr. Mário Hatayde e Prof. Dr. Carlos Kaneto;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, por ter me acolhido e em especial aos professores do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Veterinária, pelo carinho e atenção dispensada;

A todos os pesquisadores e funcionários do CPPAR, pelo companheirismo e amizade;

Ao prof. Dr. José Carlos Barbosa, Thais Rabelo e Fernando Souza, por toda atenção fornecida e contribuição nas análises estatísticas;

A EMBRAPA- Sudeste, todos os pesquisadores, funcionários e estagiários desta unidade pelo apoio incondicional, contribuição com os seus conhecimentos e carinho;

A Leticia Boschini, por todo apoio concedido em cada etapa do experimento;

A equipe do CBPQ, pelos extratos, matéria seca e pelas análises químicas da *Artemisia annua*, Pedro Magalhães, Ilza Sousa, Glyn Mara;

A equipe que forneceu o extrato de *Melia azedarach*, Lígia Borges e Lorena Alessandra;

A equipe que forneceu o extrato de *Trichilia clausenii*, Andreia Matos;

Ao Prof Moacir, pela contribuição na metodologia de extração da *A. Annua*;

A equipe do USDA, Dr Jorge F.S. Ferreira e Dr. Javier Gonzalez, pelas análises químicas do extrato *A. Annua*- Embrapa e análises das amostras de fezes;

A todos os colegas do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique e da Direção de Ciências Animais em especial;

A Otilia, Quintilia, Ângela Chocolate, Jandira, Cesaltina, muito obrigada pela companhia e amizade;

A Maria Ana Maxlhuza, por ter sido amiga, irmã, mãe e tia da minha filha durante estes anos que estive fora de casa e por ter aceite esta dura tarefa de mãe-educadora e desempenhado-a com amor e carinho;

Especial agradecimento a José Salomone Cossa pela grande amizade e pelas palavras carinhosas, de força e esperança que sempre me disse em cada momento que eu queria largar tudo e voltar para casa;

Obrigado a todos mais uma vez por me proporcionarem partilhar parte de minha vida com pessoas tão especiais.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE GRÁFICOS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1) INTRODUÇÃO.....	1
2) REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1) Nematódeos gastrintestinais na criação de pequenos ruminantes... 3	3
2.2) Controle de parasitas gastrintestinais.....	4
2.3) Alternativas de controle.....	4
2.4) Plantas com atividade anti-helmíntica.....	6
2.4.1) <i>Artemisia annua</i> L.....	9
2.4.2) <i>Melia azedarach</i> L.....	14
2.4.3) <i>Trichilia clausenii</i> C.....	18
3) OBJETIVOS.....	21
4) MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1) Local de execução.....	22
4.2) Obtenção dos extratos ativos.....	22
4.2.1) <i>Artemisia annua</i>	22
4.2.2) <i>Melia azedarach</i>	25
4.2.3) <i>Trichilia clausenii</i>	26
4.3) Teste <i>in vitro</i>	27

4.3.1) Determinação das concentrações dos extratos.....	27
4.3.2) Recuperação de ovos de nematódeos gastrintestinais.....	27
4.3.3) Teste de Eclodibilidade Larvar (TEL).....	28
4.3.4) Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL).....	28
4.4) Teste <i>in vivo</i>	29
4.5) Análise estatística.....	31
5) RESULTADOS.....	32
5.1) Estudo químico dos extratos.....	32
5.1.1) <i>Artemisia annua</i>	32
5.1.2) <i>Trichilia claussenii</i>	33
5.2) Testes <i>in vitro</i>	33
5.3) Testes <i>in vivo</i>	34
6) DISCUSSÃO.....	40
7) CONCLUSÕES.....	46
8) PERSPECTIVAS.....	47
9) REFERÊNCIAS.....	48
Anexo:.....	644

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: <i>Artemisia annua</i>	9
FIGURA 2: <i>Melia azedarach</i>	14
FIGURA 3: <i>Trichilia clausenii</i>	18

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Quantificação da artemisinina e da deoxiartemisinina nos quatro extratos vegetais de <i>A. annua</i> genótipo CPQBA – Unicamp.....	32
TABELA 2- Quantificação da artemisinina, ácido dihidroartemisiníco e do ácido artemisínico no extrato vegetal de <i>A. annua</i> genótipo CPQBA - Extração Embrapa.....	33
TABELA 3: Inibição da eclodibilidade ($\mu\text{g/mL}$) das larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos submetidas aos tratamentos com extratos vegetais e controle.....	34
TABELA 4: Inibição do desenvolvimento ($\mu\text{g/mL}$) das larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos submetidas aos tratamentos com extratos vegetais e controle.....	34
TABELA 5: Resultados das comparações múltiplas do hematócrito dos ovinos dos grupos controle e tratados no dia do tratamento (D0), no 7° (D7) e 15° dia (D15) pós tratamento.....	35
TABELA 6: Resultados das comparações múltiplas da redução do OPG (%) do D1 ao D15 em relação ao D0 dos grupos controle e tratados.....	37
TABELA 7: - Resultados das comparações múltiplas das coproculturas (%), realizadas em dias alternados do D0 ao D15 nos grupos controle e tratados.....	38

TABELA 8- Quantidade de artemisinina e deoxiartemisinina recuperada nas fezes nas horas 0, 12 e 36 do grupo extrato de *A. annua*..... 39

TABELA 9- Quantidade de artemisinina e deoxiartemisinina recuperada nas fezes nas horas 0, 12 e 36 do grupo artemisinina..... 39

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
GRÁFICO 1: Médias aritméticas do hematócrito dos grupos controle e tratados no dia do tratamento (D0), no 7° (D7) e 15° dia (D15) pós tratamento.....	35
GRÁFICO 2: Médias aritméticas do OPG dos D0 ao D15 pós tratamento dos grupos controle e tratado.....	36

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *ARTEMISIA ANNUA* L., *MELIA AZEDARACH* L. E *TRICHILIA CLAUSSENII* C. SOBRE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE OVINOS.

RESUMO: Em virtude da importância que os pequenos ruminantes desempenham no setor agropecuário e da necessidade de se encontrar alternativas de baixo custo para o controle das helmintoses, este trabalho objetivou avaliar a atividade anti-helmíntica dos extratos de *Artemisia annua*, *Melia azedarach* e *Trichilia clausenii*. Os extratos, aquoso, bicarbonato de sódio, diclorometano, etanólico de *A. annua*, hexânico de *M. azedarach* e o metanólico de *T. clausenii*, foram avaliados em testes *in vitro* de eclodibilidade larvar (TEL) e de desenvolvimento larvar (TDL) sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos. O extrato de bicarbonato de sódio de *A. annua* e artemisinina (bioativo purificado) foram avaliados *in vivo* em ovinos Santa Inês infectados por nematódeos gastrintestinais com base na avaliação do hematócrito, na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e coprocultura. Os princípios ativos dos extratos foram quantificados com base na cromatografia líquida de alta eficiência - índice de refração (CLAE-IR), ultravioleta (CLAE-UV) e líquido-líquido (CLAE-LL). A capacidade antioxidante do extrato de bicarbonato de sódio foi determinada pelo método ORAC (capacidade de absorção do radical oxigênio) e a artemisinina eliminada foi quantificada pela CLAE-UV. Analisados pelos testes *probit* e de Tukey. O extrato de bicarbonato de sódio de *A. annua* foi o mais eficiente *in vitro* com CL₅₀(concentração letal) de 0,0677 µg/mL e CL₉₉ de 1,27 µg/mL no TEL e no TDL a CL₅₀ foi de 1,67 µg/mL e a CL₉₉ de 23,8 µg/mL. No teste *in vivo*, a redução máxima do OPG foi de 31,97% no 14º dia nos animais tratados com o extrato de bicarbonato de sódio de *A. annua* (2 g/kg pv) e de 41,37% no 15º nos animais que receberam artemisinina (100 mg/kg pv). Na coprocultura obteve-se 91,2% de *H. contortus*, 8,4% de *Trichostrongylus* sp. e 0,3% de *Oesophagostomum* sp. Os resultados indicam a necessidade de mais estudos com doses mais elevadas de extratos, outras alternativas de administração e um estudo farmacocinético da artemisinina em pequenos ruminantes.

Palavras chave: Alternativas fitoterápicas, helmintoses, metabolismo, pequenos ruminantes

**EVALUATION OF THE ACTIVITY OF ARTEMISIA ANNUA L., MELIA
AZEDARACH L. AND TRICHILIA CLAUSSENII C. ON GASTROINTESTINAL
NEMATODES IN SHEEP**

ABSTRACT: Given the importance that small ruminant plays in the livestock and the need to find alternatives of low-costs for the control of helminthes, the objectives of this study was to evaluate the anthelmintic activities of extracts from *Artemisia annua*, *Melia azedarach* and *Trichilia clausenii*. The extracts, aqueous, sodium bicarbonate, dichloromethane, ethanol of *A. annua*, hexane of *M. azedarach* and methanol of *T. clausenii*, were evaluated *in vitro* tests of larval hatchability (TEL) and larval development (TDL) on gastrointestinal nematodes in sheep. The extract of sodium bicarbonate *A. annua* and artemisinin (bioactive purified) were evaluated *in vivo* in Santa Ines sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes based on the assessment of hematocrit, egg count per gram of feces (OPG) and stool culture. The active ingredients of the extracts were quantified based on liquid chromatography with high efficiency - an index of refraction (HPLC-IR), ultraviolet (HPLC-UV) and liquid-liquid (HPLC-LL). The antioxidant activity of sodium bicarbonate extract was determined by ORAC method (absorption capacity of the radical oxygen) and artemisinin in the feces was quantified by HPLC-UV. The results were analyzed by SAS *probit* and Tukey test. The extract of sodium bicarbonate *A. annua*, *in vitro*, was the most effective with LC₅₀ of 0,0677 µg/mL and 1,27 µg/mL of CL₉₉ in TEL, and in the TDL LC₅₀ was 1,67µg/mL and CL₉₉ of 23,8µg/mL. *In vivo* test, the maximum reduction in EPG was 31,97% on day 14 in animals treated with the extract of sodium bicarbonate *A. annua* (2g/ kg body weight) and 41.37% on day 15 in animals received artemisinin (100 mg/kg bw). In stool culture was obtained 91, 2% of *H. contortus*, 8, 4% *Trichostrongylus* sp. and 0, 3% of *Oesophagostomum* sp. The results show the need for more studies with higher doses of extracts, other alternatives of administration and pharmacokinetic study of artemisinin in small ruminants.

Keywords: Phytotherapy alternatives, helminthes, small ruminants, metabolism

1) INTRODUÇÃO

A criação de pequenos ruminantes é uma atividade explorada em todos os continentes, estando presente em áreas que apresentam as mais diversas características agro ecológicas. No entanto, somente em alguns países esta atividade apresenta expressão econômica, sendo, na maioria dos casos, desenvolvida de forma empírica e extensiva, adotando baixos níveis de tecnologia e, conseqüentemente, apresentando baixa produtividade e rentabilidade.

Em Moçambique, os pequenos ruminantes desempenham um papel social de extrema importância na economia e bem estar para a maior parte das famílias em zonas rurais. Eles constituem uma importante fonte de proteína em termos de leite e carne e também proporcionam rendimentos através da sua comercialização. Ovinos e caprinos são animais de rápida multiplicação, se adaptam a diversas condições adversas do país e apresentam uma maior expansão no território sem que os seus proprietários, camponeses, lhes forneçam o manejo necessário. A sua criação requer o mínimo de investimento possível, visto que tem a capacidade de sobrevivência em zonas de escassa disponibilidade de gramíneas, e com invasão de arbustos. Essas pequenas áreas são supostamente inadequadas para a manutenção de bovinos, deste modo, constituem um recurso econômico para pequenos criadores nos países em desenvolvimento.

Segundo o censo agropecuário de Moçambique, o efetivo total de pequenos ruminantes no ano de 2007 foi de 4.639.475, dos quais 218.882 são ovinos e 4.420.593 são caprinos, que se concentram majoritariamente no setor familiar (TIA, 2008).

Apesar da rusticidade de algumas raças e da prolificidade favorecerem a criação, o setor produtivo rural não consegue suprir as necessidades existentes, devido a práticas inadequadas de manejo relacionadas a doenças, nutrição e ao custo elevado de medicamentos (ATANASIO, 2000).

No manejo sanitário do rebanho, os parasitas gastrintestinais ocupam um lugar importante entre os fatores que limitam a produção de pequenos ruminantes, comprometendo a rentabilidade dos sistemas pecuários produtivos (SOULSBY, 1982;

GITHIORI et al. 2002). A maioria das perdas associadas as infecções clínicas e subclínicas por estes parasitas, tem mostrado que os custos de produção são enormes em função da mortalidade, redução da taxa de crescimento e da produtividade, aumento do custo da mão de obra e dos anti-helmínticos (GITHIORI et al. 2004; MOLENTO, 2004).

Atualmente os programas de controle de nematódeos de pequenos ruminantes visam não só curar a doença clínica, que se caracteriza por altas taxas de mortalidade, mas principalmente reduzir os prejuízos provocados pelo parasitismo subclínico. O controle dos nematódeos gastrintestinais é feito basicamente pela utilização de anti-helmínticos quimioterápicos, contudo, essas drogas não são acessíveis aos pequenos produtores nas comunidades rurais africanas (GITHIORI et al. 2004).

Um grande número de plantas medicinais tem sido usado para o tratamento de infecções parasitárias no homem e nos animais (AKHTAR et al. 2000). Obstante as dificuldades, tem se verificado que a agricultura familiar tem recorrido à sabedoria popular para superar os problemas, adotando o uso de plantas medicinais no controle das diversas doenças dos animais, mas de uma forma empírica (GITHIORI et al. 2004).

Pela importância que as comunidades rurais em Moçambique representam para o país, e pelo uso de pequenos ruminantes na subsistência das mesmas, vê-se a necessidade de se procurar alternativas que possibilitem a rentabilidade da atividade.

2) REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Nematódeos gastrintestinais na criação de pequenos ruminantes

As doenças parasitárias estão entre os fatores que limitam a produção de pequenos ruminantes no mundo inteiro, sendo responsabilizadas por elevadas perdas econômicas, em decorrência de crescimento retardado, perda de peso, redução no consumo de alimentos, queda na produção de leite, baixa fertilidade e nos casos de infecções maciças, altas taxas de mortalidade. Estes fatos devem-se a lesões na mucosa intestinal que provocam distúrbios na absorção dos nutrientes, espoliação hematófaga, que leva a infecções sub-clínicas, em alguns casos, associada à diarreia sanguinolenta e anemia, conseqüentemente, baixa condição corporal e rendimento de carcaça (SOULSBY, 1982).

Entre os parasitas que infectam pequenos ruminantes de importância veterinária estão os trichostrongilídeos, cujo ciclo evolutivo é direto e em geral não-migratório, sendo a larva do terceiro estágio (L₃) a infectante. Esta superfamília compreende os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus* e *Cooperia* que são os mais patogênicos. Destes helmintos, *Haemonchus sp.* é indicado como o maior causador de problemas à saúde dos ruminantes por ser um parasita hematófago, ingerindo sangue da mucosa do abomaso, tanto na fase imatura como na adulta, causando anemia severa (URQUHART et al. 1996).

Estudos realizados por investigadores de vários países tropicais (JANSEN & PANDEY, 1989; MBOERA & KITALE, 1994; PANDEY et al. 1994 e ATANÁSIO, 2000) indicaram que em infecções mistas onde *H. contortus* ocorre com maior incidência, às perdas econômicas são altas. AMARANTE, et al. (2004) afirma ser este o parasita de maior importância econômica nas áreas de criação de pequenos ruminantes no mundo.

CRUZ E SILVA (1971) e SPECHT (1982) observaram que várias espécies de helmintos ocorrem em Moçambique, e que *H. contortus*, *O. columbianum* e *T. colubriformes* são as mais prevalentes em pequenos ruminantes e a sua incidência é maior durante a época chuvosa.

2.2) Controle de parasitas gastrintestinais

O controle de parasitas em pequenos ruminantes vem sendo realizado através do uso de anti-helmínticos pertencentes a diversos grupos químicos, na maioria das vezes, sem considerar os fatores epidemiológicos predominantes na região. Outro fator é a falta de planejamento na rotação de pastagens, o que interfere diretamente na população parasitária presente no ambiente e, conseqüentemente, na infecção do rebanho.

Métodos como rotação de pastagens, uso de diferentes espécies de animais no mesmo piquete, cultivo alternado de pastagens e de produtos agrícolas, cultivo de forrageiras menos propícias ao desenvolvimento das fases larvais dos parasitas, uso de raças mais resistentes a verminoses e outros métodos tem sido investigados como medidas integradas de controle de parasitas gastrintestinais em pequenos ruminantes (CHAGAS & VERISSIMO, 2008).

Poucos criadores realizam a rotação racional de drogas anti-helmínticas, como conseqüência, ocorre a seleção de indivíduos que possuem a capacidade de resistirem a esses quimioterápicos (ECHEVARRIA, 1995; MOLENTO, 2004). Além disso, a falta de uma metodologia estratégica e o esquema de medicação supressiva também tem levado ao desenvolvimento de resistência dos parasitas nas criações em vários países (HALL et al. 1981; KETTLE et al. 1983; BARTON et al. 2008).

Outro fator que contribui para o agravamento da resistência é o custo de drogas anti-helmínticas convencionais no mercado, o que leva os produtores a não promoverem o tratamento adequado dos seus rebanhos (VIEIRA & CAVALCANTE, 1999).

2.3) Alternativas de controle

Os organismos possuem o que se chama de diversidade biológica e isto pode levar alguns indivíduos, em uma dada população, a terem a habilidade de sobreviver aos efeitos de um composto químico, habilidade esta que pode ser transmitida aos

seus descendentes. Portanto, a resistência parasitária é um fenômeno pelo qual alguns organismos de uma população são capazes de sobreviver após constante utilização de um composto químico (MOLENTO, 2004).

O problema da resistência dos nematódeos aos anti-helmínticos é uma preocupação de caráter mundial, principalmente nos trópicos e subtropicais onde existe uma relação direta entre a precipitação e a intensidade de infecção por nematódeos gastrintestinais. O uso inadequado de determinado anti-helmíntico, bem como a medicação supressiva, leva à seleção de estirpes resistentes a todas as classes de princípios ativos e estes são fatores determinantes na criação de pequenos ruminantes (VAN WYK et al. 1997).

Nos últimos anos, a comunidade científica vem concentrando esforços em pesquisas para obter novos métodos alternativos para o controle da população de nematódeos, principalmente em pequenos ruminantes: o uso de fungos (LARSEN, 2000), a seleção de raças resistentes (AMARANTE et al. 1999), o método Famacha (VAN WYK et al. 1997), a homeopatia (ZACARIAS, 2004) e o uso de plantas com efeito anti-helmíntico (WALLER et al. 1995; HERD, 1996; GITHIORI et al. 2004; MONGOLO et al. 2006; CHAGAS, 2004) estão entre as alternativas que tem sido estudadas.

Os fungos predadores, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys conoides* (GRAMINHA et al. 2005) e os fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* (PARAUD et al. 2005) e *Monacrosporium thaumasium*, (ARAÚJO et al. 2007), foram testados no controle de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos. Eles demonstraram redução de 73,7% a 99,3% do número de ovos por grama de fezes (OPG) e aumento do ganho de peso de 33,3% dos animais submetidos aos tratamentos. Mas, apesar dos fungos serem uma alternativa viável, apresentam desvantagens em termos do período de manutenção no ambiente, uma vez que tem a vida curta e tem que se definir aplicabilidade em diferentes regiões geográficas (LARSEN, 2006).

O método de seleção de raças ou cruzamentos busca características desejáveis de produtividade e de resistência à infecção por nematódeos gastrintestinais, este descarta indivíduos sensíveis à verminose dentro da mesma raça

e do rebanho. (AMARANTE et al. 2004). O fator limitante neste caso é determinar um método de seleção de animais resistentes que não os exponha a doses de infecção parasitária letais. O FAMACHA[®] é um método seletivo que visa tratar apenas animais suscetíveis do rebanho, a maior vantagem do método é a minimização do problema da resistência, pois a pressão seletiva sobre os parasitas é muito menor (MOLENTO, 2004).

Segundo VIEIRA (2003), a homeopatia é uma opção que, no contexto da produção orgânica, já vem sendo recomendada não somente para o controle de verminose, mas também, para outras infecções em pequenos ruminantes. A homeopatia veterinária parte do princípio que o mesmo agente capaz de causar uma enfermidade, quando administrado constantemente em concentrações reduzidíssimas, é capaz de curá-la.

A fitoterapia apresenta um ramo promissor para as pesquisas e tem potencial para participar ativamente em programas de controle parasitário (MOLENTO, 2004). A possibilidade de se produzir um medicamento antiparasitário de menor custo e de menor efeito colateral, associado ao fato do medicamento ser um produto natural, está entre as vantagens de se utilizar plantas medicinais no controle do parasitismo intestinal em pequenos ruminantes (CHAGAS et al. 2008).

2.4) Plantas com atividade anti-helmíntica

A utilização de plantas com propriedades anti-helmínticas parece ser uma alternativa eficaz, tanto do ponto de vista do controle parasitário quanto pelo seu baixo impacto ambiental em relação aos resíduos. A fitoterapia pode contribuir para aumentar os lucros da criação, uma vez que reduz o uso de anti-helmínticos convencionais, além de estender a vida útil dos produtos químicos disponíveis (VIEIRA et al. 1999).

O uso de plantas medicinais no controle ou tratamento de diversas enfermidades, infecciosas ou não infecciosas, não é recente, fazendo parte das tradições da maior parte das populações rurais ou não. O uso da fitoterapia pela população mundial é muito significativa. Dados da Organização Mundial de Saúde

(OMS) mostram que cerca de 80% faz uso de algum tipo de planta na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% foi devido à indicação médica (WHO, 1998).

As plantas medicinais são matéria-prima de origem vegetal utilizadas para elaboração de medicamentos alopáticos ou fitoterápicos (RIGUEIRO, 2007). Segundo este mesmo autor, plantas medicinais são aquelas que podem ser usadas no tratamento ou na prevenção de doenças. Toda planta medicinal tem no mínimo um princípio ativo, que é a substância responsável pelo efeito curativo. Para o efeito medicinal existir, além do fito complexo, é importante que na planta esteja presente o princípio ativo. Fito complexo é o conjunto de todas as substâncias presentes na planta (vitaminas, sais minerais, resinas, metabólitos secundários, etc.), e que agem juntamente com o princípio ativo, melhorando o efeito. A explicação para essa melhora do efeito é que as demais substâncias podem facilitar a absorção e o aproveitamento do princípio ativo pelo organismo.

Em muitos países, é crescente o número de pesquisas com plantas que apresentam atividade contra vírus, bactérias, fungos e parasitas, não sendo diferente na medicina veterinária, onde as pesquisas por plantas medicinais objetivam a redução de problemas sanitários no controle de várias doenças que comprometem a produtividade dos animais (NIEZEN et al. 1996). Além disso, existe a problemática da resistência apresentada pelos nematódeos aos anti-helmínticos atualmente.

Vários trabalhos têm sido feitos com o objetivo de identificar plantas com atividade anti-helmíntica. Por exemplo, na África do sul, MCGRAW et al. (2000) realizaram um levantamento das principais plantas usadas no tratamento de enfermidades intestinais nas comunidades rurais. Avaliou-se a atividade anti-helmíntica dos 72 extratos obtidos de 24 gêneros de plantas através de testes *in vitro* de desenvolvimento e de motilidade, contra o nematóide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Constatou-se que apenas uma planta não apresentava nenhuma atividade anti-helmíntica. As espécies *Artemisia afra* e *Melia azedarach* estavam presentes na lista das plantas testadas.

Em 2007 no Canadá, foi feito um registro de plantas medicinais usadas para tratar problemas endoparasitários em cães, gatos e suínos. Concluiu-se que a

população dessa região tem usado várias espécies como *Artemisia cina*, *Artemisia vulgaris* e *Artemisia annua* como anti-helmínticos (LANS et al. 2007).

No Nordeste do Brasil, GIRÃO et al. (1998) e OLIVEIRA et al. (1997) fizeram avaliação de algumas plantas com atividade anti-helmíntica, tais como: *Cucurbita moschata* (Abóbora), *Momordica charantia* (Melão-de-são-caetano), *Mentha* sp. (Hortelã), *Carica papaya* (Mamão), *Jathropha curcas* (Pinhão-branco), *Scoparia dulces* (Vassourinha), *Spigelia anthelmia* (Erva lombrigueira), *Melia azedarach* (Lírio-do-Campo) e *Musa* spp. (Bananeira). Os resultados mostraram-se promissores com redução do OPG em 45 a 96%.

Em levantamento bibliográfico sobre plantas com atividade anti-helmíntica feito por FURTADO (2006) foram encontradas 106 espécies, englobadas em 83 gêneros e 40 famílias. Concluiu-se que as famílias com maior número de espécies citadas com atividade contra parasitas foram Asteraceae (17 spp), Fabaceae (15 spp), Lamiaceae (10 spp) e Meliaceae (5 spp). A maior parte das citações (23,6%) indicou exclusivamente folhas como parte utilizada no preparo da infusão ou outra forma de uso, seguida de frutos com 10,4% e sementes com 9,4%. Adicionalmente, outras partes vegetais figuraram menos freqüentes, tais como cascas, flores, seiva, raízes, brotos, bulbos e troncos.

Apesar de muitas plantas já terem sido descritas como possuidoras de atividade anti-helmíntica, poucas foram avaliadas cientificamente. Para todas essas iniciativas de controle de nematódeos, existe a necessidade de trabalhos de pesquisa dentro dos parâmetros científicos que possam validar e certificar seu uso na medicina etnoveterinária (LANS, et al. 2007). A etnoveterinária é uma ciência que envolve o conhecimento das práticas populares utilizadas no tratamento ou na prevenção das doenças que acometem os animais (GITHIORI et al. 2006). Segundo MCCORKLE & MATHIAS-MUNDY (1992), as plantas se enquadram na categoria de elementos facilmente aplicáveis na medicina etnoveterinária, para o desenvolvimento da pecuária.

2.4.1) *Artemisia annua* L

2.4.1.1) Caracterização geral

A. annua (Fig. 1) é uma espécie da família Asteraceae, aromática, perene, arbustiva, conhecida comumente na China como “sweet wormwood” ou “Qinghaosu” (KLAYMAN, 1985). O caule é ereto e ramificado, alcançando entre 0,5 a 2 m de altura, as folhas alternadas variam de 2,5 a 5 cm em comprimento, são pecioladas e ovóide-alargadas; as flores são amarelas e brilhantes (FERREIRA & JANICK, 1996).



Figura 1: Cultivo de *Artemisia annua*

Foto: Ana Carolina de Souza Chagas/USDA-ARS

A planta é originária da Ásia, cresce espontaneamente em vários tipos de solos da Europa, Ásia, América, norte da África e é atualmente produzida em muitos países, onde se desenvolvem projetos de adaptação da planta (BHAKUNI et al. 2001). Em Moçambique, por meio do projeto do World Agroforestry Centre (ICRAF), tem se realizado a propagação ampla de *Artemisia* a vários agricultores (RUMLEY, 2009).

A. annua tem sido utilizada por muitos séculos na medicina tradicional chinesa no tratamento da malária (KLAYMAN, 1985; HOSTETTMANN, et al. 2003).

2.4.1.2) Princípios ativos de *A. annua*

BHAKUNI et al. (2001) mostraram, após isolamento de diferentes partes da planta, que os compostos responsáveis pela atividade da *A. annua* são os sesquiterpenóides, flavonóides, cumarinas, triterpenóides, compostos esteróides, fenóis, purinas, lipídeos e alifáticos, o que confere a ela uma alta atividade antioxidante (FERREIRA & JANICK, 2009). Entre esses metabólitos, a artemisinina (qinghaosu) lactona sesquiterpena é considerada o principal componente ativo da planta (KLAYMAN, 1985), contendo o grupo peróxido essencial para a sua atividade. Esta lactona é facilmente metabolizada formando a dihidroartemisinina, seu principal derivado com maior atividade (VAN AGTMAEL et al. 1999). Outros derivados da artemisinina, embora com estrutura bastante semelhante, como a deoxiartemisinina são completamente inativos (KLAYMAN, 1985).(Anexo).

O nível de concentração da artemisinina na planta pode variar consideravelmente, dependendo do material, condições de cultivo, variação sazonal e geográfica. No geral, a artemisinina está presente entre 0,01 e 0,4% em folhas e flores da planta seca (VAN AGTMAEL et al. 1999).

A artemisinina é considerada uma potente droga antimalárica contra *Plasmodium falciparum* e outros parasitas causadores da malária resistentes à cloroquina e a quinina (HEPPNER & BALLOU, 1998; BILIA et al. 2006).

2.4.1.3) Histórico de atividade

Atualmente vários trabalhos tem sido desenvolvidos com a finalidade de se estudar o efeito de *A. annua* e do seu princípio ativo artemisinina na pecuária. Os resultados são promissores, com atividade antiprotozoária, antibacteriana e antioxidante (FERREIRA & JANICK, 2009), sobre coccídeos, trematódeos e nematódeos.

Investigando a atividade antiprotozoária da artemisinina sobre a multiplicação intracelular de taquizoítos de *Neospora caninum*, KIM et al. (2002) observaram eficácia de 98,9% na inibição da multiplicação nas concentrações de 20 e 10 µg/ml, 11

dias pós-tratamento, e na de 1 µg/ml no 14° dia. Em 2003, KUMAR et al. estudaram a eficácia terapêutica de derivados da artemisinina (Artesunate, Falcigo® e Arteether derivado sintético, E Mal®) e Buparvaquone (Butalex®), comparando com o dipropionato de imidocarb (Imizol®), no tratamento de *Babesia equi* em azeninos esplenectomizados. Foi observada uma redução de 7,1%, 6,8% e 8,9% da parasitemia nos primeiros dias de tratamento (4° a 19° dia) com Artesunate, Arteether e Buparvaquone, respectivamente. Quando utilizou-se a combinação de Arteether e Buparvaquone, a parasitemia reduziu em 12,5% durante todo o período de tratamento (69 dias) e no grupo tratado com imidocarb em 6,4%.

A atividade antimicrobiana e antifúngica foi analisada por JUTEAU et al. (2002) usando o óleo essencial de *A. annua*, extraído a partir das partes aéreas da planta. Verificou-se que o óleo essencial inibia consideravelmente o crescimento da bactéria gram-positiva *Enterococcus hirae* e dos fungos *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* testados. O óleo essencial demonstrou ter uma atividade antioxidante equivalente a 18% comparativamente ao seu composto de referência, o α -tocopherol.

O efeito contra coccídeos em aves foi avaliado por YOUN et al. (2002) administrando folhas secas de *A. Annua*, sendo que a artemisinina pura foi eficaz contra pelo menos duas espécies de protozoários, quando utilizada como um suplemento aditivo. Os extratos de folhas e talos melhoravam em 90% a taxa de sobrevivência dos frangos infectados com *Eimeria tenella* e o uso da planta inteira resultava em 80%.

Segundo SHALABY et al. (2009) qualquer droga que tem o potencial para atingir o tegumento de um parasita poderá apresentar eficácia devido à função do mesmo na imunoproteção, osmorregulação, absorção de nutrientes, percepção sensorial e secreção. Neste contexto, avaliaram *in vitro* o efeito da atividade de Artemether, um derivado semi-sintético da artemisinina, sobre adultos de *Fasciola gigantica* de búfalos, nas doses de 10 µg/ml, 20 µg/ml e 30 µg/ml. Observaram que em 24h pós-tratamento as lesões no parasita foram aparecendo e estas se tornaram mais graves à medida que se aumentava a dose, caracterizadas como inchaço até o

rompimento do tegumento do cone apical, desaparecimento das espinhas e bolhas em torno da ventosa ventral.

Avaliando a atividade anti-helmíntica, IQBAL et al. (2004) observaram em ovinos com infecção mista de nematódeos gastrintestinais uma redução de 67,2% do OPG no 14º dia pós tratamento com extrato aquoso de *Artemisia brevifolia* na dose de 3,0 g/kg pv (peso vivo). *In vitro* verificaram a paralisia completa e ou mortalidade 6 h após a exposição dos extratos aquoso e metanólico em adultos de *H. contortus*. Em 2009, TARIQ et al. avaliaram a eficácia anti-helmíntica do extrato bruto aquoso (EBA) e extrato bruto etanólico (EBE) das partes aéreas de *Artemisia absinthium*, contra nematódeos gastrintestinais de ovinos. No teste *in vitro* observaram 73,6% e 94,7% de inibição da motilidade de dultos de *H. contortus* para os EBA e EBE, respectivamente. Constataram que o EBE é tão eficaz quanto o albendazol, que demonstrou uma redução do OPG de 90,46% nos ovinos, na dose de 2,0 g/kg pv no 15º dia pós tratamento. Na dose de 1g/kg pv a redução foi de 82,85% com mesmo período pós tratamento. O EBA teve menor atividade comparativamente ao EBE, nas mesmas doses e dias pós tratamento, tendo eficácia máxima na redução do OPG de 80,49%.

RAHMANN & SEIP (2008) mencionaram diferentes espécies de *Artemisia* que são usadas como alternativas anti-helmínticas: *Artemisia herba-alba*, *Artemisia cina*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia vulgaris* e *Artemisia abrotanum*.

2.4.1.4) Farmacocinética da artemisinina

A farmacocinética é definida como o estudo quantitativo do desenvolvimento temporal dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos fármacos. Nestes estudos, os teores dos fármacos e seus metabólitos no organismo (produtos da biotransformação) são determinados, permitindo a obtenção de importantes dados sobre estas substâncias (BARCELLOS, 2009).

Segundo GOLENSER et al. (2006), os mecanismos de ação atribuídos à artemisinina incluem interferência nas proteínas de transporte na função mitocondrial do parasita, modulação da função imune do hospedeiro e inibição da angiogênese.

Em estudo farmacocinético da artemisinina em caprinos, a dihidroartemisinina, o principal metabólito da artemisinina, apareceu no plasma 4 h após a administração oral na dose de 23 mg de artemisinina/Kg pv e atingiu o seu pico 12 h depois. Nas fezes, a concentração não absorvida de artemisinina nas primeiras 24 h atingiu 2,41 µg/g e diminuiu rapidamente 30 h depois. Observou-se que a maior parte da artemisinina foi eliminada nas fezes, e este fato provavelmente impediu que a artemisinina administrada por via oral atingisse níveis terapêuticos sanguíneos desejados (FERREIRA & GONZALEZ, 2008b).

2.4.1.5) Toxicidade

É a capacidade de uma substância química produzir um efeito nocivo quando interage com um organismo vivo. A toxicidade de uma substância depende da dose e ou do sistema biológico do indivíduo (INFOPEDIA, 2010).

Os efeitos adversos em pacientes tratados com artemisinina e derivados de artemisinina são raros. Na Tailândia, em um estudo prospectivo com mais de 3.500 pacientes no tratamento da malária, não houve nenhuma evidência de efeitos graves adversos (MESHNICK, 2002). Na dose de 30 mg/kg de peso corporal em humanos, a artemisinina foi eficaz contra *Plasmodium* sem apresentar toxicidade, mas tem baixa biodisponibilidade e meia-vida curta, sendo rapidamente eliminada do organismo (FERREIRA & JANICK, 2009).

A administração da dihidroartemisinina via oral nas doses de 10, 20 e 30 mg/Kg pv em coelhos e de 20 mg/Kg pv em cães, não apresentou toxicidade em nenhum dos experimentos (ZHAO & SONG, 1990).

BOARETO et al. (2008) avaliaram o efeito da artemisinina em doses crescentes de 7,35 e 70 mg/kg pv/dia sobre diferentes períodos da gestação de ratas "Wistar" (7 a 13 e de 14 a 20 dias). Observou-se toxicidade para todos os períodos de tratamento, com menor sensibilidade em estágios mais avançados de gestação. As doses de 35 e 75 mg/kg causavam elevadas porcentagens de perdas pós-implantação. Concluiu-se que a administração oral da artemisinina pode afetar estes estágios e o próprio desenvolvimento gestacional em ratas. Assim, fica evidente que a

toxicidade e a eficácia da artemisinina e da dihidroartemisinina dependem do seu tempo de exposição e da sua concentração no sangue (LI et al. 2002).

2.4.2) *Melia azedarach* L.

2.4.2.1) Caracterização geral

M. azedarach (Fig. 3) é uma espécie da família Meliaceae, popularmente conhecida como cinamomo, santa-bárbara, lírio, lilás da Índia, amargoseira e tem sido cultivada há muitos anos como planta ornamental (BURKS, 1997).

Nativa da Ásia, hoje está amplamente distribuída em quase todos os países tropicais e subtropicais (BURKS, 1997). No continente Africano encontra-se distribuída por quase toda a África sub saariana, vinda da Índia como árvore ornamental. Na região austral, África do sul, Moçambique e Suazilândia é conhecida como “seringa”, “maksering”, “margosa” (AGROFORESTRYTREE 2009).



Figura 2: *M. azedarach*

Foto: Rodrigo Giglioti, 2009

M. azedarach é descrita como uma planta de 15 a 20m de altura, folhas caducas, ramos robustos, com casca arroxeadada pontilhada de amarelo. As folhas são duas a três vezes compostas e alternadas, as flores têm a cor lilás e o fruto é

pequeno, amarelo e arredondado. É descrita como possuidora de diversas propriedades terapêuticas (BURKS, 1997).

Na medicina popular, suas raízes, caule, folhas, frutos e flores têm sido amplamente empregados contra uma variedade de doenças na China, Índia e Austrália. As suas folhas e flores são usadas para aliviar dores de cabeça, dor estomacal, para tratar doenças uterinas, da pele, cistites e como anti-helmíntico (OELRICHS et al. 1983; HAMMOND et al. 1997; JOSHI & JOSHI, 2000; KHAN et al. 2001).

BURKS (1997) afirmou que os extratos aquosos de folhas e sementes são usados no controle de insetos, ácaros, nematódeos, como abortivo, anti-séptico, purgante e diurético. Na África do Sul, os extratos são usados para o tratamento de Hanseníase e na redução de ataques asmáticos (OELRICHS, 1983). Em Moçambique é usada para o tratamento de transtornos gastrintestinais (AAAS.ORG, 2010).

2.4.2.2) Princípios ativos de *M. Azedarach*

Extratos de folhas e sementes de *M. azedarach* (Fig. 4) contêm cerca de quatro compostos ativos, azadiractina, salanina, meliantriol e nimbina (YAMASAKI et al. 1988). Segundo TAKEYA et al. (1996) estes metabólitos são os que se apresentam biologicamente ativos contra parasitas. A análise fitoquímica dos extratos mais ativos contra nematódeos gastrintestinais de ovinos revelou a presença de taninos, triterpenos e alcalóides (MACIEL, 2006).

2.4.2.3) Histórico de atividade

A azadiractina provoca distorções na metamorfose, tem ação repelente, inibe o crescimento, induzindo malformação, redução da fertilidade e mortalidade do parasita, Neves (1996) citado por (CHAGAS, 2004).

Pesquisas realizadas com diferentes extratos obtidos de folhas e de frutos de *M. azedarach* mostraram efeito contra parasitas e outros agentes causadores de doenças em animais de interesse pecuário. CARPINELLA et al. (1999) detectaram

atividade antifúngica do extrato etanólico obtido a partir de frutos maduros contra os fungos *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporium canis* e *Fusarium moniliforme*. GAJMER et al. (2002) verificaram atividade inseticida do extrato metanólico das sementes sobre *Earias vitella*, com inibição de 59% da eclosão dos ovos.

Em 1985, AKHTAR & RIFFAT testaram o efeito do extrato aquoso, metanólico e etanólico de frutos de *M. azedarach* em galinhas infectadas com *Ascaridia galli*. Verificaram que 20 mg/kg de pv de frutos provocavam uma redução que variava de 15,7%, 18,5 e 67,8% nos extratos aquoso, metanólico e etanólico nos OPG realizados entre 10 e 15 dias após o tratamento. A eficácia do extrato hexânico dos frutos de *M. azedarach* foi testada por BORGES et al. (2005), em bezerros infestados artificialmente com o carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Foi aplicada uma solução a 0,25% do extrato em água e acetona e foi realizada contagem das fêmeas desprendidas durante 21 dias após exposição, observando uma redução de 24% da infestação por carrapato.

Em ovinos, em 1994, PERVEZ et al. testaram *in vivo* a eficácia anti-helmíntica das sementes de *M. azedarach* em ovinos nas doses de 10mg/Kg a 1g/Kg pv e não se observou nenhum efeito anti-helmíntico entre o 7º e o 15º dia pós-tratamento.

Testes *in vitro* foram realizados por MACIEL et al. (2006) onde se avaliou a atividade ovicida e larvicida de extratos etanólicos e hexânicos de sementes, além de extratos etanólicos e de clorofórmio de folhas de *Melia azedarach* sobre *H. contortus*. Observaram que o extrato etanólico das sementes foi mais ativo sobre ovos (CL₅₀ de 0,36 mg/mL) e o extrato etanólico das folhas apresentou os melhores índices de inibição do desenvolvimento larvar (CL₅₀ de 9,18 mg/mL). A análise fitoquímica dos extratos mais ativos revelou a presença de taninos, triterpenos e alcalóides.

FALBO et al. (2008) avaliaram *in vivo* a atividade anti-helmíntica dos frutos secos e moídos de *M. azedarach*, em cordeiros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais, comparado com o albendazol. Neste experimento, os animais foram tratados com dose única de 0,2 g/Kg pv de frutos de *M.azedarach* e 0,5 mg/Kg pv de albendazol via oral. Os resultados encontrados demonstraram que o albendazol apresentou eficácia de 51,96% e o cinamomo de 33,21%. Estes resultados

indicam que, apesar de reduzido efeito anti-helmíntico, os frutos de *M. azedarach* secos, moídos e administrados juntamente com a ração apresentam alguma atividade anti-helmíntica.

2.4.2.4) Toxicidade

Em coelhos não foi observada nenhuma alteração clínica (temperatura, frequência respiratória e cardíaca) após administração oral nas doses únicas de 20 25 e 30 g/Kg pv de frutos triturados e peletizados de *M. azedarach* (BEUTLER et al. 2008).

MÉNDEZ et al. (2002) induziram uma intoxicação experimental usando folhas verdes de *M. azedarach* na dose única de 5 a 30 g/Kg pv em 11 bovinos. Oito a 24 h após a ingestão das folhas os sinais clínicos foram caracterizados por depressão, atonia ruminal, fezes duras com sangue, incoordenação, tremores musculares, decúbito esternal, hipotermia e dores abdominais com permanência de 2 a 72 h. Três dos animais que receberam 30 g/kg pv pereceram. Já em 2006, MÉNDEZ et al. administraram frutos maduros e triturados de *M. azedarach* misturados com a ração de 8 suínos na dose única de 5 a 20 g/Kg pv, os animais que consumiram a dose de 5 g/Kg pv tiveram como único sintoma diarreia passageira. Nos que ingeriram doses únicas de 10, 15 e 20 g/kg pv os sinais clínicos observados caracterizaram-se por incoordenação, tremores musculares, dificuldade para manter-se de pé, relutância para levantar-se, decúbito esternal e hipotermia e os dois suínos que ingeriram 20 g/kg pv vieram a óbito.

OELRICHS et al. (1985) afirmam que a toxicidade das plantas pode variar de acordo com a área onde crescem e que algumas árvores podem não ser tóxicas. Isto se deve ao fato de os metabólitos secundários, onde se encontram concentrados os princípios ativos, sofreram alterações de acordo com as condições ambientais submetidas à planta durante o crescimento. GOBBO-NETO E LOPES (2007) observaram que sazonalidade, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e a indução por estímulos mecânicos ou o ataque de patógenos influenciam o conteúdo dos metabólitos

secundários. A época em que a planta é coletado, as condições de coleta, estabilização e estocagem são fatores de maior importância, visto que podem ter grande influência na qualidade e, conseqüentemente no valor terapêutico de preparados fitoterápicos.

2.4.3) *Trichilia clausenii* C

2.4.3.1) Caracterização geral

T. clausenii (Fig. 4) é uma espécie da família Meliaceae, que é conhecida popularmente no Brasil por catiguá, catiguá-vermelho, quebra machado. É uma árvore que atinge entre seis e 12 m de altura, folhas compostas e frutos de cápsula ovóide. No Brasil ocorre entre Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (LORENZI, 2000).

O gênero *Trichilia* possui cerca de 70 espécies distribuídas na sua maioria em terras baixas da América tropical, 14 espécies na África e duas na Região Indo-Malaio. Ocorre também nos estratos inferiores de florestas da Amazônia (REITZ, 1984). No continente Africano, ocorre a espécie *Trichilia emetica* desde a região Central até a África Austral, da qual Moçambique faz parte (AGROFORESTRYTREE, 2009).



Figura 3: *T. clausenii*

Foto: Juliano Pörsch, 2009,

<http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1026>

2.4.3.2) Princípios ativos de *T. clausenii*

PUPO et al. (1997) afirmam que as espécies da família Meliaceae são conhecidas por serem possuidoras de uma rica fonte de limonóides, com atividade biológica contra insetos, inibindo a alimentação e a ecdise. O estudo químico das folhas de *T. clausenii* resultou no isolamento de 24-metileno-26-hidroxicicloartan-3-ona e uma mistura de ácidos ω -fenil alcanóicos e alcenóicos, além dos aminoácidos *N*-metilprolina, 4-hidroxi-*N*-metilprolina e do sesquiterpeno epóxido de cariofileno (PUPO et al. 1996). Dos galhos foram isolados esteróides pregnanos (PUPO et al. 1997) e três novos sesquiterpenos 14 - hidroxielemol, germacra-10(14)-em-9,11,15-triol e germacra-3,10(14)-dien-9,11-diol-4-carbaldeído. Também foram isolados os sesquiterpenos β -eudesmol, criptomeridiol e o triterpeno 22,25-diidroxi-9 β ,19-ciclolanost-23-en-3-ona (PUPO et al. 2002). O estudo químico dos frutos levou ao isolamento de novas γ -lactonas (PUPO et al. 1998).

MATOS (2006) identificou várias substâncias da mesma espécie utilizadas no presente trabalho. No extrato hexânico das folhas de *T. clausenii* foram isolados também os esteróides β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, sitostenona e os triterpenóides α -amirina, β -amirina, lupeol, lupenona, além do triterpeno do tipo cicloartano 24-metileno-26-hidroxicicloartan-3-ona e do sesquiterpeno criptomeridiol.

2.4.3.3) Histórico de atividade

Várias espécies da família meliaceae tem sido pesquisadas: MATOS et al. (2006) relataram a atividade inseticida das espécies da *Trichilia*. Bray et al. (1990) e Champagne et al. (1992), citados por MATOS (2006), mencionam a sua atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral. TOGOLA et al. (2005) discutem a atividade antiparasitária no controle da malária e também como antiinflamatória.

Programas de “screening” da família Meliaceae têm identificado o gênero *Trichilia* como fonte para desenvolvimento de inseticidas. Entretanto, apesar do isolamento de limonóides com diversas atividades biológicas, poucos trabalhos foram

desenvolvidos com o objetivo de se aplicar esses compostos sobre parasitas na agropecuária.

MATOS (2006) testou os extratos hexânico e metanólico das folhas, hexânico de ramos e metanólico de frutos de *T. clausenii* sobre a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, uma das principais pragas da cultura do milho. Observou-se uma taxa geral de mortalidade acima de 60%. Constatou-se também que o extrato metanólico dos frutos foi o que apresentou maior atividade inseticida, inibindo ou retardando o desenvolvimento larvar em 1 a 3 dias.

No continente Africano, *T. emetica* tem sido alvo de várias pesquisas em diferentes áreas. Contra a esquistossomose, o efeito letal foi observado por SPARG et al. (2000), como anti-plasmódico por BAH et al. (2007), antifúngico e antibacteriano por SHAI et al. (2008), anti-tripanosossômica e antileishmania por HOET et al. (2004). As observações mostraram evidências de que os extratos do gênero *Trichilia* apresentam atividade contra vários agentes etiológicos de doenças.

3) OBJETIVOS

Com base na avaliação da atividade anti-helmíntica de gêneros vegetais comuns ao Brasil e a Moçambique, teve-se por objetivos:

- Obtenção de extrato ativo de *A. annua*, usando como solvente o bicarbonato de sódio a 0,1%;
- Avaliar a atividade anti-helmíntica *in vitro* de extratos das espécies *Artemisia annua* L., *Melia azedarach* L e *Trichilia clausenii* C em testes de eclodibilidade e desenvolvimento larvar de nematódeos gastrintestinais de ovinos;
- Avaliar a atividade anti-helmíntica *in vivo* da espécie mais ativa nos testes *in vitro*, bem como do seu bioativo purificado, sobre ovinos Santa Inês, naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais;
- Investigar alternativas fitoterápicas de baixo custo para uso no controle de nematódeos gastrintestinais de pequenos ruminantes para a agricultura familiar, por meio de validação científica.

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Local de execução

O experimento foi desenvolvido na Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa), unidade Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste (CPPSE), no Setor de Ovinocultura e no Laboratório de Sanidade Animal, entre junho e dezembro de 2009. A unidade se localiza na cidade de São Carlos, São Paulo, latitude de 21°57'42"(S), longitude de 47°50'28"(O) e altitude de 860 m.

Durante o período do experimento, os dados climáticos foram coletados na Estação Meteorológica do CPPSE e a temperatura média foi de 20,7°C, a umidade relativa média de 75% e a precipitação pluvial de 718,5mm.

4.2) Obtenção dos extratos ativos

4.2.1) *Artemisia annua*

4.2.1.a) Extratos fornecidos pelo Centro Pluridisciplinar de pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)

A espécie é cultivada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). A matéria seca foi coletada em março de 2008, a secagem inicial foi a campo e a final em secador a gás até a obtenção de teor de umidade final de 12%. O CPQBA produziu quatro extratos conforme SIMÕES et al. (2004), utilizando diferentes solventes para a extração não seqüencial:

- 1) Extrato aquoso: o solvente foi água, seguida de liofilização;
- 2) Extrato de bicarbonato de sódio: água basificada com bicarbonato de sódio a 0,1%;
- 3) Extrato de diclorometano: diclorometano, seguida de concentração em rota-evaporador;

4) Extrato etanólico: produzido seguindo-se a metodologia descrita por RODRIGUES et al. (2006), usando o processo clássico de extração, onde se colocou 1 kg de planta seca e moída ao etanol 96° GL como líquido extrator, com auxílio de agitação mecânica durante 4 ½ h (3 x de 1 ½ h), à temperatura ambiente. Os extratos obtidos foram filtrados, reunidos e concentrados até 1/3 do volume total, fornecendo um extrato denominado extrato etanólico concentrado. Ele foi submetido à evaporação até a secura do solvente.

4.2.1.b) Extrato de bicarbonato de sódio produzido na Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE)

A extração foi feita nos meses de agosto a novembro de 2009 no CPPSE. Foi adaptada a metodologia descrita por TARIQ et al. (2009), onde 300g de material vegetal foi pesado e imerso em 5 litros de solução de bicarbonato de sódio a 0,1% aquecida até 70°C. Agitou-se por 10 min, deixou-se em temperatura ambiente por 24 h protegido da luz e em seguida filtrou-se a solução sob quatro pedaços de gaze sobrepostos. A solução filtrada foi liofilizada e o produto da liofilização foi homogeneizado e armazenado a uma temperatura de 4°C, protegido da luz até o uso. Amostras homogêneas foram coletadas e enviadas para análise química no United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service/Appalachian Farming Systems Research Center (USDA-ARS/AFSRC).

4.2.1.c) Quantificação da artemisinina e deoxiartemisinina (Extratos CPQBA)

A quantificação do teor de artemisinina e de deoxiartemisinina dos extratos foi realizada pela equipe de fitoquímica do CPQBA utilizando-se a metodologia desenvolvida e validada por CELEGHINI et al. (2009) onde os extratos foram suspensos em balão volumétrico de 5,0 mL com metanol grau cromatográfico, filtrados sob membrana Millex 0,45 µm Millipore JBR6. 10222 e analisados por

cromatografia líquida de alta eficiência com índice de refração (CLAE-IR). As amostras para cada fase foram preparadas da seguinte forma: a fase móvel foi feita misturando os solventes (H₂O: MeOH) na proporção de 60:40, filtrado em filtro Millipore de 0,45 µm e sonificada sob vácuo, para obtenção da curva analítica. Pesou-se 65 mg dos extratos para diluição em 25 mL de metanol grau CLAE. Desta forma, obteve-se uma concentração mãe de 2,444 µg/mL padrão analítico com 94% de pureza. Os pontos da curva analítica foram injetados em triplicata, com concentrações de 50 a 1250 µg/mL obtendo-se a curva através do software Empower.

4.2.1.d) Quantificação da artemisinina, ácido dihidroartemisínico e do ácido artemisínico por CLAE- UV e determinação da capacidade antioxidante pelo método ORAC (extrato de bicarbonato de sódio da Embrapa)

O extrato de bicarbonato de sódio foi analisado em CLAE-UV segundo a metodologia descrita por FERREIRA & GONZALEZ (2008a), com o solvente de extração modificado, onde 100 mg de extrato liofilizado foi adicionado em 10 mL de uma solução de 60% acetonitrila para 40% de 0,1% ácido acético (pH=3,25), e sonicados por 30 min a 38 °C. Após extração, a solução foi filtrada em filtro de nylon Millex de 0,2 µm e injetada no CLAE para a quantificação da artemisinina, do ácido dihidroartemisínico e do ácido artemisínico.

Para a determinação da capacidade antioxidante atribuída pelos flavonóides e ácidos fenólicos, os extratos foram analisados pela capacidade de absorção de radical oxigênio (ORAC), em que 100 mg do extrato liofilizado foi adicionado em 10 mL de acetona:água:ácido acético (70:29,5:0,5), agitados em vórtex por 30 seg e sonicados por 10 min a 37°C. Após este período foram agitados em vórtex por 15 seg e depois centrifugados a 3.000 rpm por 7 min, o sobrenadante foi transferido para um balão de 25 ml e as etapas anteriores foram repetidas. Os sobrenadantes foram combinados em um balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com acetona:água:ácido acético. As amostras foram diluídas 200 vezes em solução tampão de fosfato. Foram distribuídos 40 µL em uma placa de 48 poços e em cada

poço foi adicionado 400 μL de fluoresceína. A leitura foi feita em um leitor de placas de fluorescência fixada nos comprimento de onda de 485 nm para excitação 520 nm para emissão. As amostras reagiram com o oxidante APPH (2,2'-azobis-(2-aminopropano) dihidroclorato) e a fluoresceína aquecida a 37°C. Esta reação foi monitorada em 45 ciclos. A capacidade antioxidante foi calculada pela diferença entre a área sob a curva (AUC) das amostras e os padrões (usando Trolox como antioxidante padrão, um composto análogo a Vitamina E, mas solúvel em água) e expressa em micromoles equivalentes de Trolox por grama de peso seco ($\mu\text{moles TE/gr ps}$), de acordo com método pré-estabelecido (PRIOR et al. 2003).

4.2.1.e) Quantificação da artemisinina nas cápsulas (Nutricology, Alergy Research Group)

O conteúdo de três cápsulas de 100 mg foi colocado num frasco volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com acetonitrila. Após agitação dos frascos, uma alíquota de 1,0 ml foi retirada e filtrada (0,2 μm filtro de nylon Millex) e 10 μL foram injetados no CLAE para análise. Esta quantificação foi feita para se determinar se artemisinina das cápsulas era a mesma referida na bula, depois de um período de estocagem.

4.2.2) *Melia azederach*

Os frutos verdes foram colhidos em fevereiro de 2009, na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiânia. Após serem secos durante sete dias a 40°C, com circulação e renovação de ar, os frutos foram triturados em moinho de facas rotativas.

4.2.2.a) Extrato Hexânico

A matéria seca triturada foi submetida à extração por percolação a frio em Soxhlet, utilizando-se como solvente o hexano. Em seguida, o solvente foi evaporado em um rotaevaporador até a eliminação total do mesmo. Posteriormente, sob pressão

reduzida, e para maior eficiência do processo, o extrato passou por uma bomba de vácuo para retirar o máximo de resíduo de solvente. O extrato foi armazenado em geladeira (4°C) até o uso.

4.2.2.b) Princípios ativos

Em função da impossibilidade de realização da análise fitoquímica deste extrato, a discussão baseou-se em levantamentos da literatura.

4.2.3) *Trichilia clausenii*

As folhas de *T. clausenii* foram coletadas em Piracicaba/SP na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ).

4.2.3.a) Extrato metanólico

O extrato metanólico foi fornecido pela equipe de fitoquímica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em maio de 2009 e sua preparação ocorreu da seguinte forma: as folhas foram submetidas à extração à temperatura ambiente e em repouso, com solventes em ordem crescente de polaridade (Hexano, MeOH e MeOH/H₂O 1:1) durante 7 dias. Após a evaporação dos solventes foi obtido o extrato metanólico.

4.2.3.b) Princípios ativos

Este foi feito através de cromatografia líquido-líquido, em que o extrato foi fracionado por meio de solventes na ordem crescente de polaridade (hexano, CH₂Cl₂, AcOET, *n*-BuOH). As frações obtidas foram submetidas à coluna em sephadex LH-20, φ = 14,0 cm e h = 119,0 cm. Utilizou-se como eluente o CH₂Cl₂/MeOH. As frações obtidas da coluna foram identificadas conforme MATOS (2006).

4.3) Teste *in vitro*

4.3.1) Determinação das concentrações dos extratos

As concentrações foram determinadas seguindo a razão de 2 de 0,58 µg/mL a 160 µg/mL, para o teste de eclodibilidade e 0,58 µg/mL a 18,7 µg/mL para o de desenvolvimento em seis repetições para cada concentração. A menor concentração foi determinada com base na eclodibilidade e ou desenvolvimento larvar semelhante ao controle e a maior concentração foi com base na turvação da concentração, pois quanto mais turvo, mais difícil a leitura.

4.3.2) Recuperação de ovos de nematódeos gastrintestinais

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal em animais previamente selecionados, infectados naturalmente por nematódeos gastrintestinais (95% de *H. contortus*) e OPG superior a 2000. Entre 10 e 20 g de fezes foram processadas segundo a técnica de COLES et al. (1992), modificada por BIZIMENYERA et al. (2006). As fezes foram maceradas e homogeneizadas em água aquecida a 40°C e filtradas em uma seqüência de peneiras com malhas contendo poros de 1 mm, 105 µm, 55 µm e 25 µm. Após esta seqüência de lavagem com água destilada, os ovos coletados da última peneira, foram distribuídos em tubos falcon de 50 mL e centrifugados da seguinte forma: após a primeira centrifugação a 1.100 x g/5 min, descartou-se o sobrenadante e completou-se com solução salina saturada para a ressuspensão do sedimento; centrifugou-se novamente nas mesmas condições que a anterior e o sobrenadante foi lavado na peneira de 25 µm com água destilada sucessivas vezes, até a retirada total da solução salina. O conteúdo da peneira foi despejado em um cálice de sedimentação por 1h à temperatura ambiente e os ovos recuperados foram transferidos para um Becker, e quantificados em alíquotas de 25 µL com aproximadamente 100 ovos, para uso imediato.

4.3.3) Teste de Eclodibilidade Larvar (TEL)

Após a recuperação dos ovos, foi seguido o procedimento descrito por COLES et al. (1992), modificada por BIZIMENYERA et al. (2006). Em placas de 24 poços, 25 µL da suspensão de ovos com aproximadamente 100 ovos foram pipetados e colocados nos poços. Calculado o volume final de 1 mL para cada poço em 6 repetições por concentração, os tratamentos fitoterápicos foram preparados nas diferentes concentrações e adicionados. Para completar o volume final usou-se água destilada. Para uma melhor diluição do extrato, foi adicionado Tween 80 a 3%.

Os controles foram feitos com água destilada (controle negativo) e o controle positivo com o emulsificante Tween 80 a 3%. As placas foram identificadas e acondicionadas por 24 h em B.O.D. a 27°C, umidade relativa (UR) >80%. Após este período, foi adicionada uma gota de lugol, para inibir possíveis eclosões, fez-se a contagem dos ovos e das larvas que eclodiram (L₁) em microscópio invertido. Para o cálculo do *Probit* estimando-se a CL₅₀ e a CL₉₉ foi calculada a porcentagem de eficácia (E) por poço conforme fórmula abaixo:

$$E = \frac{(\text{ovo} + L_1) - L_1}{\text{ovo} + L_1} \times 100$$

4.3.4) Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL)

Seguindo-se a metodologia descrita por Hubert & Kerbouef (1992), modificada por BIZIMENYERA et al. (2006), 25 µL de suspensão com aproximadamente 100 ovos foram pipetados em cada poço de placas de 24 poços. Em cada poço adicionou-se 80 µL de meio nutritivo (*E. Coli*), completou-se com água destilada até perfazer um volume de 200 µL. As placas foram identificadas, envolvidas com plástico PVC e acondicionadas por 24 h em B.O.D. a 27°C, UR >80%. Após este período, observou-se em microscópio invertido se as larvas eclodiram e prepararam-se as soluções fitoterápicas para um volume final em cada poço de 500 µL. Usou-se o emulsificante

dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% para diluir os extratos. Adicionou-se aos poços o fitoterápico, embalou-se com plástico PVC e acondicionou-se em B.O.D. nas mesmas condições por mais quatro dias. Após este período, procedeu-se à contagem em microscópio invertido das L_1 e L_3 em cada poço, calculou-se a porcentagem de eficácia (E) conforme fórmula abaixo:

$$E = \frac{(L_1 + L_3) - L_3}{L_1 + L_3} \times 100$$

4.4) Teste *in vivo*

Após a realização dos testes *in vitro* e seleção da espécie vegetal e seu extrato mais ativo (*A. annua*, extrato aquoso com bicarbonato a 0,1%), procedeu-se à realização do teste *in vivo* com o extrato e seu ativo sintético (artemisinina). Foram utilizados um total de 24 ovinos de raça Santa Inês, divididos em 4 grupos de 6 animais cada de ambos os sexos, com média de sete meses de idade e com pesos que variavam de 18 a 24 Kg pv. Os animais estavam naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais confirmado pelo exame qualitativo e quantitativo de fezes segundo UENO & GONÇALVES (1998). Os animais selecionados, a sua distribuição para os grupos 1, 2 e 4 foi feita alternadamente, seguindo-se a ordem decrescente do OPG, o grupo 3 foi feito com base na quantidade de extrato existente para a realização do experimento. Os grupos ficaram com o OPG médio de: Grupo 1 com 5.600, grupo 2 com 9.900, grupo 3 com 20.000 e o grupo 4 com 5.8000. A diferença do OPG médio dos grupos ocorreu em função da seleção de animais de menor peso para receber o extrato, já que a dose foi por kg de pv. Os animais menores estavam com o OPG mais elevado. Eles foram mantidos em baias separadas e tratados via oral por meio de seringa descartável da seguinte forma:

G1- controle negativo: recebeu 20 mL de óleo de soja comercial;

G2- controle positivo, tratado com Cloridrato de Levamisole (Ripercol L 7,5% Fort Dodge) dose 1 mL/10 kg pv

G3- tratados com dose única de 2 g/Kg pv de extrato aquoso com bicarbonato a 1% misturado em 20 mL de óleo de soja;

G4- tratados com dose única de 100 mg/kg pv de artemisinina (Allergy Research Group®), misturada em 20 mL de óleo de soja.

Doze horas antes do tratamento os animais foram mantidos em jejum. Amostras de fezes de cada animal foram coletadas diariamente do dia zero ao 15º dia pós-tratamento. A presença de ovos de nematódeos foi avaliada e o OPG foi determinado usando-se o método descrito por UENO & GONÇALVES, (1998).

A porcentagem de redução do OPG foi feita usando-se a fórmula:

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{média OPG pré tratamento} - \text{média OPG pós tratamento}}{\text{média OPG pré tratamento}} \times 100$$

Em dias alternados foi feita a coprocultura por grupo de tratamento conforme a técnica descrita em UENO & GONÇALVES (1998).

Nos dias 0, 7 e 14 pós tratamento foram coletadas amostras de sangue dos ovinos para a determinação do hematócrito.

Nas horas 0, 12, 24, e 36 pós tratamento, amostras de fezes de cada animal foram coletadas, secas em estufa a 60°C e enviadas para análise em CLAE-UV no USDA-ARS para detecção da presença de artemisinina conforme metodologia descrita por FERREIRA & GONZALEZ (2008b): Extração de cerca de 500 mg da amostra seca de fezes por refluxo em 50 mL de éter de petróleo durante uma hora, por duas vezes. O sobrenadante foi separado a cada extração e transferido para um exaustor para secagem completa. Após 24 h o resíduo seco de éter de petróleo foi reconstituído em 10 mL de acetonitrila (duas lavagens de 5.0 mL cada), filtrado por um filtro de nylon Millex de 0,2 µm e uma alíquota foi analisada por CLAE-UV.

4.5) Análise estatística

O cálculo das concentrações letais dos extratos nos testes *in vitro* foi realizado por meio do ajuste de regressão utilizando-se distribuição normal e logística, com as estimativas dos parâmetros dessas equações obtidas por máxima verossimilhança. O procedimento utilizado foi *probit* do SAS com as variáveis independentes (dose) transformadas por logaritmo natural (log da dose). A qualidade de ajuste dos modelos (*goodness-of-fit*) foi avaliada por meio do teste de *Qui-quadrado de Pearson* e teste de razão de máxima verossimilhança. Os resultados do testes *in vivo* foram analisados usando-se o teste de Tukey, para comparação das médias.

5) RESULTADOS

5.1) Estudo químico dos extratos

5.1.1) *Artemisia annua*

A análise dos quatro extratos vegetais permitiu a quantificação de artemisinina e da deoxiartemisinina (Tabela 1).

Tabela 1- Quantificação da artemisinina e da deoxiartemisinina nos quatro extratos vegetais de *A. annua* genótipo CPQBA – Unicamp

Extrato	Artemisinina (g/100g)	Deoxiartemisinina (g/100g)
<i>A. annua</i> - Extrato aquoso	0,28	0,099
<i>A. annua</i> - Extrato bicarbonato de sódio	0,36	0,144
<i>A. annua</i> - Extrato etanólico	4,43	1,292
<i>A. annua</i> - Extrato diclorometano	9,79	2,30

Avaliando os valores encontrados foi possível observar que o extrato diclorometano apresentou maior quantidade de artemisinina e de deoxiartemisinina, seguido pelo extrato bicarbonato de sódio. Esses resultados também demonstram a maior afinidade dessas substâncias pelo solvente diclorometano.

Podem-se observar na tabela 2, os constituintes de maior interesse no extrato bicarbonato de sódio de *A. annua* produzido na Embrapa. A média da capacidade antioxidante (ORAC) desse extrato em $\mu\text{moles TE/g}$ foi de 2295,02, com o desvio padrão de 26%, e o desvio padrão relativo ao número de repetições ($n=8$) de 9.2%. Este valor mostra que o extrato de *A. annua* teve alto teor de flavonóides e de ácidos fenólicos.

Tabela 2- Quantificação da artemisinina, ácido dihidroartemisínico e do ácido artemisínico no extrato vegetal de *A. annua* genótipo CPQBA- Extração Embrapa

<i>A. annua</i> - Extrato bicarbonato de sódio	Artemisinina*	Ácido dihidroartemisínico*	Ácido artemisínico*
Extraídos na fase móvel CLAE	0,91	0,11	0,014
Extraídos em 90% MeOH	0,91	0,10	0,020

* em g/100g de extrato

A análise cromatográfica do conteúdo das cápsulas (Nutricology, Alergy Research Group) contendo a artemisinina fornecida aos animais demonstrou que a quantidade de artemisinina foi estável, 1,004 mg/mL, ou seja, muito próximo do que se esperava que fosse de 1 mg/mL conforme a bula, o que indica que a artemisinina após o encapsulamento e estocagem manteve-se estável.

5.1.2) *Trichilia clausenii*

Do extrato metanólico das folhas de *T. clausenii* foram isolados os esteróides 24-metileno-3 β ,4 β ,22 α -triidroxi-colesterol e - β -O- β -Dglucopiranosil sitosterol.

5.2) Testes *in vitro*

O percentual de inibição da eclodibilidade e do desenvolvimento aumentou significativamente com o aumento das concentrações dos extratos, exceto no extrato aquoso de *A. annua*, no qual o aumento da dose diminuiu o percentual de inibição da eclodibilidade. As concentrações letais para cada extrato estão apresentadas nas Tabela 3 e Tabela 4, onde se pode ver que o extrato de bicarbonato de sódio apresentou a menor CL₅₀ e CL₉₉.

Tabela 3- Inibição da eclodibilidade ($\mu\text{g/mL}$) das larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos submetidas aos tratamentos com extratos vegetais e controle

Extrato	CL₅₀	CL₉₉	P
<i>A. annua</i> - Extrato aquoso	66,49	21,74	0,0001
<i>A. annua</i> – Extrato* bicarbonato de sódio	0,0002	1,50	0,0001
<i>A. annua</i> - Extrato etanólico	***	***	***
<i>A.annua</i> - Extrato diclorometano	***	***	***
<i>A. annua</i> – Extrato** bicarbonato de sódio	0,0677	1,27	0,0001
<i>M. azedarach</i>	572,2	1137,8	0,0033
<i>T. clausseii</i>	263,8	522,5	0,0001

*Extrato CPQBA, ** Extrato Embrapa, *** Não foi possível calcular porque todas as concentrações testadas causaram 100% de inibição.

Tabela 4- Inibição do desenvolvimento ($\mu\text{g/mL}$) das larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos submetidas aos tratamentos com extratos vegetais e controle

Extrato	CL₅₀	CL₉₉	P
<i>A. annua</i> – Extrato* bicarbonato de sódio	1,67	23,80	0,0001
<i>M. azedarach</i>	0,675	60,85	0,0001
<i>T. clausseii</i>	1,075	26,38	0,0001

* Extrato Embrapa

Os resultados demonstraram que os extratos têm atividade ovicida e larvicida, contudo, os extratos hexânico de *M. azedarach* e metanólico de *T. clausseii* precisaram de doses elevadas para inibir a eclodibilidade larvar comparativamente ao extrato de bicarbonato de sódio de *A. annua*.

5.3) Testes *in vivo*

5.3.1) Efeito do tratamento no hematócrito

No D0 a comparação das médias do hematócrito entre os grupos controle, levamisole e artemisinina não apresentou diferença, ocorrendo o oposto para o grupo

tratado com extrato de *A. annua*, que eram animais menores e que iniciaram o experimento com o OPG mais elevado, esta observação manteve-se até ao 7º dia.

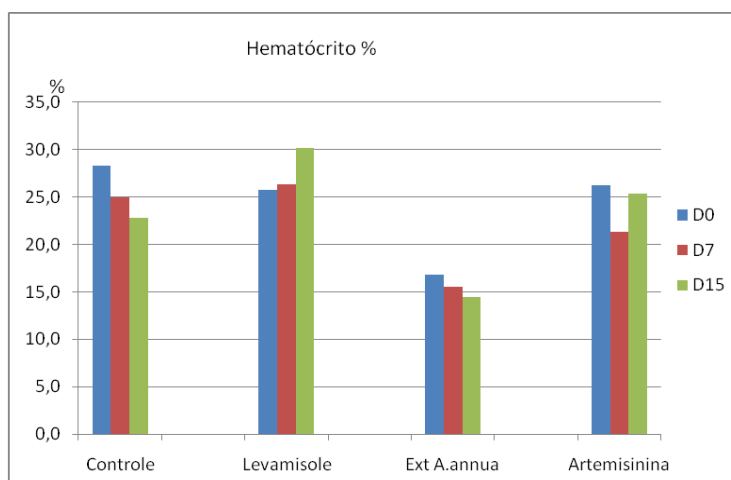
Quinze dias pós o tratamento, entre o grupo artemisinina e levamisole não houve diferença significativa. (Tabela 5 e Gráfico 1).

Tabela 5 - Resultados das comparações múltiplas do hematócrito dos ovinos dos grupos controle e tratados no dia do tratamento (D0), no 7º (D7) e 15º dia (D15) pós tratamento.

Tratamentos / Médias ¹				
Dia	Controle	Levamisole	<i>A.annua</i>	Artemisinina
D0	28,3 ± 4,6 ^{Aa}	25,8 ± 3,4 ^{Ab}	16,8 ± 3,3 ^{Ba}	26,1 ± 4,9 ^{Aa}
D7	25,0 ± 3,7 ^{Aab}	26,3 ± 2,8 ^{Aab}	15,5 ± 3,1 ^{Ba}	21,3 ± 7,0 ^{Ab}
D15	22,8 ± 3,2 ^{Bb}	30,1 ± 2,7 ^{Aa}	14,5 ± 3,5 ^{Ca}	25,4 ± 3,3 ^{Aab}

1: Médias da somatória das seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \geq 0,05$)

Gráfico 1- Médias aritméticas do hematócrito (%) dos grupos controle e tratados no dia do tratamento (D0), no 7º (D7) e 15º dia (D15) pós tratamento.



5.3.2) Médias do OPG e Redução

A atividade anti-helmíntica do extrato de *A. annua* demonstrou uma redução significativa na média aritmética do OPG. O Gráfico 2, mostra uma diminuição na média do OPG do 4º ao 15º dia pós tratamento para artemisinina e do 11º ao 15º dia para o extrato de *A. annua*. A redução máxima foi verificada no 14º para o extrato de *A. annua* (31,97%) e no 15º para a artemisinina (41,37%) (Tabela 6).

Gráfico: 2 – Médias aritméticas do OPG do D0 ao 15º dia após tratamento dos grupos controle e tratado

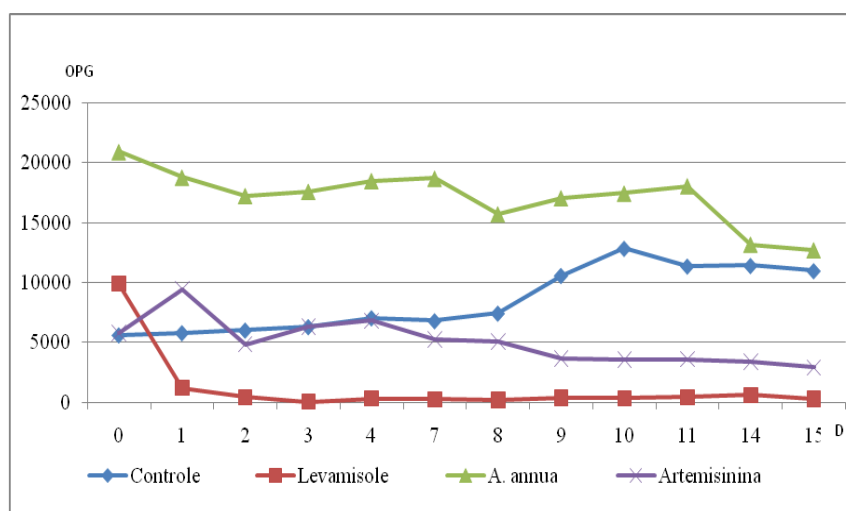


Tabela 6- Resultados das comparações múltiplas da redução do OPG (%) do D1 ao D15 em relação ao D0 dos grupos controle e tratados.

OPG	Tratamentos / Médias ¹			
	Controle	Levamisole	<i>A. annua</i>	Artemisinina
1	13,31±16,39 ^{Aa}	87,16±7,19 ^{Ba}	12,35±19,32 ^{Aa}	4,24±10,39 ^{Aa}
2	10,84±23,36 ^{Aa}	97,11±4,40 ^{Ba}	15,48±26,64 ^{Aa}	13,83±15,26 ^{Aa}
3	14,33±18,99 ^{Aa}	99,64±0,57 ^{Ba}	6,25±15,31 ^{Aa}	14,17±20,68 ^{Aa}
4	5,48±6,70 ^{Aa}	95,88±4,98 ^{Ba}	9,26±6,61 ^{Aa}	6,52±11,21 ^{Aa}
5	2,72±5,41 ^{Aa}	98,14±2,60 ^{Ba}	6,82±15,55 ^{Aa}	18,63±20,93 ^{Aa}
7	8,80±21,55 ^{Aa}	95,89±6,69 ^{Ba}	22,75±22,94 ^{Aa}	17,35±20,67 ^{Aa}
8	8,80±21,55 ^{Aa}	95,89±6,69 ^{Ba}	22,75±22,94 ^{Aa}	17,35±20,67 ^{Aa}
9	0,00±0,00 ^{Aa}	95,17±5,40 ^{Ba}	19,41±21,75 ^{Aa}	21,65±25,42 ^{Aa}
10	0,00±0,00 ^{Aa}	96,61±2,80 ^{Ca}	15,26±17,39 ^{ABa}	23,82±19,87 ^{Ba}
11	0,00±0,00 ^{Aa}	91,99±10,75 ^{Ba}	11,47±17,32 ^{Aa}	22,21±26,45 ^{Aa}
14	0,00±0,00 ^{Aa}	88,66±17,80 ^{Ba}	31,97±34,15 ^{Aa}	26,36±23,85 ^{Aa}
15	0,00±0,00 ^{Aa}	93,60±11,39 ^{Ca}	26,33±23,92 ^{ABa}	41,37±34,57 ^{Ba}

1: Médias da somatória de $\log(x+1)$ seguidas pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \geq 0,05$)

5.2.4) Resultados da coprocultura

A tabela 7 indica que os gêneros de parasitas presentes nos animais não diferem entre os grupos de tratamento ($P \geq 0,05$). A espécie *H. contortus* é a que ocorre em maior porcentagem em todos os grupos.

Tabela 7- Resultados das comparações múltiplas das coproculturas (%), realizadas em dias alternados do D0 ao D15 nos grupos controle e tratados.

Larvas	Grupos Experimentais/ Média ¹			
	Controle	Levamisole	<i>A. annua</i>	Artemisinina
<i>Haemonchus</i>	91,29 ± 5,41 ^A	84,29 ± 9,83 ^A	89,86 ± 5,58 ^A	89,40 ± 8,11 ^A
<i>Trichostrongylus</i>	8,43 ± 5,19 ^A	15,57 ± 9,71 ^A	9,43 ± 5,71 ^A	10,16 ± 8,06 ^A
<i>Oesophagostomum</i>	0,29 ± 0,49 ^A	0,14 ± 0,38 ^A	0,71 ± 0,76 ^A	0,44 ± 0,55 ^A

1: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \geq 0,05$)

5.2.5) Quantidade de artemisinina e deoxiartemisinina recuperada nas fezes

As tabelas 8 e 9 indicam a quantidade de princípio ativo que é eliminado nas fezes dos ovinos nas primeiras 36 horas após o tratamento. Pode-se observar uma elevada variação dos resultados entre os animais dentro do mesmo grupo de tratamento.

Tabela 8 - Quantidade, média e desvio padrão da artemisinina e da deoxiartemisinina recuperada nas fezes nas horas 0, 12, 24 e 36 nos ovinos que receberam o extrato de *A. annua*

Animal	Artemisinina ($\mu\text{g/g}$)				Deoxiartemisinina ($\mu\text{g/g}$)			
	0 h	12 h	24 h	36 h	0 h	12 h	24 h	36 h
817	0	0,36	0,02	0,02	0	0,04	0,02	0,02
823	0	0,00	0,04	0,02	0	0,00	0,04	0,02
825	0	2,71	0,05	0,04	0	1,60	0,04	0,03
834	0	0,21	0,04	0,02	0	0,02	0,04	0,02
836	0	0,23	0,03	0,02	0	0,01	0,02	0,01
848	0	0,88	0,04	0,03	0	0,58	0,03	0,03
Média	0	0,73	0,04	0,02	0	0,37	0,03	0,02
DP	0	1,01	0,01	0,01	0	0,64	0,01	0,01

Tabela 9 - Quantidade, média e desvio padrão da artemisinina e da deoxiartemisinina recuperada nas fezes nas horas 0, 12, 24 e 36 nos ovinos que receberam artemisinina

Animal	Artemisinina ($\mu\text{g/g}$)				Deoxiartemisinina ($\mu\text{g/g}$)			
	0h	12h	24h	36h	0h	12h	24h	36h
710	0	344,63	190,60	55,81	0	6,24	3,64	1,36
732	0	25,18	125,92	75,61	0	3,09	3,35	2,36
770	0	1,58	179,04	-	0	2,04	8,87	-
802	0	6,42	152,28	63,28	0	0,26	3,86	2,17
807	0	0,23	7,06	16,30	0	0,20	0,90	0,69
816	0	102,75	104,23	33,81	0	3,43	3,63	0,86
Média	0	80,13	126,52	48,96	0	2,54	4,04	1,49
DP	0	135,26	66,78	23,76	0	2,27	2,61	0,76

6) DISCUSSÃO

As plantas são uma rica fonte botânica de substâncias anti-helmínticas, antibacterianas e inseticidas. Um grande número de plantas medicinais tem sido usado para o tratamento de infecções parasitárias em homens e animais (AKHTAR et al., 2000). A utilização de plantas com propriedades anti-helmínticas parece ser uma alternativa eficaz, tanto do ponto de vista do controle parasitário quanto pelo seu baixo impacto ambiental em relação aos resíduos. Pesquisas envolvendo plantas geram informações sobre os melhores métodos de elaboração dos extratos, do isolamento de compostos químicos e testes *in vivo* e *in vitro* para avaliar os seus efeitos.

A atividade anti-helmíntica significativa *in vitro* foi observada em todos os extratos em termos de inibição de eclodibilidade e de desenvolvimento.

Plantas da família Meliaceae são conhecidas por possuírem uma rica fonte de limonóides, com atividade biológica contra insetos (PUPO et al. 1997). Trabalhos têm sido feitos com o objetivo de se detectar a atividade anti-helmíntica das plantas desta família. No presente trabalho, a avaliação dos extratos de *M. azedarach* e de *T. clausenii* demonstrou atividade anti-helmíntica.

O extrato hexânico de frutos de *M. azedarach* foi efetivo com a CL₅₀ de 572,2 µg/mL para o TEL e 0,675 µg/mL para o TDL. Comparando com os resultados obtidos por MACIEL et al. (2006) usando diferentes extratos de *M. azedarach*, observa-se que o extrato etanólico de sementes teve a CL₅₀ melhor (360 µg/mL para o TEL), mas, no TDL o extrato etanólico de folhas teve CL₅₀ muito elevada 9180 µg/mL. Estes resultados mostram a atividade anti-helmíntica *in vitro* dos diferentes extratos de *M. azedarach*, contudo, as diferenças observadas provavelmente podem ser devidas a diferentes métodos de extração. *In vivo* a atividade anti-helmíntica foi demonstrada por AKHTAR & RIFAT (1985) sobre *Ascaridia galli* e por FALBO et al. (2008) sobre nematóides gastrintestinais de ovinos, apresentando eficácia de 33,21%. Os efeitos dos extratos obtidos de frutos e sementes de *M. azedarach* também foram observados e reportados por diversos pesquisadores, por exemplo, a atividade antifúngica (CARPINELLA et al. 1999), inseticida (GAJMER et al. 2002) e acaricida (BORGES et al. 2005).

A literatura mostra que a análise química dos extratos de frutos de *M. azedarach* revelou a presença de taninos, compostos fenólicos não tânicos e esteróides (DANTAS et al 2000). Estes resultados também foram obtidos por MACIEL et al. (2006). Os taninos condensados são substâncias descritas como possuidoras de atividade anti-helmíntica. Estes podem atuar por dois tipos de mecanismos: ligar-se a proteínas livres reduzindo a disponibilidade dos nutrientes resultando em morte das larvas por inanição, ou ligar-se à cutícula das larvas, rica em glicoproteínas, e causar sua morte. Este mecanismo de ação leva a crer que os taninos presentes nos extratos seja a substância ativa sobre ovos e larvas de *H. contortus* (ATHANASIADOU et al. 2001).

O extrato metanólico de folhas de *T. clausenii* apresentou a CL₅₀ de 263,8 µg/mL e CL₉₉ de 522,5 µg/mL para o TEL e para o TDL foi de 1,075 µg/mL para a CL₅₀ e 26,38 µg/mL para a CL₉₉. Comparando os extratos das duas plantas Meliaceae vemos que o extrato de *T. clausenii* apresentou no geral melhor resultado nos testes em relação ao extrato de *M. azedarach*.

A atividade antiparasitária da *T. clausenii* também foi observada por MATOS (2006) que obteve 70% de mortalidade de larvas de *Spodoptera frugiperda*. Além da mortalidade, o extrato inibia ou retardava o desenvolvimento das larvas em 1 a 3 dias. Este fato foi observado também no TDL deste trabalho onde o extrato não provocou a mortalidade, mas sim a inibição ou retardamento do desenvolvimento. Apesar de poucos trabalhos terem sido feitos com plantas do gênero *Trichilia*, MATOS (2006) cita alguns trabalhos realizados por outros pesquisadores que relatam atividade antifúngica, antibacteriana e antiviral. A atividade antiparasitária e antiinflamatória foi relatada por TOGOLA et al. (2005). Do extrato metanólico das folhas de *T. clausenii* foram isolados os esteróides 24-metileno-3β,4β,22α-triidroxi-colesterol e -β-O-β-Dglucopiranosil sitosterol e estes compostos foram os mesmos isolados por MATOS (2006). Os efeitos causados por *T. clausenii* sobre ovos e larvas podem estar associados a um ou mais compostos orgânicos já isolados e identificados em caules, folhas e frutos (PUPO et al., 1996, 1997, 1998), contudo, a atividade anti-helmíntica destes compostos isoladamente ainda não foi avaliada.

Os testes químicos com *A. annua* revelaram a presença de artemisinina e seus derivados deoxiartemisinina, ácido dihidroartemisínico e ácido artemisínico, com estrutura semelhante (anexo). Comparando o extrato bicarbonato de sódio CPQBA em relação ao extrato Embrapa, vemos que o extrato Embrapa tem três vezes mais a quantidade de artemisinina. Apesar de ter a estrutura semelhante, a deoxiartemisinina é um produto de degradação da artemisinina e não possuiu a ligação peróxido na sua estrutura, o que a torna completamente inativa (KLAYMAN, 1985). FERREIRA e GONZALEZ (2008a) afirmam que os derivados ácidos (dihidroartemisínico e artemisínico) têm alta atividade antioxidante.

De todos os extratos de *A. annua* testados o que apresentou menor CL₅₀ e CL₉₉ foi o extrato de bicarbonato de sódio (extrato Embrapa), com CL₅₀ de 0,0677 µg/mL e CL₉₉ de 1,27 µg/mL no TEL e CL₅₀ de 1,67 µg/mL e DL₉₉ de 23,8 µg/mL no TDL, com $p < 0,001$. Contudo, dos dois extratos de bicarbonato de sódio, o do CPQBA apresentou a menor CL₅₀ (0,0002 µg/mL) no TEL, mas as demais doses foram superiores em relação ao extrato Embrapa. Isto se deve, provavelmente, ao fato de o extrato Embrapa ter tido maior quantidade de artemisinina. A atividade anti-helmíntica *in vitro* dos extratos de *Artemisia* também foi avaliada por IQBAL et al. (2004) e TARIQ et al (2009), que observaram a atividade anti-helmíntica *in vitro* dos extratos obtidos de plantas deste gênero.

Nos testes *in vivo*, as médias aritméticas do hematócrito e da redução do OPG são indicadores do efeito dos tratamentos sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos. Os resultados observados no presente trabalho mostraram que a porcentagem do hematócrito dos animais tratados com artemisinina melhorou no 15º dia após tratamento. A redução de OPG foi de 6,25% a 31,97% e de 4,24% a 41,37% dos grupos tratados com extrato de bicarbonato de *A. annua* e artemisinina, respectivamente. O gráfico 2 mostra que a atividade anti-helmíntica do extrato de *A. annua* e artemisinina ocorreu de forma gradativa em relação ao tempo. Em experimento com cabras, a dihidroartemisinina, o principal metabólito do artemisinina, começou a aparecer no plasma quatro horas após administração oral e teve o seu pico máximo 12 horas depois. Supostamente a artemisinina exerce o seu efeito por reação com grupos heme a partir de moléculas de hemoglobina digerida por parasitas

e por perturbar a estrutura celular e funções normais deste através dos radicais livres dos seus derivados. Estes causam danos na membrana das células após a ativação do citocromo C na cadeia de transporte de elétrons na membrana mitocondrial. Então, parasitas como *H. contortus*, que não tem genes para a biossíntese do heme, necessitam do grupo heme do citocromo C ou hemoglobina para o crescimento e reprodução (FERREIRA & GONZALEZ, 2008b). Talvez a redução gradativa do OPG dos animais possa estar relacionada a esse efeito no crescimento e reprodução das L₅ e adultos estabelecidos no abomaso.

A maior redução para o extrato foi observada no 14º dia (31,97%), e no 15º dia para artemisinina (41,37%) e para o levamisole no 15º dia a redução foi de 93,6%. Com base nas médias gerais de OPG entre o dia 0 e o 15º foi observada uma redução de 97,2%, de 49,84% e de 39,2% para os grupos levamisole, artemisinina e extrato respectivamente e para o grupo controle foi observado um aumento de 95,5% do OPG. Estes resultados vão de acordo com os obtidos por IQBAL et al. (2004) e TARIQ et al. (2009) que obtiveram a maior redução de OPG no 14º e no 15º, respectivamente, entretanto, o OPG no dia zero dos trabalhos citados foi de aproximadamente 900 e 1000 ovos respectivamente. IQBAL et al. (2004) observaram que o extrato aquoso de *A. brevifolia* foi mais efetivo comparando com o extrato metanólico, já TARIQ et al. (2009) observaram que o extrato etanólico tinha sido mais efetivo em relação ao extrato aquoso de *A. absinthium*. Comparando os resultados obtidos por estes pesquisadores, observa-se que o extrato de bicarbonato de sódio de *A. annua*, foi menos efetivo, entretanto o OPG inicial do presente trabalho foi muito superior aos dos autores supracitados. Estas observações levam a crer que os métodos de extração têm muita influência na concentração de princípios ativos e, conseqüentemente, na sua atividade farmacológica. Outros fatores que podem ter influenciado nos resultados estão relacionados ao local onde a planta é cultivada (OELRICHS et al., 1985), com as condições climáticas e forma de colheita, estabilização, estocagem (GOBBO-NETO E LOPES, 2007) e com a estabilidade química e biológica da artemisinina quando administrada por via oral (FERREIRA & GONZALEZ, 2008b).

A estabilidade metabólica da artemisinina foi avaliada na cultura ruminal onde se recuperou 67% a 92% de artemisinina no pH 6,8 e 95% no pH 3,0, indicando que apenas 2,7% dos metabólitos se dissolveram no conteúdo ruminal, e se encontram disponíveis para absorção. A quantidade não dissolvida encontra-se possivelmente aderida ao conteúdo gastrointestinal e é eliminada pelas fezes FERREIRA & GONZALEZ (2008b), estes observaram também que a quantidade de artemisinina eliminada pelas fezes em 24h após administração oral atingiu um pico de 2,4 µg/g, assim a alta quantidade de artemisinina nas fezes, associada à meia vida curta quando administrada por via oral, é um indicador da baixa biodisponibilidade. Outros autores citados por FERREIRA & GONZALEZ (2008b) relataram que a biodisponibilidade dos fármacos do tipo artemisinina foi apenas de 19% a 35% após a administração oral em caprinos. Os dados fecais obtidos no presente trabalho (Tabela 8 e 9) indicam que uma parte da artemisinina é eliminada pelos ovinos nas primeiras 24 horas, fazendo com que a artemisinina administrada por via oral não atinja níveis sanguíneos terapêuticos desejáveis. Contudo, observando as duas tabelas, verifica-se que os animais que receberam extrato eliminaram uma baixa quantidade de artemisinina comparativamente ao grupo que recebeu artemisinina pura. RATH et al. (2004) afirmam que a artemisinina é rapidamente absorvida quando administrada por via oral em forma de chás comparativamente à administração em forma de cápsulas. Já, ABRAHAMSE et al. (2005) mostrou que os flavonóides eram mais excretados na urina que nas fezes, no entanto, eram mais absorvidos que eliminados. No presente trabalho não foi avaliada se a artemisinina e seus derivados foram eliminados pela urina.

Comparando-se a quantidade de artemisinina administrada, neste experimento, observa-se que o grupo 3 recebeu em média 18,2 mg/kg de pv de artemisinina e o grupo 4 recebeu 100 mg/kg de pv, o que corresponde a cerca de seis vezes mais a quantidade de artemisinina por animal. Como o resultado com 14 e 15 dias após tratamento foi bem semelhante em relação à redução do OPG, talvez a pequena quantidade de artemisinina presente no extrato tenha agido em conjunto com a alta quantidade de flavonóides e ácidos fenólicos (2295,024µmoles pelo teste ORAC) presentes no extrato, responsáveis pela alta atividade antioxidante. O potencial dos

extratos de *A. annua* é baseado em efeitos sinérgicos dos flavonóides precursores da artemisinina (FERREIRA & JANICK 2009).

STEEL (1993), estudando a farmacocinética das avermectinas, observou que cerca de 60% de ivermectina era eliminada nas fezes de ovinos após administração intra-ruminal, o que mostrava a baixa biodisponibilidade destes no plasma, mas quando combinou a moxidectina com a quercetina, um flavonóide, a sua biodisponibilidade aumentou. Uma alternativa para contornar a baixa biodisponibilidade e solubilidade da artemisinina seria sua combinação com flavonóides e outros compostos que podem agir como sinérgicos e aumentar o efeito da artemisinina e de seu derivado, a dihidroartemisinina. Para melhorar o efeito pode-se utilizar solventes de baixa toxicidade orgânica e testar outras formas de administração, como via intramuscular ou endovenosa, a fim de se obter maior disponibilidade da artemisinina no sangue, ou ainda, proteger os extratos em cápsulas que possam ser liberadas no abomaso, visto que a artemisinina é estável no pH do rúmen, que é o órgão onde ocorre a maior absorção dos nutrientes para a corrente sanguínea e é o órgão de predileção de *H. contortus*. Também há necessidade de se estudar melhor a farmacocinética da artemisinina em ovelhas, para se determinar a melhor opção de administração de forma a se reduzir a quantidade de artemisinina eliminada pelas fezes e aumentar a sua biodisponibilidade no plasma ou nos órgãos de eleição dos parasitas gastrintestinais.

7) CONCLUSÕES

Foi obtido o extrato de bicarbonato de sódio de *A. annua* a 0.1%;

Foi observada a atividade anti-helmíntica *in vitro* dos extratos testados;

O extrato de bicarbonato de sódio a 0,1% de *A. Annua* demonstrou atividade anti-helmíntica sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos, assim como o seu bioativo purificado;

Como alternativa de baixo custo para a agricultura familiar, mais estudos envolvendo extratos de *A. Annua* com doses elevadas e alternativas de administração são necessários para se alcançar o real potencial anti-helmíntico do seu princípio ativo e de seus derivados, assim como a sua farmacocinética em pequenos ruminantes.

8) PERSPECTIVAS

Estudar quimicamente o extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach* através de métodos cromatográficos para isolamento dos constituintes químicos;

Realizar mais estudos prospectivos *in vitro* com diferentes extratos de *T. clausenii*;

Realizar testes toxicológicos dos extratos de *M. azedarach*, *T. clausenii* e *A. annua* com animais de laboratório;

Avaliar atividade anti-helmíntica *in vivo*, em doses superiores a 2 g/ kg pv, assim como a prova crítica com necropsia helmintológica;

Estudar a farmacocinética dos extratos de *A. annua* em pequenos ruminantes envolvendo todos os parâmetros bioquímicos.

9) REFERÊNCIAS

AAAS.ORG. *Melia azedarach*, Disponível em
<<http://www.aaas.org/international/africa/moz/bant1.html>>. Acesso em 31 jan 2010.

AGROFORESTRYTREE. *Melia azedarach*, Disponível em:
<<http://www.agroforestrytree.com>>. Acesso em: 12 dez 2009.

ABRAHAMSE, S. L.; KLOOTS, W.J., AMELSVOORT, J. M.M. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat, **Nutrition Research**, Tarrytown, v.25 p. 305–317, 2005.

AGROFORESTRYTREE *Trichilia emética*. Disponível em:
<<http://www.worldagroforestry.org>> Acesso em: 12 dez 2009.

AKHTAR, M. S.; RIFFAT, S. Evaluation of *Melia azedarach* Linn. Fruit (Bakain) against *Ascaridia galli* infection chickens. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 5, n. 1, p. 34-37, 1985.

AKHTAR, M. S.; IQBAL, Z.; KHAN, M. N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medical plants with particular reference to their use in animals in the Indo –Pakistan subcontinent. **Small Ruminant Research** , Amsterdan, v. 38, p. 99-107, 2000.

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, Amsterdan, v. 120, p. 91-106, 2004.

AMARANTE, A. F. T.; CRAIG, T. M.; RAMSEY, W. S.; SAYED, N. M. E.; DESOUKI, A. Y.; BAZER, F. W. Comparison of naturally acquired parasite burdens among Florida

Native, Rambouillet and crossbred ewes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 85, p. 61 - 69, 1999.

ARAÚJO, J. V.; RODRIGUES, M. L. A.; SILVA, W. W.; VIEIRA, L. S. Controle biológico de nematódeos gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 8, p. 1177-1181, 2007.

ATANASIO, A. **Helminths, protozoa, heart water, and the effect of gastrointestinal nematodes on productivity of goats of the family sector in Mozambique**. 2000. 185 f. Thesis (PhD) - Medical University of Southern Africa, Pretoria, 2000.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R.L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, p. 205–219, 2001.

BAH, S.; JAGER, A. K.; ADSERSEN, A.; DIALLO, D.; PAULSEN, B. S. Antiplasmodial and GABAA–benzodiazepine receptor binding activities of five plants used in traditional medicine in Mali, West Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.110, p. 451–457, 2007.

BARTON, N. J.; TRAINOR, B. L.; URIE, J.S.; ATKINS, J. W.; PYMANS, M. F. S.; WOLSTENCROFT I. R. Anthelmintic resistance in nematode parasites of goats. **Australian Veterinary Association**, Brunswick, v. 62, n.7, p. 224–227, 2008.

BARCELLOS, N. M. S. *Farmacocinética* Disponível em: <http://www.farmacia.ufmg.br/cespmed/text7.htm>. Acesso em: 31 dez 2009.

BEUTLER, H. P.; MAIER, E. M.; PETERS, G. B.; ROSSATO, C. K. Intoxicação experimental com frutos de *Melia azedarach* em coelhos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 35. 2008, Gramado, RS. **Anais...** Gramado: Conbravet, 2008.

BHAKUNI, R.S.; JAIN, D.C.; SHARMA, R.P.; KUMAR, S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. **Current Science**, Bangalore, v. 80, n. 11, p. 35–48, 2001.

BILIA, A. R.; MELILLO DE MALGALHÃES, P.; BERGONZI, M. C.; VINCIERI, F. F. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 13, p. 487–493, 2006.

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

BOARETO, A. C.; MULLER, J. C.; BUFALO, A. C.; BOTELHO, G. G. K.; ARAUJO, S. L.; FOGGIO, M. A.; MORAIS, R. N.; DALSENTER, P. R. Toxicity of artemisinin *Artemisia annua* L. in two different periods of pregnancy in Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, Tarrytown, v. 25, p. 239–246, 2008.

BORGES, L. M. F.; FERRI, P. H.; SILVA, W. C.; SILVA, W. J.; MELO L. S.; SOUZA, L. A. D.; SOARES, S. F.; FARIA, K. A.; GOMES, N. A.; MORI, A.; SILVA N. F. Ação do extrato hexânico de frutos maduros de *Melia azedarach* (MELIACEAE) sobre *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) em bezerros infestados artificialmente. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, n. 1, p. 53-59, 2005.

BURKS, K. C. *Melia azedarach*. Tallahassee, FL, USA: Florida Natural Areas Inventory, Florida State University, 1997. Disponível em <[www.issg.org/database/species/Ecology_of Melia azedarach](http://www.issg.org/database/species/Ecology_of_Melia_azedarach)>. Acesso em: 31 dez 2009.

CARPINELLA, M. C.; HERRERO, G. G.; ALONSO, R. A.; PALACIOS, S. M. Antifungal activity of *Melia azedarach* fruit extract. **Fitoterapia**, v. 70, p. 296-298, 1999.

CELEGHINI, R. M. S.; SOUSA, I. M. DE OL.; SILVA, A. P.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-IR para determinação de Artemisinina em *Artemisia annua* L. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 875-879, 2009.

CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Seropédica, v. 13, n. 1, p. 156-160, 2004.

CHAGAS, A. C. S.; VERÍSSIMO, C. J. **Principais enfermidades e manejo sanitário de ovinos**, São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. p. 32-39.

CHAGAS, A.C.S.; VIEIRA, L.S.; FREITAS, A.R.; ARAÚJO, M.R.A.; ARAÚJO-FILHO, J.A. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.151, p.68–73, 2008.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) - methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, p. 35-44, 1992.

CRUZ E SILVA, J. A. Contribuição para o estudo das Helmintoses das Espécies Pecuárias do Sul do Save. **Veterinária Moçambicana**, Maputo, v. 4, n. 1, p. 33-42, 1971.

DANTAS, D. A.; MAGANHA, M.; BERETTA, T. E.; NOZU, P.; PEREIRA, G. S.; MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.; KOLLER, W. W.; GOMES, A. Estudo fitoquímico dos frutos de *Melia azedarach* L. (Cinamomo, Meliaceae). In: ENCONTRO DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIDERP, 2000, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: INIDERP, 2000. v. 2, p. 119-120.

ECHEVARRIA F. Situação da resistência de helmintos de bovinos e ovinos no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9., 1995, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: CBPV, 1995. p. 277-281.

FALBO, M. K.; SANDINI I. E.; HELCYA M. I.; FÁVARO, J. L.; SANTOS C.E.; BASTOS S.; RODIGHERI D.; GUZZO D. Atividade anti-helmíntica do fruto da *Melia azedarach* em cordeiros naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 881-886, 2008.

FERREIRA, J. F. S.; JANICK, J. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. p. 579-584. In: J. JANICK, J (Ed.). **Progress in new crops**. Arlington: ASHS Press, 1996.

FERREIRA, J. F. S.; GONZALEZ, J.M. Analysis of underivatized artemisinin and related sesquiterpene lactones by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 20, n. 2, p. 91-97, 2008a.

FERREIRA, J. F. S.; GONZALEZ, J.M. Chemical and biological stability of artemisinin in bovine rumen fluid and its kinetics in goats (*capra hircus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Seropédica, v.17, n.1, p.103-109, 2008b.

FERREIRA, J.; JANICK, J. **Annual Wormwood (*Artemisia annua* L.)**. Disponível em: <www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheet/artemisia.pdf>. Acesso em: 31 dez 2009.

FURTADO, S. K. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 2006. 147f. Tese (*Doutorado em Agronomia*) - Universidade Federal de Paraná, Curitiba, 2006.

GAJMER, T.; SINGH, R.; SAINI, R. K.; KALIDHAR, S. B. Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach*) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab) (Lep., Noctuidae). **Journal Applied Entomology**, Berlin, v. 126, p. 238-243, 2002.

GIRÃO, E. S.; CARVALHO, J. H.; LOPES, A. S.; MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N. **Avaliação de plantas medicinais com efeito anti-helmíntico para caprinos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte. 1998.

GITHIORI, J. B., ATHANASIADOU, S., THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, p. 308–320, 2006.

GITHIORI, J. B., HOGLUND, J., WALLER P. J., BAKER, R. L. Evaluation of anthelmintic properties of some plants used as livestock dewormers against *Haemonchus contortus* infections in sheep. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 129, p. 245-253, 2004.

GITHIORI, J. B.; HOGLUND, J.; WALLER P. J.; BAKER R. L. Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine Africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite, *Haemonchus contortus*, of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 80, p. 187-191, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOLENSER, J.; WAKNINE, J. H.; KRUGLIAK, M.; HUNT, N.; GRAU, G. E. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. **International Journal for Parasitology**, Kidlington, v. 36, p. 1427–1441, 2006.

GRAMINHA, E. B. N.; COSTA A. J.; OLIVEIRA, G. P.; MONTEIRO, A. C.; PALMEIRA, S. B. S. Biological control of sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: in vitro activity and after passage through the gastrointestinal tract. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, London, v. 21 p. 717–722, 2005.

HALL C. A.; RITCHIE L.; McDONELL P. A. Investigations for anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from goats. **Research Veterinary Science**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 116–119, 1981.

HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for Plant Anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 213-228, 1997.

HEPPNER, D. G.; BALLOU, W. R. **Malaria in 1998**: advances in diagnosis, drugs and vaccine development. Tropical and Travel Association, Panajachel, v.11, n. 519, p.30, 1998.

HERD, R. **Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. “Controle dos nematóides gastrintestinais em ruminantes.”** Coronel Pacheco, MG: EMBRAPA-CNPGL, 1996. p. 95-111.

HOET, S.; OPPERDOES, F.; BRUN, R.; ADJAKIDJÉ, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. In vitro antitrypanosomal activity of ethnopharmacologically selected Beninese plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 91, p. 37-42, 2004.

HOSTETTMANN, K.; QUEÍROZ, E. F.; VÍEIRA, P. C. **Princípios ativos das plantas superiores**. São Carlos, SP: EdUFSCAR, Ed. 2003. p. 17-36.

INFOPÉDIA. **Toxicidade**. Disponível em <[http://www.infopedia.pt/\\$toxicidade](http://www.infopedia.pt/$toxicidade)>. Acesso em: 08 jan 2010.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; ASHRAF, M.; JABBAR, A. Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 93, p. 265–268, 2004.

JANSEN, J.; PANDEY, V. S. Observations on gastro-intestinal helminths of goats in Zimbabwe. **Zimbabwe Veterinary Journal**, Grahamstown, v. 20, p. 11-13, 1989.

JOSHI, A. R.; JOSHI, K. Indigenous knowledge and uses on medicinal plants by local communities of the kali Gandaki Watershed Area, Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 73, p. 175-183, 2000.

JUTEAU, F.; MASOTTI, V.; BESSIE`RE, J. M.; DHERBOMEZ, M.; VIANO, J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil, **Fitoterapia**, v. 73, p. 532–535, 2002.

KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwigii* and *Melia azedarach*, **Fitoterapia**, v. 72, p. 423-427, 2001.

KETTLE, P. R.; VLASSOFF, A.; REID, T. C.; HORTON, C. T. A survey of nematode control measures used by milking goat farmers and of anthelmintic resistance on their farms. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 31, n. 8, p. 139-143, 1983.

KIM, J.-T.; PARK, J.-Y.; SEO, H.-SU; OH, H.-G.; NOH, J.-W.; KIM, J.-H.; KIM, D.-Y.; YOUN, H.-J. *In vitro* antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, p. 53–63, 2002.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): An antimalarial drug from China. **Science**, Washington, v. 228, n. 4703, p. 1049-1055, 1985.

KUMAR, S.; GUPTA, A. K.; PAL, Y.; DWIVEDI, S. K. *In-vivo* Therapeutic efficacy trial with Artemisinin derivative, Buparvaquone and Imidocarb dipropionate against *Babesia equi* Infection in Donkeys. **Journal of Veterinary Medical Science**, Bunkyo-Ku, v. 65, n. 11, p. 1171-1177, 2003.

LANS, C.; TURNER, N.; KHAN, T.; BRAUER, G. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 148, p. 325–340, 2007.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, Cambridge, v. 120 p. 120–131, 2000.

LARSEN, M. Biological control of nematode parasites in Sheep. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 84, n. 13, p. 133, 2006.

LI, Q. G.; MOG, S. R.; SI, Y. Z.; KYLE, D. E.; GETTAYACAMIN M.; MILHOUS, W. K. Neurotoxicity and efficacy of arteether related to its exposure times and exposure levels in rodents. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 66. n. 5, p. 516–525, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2000. v. 1, p. 368.

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

MATOS, A. P. **Busca de compostos inseticidas**: estudo de espécies do gênero *Trichilia* (Meliaceae). 2006. 194f, Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, SP. São Carlos, 2006.

MATOS, A. P.; NEBO, L.; CALEGARI, E. R.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; FILHO, P. F.; RODRIGUES, R. R. Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia* spp. (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial. **BioAssay**, Piracicaba, v. 1, n. 7, p.1-6, 2006.

MBOERA, L. E. G.; KITALYI, J. I. Diseases of small ruminants in Central Tanzania. In: CONFERENCE OF THE AFRICAN SMALL RUMINANT RESEARCH NETWORK ON SMALL RUMINANT RESEARCH AND DEVELOPMENT IN AFRICA, 1994, Arusha, Tanzania. **Proceedings...**, p.17–102.

McCORKLE, C. M.; MATHIAS-MUNDY, E. Ethnoveterinary medicine in Africa. **International African Institute**, Oxford, v.62, p.59–93, 1992.

MCGRAW, L. J.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Antibacterial, anthelmintic and antiamebic activity in South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.72, p.247-63, 2000.

MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal for Parasitology**, Cambridge, v. 32, p.1655–1660, 2002.

MÉNDEZ, M. C.; ARAGÃO, M.; ELIAS, F.; RIET-CORREA, F.; GIMENO, E. J. Experimental intoxication by the leaves of *Melia azedarach* (Meliaceae) in cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 19-24, 2002.

MÉNDEZ, M. C.; ELIAS, F.; RIET-CORREA, F.; GIMENO, E. J.; PORTIANSKY, E. L. Intoxicação experimental com frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 26-30, 2006.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Seropédica, v. 13, n. 1, p.72-79, 2004.

MONGOLO, D.; NJONGMETA, L.M.; MUSONGONG, G.; NGASSOUM, M.; NUKENINE, E.N. Evaluation of anthelmintic potential of ethanolic plant extrats from northern Cameroon. **Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 6, n. 2, p. 426-433, 2006.

NIEZEN, J.H. et al. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 983-92, 1996.

OELRICHS, P.B.; HILL, M.W.; VALLELY, P.J.; MACLEOD, J.K.; MOLINSKI, T.F. The chemistry and pathology of meliatoxins A and B constituents from the fruit of *Melia azedarach* L. var. *australasica*. In: SEAWRIGHT, A.; HEGARTY, M. P.; JAMES, L. F. (Ed.). **Plant toxicology**. yeerongpilly: *Queensland Poisonous Plants Committee*, 1985. p. 387-394.

OELRICHS, P. B.; HILL, M. W.; VALLELY, P. J.; MACLEOD J. K.; MOLINSKY, T. F. Toxic tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 531-534, 1983.

OLIVEIRA, D. B.; AMORIM, A.; BRAGA, M. M.; MATTOS; D. G.; ALMOSNY, N. R. P. Atividade anti-helmíntica da bananeira (*Musa* sp.) em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 15. 1997, Salvador, BA. **Anais...** Salvador: *Sociedade Brasileira de Parasitologia*, 1997.

PANDEY, V. S.; NDAO, M.; KUMAR, V. Seasonal prevalence of gastrointestinal nematodes in communal land goats from the highveld of Zimbabwe. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 51, n. 3-4, p. 241-248, 1994.

PARAUD, C.; HOSTE, H.; LEFRILEUX, Y.; POMMARET, A.; PAOLINI, V.; PORS, I.; CHARTIER, C. Administration of *duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. **Veterinary Research**, Paris, v.36, p.157-166, 2005.

PERVEZ, K.; ASHRAF, M.; HANJIRA, A.H. Anthelmintic Efficacy of *Melia Azedarach* (Bakin) LINN. Against Gastrointestinal Nematodes in Sheep. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v.14, n.3, p.135-137, 1994.

PRIOR, R.L.; LIWEI, GU; HA, H.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. A cycloartane triterpenoid and ω -phenyl alkanolic and alkenolic acids *Trichilia clausenii*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 42, p. 795, 1996.

PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. Androstane e pregnane 2- β ,19-hemiketal steroids from *Trichilia clausenii*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 45, p. 1495, 1997.

PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. γ - Lactones from *Trichilia clausenii*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 307-310, 1998.

PUPO, M. T.; ADORNO, M. A. T.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. Terpenoides and steroids from *Trichilia* specie". **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 13, p. 382, 2002.

RAHMANN, G.; SEIP, H. **Bioactive forage and phytotherapy to cure and control endo-parasite diseases in sheep and goat farming systems** – a review of current scientific knowledge Institute of Organic Farming. Trenthorst: Agricultural Research Centre, 2008. D-23847.

RÄTH, K.; TAXIS, K.; WALZ, G.; GLEITER, C. H.; LI, S.; HEIDE, L. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *artemisia annua* L. (annual wormwood). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 70, n. 2, p. 128–132, 2004.

REITZ, R. **As plantas Meliáceas**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário, 1984. p.64.

RIGUEIRO, M. P. **Plantas medicinais**. Disponível em: <www.saudealternativa.org/2007/plantas-medicinais>. Acesso em: 31 dez 2009.

RODRIGUES, R. A. F.; FOGGIO, M. A.; BOAVENTURA JÚNIOR, S.; SANTOS, A. S.; REHDER, V. L. G. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 368-372, 2006.

RUMLEY, R. **African Malaria Day Special Report**: artemisia, a homegrown cure for malaria. Nairobi, Kenya. Disponível em: <<http://www.worldagroforestrycentre.org>>. Acesso em: 12 dez 2009.

SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: São Carlos, SP: EdUFSCAR Ed, 2004.

SHALABY, H. A.; NAMAKY, A. H. EL; KAMEL, R. O. A. *In vitro* effect of artemether and triclabendazole on adult *Fasciola gigantica*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, p. 76–82, 2009.

SOULSBY, E. J. L. **Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals**. 7th ed. London: Williams & Wilkins, 1982. v. 78.

SPARG, S. G.; STADEN, J. van; JAGER, A. K. Efficiency of traditionally used South African plants against Schistosomiasis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lemerick, v. 73, p. 209–214, 2000.

SPECHT, E. J. Seasonal incidence of helminths in sheep and goats in south Mozambique. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 317-28, 1982.

STEEL, J. W. Pharmacokinetics and metabolism of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 48, p. 45-57, 1993.

TAKEYA, K.; QIAO, Z.; HIROBE, C.; ITOKAYA, H. Cytotoxic Trichilin- type Limonoides from *Melia azedarach*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Kidlington, v.4, n. 8, p. 1359- 1996, 1996.

TARIQ, K. A.; CHISHTI, M. Z.; AHMAD, F.; SHAWL, A. S. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, p. 83–88, 2009.

TIA.Trabalho de inquérito agrícola. 2007. Maputo, **Ministério de Agricultura de Moçambique**, 2008.

TOGOLA, A.; DIALLO, D.; DEMBÉLÉ, S.; BARSETT, H.; PAULSEN, B. S. Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali,

(West Africa) in the regions Doila, Kolokani and Siby. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, p. 7, 2005.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnostico das Helmintoses de ruminantes**, 4th ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. p. 14-45.

URQUAHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, 1996. p. 9, 273.

VAN AGTMAEL, M. A.; EGGELTE, T. A.; BOXTEL, C. J. van. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. **TIPS**, Kidlington, v. 20, p. 199-205, 1999.

VAN WYK, J. A.; MALAN, F. S.; RANGLES, J. L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 70, p. 111-122, 1997.

VIEIRA, L. S. **Alternativas de controle da verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2003. 10 p. (Circular Técnica, 29).

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Anthelmintic resistance in goat herds in the State of Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 3/4, p. 99-103, 1999.

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

WALLER, P. J., DASH, K. M., BARGER, I. A., LEJAMBRE, L. F. & PLANT, J. Anthelmintic resistance in nematodes parasites of sheep: learning from the Australian experience. **Veterinary Record**, London, v.136, p. 411-413, 1995.

WHO. **Regulatory situation of herbal medicines. a world review**. 1998. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs>.> Acesso em 05 jan 2010.

YAMASAKI, B. R.; RITLAND, T. G.; BARNBY, M. A.; KLOCKE, J. A. Isolation and purification of salannin from neem seeds and its quantification in neem and chinaberry seeds and leaves. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 447, p. 17-283, 1988.

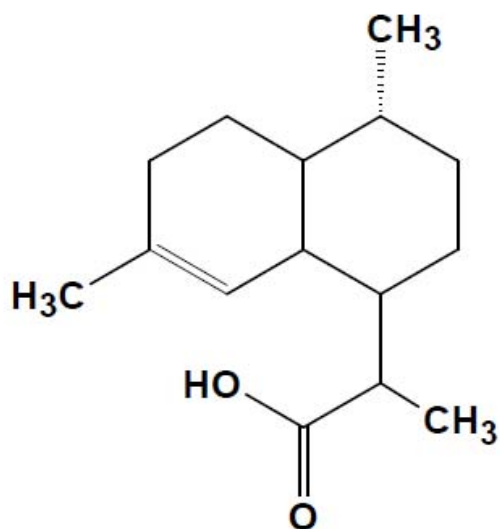
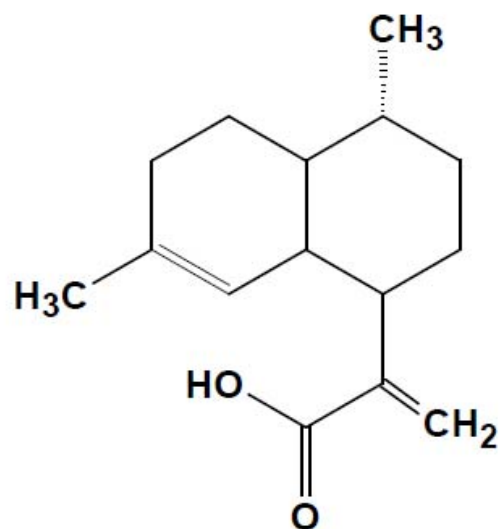
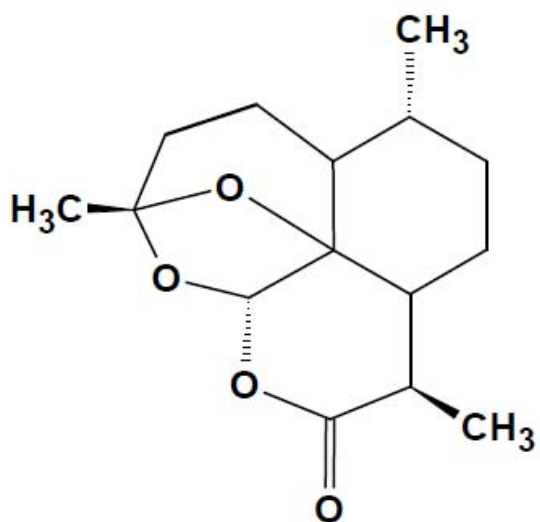
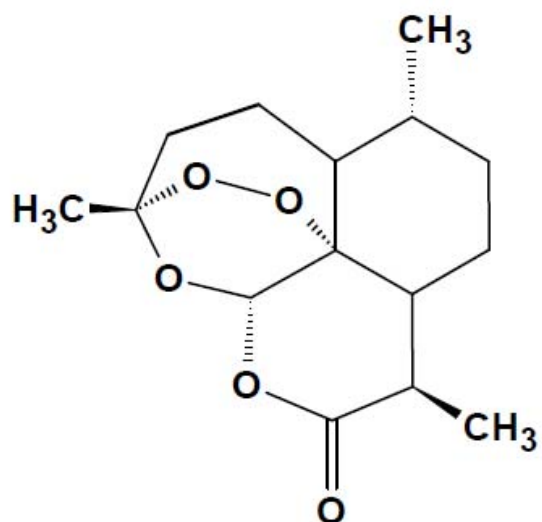
YOUN, H.J.; NOH, J. W. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 96, p. 257–263, 2001.

ZACARIAS, F. **Controle alternativo da infecção por Haemonchus contortus em ovinos: avaliação do tratamento homeopático**. 2004. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

ZHAO, K.; SONG, Z. The pharmacokinetics of dihydroqinghaosu given orally to rabbits and dogs (chinese). **Acta Pharmaceutica Sinica**, Beijing, v. 25, p. 161–163. 1990.

Anexo:**Estruturas da *A. annua*.**

1) Ácido dihydroartemisínico, 2) Ácido artemisínico, 3) Deoxyartemisina, 4) Artemisinina

**1****2****3****4**