

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE
Artemisia annua SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus)*
microplus E *Haemonchus contortus*, *in vivo*, POR MEIO DO
FORNECIMENTO DO MATERIAL VEGETAL SECO NA
ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

Ives Charlie da Silva

Médico Veterinário

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE
Artemisia annua SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E
Haemonchus contortus, *in vivo*, POR MEIO DO FORNECIMENTO
DO MATERIAL VEGETAL SECO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL**

Ives Charlie da Silva

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Pereira de Oliveira
Coorientadora: Dra. Ana Carolina Souza Chagas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal–UNESP, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária - Medicina Veterinária Preventiva.

Silva, Ives Charlie da
S586a

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE *Artemisia annua* SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E *Haemonchus contortus*, *in vivo*, POR MEIO DO FORNECIMENTO DO MATERIAL VEGETAL SECO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL/ Ives Charlie da Silva

-- Jaboticabal, 2013
x, 48 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Gilson Pereira de Oliveira

Banca examinadora: Marcos Rogerio Andre, Márcia

Cristina de Senna Oliveira

Bibliografia

1.Carrapato . 2. Helmintos. 3. Bovinos. 4. Ovinos. 5.Artemisinina

I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.9:636.2/.3

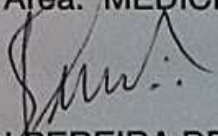
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE *Artemisia annua* SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E *Haemonchus contortus*, *in vivo*, POR MEIO DO FORNECIMENTO DO MATERIAL VEGETAL SECO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

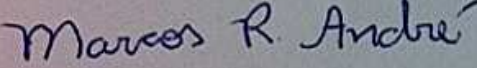
AUTOR: IVES CHARLIE DA SILVA

ORIENTADOR: Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. GILSON PEREIRA DE OLIVEIRA

Docente Credenciado / Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. MARCIA CRISTINA DE SENA OLIVEIRA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos/SP

Data da realização: 05 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

IVES CHARLIE DA SILVA– nascido em Ibaté – SÃO PAULO, em 11 de fevereiro de 1988, é Médico Veterinária, formada em Dezembro de 2010, pela Universidade Camilo Branco (UNICASTELO), campos de DESCALVADO-SP. Durante a graduação fez estágios em diversas áreas. Foi bolsista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA/ Pecuária Sudeste no Departamento de Sanidade Animal, e do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Empresa ROYAL CANIN, por 2 vezes consecutivas. Foi contemplado com bolsa de iniciação científica do Programa Pró Inicial UNICASTELO. Coursou como aluno especial a disciplina de metodologia científica no curso de pós graduação " Stricto Sensu " em Produção Animal. Participou como membro discente do colegiado do curso de Medicina Veterinária e do diretório acadêmico do curso de Medicina Veterinária. Atuou como monitor das aulas práticas de Parasitologia Veterinária e Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos.

MENSAGEM

Podemos acreditar que tudo que a vida nos oferecerá no futuro é repetir o que fizemos ontem e hoje. Mas, se prestarmos atenção, vamos nos dar conta de que nenhum dia é igual a outro. Cada manhã traz uma benção escondida; uma benção que só serve para esse dia e que não se pode guardar nem desaproveitar.

Se não usamos este milagre hoje, ele vai se perder.

Este milagre está nos detalhes do cotidiano; é preciso viver cada minuto porque ali encontramos a saída de nossas confusões, a alegria de nossos bons, a pista correta para a decisão que tomaremos. Nunca podemos deixar que cada dia pareça igual ao anterior porque todos os dias são diferentes, porque estamos em constante processo de mudança.

Paulo Coelho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu pai e minha mãe que sempre estiveram ao meu lado apoiando, me dando forças e acreditando. Todo o investimento não foi em vão. Foi para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Gilson Perreira de Oliveira** pela confiança em mim depositado e no meu trabalho, pela amizade, e por sua orientação nestes anos de trabalho.

À estimada Dra. Ana Carolina Souza Chagas pela oportunidade que me foi dada de aprender e vivenciar o mundo das pesquisas, proporcionando-me espaço no laboratório de Sanidade Animal da EMBRAPA/São Carlos onde além de aprender muito e amadurecer, fiz grandes amigos.

A todos os funcionários do Laboratório de Sanidade Animal da EMBRAPA, pela amizade, carinho, pela ajuda e ensinamentos importantes para a realização desta pesquisa. Entre eles: Márcio Dias Rabelo, técnico do Laboratório de Sanidade Animal do CPPSE, Cynthia Sanches Georgetti e Karina Alves Feitosa, Camila Olivo de Carvalho, estudante de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista – UNESP Botucatu, Ilza Maria de Oliveira Sousa.

A toda a equipe do Centro de Pesquisa de Sanidade Animal, Marcos V. Garcia, Thalita S. Righi, Carolina Buzzulini, Gustavo Felipelli, Gabriel Rossi, Weslen Teixeira, Thiago A. Combe, Carlos Augusto Nicolino, Thaís Rabelo dos Santos, Helenara M. da Silva, André e Breno Cruz, Vando E. Soares e aos técnicos Ana Lúcia, Luiz, José Lúcio, Danielle.

“A vida revela-se ao mundo como uma alegria. Há alegria no jogo eternamente variado dos seus matizes, na música das suas vozes, na dança dos seus movimentos. A morte não pode ser verdade enquanto não desaparecer a alegria do coração do ser humano.”

Rabindranath Tagore

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE *Artemisia annua* SOBRE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* E *Haemonchus contortus*, *in vivo*, POR MEIO DO FORNECIMENTO DO MATERIAL VEGETAL SECO NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

RESUMO: Os extratos vegetais têm sido importantes fontes de substâncias com diferentes estruturas químicas expressando diversas atividades deletérias contra os parasitas. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a ação antiparasitária de *Artemisia annua in vivo*. Para tal, foram propostos dois estudos: um utilizando bovinos naturalmente infestados e outro usando ovinos artificialmente infectados. **Experimento I:** foram selecionadas vinte novilhas com peso médio de 280 kg para avaliar a eficácia carrapaticida sobre *R. (Boophilus) microplus*. As mesmas foram divididas em dois grupos experimentais, um grupo que recebeu por via oral 200g/dia de *A. annua* em cocho coletivo e outro não recebeu. As contagens foram realizadas nos dias 0, 3, 7, 21, 35, 42, 49, 56, pós tratamento. Foi realizada a quantificação de artemisinina por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados das três contagens de carrapatos com o valor referente às médias do dia foi 96,55. Nas contagens posteriores não observou-se diferença significativa entre ambos os grupos. **Experimento II:** Para avaliar a atividade anti-helmíntica, foi conduzido um estudo controlado utilizando-se vinte e quatro ovinos machos Santa Inês com peso médio de 20 Kg artificialmente infectados com *H. contortus* e randomizados em quatro grupos homogêneos com seis animais cada, sendo, controle não tratado (Grupo I), Controle positivo tratado com levamisol 10 mg/kg (GII), *A. annua* a 10% (GIII) e *A. annua* a 20% (GIV). Contagens de OPG foram realizadas nos dias -3, -2, -1, 0 (dia do tratamento), 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 e 28 pós-tratamento. De acordo com as quantificações estatísticas, foram observadas eficácias persistentes de 92,57% e de 85,00% no grupo controle positivo tratado com levamisol. Nota-se não houve diferença significativa entre ambos os grupos. Portanto, os resultados obtidos possibilitam inferir que *A. annua* administrada via oral não demonstrou atividade anti-helmíntica e carrapaticida *in vivo* em bovinos e ovinos.

Palavras-Chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, carrapato, bovinos, ovinos, fitoterápico, helmintos, artemisinina.

EVALUATION OF THE ANTIPARASITIC ACTIVITY of *Artemisia annua* ON *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemonchus contortus*, *in vivo*, THROUGH THE PROVISION OF THE DRY PLANT MATERIAL IN FEED.

ABSTRACT: Vegetal extracts has been important sources for substances with different chemical structures that express several deleterious activities against parasites. The present study focused on evaluating the anti-parasitic action of *Artemisia annua in vivo*. For such, two experiments were proposed: one using naturally infested animals and a second one with artificially infected sheep. **Experiment I:** twenty heifers weighing around 280 kg were selected in order to evaluate the acaricidal efficacy of the compound against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. These animals were divided in two experimental groups: one being held as a control group and the second one were animals received, orally, 200 g/day of *A. annua* in a collective trough on days 0, 3, 7, 21, 35, 42, 49 and 56, post-treatment. Artemisinin was quantified through high performance liquid chromatography. Results of the three tick counts, regarding the average values, was of 96.55. In subsequent counts, no significant difference was observed between both groups. **Experiment II:** To evaluate the anthelmintic efficacy of the compound, a controlled trial was conducted using 24 male sheep, from the “Santa Inês” breed, with an average weight of 20 Kg, artificially infected with *H. contortus*. These animals were randomized in four homogeneous groups with six animals each, being: untreated control (Group I); positive control, treated with levamisole at 10 mg/kg (Group II); *A. annua* at 10% (Group III) and *A. annua* at 20% (Group IV). EPG counts were conducted on days -3, -2, -1, 0 (treatment day), 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 and 28 post-treatment. According to statistical quantifications, persistent efficacies of 92.57% and 85.00% were observed in the positive controls, treated with levamisole. It is possible to note that no significant difference was observed between the other groups. Therefore, the obtained results allow inferring that *Artemisia annua*, administered orally, did not present anthelmintic activity in sheep or acaricidal activity in cattle, on both *in vivo* trials.

Keyword: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ticks, cattle. Sheep, fitoterápico.helmintos, artemisinin.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Parasitismo por <i>R. (B.) microplus</i>	3
2.1.1. Distribuição e ciclo de vida	3
2.1.2. Danos causados por <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
2.1.3. Controle e resistência de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
2.1.4. Pesquisa de extratos vegetais para o controle do carrapato.	5
2.2.Parasitismo por nematóides gastrintestinais em ovinos	5
2.2.1: Distribuição e ciclo de vida	5
2.2.2. Controle e resistência dos nematoides gastrintestinais em ovinos.	7
2.2.3. Pesquisa de extratos vegetais para o controle de nematoides gastrintestinais em ovinos	8
2.3. <i>Artemisia annua</i>	9
2.3.1.Histórico de atividade antiparasitária do princípio ativo artemisinina.....	9
2.3.2. Estrutura química da artemisinina	10
2.3.3. Mecanismo de ação da artemisinina	10
2.3.4. Farmacocinética da artemisinina	11
2.3.5. Toxicologia de artemisinina.	12
4.OBJETIVO GERAL	13
4.1 Objetivos específicos.	13
5. MATERIAL E MÉTODOS	14
5.1. Local de estudo.	14
5.2. Coleta da planta e quantificação da artemisinina	14
<u>5.3. Experimento I – Administração de <i>Artemisia annua</i> na alimentação de bovinos de corte para controle do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>:</u>	<u>15</u>
5.3.1. Delineamento experimental	15
5.3.2. Colheita das amostras e exames clínicos	15
5.3.3. Avaliação da infestação de larvas na pastagem	16
5.3.4. Análise estatística.	16
<u>5.4. Experimento II – Administração de <i>Artemisia annua</i> na alimentação de ovinos para o controle de nematoides gastrintestinais</u>	<u>17</u>
5.4.1. Delineamento experimental	16
5.4.2. Colheita de amostras e exames clínicos	17
5.4.3. Análise estatística	18
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18

6.1. Análise de teor de artemisinina nas amostras vegetativas utilizadas para os experimentos.	18
6.2. Efeito da dieta com <i>A. annua</i> em bovinos infestados naturalmente com carrapatos <i>R. (B). microplus</i> .	18
6.3. Efeito da dieta com <i>A. annua</i> em bovinos naturalmente infestados por <i>R. (B). microplus</i> na dinâmica populacional do ixodídeo no pasto.	22
6.4. Ação de <i>A. annua</i> administrada sobre o OPG de ovinos infectados artificialmente por <i>H. contortus</i> .	23
CONCLUSÃO	27
7. REFERENCIAS	28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Contagens de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (entre 4,5 e 8,0 mm de comprimento) em bovinos pertencentes aos grupos controle e tratado: EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.**20**
- Figura 2.** Eficácia média das reduções dos ovos por grama de fezes (OPG) dos ovinos tratados com *Artemisia annua* via oral durante 30 dias; EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2012.**25**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de artemisinina em amostras de <i>Artemisia annua</i> L analisadas por HPLC-IR.	18
Tabela 2: Resultados das pesagens dos bovinos dos grupos controle e tratado com <i>Artemisia annua</i> ; Médias aritméticas; EMBRAPA/São Carlos, SP, Brasil. 2011.	19
Tabela 3: Resultados hematológicos do referente ao hematócrito dos bovinos pertencentes aos grupos controle e tratado com <i>Artemisia annua</i> ; Médias aritméticas; EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.	19
Tabela 4. Contagens de fêmeas de <i>Riphipcephalus (Boophilus) microplus</i> (entre 4,5 e 8,0 mm de comprimento) em bovinos pertencentes aos grupos controle e tratado com <i>Artemisia annua</i> : EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.	20
Tabela 5. Resultados das comparações múltiplas das contagens de fêmeas de <i>Riphipcephalus (Boophilus) microplus</i> (dados transformados em $\log(\text{contagem}+1)$): EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.	21
Tabela 6. Contagens de larvas de <i>Riphipcephalus (Boophilus) microplus</i> nos piquetes experimentais. Médias Aritméticas. EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.	22
Tabela 7. Altura em centímetros da forragem nos piquetes experimentais; EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011	22
Tabela 8. Contagens de ovos por grama de fezes em ovinos pertencentes aos grupos controle e tratado com <i>Artemisia annua</i> ; EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.	23
Tabela 9. Resultados das comparações múltiplas das contagens de ovos por gramas de fezes (dados transformados em $\log(\text{contagem}+1)$); EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil	25

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ART Artemisinina

°C Graus Celsius

DL 50 Dose letal 50%

g Gramas

h Horas

kg Quilograma

mL Mililitro

µL Microlitro

n Número de animais por grupo

n° Número

p Nível de significância estatística

% Percentual

® Marca registrada

♀ Fêmea

♂ Macho



Pecuária Sudeste

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado: "Avaliação de formulações a base de substâncias isoladas e quimicamente modificadas de plantas sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Haemonchus contortus*", utilizando 40 animais da espécie bovina (*Bos taurus taurus*) e 24 ovinos (*Ovis aries*), sob responsabilidade da pesquisadora científica Dr^a Ana Carolina de Souza Chagas, está de acordo com os princípios éticos e de experimentação animal da Embrapa Pecuária Sudeste e foi aprovado pela referida instituição.

(We hereby declare that the research: "Evaluation of antiparasitic formulations based on isolated and chemically modified substances from plants on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Haemonchus contortus*", utilizing 40 animals of the bovine species (*Bos taurus taurus*) and 24 animals of the ovine species (*Ovis aries*), under the responsibility of the scientific researcher Dr. Ana Carolina de Souza Chagas, is in agreement with ethical principles of animal experimentation of Embrapa Southeast Livestock and was approved to be carried out at that institution).

São Carlos, 03 de Setembro de 2012.

Dr. Rui Machado
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

recebido

03/09/12

1.INTRODUÇÃO

O parasitismo é responsável por grandes perdas econômicas na produção de ruminantes no Brasil. Estratégias de controle, normalmente, enfocam a utilização de produtos químicos, rotação de pastagens e uso de tratamentos em períodos específicos (estratégica) ou descontroladamente pelos produtores rurais (PEREIRA et al.,2008).

O sucesso na pecuária bovina depende da aplicação de práticas adequadas de manejo nutricional, reprodutivo e sanitário. No manejo sanitário, o controle de parasitas é um grande desafio, uma vez que a criação de animais implica inevitavelmente em infestação parasitária. O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, estimado em 209,5 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2010), superado apenas pela Índia. Com abate estimado em 42 milhões de cabeça/ano, destaca-se como segundo maior produtor de carne atrás dos Estados Unidos.

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é considerado o principal parasita responsável por perdas econômicas na pecuária nacional, gerando gastos em torno de 800 milhões de reais com carrapaticidas (FURLONG et al.,2007). O controle utilizando quimioterápicos tem se tornado cada vez menos sustentável por várias razões, tais como altos custos, tempo de eficácia curto, rápido desenvolvimento da resistência, manejo inadequado, desrespeito do tempo de carência e riscos de contaminação do ambiente e dos produtos de origem animal com resíduos carrapaticidas. Em função dessa realidade, a busca por alternativas inovadoras para o controle do carrapato é de grande relevância.

Ademais, o Brasil possui 16 milhões de cabeças de ovinos (ANUALPEC, 2010),apesar da rusticidade de algumas raças e da prolificidade favorecerem a criação, o setor produtivo rural não consegue suprir as demandas existentes, devido a práticas inadequadas de manejo relacionadas à doenças, nutrição e ao custo elevado de medicamentos (ATANASIO, 2000). No manejo sanitário do rebanho, os parasitas gastrintestinais, dentre eles: o *Haemonchus contortus* ocupam um lugar importante entre os fatores que limitam a sua produção, comprometendo a rentabilidade dos sistemas pecuários produtivos (SOULSBY, 1982; GITHIORI et al. 2002). A maioria das perdas associadas às infecções clínicas e subclínicas por este parasita, 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 *H. contortus* 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 é feito basicamente pela utilização de anti-helmínticos quimioterápicos, contudo, essas drogas não são acessíveis aos pequenos produtores nas comunidades rurais.

Decorrente da demanda de novas alternativas para o controle do parasitismo animal, diversos estudos vêm sendo realizados com várias espécies vegetais para verificação da eficácia parasitária (CHAGAS et al., 2002).

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).

Neste contexto, a artemisinina tem sido extensivamente investigada quanto ao seu mecanismo de ação, aspectos clínicos e farmacológicos e eficácia terapêutica em parasitoses (KEISER et al., 2006, 2008; EKANEM e BRISIBE, 2010).

Tendo em vista a escassa literatura técnico-científica sobre a ação de *Artemisia annua* como agente antiparasitário na saúde animal, e sua não constatação parasiticida contra *R. (B.) microplus* (CHAGAS et al., 2012) originou a presente pesquisa. Após a ineficácia verificada *in vitro*, realizou-se levantamento quanto ao possível modo de ação da planta, indiretamente, ou seja, não por contato com a cutícula e sim pela ingestão e absorção do seu princípio ativo pela corrente circulatória. Assim sendo avaliou-se a ação antiparasitária da *A. annua* por meio da administração *per os* em bovinos naturalmente infestados por carrapatos *R. (B.) microplus*. e em ovinos artificialmente infectados por *Haemonchus. contortus*.

A realização desta pesquisa justifica-se bem como identificar e quantificar seus constituintes, gerando conhecimento inédito quanto à possibilidade de uso desse fitoterápico contra parasitas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Parasitismo por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2.1.1. Distribuição e ciclo de vida

No Brasil, as condições climáticas permitem o desenvolvimento e a sobrevivência do carrapato *R. (B.) microplus* durante o ano todo, em várias regiões, em níveis mais que suficientes para causar danos. Este ectoparasito foi registrado em quase todos os estados da federação, num total de $\pm 60\%$ dos 2.962 municípios (GONZALES; SERRA-FREIRE, 1992).

Os carrapatos são identificados como parasitas de répteis desde a Era Paleozóica/Mesozóica. Sua presença nas aves e mamíferos data de 70 milhões de anos e suas espécies vêm se adaptando a seus hospedeiros criando perfeita associação entre estes e os agentes infecciosos por eles transmitidos comum das espécies e raças bovinas, excepcionalmente parasita cavalos, ovelhas e cervídeos, e raramente o homem (PEREIRA, et al., 2008).

O parasitismo está inserido na história da humanidade e sua relação com os animais domésticos sempre foi objeto de preocupações e perdas relacionadas à produção animal e transmissibilidade de agentes etiológicos de importantes doenças zoonóticas. Compreendem aproximadamente 800 espécies conhecidas, todas parasitas de vertebrados terrestres, resultando no surgimento de ectoparasitos idealmente adaptados (PEREIRA, et al., 2008).

É um carrapato com ampla distribuição mundial, estando presente na faixa contida entre os paralelos 32° N e 32° S, tem destacada importância nos países da América Latina, África e Oceania (PEREIRA, et al., 2008).

Na fase de vida livre, são necessários em torno de três dias para a pré-postura, três a seis semanas para a postura, vinte e dois a trinta dias para a eclosão das larvas e de dois a três dias para o fortalecimento de suas cutículas, transformando-se em larvas infestantes. A cada postura, uma fêmea produz de 2000 a 3000 ovos. Na fase parasitária são necessários, em média, de 18 a 26 dias para a fixação, alimentação, metamorfoses, e acasalamento, assim como para a alimentação, ingurgitamento e queda das teleóginas. Os machos permanecem por mais tempo sobre o bovino e se acasalam com outras fêmeas. O ingurgitamento e queda da fêmea do *R. (B.) microplus* são bastante rápidos, porém, os padrões de ingurgitamento se diferenciam entre as estações, assim como em

bovinos estabulados, sugerindo que este sofre uma influência do ambiente externo, principalmente de luz e temperatura (GONZALES, 1974).

Vários autores demonstraram a influência dos fatores sazonais no ciclo de vida e a conseqüente diferença de infestações nos animais, de acordo com o clima da região em que vivem e as épocas do ano. Porém, o período seco, de temperaturas mais baixas, entre abril e setembro, prejudica o desenvolvimento da fase de vida livre, fazendo com que o ciclo se prolongue (FURLONG, 1993).

O ecossistema do carrapato e os fatores que interferem na sua sobrevivência tais como condições climáticas, manejo do rebanho, da pasto e tipo de vegetação, são importantes aspectos a serem estudados com vistas ao controle de sua população (GONZÁLES, 1975).

2.1.2. Danos causados por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Entre os ectoparasitas dos bovinos, continua a ser uma das principais causas de perdas econômicas para a pecuária (MENDES&SATO, 2013). Os prejuízos à pecuária têm sido causados principalmente pela presença de parasitas devido aos danos resultando em morbidade e mortalidade nos animais, e, conseqüente queda na produção. Em relação aos prejuízos causados por esse carrapato no Brasil, estima-se uma perda na ordem de um bilhão de dólares por ano, sendo 40% por perdas na produção de leite, 27% por mortalidade de bovinos, 11% por desempenho reprodutivo, 9% em gastos com acaricidas, 5% por redução no ganho de peso, 5% em juros bancários, 3% devido à má qualidade do couro e despesas no controle e prevenção das hemoparasitoses (SOUSA-BRITO, 2008).

2.1.3. Controle e resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O controle efetivo desses parasitas está na dependência de um conjunto de fatores: do produto certo, na dosagem correta, no momento exato para a remoção de uma quantidade ideal da população parasitária. Na falta de um destes componentes, todo o sistema de controle estará comprometido e ocorrerá uma seleção para a resistência e conseqüentemente uma inviabilização do programas sanitários quanto à relação custo-benefício (DOURADO, 2001).

Os produtos químicos convencionais usados no controle efetivo de parasitas se deparam com dois grandes problemas: o desenvolvimento acelerado da resistência ao princípio ativo e os resíduos nos produtos de origem animal que têm provocado preocupação na sociedade e órgãos governamentais. Estes dois pontos têm determinado

efetivamente o rumo atual das pesquisas científicas na área da parasitologia.

Para evitar a ação do produto químico, o parasita encontra meios para sobreviver e se reproduzir, os bioensaios são utilizados para avaliar o nível de efetividade de *R.(B.) microplus* frente aos diferentes grupos químicos, tais como organofosforados, piretróides sintéticos, lactonas macrocíclicas, phenylpyrazoles, e amidinas. Recentemente realizou-se estudos com carrapatos provenientes de varias regiões Sul do Brasil, utilizando biocarrapaticidogramas. Estes estudos confirmaram a existência de resistência múltipla de amitraz e cipermetrina em populações da região sul do Brasil (MENDES, 2011).

2.1.4. Pesquisa de extratos vegetais para o controle do carrapato

Os extratos vegetais têm sido utilizados como inseticidas naturais no controle parasitário desde nossos ancestrais Romanos. Essa prática continua até os dias atuais por meio do uso de plantas locais com baixo custo para os pequenos produtores em relação aos produtos químicos tradicionais. Existem mais de duas mil plantas com propriedades pesticidas conhecidas, no entanto, somente algumas destas têm sido utilizadas comercialmente como forma de controle (CHAGAS, 2004).

A utilização de óleos essenciais e extratos vegetais é uma prática antiga no controle de carrapatos, porém só recentemente tem recebido a devida atenção dos pesquisadores. Atualmente, alguns estudos estão sendo feitos no Brasil e várias espécies estão sendo pesquisadas quanto à sua atividade carrapaticida, tais como: (NIN) *Azadirachta indica* (MARTINEZ, 2002); (CITRONELA) *Cymbopogon nardu* (OLIVO et al., 2008), (PAU INCENSO) *Tetradenia riparia* (GAZIM et al., 2011), (GUINÉ) *Petiveria alliacea* (ROSADO- AGUILAR et al., 2010), *Piper aduncum* (SILVA et al., 2009), (EUCALIPITO) *Eucalyptus citriodora* (CHAGAS et al., 2002), (MANJERIÇÃO) *Ocimum basilicum* (MARTINEZ- VELASQUES et al., 2011), (QUEBRA-TUDO) *Calea serrata* (RIBEIRO et al., 2011), (FUMO) *Nicotiana tabacum* (RODRIGUEZ et al., 2010).

2.2.Parasitismo por nematóides gastrintestinais em ovinos

2.2.1: Distribuição e ciclo de vida

Várias espécies de helmintos parasitam o trato gastrintestinal dos pequenos ruminantes, tais como *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus axei*, *Haemonchus contortus*, *Strongyloides papillosus*, *Cooperia curticei* e *Oesophagostomum columbianum* (AMARANTE et al., 2004).

H. contortus tem um ciclo evolutivo direto. As fêmeas são ovíparas prolíferas. Os

ovos são eliminados nas fezes e em condições ideais (18 a 26°C e 80 a 100% umidade relativa do ar) se desenvolvem no pasto até o terceiro estágio infectante (L₃) em aproximadamente 5 dias. Em condições de baixa temperatura o desenvolvimento pode ser retardado devido ao seu baixo metabolismo por semanas ou meses. A temperatura ótima para a sobrevivência das larvas é de 18 a 26°C (ONYAH & ARSLAN, 2005). Em baixas temperaturas as larvas sobrevivem por longos períodos devido ao seu acúmulo de reservas energéticas. A umidade relativa do ar, também considerado um fator importante para a sobrevivência das larvas. Em condições secas, como no semi-árido brasileiro, as larvas não sobrevivem por período prolongado (AROSEMENA et al., 1999). A irrigação quando existente pode influenciar na disponibilidade de L₃, sendo encontradas em grande número nestas condições durante o verão com temperaturas em torno de 24°C (KRECEK et al., 1991). Após a ingestão e desembainhamento no rúmen, as larvas sofrem duas mudas. Exatamente antes da muda final, desenvolvem a lanceta perfurante que lhes permite a obtenção do sangue dos vasos da mucosa do abomaso, local de fixação do parasito. Quando adultos, movem-se livremente na superfície da mucosa. O período pré-patente é de duas a três semanas (SOULSBY, 1987).

Um dos parasitas de ovinos, *H. contortus*, mostra-se mais importantes e prevalentes em diversos micro-climas de pastagens (AMARANTE et al., 2004), ocasionando perdas produtivas como retardo no crescimento e mortalidade especialmente de jovens e fêmeas no periparto (MOTA et al., 2003).

A prevalência maior ou menor de uma ou mais espécies de parasitas depende de um conjunto de fatores, tais como: temperatura, precipitação pluvial, solo, tipo e manejo da pastagem, raça, idade, estado fisiológico, nutricional e manejo dos animais. As perdas econômicas causadas são de dois tipos: as diretas, caracterizadas pela redução da produção, menor qualidade do produto e mortalidade, e, as indiretas, como os altos custos associados ao tratamento e controle (diagnósticos laboratoriais, medicamentos e mão de obra para a administração dos mesmos) (RUAS & BERNE, 2001).

Estas perdas também podem estar relacionadas com o status nutricional do hospedeiro que é considerado um importante fator que influencia a relação parasito/hospedeiro e a patogenia das infecções parasitárias.

2.2.2. Controle e Resistência dos nematoídes gastrintestinais em ovinos.

No Brasil, aumentam demasiadamente os dispêndios com aquisição de anti-helmínticos. De acordo com Molento (2005), a ordem de faturamento com vendas de anti-helmínticos são de 700 milhões de dólares anuais. A principal medida de controle

adotada para reduzir os efeitos do parasitismo é o uso de drogas principalmente dos grupos químicos da avermectinas, milbemicina, benzimidazóis, imidazóis, salicilanidas, visando reduzir os níveis de infecção dos animais e diminuir o grau de contaminação das pastagens.

O primeiro relato de resistência à anti-helmínticos utilizados contra nematóides gastrintestinais de ovinos foi com o tiabendazole (DRUDGE et al., 1964). Este problema disseminou-se pelo mundo inteiro. A resistência anti-helmíntica é definida como a capacidade de uma população de parasitas em sobreviver a doses de anti-helmínticos que poderiam ser letais para populações susceptíveis (TORRES-ACOSTA & HOSTE, 2008). Esta habilidade de sobreviver a futuras exposições de uma droga pode ser transmitida aos seus ascendentes. Hoje, este fenômeno ocorre frente a todos os compostos químicos com graves conseqüências econômicas em todo mundo.

A resistência é diagnosticada, na maioria dos casos, após a observação empírica da baixa eficácia da medicação utilizada, sendo um dos maiores entraves a falta de métodos sensíveis para quantificá-la (MOLENTO, 2005). A atividade dos antiparasitários é medida da seguinte forma: altamente efetivo quando reduz mais que 98%; efetivo quando reduz 90-98%; moderadamente efetivo 80-89% e insuficientemente ativo inferior a 80%.

O primeiro relato de resistência a anti-helmínticos em ovinos, no sul do Brasil, foi feito por Dos Santos & Gonçalves (1967), no Rio Grande do Sul, demonstrando que esse problema estava disseminado. Na região nordeste foi detectada resistência anti-helmíntica em Pernambuco e na Bahia (BARRETO & SILVA, 1999). Segundo estudo realizado por Sczesny-Moraes (2010), a múltipla resistência aos anti-helmínticos já está instalada na maioria dos rebanhos de ovinos do Estado de Mato Grosso do Sul. Os relatos indicam que suas populações possuem elevados índices de resistência às moléculas com as bases farmacológicas: albendazole, ivermectina, levamisole, triclorfon, moxidectina e closantel, Apesar de inúmeros trabalhos, a real situação da prevalência da resistência em fazendas comerciais de criação de ovinos e caprinos no Brasil ainda é desconhecida. Estimar essa prevalência é muito difícil, pois raramente é medida com nível de confiabilidade (SANGSTER, 2001).

Atenção particular é dada ao desenvolvimento genético da resistência, diferenças fisiológicas entre parasitas resistentes e sensíveis, diversidade genética em *H. contortus*, mecanismos de resistência às drogas e o diagnóstico da resistência utilizando técnicas *in vitro* e de biologia molecular (MELO, 2005).

A resistência apresenta três componentes: estabelecimento, desenvolvimento e dispersão. No primeiro a resistência é amplamente influenciada pelo tamanho e

diversidade da população e taxa de mutação do gene envolvido (SUTHERST & COMINS, 1979). Quanto mais elevados estes fatores, maior será a probabilidade da existência do alelo para a resistência (GEARY et al., 1999). O desenvolvimento da resistência deve-se ao uso do agente seletivo, neste caso, o anti-helmíntico (SUTHERST & COMINS, 1979). A grande frequência de tratamentos seleciona para resistência diminuindo a vida útil do fármaco (BARNES E DOBSON, 1990). Por último, o processo de dispersão dos genes na população é realizado pela migração e fluxo gênico (HUMBERT et al., 2001). Logo, os processos de desenvolvimento e dispersão são influenciados pela biologia e manejo dos parasitos responsáveis pela resistência.

2.2.3. Pesquisa de extratos vegetais para o controle de nematoides gastrintestinais em ovinos

Devido à resistência dos nematoides de ovinos às drogas anti-helmínticas, torna-se necessário a busca de novas alternativas no controle das endoparasitoses, dentre elas, inclui-se o uso de fitoterápicos (CHAGAS, 2004).

No Brasil, alguns pesquisadores têm estudado o efeito de óleos essenciais no controle de parasitas. O conhecimento popular das propriedades terapêuticas das plantas, que há séculos é transmitido de geração para geração, reúne informações sobre o potencial medicamentoso de várias espécies, constituindo um importante instrumento para o desenvolvimento de novos fármacos. A pesquisa envolvendo as propriedades terapêuticas de plantas tem apresentado resultados científicos positivos, aumentando os estudos com plantas medicinais (SOUZA BRITO, 2003). Com o intuito de diminuir o uso de antiparasitários químicos, devido às suas ações prejudiciais ao ambiente, à saúde animal, ao aplicador, novas pesquisas vêm sendo realizadas em busca de alternativas viáveis ao controle químico através de substituição por produtos naturais de origem vegetal ou associação destes com os produtos sintéticos.

A atividade de extratos e óleos essenciais já foi demonstrada sobre diferentes estádios de vida de parasitas (SQUIRES et al., 2010). Entre as muitas plantas que estão sendo testadas, cita-se os gêneros *Eucalyptus*, *Mentha* e *Cymbopogon*, dentre outros, os óleos essenciais: *Mentha piperita*, *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon schoenanthus* apresentaram elevada atividade contra tricostrongilídeos de ovinos. Em testes *in vivo*, a emulsão do óleo essencial de laranja na dose única de 600mg/kg (SQUIRES et al., 2010) promovendo redução de 98% do OPG de ovinos, já o óleo essencial de *Lippia sidoides* na dose de 283mg/kg durante cinco dias demonstrou eficácia de 43,7% no teste controlado (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008).

2.3. *Artemisia annua*

2.3.1. Histórico de atividade antiparasitária do princípio ativo artemisinina

Originária da Ásia, *Artemisia annua* L. é atualmente produzida em muitos países, onde se desenvolvem projetos de adaptação da planta, visando o aumento de produção da artemisinina, uma lactona sesquiterpênica, oriunda do metabólito secundário da planta (CREEK et al., 2005; FERREIRA et al., 2006).

A artemisinina é extraída de *A. annua*, utilizada na China há mais de 2.000 anos, denominada como qing hao. Pertencente à família Asteraceae e atualmente utilizada em muitos países (DHINGRA et al., 2000). A primeira citação relatada popularmente como qing hao data de 168 a.C., encontrada na tumba da dinastia Mawangdui Han, Nas “Receitas consta 52 tipos de doenças”, constando seu uso recomendado para hemorróidas. A planta também foi mencionada mais tarde no “Livro de Bolso de Prescrições para Tratamento de Emergências”, de Ge Hong, para reduzir febre (KLAYMAN et al., 1985). A descrição mais detalhada aparece no “Compêndio de Matéria Médica” publicada em 1956, pela Dinastia, Ming Li Shizhen, famoso herbalista chinês, e impresso até hoje na China (HAYNES&VONWILLER, 1997). Em 1967 o governo na República Popular da China desenvolveu um exame sistemático das principais plantas utilizadas pela medicina popular; mais de 3.000 plantas foram analisadas, entre elas o qing hao, onde sua ação antimalárica foi comprovada (LEE et al., 2002). Em 1972 o ingrediente ativo foi purificado e denominado qing haosu (MESHNICK, 2002).

O nome adotado oficialmente no ocidente foi artemisinina (AVERY et al., 2002), teve como base estudos, em 1979, quando teve sua estrutura química elucidada (KLAYMAN et al., 1985). Neste mesmo ano, o Chinese Coordinatin Research Group realizou o tratamento de 2.099 pacientes com malária utilizando artemisinina, sendo todos curados. Em adição, trataram 143 casos de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina, e 141 casos de malária cerebral, com sucesso. A partir da década de 80 houve a disseminação dessa droga para o ocidente (LEE et al., 2002).

Sua produção é obtida através das folhas e se acumula nas inflorescências, podendo ser extraída de ambos, em concentração que varia entre 0,01 a 0,8% do peso seco, sendo seu rendimento baixo uma das limitações para a produção em larga escala, e um dos fatores do alto custo da medicação (JAIN et al., 1996).

A artemisinina em modelos animais impediu hipersensibilidade mediada por IgE cutânea vascular. De acordo com Cheng et al., (2013), observou-se atividade anti-alérgica indicando possibilidade de uso no tratamento de asma e outras doenças mediadas por

células mastócitos, mostrando-se eficazes para atenuar a asma alérgica em modelos de rato.

A eficácia de *A. annua* sobre diferentes parasitas que afetam a saúde dos seres humanos e animais já foi comprovada, como em *Plasmodium* spp. (KLAYMAN, 1993), coccídeos (ALLEN, et al., 1997), *Babesia* spp. (KUMAR, et al. 2003), *Leishmania* spp. (YANG & LIEW, 1993) e *Neospora caninum* (KIM, et al, 2002). A artemisinina e seus derivados também foram utilizados com sucesso para o tratamento do câncer (SINGH; LAI, 2001) e foi aprovado pela Food and Drug Administration.

2.3.2. Mecanismo de ação da artemisinina

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

A artemisinina tem ação mais rápida sobre o *Plasmodium* porque inibe os estádios iniciais de desenvolvimento, logo que invade os eritrócitos. Já foram descritos ao longo de mais de 30 anos grande número de artigos (WU, 2002). O progresso foi grande, mas o mecanismo exato de ação dessa droga ainda é controverso (UHLEMANN et al., 2005), havendo, inclusive, inconclusivo mecanismo de ação para a artemisinina, esclarecendo sumariamente que inibe o retículo sarcoendoplasmático Ca^{+2} ATPase.

2.3.4. Farmacocinética da artemisinina

A artemisinina é pouco solúvel em água e óleo, este fator, impossibilita sua administração parenteral, intravenosa e intramuscular (AVERY et al., 2002).

As formulações orais de artemisinina são absorvidas rapidamente, mas de forma incompleta. A concentração plasmática máxima (C_{max}) ocorre em uma a duas horas e a maioria dos compostos possui meia vida ($T_{1/2}$) de uma a três horas após a ingestão. Formulações lipossolúveis administradas, via intramuscular, possuem meia vida ($T_{1/2}$) maior devido à formação de depósito muscular (VAN AGTMAEL et al., 1999). São convertidos primeiramente em dihidroartemisinina e em seguida, metabolizados pelas enzimas do citocromo P450 e outros sistemas enzimáticos. Possui potente, $T_{1/2}$, meia vida de 45 minutos e 90% de ligação com proteínas plasmáticas (WOODROW et al., 2004).

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 $\mu\text{g/g}$ 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, 2008).

2.3.5. Toxicologia de artemisinina.

Seus derivados exibem toxicidade em estudos em animais *in vivo* e *in vitro* em células neuronais. A toxicidade pode ser devido a uma interação de ferro com a ponte de endoperóxido, derivado para produzir radicais livres tóxicos e/ou outros metabólitos (SMITH, 1997). A genética toxicológica é uma das áreas da ciência que tem se dedicado à pesquisa das propriedades genotóxicas e mutagênicas de agentes aos quais os organismos estão expostos.

Alguns trabalhos demonstraram o potencial genotóxico em células tumorais e células de roedores, *in vitro* (DU et al., 2010). A artemisinina apresenta efeito deletério citotóxico e mutagênico, isso indica que seu uso deve ser cauteloso, uma vez que pode acarretar um aumento da carcinogênese (CARDOSO, 2012).

Os efeitos adversos em pacientes tratados com artemisinina e seus derivados 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 $T_{1/2}$ 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). Observaram 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 dependem do seu tempo de exposição e da sua concentração no sangue (LI et al. 2002).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a ação antiparasitária da *Artemisia annua* por meio da administração *per os* em bovinos naturalmente infestados por carrapatos *R. (B.) microplus*. e em ovinos artificialmente infectados por *H. contortus*.

4.2. Objetivos específicos.

- 4.2.1. Determinar a concentração de artemisinina nas amostras administradas.
- 4.2.2. Avaliar a eficácia da *A. annua*, administrada *per os* durante 56 dias em bovinos naturalmente infestados com *R. (B.) microplus*;
- 4.2.3. Avaliar a dinâmica populacional do *R. (B.) microplus* nas pastagens utilizadas para o experimento com bovinos;
- 4.2.4. Avaliar possíveis diferenças no ganho de peso entre os dois grupos de bovinos tratados com *A. annua*;
- 4.2.5. Avaliar o efeito na redução do número de ovos por grama de fezes (OPG) com administração, *per os*, de *A. annua* durante 30 dias em ovinos artificialmente infectados *H. contortus*..

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local de estudo.

Os estudos foram realizados na fazenda Canchim, sede da Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), localizada no município de São Carlos, a 22°01' Lat.S e 47°53' Long. W.Gr., com altitude de 856m. Estado de São Paulo. O índice pluviométrico 14592mm distribuídos, na sua maioria de outubro a março, caracterizam o clima em temperado, de inverno seco, com verão quente e úmido, tipo CWB, segundo classificação de KOEPPEN (1498). O solo predominante corresponde a 2660 há é do tipo latossolo vermelho-amarelo e latossolo vermelho-escuro, com textura argilosa, pH variando de 4,5 5,2.

Os bovinos e ovinos fazem parte do rebanho experimental e foram previamente vacinadas contra as principais enfermidades de importância sanitária, às duas categorias de animais envolvidos. Os animais selecionados estavam isentos de tratamentos com antiparasitário nos 40 dias anteriores ao início do estudo.

5.2. Coleta da planta e quantificação da artemisinina

A. annua foi cultivada, coletada e analisada em Paulínia, estado do São Paulo, no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP. Coordenadas “geográficas: Latitude: 22°45'40”S. e Longitude: 47°09'15”W ,Altitude: 590m.

Extração: extratos foram obtidos a partir de 0,500g de folhas secas e moídas com 3 extrações com 5 mL de metanol, em Ultra Turrax marca Quimis, por 3 minutos a 10000 rpm em temperatura ambiente. O extrato foi filtrado a vácuo em funil de placa porosa e evaporado a securo.

Extração da fase sólida-Limpeza (CELEGHINI et al, 2006): os cartucho de florisil (8B-SO13-HCH phenomenex), foram conectados ao Manifold e condicionados com 10 mL de hexano, em seguida introduziu-se o extrato dissolvido em 2 mL de diclorometano, diluindo com 3 mL de hexano e 60 mL de diclorometano, coletando as frações separadamente. A fração de diclorometano foi evaporada à securo e ressuspendida em balão volumétrico de 5 mL com metanol grau CLAE. As amostras foram filtradas (membranas durepore PVDF 0,45µm Millipore) e analisadas em triplicata por cromatografia líquida de alta eficiência com índice de refração (CLAE/IR).

Quantificação da artemisinina (CELEGHINIetal., 2009): os extratos foram dissolvidos em balão volumétrico de 5 mL com metanol grau cromatográfico, filtrados (membrana Millex 0,45 µm Millipore JBR6. 10222) e analisados por CLAE-IR. A

fase móvel utilizada foi H₂O. Metanol na proporção de 60:40, filtrado (filtro Millipore de 0,45 µm) e sonificada sob vácuo, modo isocrático com vazão de 1 mlmin⁻¹. A curva analítica foi obtida pesando-se 65 mg do padrão de artemisinina com 94% de pureza, em balão volumétrico de 25 mL dissolvido em metanol grau cromatográfico até completar o volume, obtendo de uma solução de estoque de concentração 2444 µg/mL que foi distribuído numa faixa de concentrações variando de 50 a 1250 µg/mL, totalizando 7 pontos da curva analítica, que foram injetados em triplicata, a curva foi obtida através do software Empower.

5.3. Experimento I – Administração de *Artemisia annua* na alimentação de bovinos de corte para controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*:

5.3.1. Delineamento experimental

Foram selecionados 20 bovinos da raça Canchim (3/8 zebu x 5/8 charolês, com média de 250 kg, infestados naturalmente por carrapatos *R. (B.) microplus*. Cinco dias antes do tratamento estes animais foram mantidos em piquetes por grupos (dois Grupos Experimentais: A - Não tratado e B - Tratado), onde o estudo foi conduzido, a partir do dia zero (D-0).

O grupo A, permaneceu em piquete isolado sub-divididos em 12 piquetes menores para rotação a cada 3 dias e recebeu apenas suplementação composta por 100 g de soja e 300 g de milho/animal em cocho coletivo, além de água e sal mineral *ad libitum*. O grupo B (tratado) também foi mantido em outro piquete sub-divididos e recebeu durante 30 dias seguidos 200 g de *A. annua*, 100 g de soja e 300 g de milho/animal em cocho coletivo. Para a formação dos grupos, os 20 animais pré-selecionados foram distribuídos homogeneamente entre os dois grupos de acordo com as contagens de fêmeas ingurgitadas medindo entre 4,5 e 8 mm, presentes no lado esquerdo de cada animal, nos 3 dias anteriores ao tratamento (-3, -2, -1).

Os dois grupos de animais também tinham peso médio semelhante: 249,4 kg o grupo controle e 251,8 kg o grupo tratado. Após a distribuição dos animais, estes foram imediatamente direcionados aos respectivos piquetes sob as mesmas condições ambientais e o Grupo B (tratado) ficou recebendo por uma semana a metade da dose *A. annuano* cocho (100 g/animal) correspondendo ao período de adaptação já que a planta possui baixa palatabilidade. Após a semana de adaptação do grupo B, foi iniciado o tratamento na dose proposta (200 g/animal/dia) e procederam-se às contagens nos dias

3, 7 e, semanalmente, até o final do experimento (WHARTON et al., 1970).

5.3.2. Colheita das amostras

Para realização dos exames hematológicos, aproximadamente 10 mL de sangue foram colhidos de via endovenosa, em tubos contendo anticoagulante (EDTA). As amostras foram colhidas nos dias zero (antes do tratamento), 30 e 60 pós-tratamento e submetidas à quantificação do volume corpuscular médio (VCM) pela hematocritometria. Todos os bovinos foram pesados nos dias zero, 30 e 60 pós-tratamento.

5.3.3. Avaliação da infestação de larvas na pastagem

Para avaliar a infestação das pastagens com larvas do carrapato foi utilizada a técnica estatística do quadrado (1 m²), que foi demarcado aleatoriamente em cada pasto. Todas as hastes de gramínea contendo larvas do carrapato, dentro de cada quadrado, foram coletadas em saco de plástico e levadas ao laboratório, onde foi realizado a sua contagem, segundo metodologia descrita por BASSO et al. (2005). Para determinação do grau de infestação das gramíneas, as coletas e contagem das larvas ocorreram a cada 15 dias a partir do início do tratamento.

5.3.4. Análise estatística

Os dados referentes às contagens de fêmeas no lado esquerdo de cada animal foram transformados em log (contagem+1) para atender as prerrogativas de normalidade e homogeneidade de variâncias, posteriormente analisados em parcelas subdivididas e empregando a metodologia de modelos mistos. O valor da probabilidade do teste F ficou subestimado para o fator tempo e interação tratamento*tempo e as comparações múltiplas dos grupos experimentais foram aferidas pelo teste t ao nível de 95% de confiança (SAS, 2002-2004).

5.4. Experimento II – Administração de *Artemisia annua* na alimentação de ovinos para o controle de *Haemonchus contortus*

5.4.1. Delineamento experimental

Foram selecionados 24 ovinos machos da raça Santa Inês com média de 20 kg. Durante o período de estudo, os ovinos receberam diariamente alimentação composta por feno de tifton *ad libitum* e 200 g do alimento concentrado por animal dia. Os animais

receberam o tratamento antiparasitário contendo albendazol e levamisol na dose 10 mg/kg para remover a infecção natural.

A infecção artificial por helmintos foi realizada via oral com a administração de 4.000 larvas L₃ de *H. contortus* do isolado Embrapa 2010 caracterizado como resistente aos benzimidazóis, lactonas macrocíclicas (CHAGAS et al., 2013).

Vinte e oito dias após a infecção, os cordeiros foram pesados e as contagens de ovos por grama de fezes (OPG) realizado para alocar os animais em gaiolas metabólicas individualizadas durante todo o período experimental.

Para a composição dos grupos experimentais foram realizadas contagens consecutivas de OPG durante três dias anteriores ao tratamento. Pelas médias destas contagens os ovinos foram distribuídos uniformemente em quatro grupos de 6 animais:

Grupo I: controle negativo

Grupo II: controle positivo, levamisol na dosagem 10mg/Kg/pv.

Grupo III: 0,2%/pv durante 30 dias seguidos de *A. annua* a 10%

Grupo IV: 0,4%/pv durante 30 dias seguidos de *A. annua* a 20%.

5.4.2. Colheita de amostras e exames clínicos

As contagens de OPG foram realizadas nos dias -3, -2, -1, 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 e 28 pós-tratamento GORDON & WHITLOCK (1939). A partir dos resultados coprológicos obtidos, foram calculados os percentuais de eficácia terapêutica de *A. annua*, bem como de redução de OPG, de acordo com as médias aritméticas (WOOD et al., 1995; VERCRUYSSSE et al., 2001):

$$\% \text{ Eficácia OPG} = \frac{\text{OPG do grupo controle} - \text{OPG do grupo tratado}}{\text{OPG do grupo controle}} \times 100$$

PG do grupo controle

5.4.3. Análise estatística

Os dados referentes ao OPG foram transformados em log (contagem+1), posteriormente analisados em parcelas subdivididas e empregando a metodologia de modelos mistos pelo teste t ao nível de 95% de confiança (SAS, 2002-2004).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análise de teor de artemisinina do material vegetal utilizados nos experimentos

A análise fitoquímica de *A. annua* evidenciou presença de artemisinina a uma concentração média de 0,95% ($\pm 0,06$) ou 479 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1). Isso denotou que cada 100 g de material vegetal seco, possuía 0,95 g de artemisinina. Como cada bovino recebeu cerca de 200 g de *A. annua* por dia, pôde-se estimar que ingeriram cerca de 1,9 g de artemisinina/dia.

Por ter sido utilizado um genótipo de *A. annua* produzido com melhoramento genético no CPQBA/UNICAMP, a quantificação demonstrou elevada concentração de artemisinina (1,9/200 g).

Optou-se por avaliar a planta seca misturada ao alimento, pois esta mimetizou a forma mais prática de uso futuro da tecnologia, caso os resultados fossem positivos.

Tabela 1. Concentrações de artemisinina em amostras de *Artemisia annua* analisadas por HPLC-IR.

Amostra	Peso (mg)	Volume (mL)	Conc. $\mu\text{g/mL}$	(%) p/p	Média	Desvio Padrão	CV (%)
1-A – HPLC-IR	250	5	487,841	0,98			
1-B – HPLC-IR	251	5	481,932	0,96	0,96	0,010	1,03
1-C – HPLC-IR	251,6	5	481,649	0,96			

6.2. Efeito da dieta com *A. annua* em bovinos infestados naturalmente com carrapatos *R. (B.) microplus*.

Não foi observado aumento do desempenho dos bovinos, medido pelo ganho em peso médio diário e desempenho ponderal. Na média, foi de 0,910 kg/dia de ganho em peso diário no grupo controle e de 0,898 kg/dia no tratado. Não houve diferença ($P \geq 0,05$) significativa nesse estudo, mostrando que é possível obter bom desempenho semelhante em ambos os grupos ao longo de todo o período experimental (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados das pesagens dos bovinos dos grupos controle e tratado com *A. annua*; Médias aritméticas; EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.

	Grupo	Dia-3	Dia 7	Dia 28	Dia 56
Mínima	Controle	169,50	185,50	189,00	207,50
Máximo		367,50	395,50	423,00	440,00
Desvio Padrão		78,33	83,32	90,69	95,07
Média		249,40 ^a	268,90 ^a	283,60 ^a	303,10 ^a
Mínima	Tratado	162,00	170,05	176,00	194,00
Máximo		379,50	399,50	416,00	437,00
Desvio Padrão		85,74	90,70	95,33	99,56
Média		251,80 ^a	268,55 ^a	283,60 ^a	304,10 ^a

Na Tabela 3, demonstra-se que não foram observadas diferenças entre os valores de hematócrito dos animais controle quando comparados aos tratados. Com os valores médios encontrados no dia -3 foram de 33,5% no grupo controle e 33,0% no grupo tratado. Todos os valores do hematócrito ao longo do experimento encontram-se dentro dos limites para a espécie bovina o que denota não haver ação da artemisina sobre esse parâmetro biológico.

Tabela 3: Valores hematológicos do referente ao Volume Corpuscular Médio (VCM) dos bovinos pertencentes aos grupos controle e tratado com *A. annua*; Médias aritméticas; EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.

	Grupo	Dia-3	Dia 28	Dia 56
Mínima	Controle	30,00	30,00	31,00
Máximo		39,00	42,00	42,00
Desvio Padrão		3,90	4,70	4,70
Média		33,50	35,10	37,20
Mínima	Tratado	25,00	30,00	30,00
Máximo		37,50	44,00	41,00
Desvio Padrão		4,05	4,45	4,09
Média		33,00	35,60	34,90

Nos resultados ilustrados na Figura (2) e expressos nas Tabelas 4 e 5, pode-se observar as contagens médias de carrapato inicial e posteriormente ao tratamento. Na análise dos dados, não foi observada diferença significativa numérica e estatística entre as médias de fêmeas ingurgitadas contadas no lado esquerdo dos animais do grupo tratado (46,7, 3,8, 13,5, 9,6, 35,2, 23,0, 34,7, 13,9, 31,8, 57,6 e 21,3) e do grupo controle (46,4, 2,3, 18,0, 14,5, 32,7, 23,3, 28,7, 22,4, 51,2, 41,1 e 29,9).

No teste *in vivo* não foi observada redução significativa da carga parasitária dos bovinos tratados. Optou-se por avaliar a planta seca misturada ao alimento, pois esta pareceu ser a forma mais prática de uso futuro da tecnologia, caso os resultados fossem

positivos. A inexistência de baias individuais inviabilizou a medida do consumo individual, mas o objetivo prático do trabalho foi alcançado, já que a redução da carga parasitária de alguns animais provocaria a redução da média das contagens de carrapatos *R. (Boophilus) microplus*. (B) *microplus*.

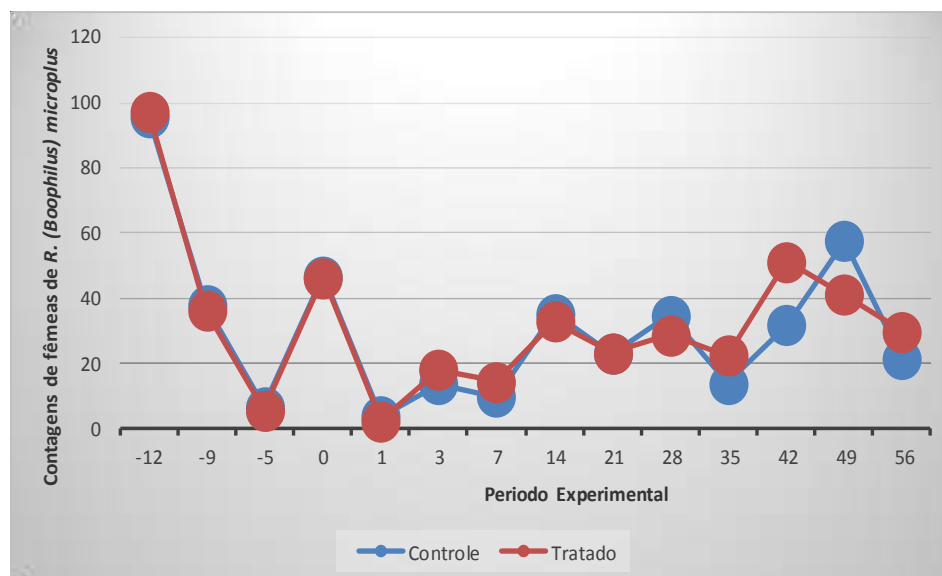


Figura 1: Contagens de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (entre 4,5 e 8,0 mm de comprimento) em bovinos pertencentes aos grupos controle e tratado: EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.

Tabela 4. Contagens de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (entre 4,5 e 8,0 mm de comprimento) do lado esquerdo em bovinos pertencentes aos grupos controle e tratado, realizadas do dia zero ao dia 56: EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.

Grupo		0	1	3	7	14	21	28	35	42	49	56
Controle	Desvio Padrão	38,1	2,9	11,3	4,7	16,3	12,1	15,7	10,5	21,4	35,1	9,4
	Média	46,7	3,8	13,5	9,6	35,2	23,0	34,7	13,9	31,8	57,6	21,3
	Total	467,00	38,00	135,00	96,0	352,0	230,0	347,0	139,0	318,0	576,0	213,0
Tratado	Desvio Padrão	26,2	1,6	10,0	9,6	26,4	21,2	12,3	11,7	20,5	15,4	14,3
	Média	46,0	2,3	18,0	14,5	32,7	23,3	28,7	22,4	51,2	41,1	29,9
	Total	464,0	23,0	180,0	145,0	327,0	233,0	287,0	224,0	512,0	411,0	299,0

Tabela 5. Resultados das comparações múltiplas das contagens de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (dados transformados em $\log(\text{contagem}+1)$): EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.

Período Experimental		Grupos Experimentais/Médias e Desvios Padrões ¹		Análise de Variância	
Dias	Controle	Artemisia	Valor de F	Pr < F	
0	1,8468 ± 0,3820 Aa	1,8965 ± 0,3238 Aa	0.16	0.6901	
3	1,4503 ± 0,3668 Abcd	1,5335 ± 0,1906 Ab	0.45	0.5046	
7	0,7468 ± 0,3903 Ae	0,7364 ± 0,3435 Ae	0.01	0.9334	
21	0,9810 ± 0,2164 Ae	1,1113 ± 0,2791 Ad	1.10	0.2965	
35	1,3221 ± 0,2533 Abcd	1,2827 ± 0,2981 Acd	0.10	0.7520	
42	1,5016 ± 0,2453 Aabc	1,4353 ± 0,1969 Acd	0.28	0.5948	
49	1,0793 ± 0,3046 Bde	1,3183 ± 0,2235 Acd	3.69	0.0564	
56	1,4512 ± 0,2415 Babcd	1,6812 ± 0,1986 Aab	3.41	0.0663	
63	1,6752 ± 0,3284 Aab	1,5930 ± 0,1852 Aab	0.44	0.5098	
70	1,3060 ± 0,2140 Acd	1,4409 ± 0,2268 Abc	1.18	0.2798	
Análise de Variância	Valor de F	13,92	13,31		
	Pr < F	<0,0001	<0,0001		

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t ($P \geq 0,05$)

6.3. Efeito da dieta com *A. annua* em bovinos naturalmente infestados por *R. (B). microplus* na dinâmica populacional do ixodídeo no pasto

As médias das 4 contagens de larvas de *R. (B). microplus* nos piquetes também não diferiram entre grupo tratado (71,6; 86,7; 4,6; 77,8) e o grupo controle: (59,3; 81,6; 6,2; 51,5) (Tabela 6). A altura das gramíneas nos respectivos grupos foi em média de 67 e 64 cm durante o período experimental (Tabela 7).

Tabela 6.Contagens de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* realizadas nos dias 7, 21, 35 e 49 pós início do tratamento, nos piquetes experimentais. Médias Aritméticas. EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011.

	Grupo	7	21	35	49
Desvio Padrão	Controle	66,1	63,6	9,7	86,1
Média		59,3	81,6	6,2	51,5
Desvio Padrão	Tratado	71	42,3	6,3	173,2
Média		71,6	86,7	4,6	77,6

Tabela 7.Altura (cm) da forragem realizadas nos dias 7, 21, 35 e 49 pós início do tratamento, nos piquetes experimentais; EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011

	Grupo	7	21	35	49
Desvio Padrão	Controle	31,9	22,2	12,7	23,0
Média		81,8	60,1	55,3	58,6
Desvio Padrão	Tratado	31,4	25,5	15,7	11,9
Média		76,4	70,5	59,5	62,8

No caso do carrapato *R. (B.) microplus*, após a ineficácia verificada *in vitro* (CHAGAS et al., 2012), investigou-se quanto ao modo de ação da artemisinina, pois uma ação indireta, ou seja, não por contato com a cutícula e sim pela ingestão, justificaria a continuidade do estudo por meio de experimentos a campo. Derivados desprovidos de ligação peróxido, como a deoxiartemisinina, são considerados completamente inativos sobre parasitas.

Dessa forma, o agrupamento fundamental que confere atividade à artemisinina, e mesmo às substâncias sintetizadas, é a ligação peróxido (KLAYMAN, 1985; MESHINICK et al., 1996). Os endoperóxidos são classificados como agentes esquizonticidas sanguíneos no caso do controle de *Plasmodium* spp. na malária (TARANTO et al., 2006). Supostamente a artemisinina exerce o seu efeito reagindo com os grupos heme das moléculas de hemoglobina digeridas pelos parasitas, alterando a estrutura celular e suas funções, através dos radicais livres derivados da artemisinina e, com isso, prejudica o crescimento e a reprodução dos parasitas (WRIGHT; WARHURST, 2002 apud FERREIRA; GONZALEZ, 2008).

6.4. Ação de *A. annua* administrada sobre o OPG de ovinos infectados artificialmente por *H. contortus*

Na tabela (8) está ilustrado os resultados percentuais de redução nas contagens de ovos nas fezes de ovinos.

Tabela 8. Contagens de ovos por grama de fezes em ovinos pertencentes aos grupos controle e tratado; EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil. 2011

		Dia Pós-tratamento/contagem OPGs								
Grupo		D0	D3	D7	D10	D14	D17	D21	D24	D28
Mínima	Controle +	250,00	0,00	0,00	0,00	0,00	50,00	150,00	250,00	50,00
Máximo		3700,00	700,00	1200,00	950,00	850,00	1000,00	1100,00	1300,00	850,00
Desvio Padrão		1196,56	273,25	449,91	351,31	348,45	518,33	439,79	507,36	382,10
Média		1625,00	366,67	491,67	308,33	391,67	566,67	491,67	658,33	450,00
Mínima	Controle -	50,00	350,00	1150,00	1300,00	750,00	1400,00	250,00	200,00	150,00
Máximo		4400,00	5500,00	9500,00	7100,00	12700,00	10250,00	8750,00	7000,00	10750,00
Desvio Padrão		1529,30	2111,73	3126,25	2442,54	4719,64	3558,29	3588,14	2425,16	3830,07
Média		1625,00	2858,33	4341,67	4150,00	4900,00	4441,67	4525,00	4391,67	4508,33
Mínima	Artemisia 10%	100,00	350,00	550,00	1800,00	950,00	200,00	450,00	450,00	500,00
Máximo		3350,00	3800,00	2850,00	6050,00	6950,00	7100,00	4300,00	4050,00	4600,00
Desvio Padrão		1121,35	1491,98	1835,76	1646,03	2702,53	2509,91	1398,45	1319,72	1680,00
Média		1908,33	2000,00	2900,00	3441,67	3816,67	3566,67	2483,33	2083,33	2541,67
Mínima	Artemisia 20%	750,00	950,00	1200,00	2400,00	3700,00	2200,00	250,00	50,00	500,00
Máximo		4450,00	5550,00	5900,00	8450,00	6650,00	9350,00	6150,00	6350,00	6200,00
Desvio Padrão		1341,52	1710,77	1960,78	2564,70	1114,34	2738,14	2444,26	2456,10	2126,26
Média		2083,33	2275,00	3383,33	5666,67	5225,00	5341,67	3591,67	3591,67	2850,00

As médias do grupo controle positivo foram: (1625,00 366,67 91,67 308,33 391,67 566,67 491,67 658,33 450,00). Grupo controle negativo: (1625,00 2858,33 4341,67 4150,00 4900,00 4441,67 4525,00 4391,67 4508,33). Grupo Artemisia 10%: (1908,33 2000,00 2900,00 3441,67 3816,67 3566,67 2483,33 2083,33 2541,67). Grupo Artemisia 20%: (2083,33 2275,00 3383,33 5666,67 5225,00 5341,67 3591,67 3591,67 2850,00).

No dia zero do experimento os ovinos artificialmente infectados com *H. contortus* apresentaram contagens médias de OPG estatisticamente iguais (Controle Positivo = 1625) (Controle Negativo = 1625), (Artemisia 10% = 1908) (Artemisia 20% = 2083) (Tabela 8). Pode-se observar que houve diferença significativa numérica e estatística quanto às contagens médias dos percentuais de redução de ovos excretados nas fezes dos ovinos, no dia 24 pós tratamento, para os grupos tratados com Artemisia 10% e Artemisia 20%. O grupo controle positivo tratado com levamisol 10 mg/kg deferiu em todos as datas experimentais do grupo controle negativo (Tabela 9, Figura 3).

A atividade anti-helmíntica de *A. annua* 20% demonstrou uma redução significativa na eficácia média aritmética do OPG. O Gráfico 3, mostra uma diminuição na média do OPG do 3º ao 28º dia pós tratamento. A eficácia máxima foi verificada no 28º dia para o extrato de *A. annua* 10% (37%) e no 24º dia para a *A. annua* 20% (50%) (Figura, 3). No D0 a comparação das médias de OPGs entre os grupos controle, levamisol apresentou diferença, ocorrendo o oposto para o grupo tratado com levamisol, o grupo tratado com *A. annua* 20% usando esta observação manteve-se até ao dez dias após

tratamento com eficácia máxima de 30%, dezessete dias pós o tratamento apresentou aumento na eficácia chegando em 50%. Entre o grupo artemisia 20% e 10% e levamisole houve diferença significativa numérica e estatística (Tabela 8 e 9). Podemos notar que, o grupo tratado com *A. annua* 2% apresentou contagens medias maiores que todos os respectivos grupos em três datas experimentais.

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. No presente estudo a atividade anti-helmíntica não foi observada significância numérica e estatística.

Em Estudo semelhante realizado por Idris et al. (1982) foram fornecidas para caprinos artificialmente infectados por *H. contortus*, doses de 2 a 30 g de *A. herba-alba* observou-se redução do OPG, de adultos no abomaso, bem como de lesões histológicas e alterações sanguíneas. No estudo de Cala et al. (2012), os ovinos consumiram 100 mg/kg peso vivo e apresentaram 31% de redução do OPG, enquanto no grupo controle o OPG elevou-se a 96%. Ademais, em ovelhas que receberam o extrato bruto etanólico e o metanólico de *A. brevifolia* por 14 dias, em dose de 3 g/kg de pv, detectou-se 67% e 62% de redução do OPG, respectivamente (IQBAL et al., 2004). Os extratos brutos aquosos e etanólico de *A. absintium* foram administrados via oral em ovinos infectados, e observou-se elevada redução do OPG: 80% na dose de 2 g/kg pv e, 83% a 1 g/kg pv (TARIQ et al., 2009).

Os parasitas gastrintestinais, principalmente *H. contortus*, causam severa depressão da capacidade digestiva e de absorção dos nutrientes pela mucosa intestinal levando a anemia e desencadeando altos índices de morbidade e mortalidade, especialmente nos rebanhos ovinos. A artemisinina tem sido extensivamente investigada quanto ao seu mecanismo de ação, aspectos clínicos e farmacológicos em nematoides gastrintestinais (KEISER et al., 2006, 2008; EKANEM e BRISIBE, 2010).

Tabela 9. Resultados das comparações múltiplas das contagens de ovos por gramas de fezes (dados)

Período Experimental	Grupos experimentais / Médias e Desvios-Padrão				Análise de Variância	
	Positivos	Negativos	Artemisia 10%	Artemisia 20%	Valor de F	Pr<F
0	3,085 ± 0,404 Aa	2,940 ± 0,677 Aa	3,114 ± 0,560 Aa	3,246 ± 0,278 Aa	0,25	0,8606
3	2,139 ± 1,089 Ba	3,304 ± 0,455 Aa	3,161 ± 0,421 Aa	3,275 ± 0,279 Aa	4,97	0,0025
7	2,222 ± 1,133 Ba	3,531 ± 0,349 Aa	3,348 ± 0,389 Aa	3,457 ± 0,288 Aa	6,08	0,0006
10	2,007 ± 1,053 Ba	3,534 ± 0,318 Aa	3,497 ± 0,203 Aa	3,710 ± 0,222 Aa	10,05	<0,0001
14	2,097 ± 1,119 Ba	3,471 ± 0,510 Aa	3,459 ± 0,385 Aa	3,710 ± 0,094 Aa	8,62	<0,0001
17	2,533 ± 0,540 Ba	3,528 ± 0,355 Aa	3,366 ± 0,562 Aa	3,672 ± 0,253 Aa	4,17	0,0070
21	2,225 ± 1,134 Ba	3,439 ± 0,585 Aa	3,306 ± 0,350 Aa	3,355 ± 0,569 Aa	5,27	0,0017
24	2,670 ± 0,433 Ba	3,471 ± 0,583 Aa	3,222 ± 0,349 ABa	3,267 ± 0,802 ABa	1,88	0,1347
28	2,149 ± 1,147 Ba	3,403 ± 0,660 Aa	3,291 ± 0,381 Aa	3,326 ± 0,397 Aa	5,71	0,0009
Valor de F ^{2b}	1,95	0,57	0,26	0,63		
Pr < F ^{3b}	0,0554	0,8041	0,9774	0,7528		

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t (P≥0,05)

2: Valor do teste F

3: Probabilidade de significância de F

a: Desdobramento dos grupos experimentais dentro de cada data.

b: Desdobramento das datas dentro de grupo experimental.

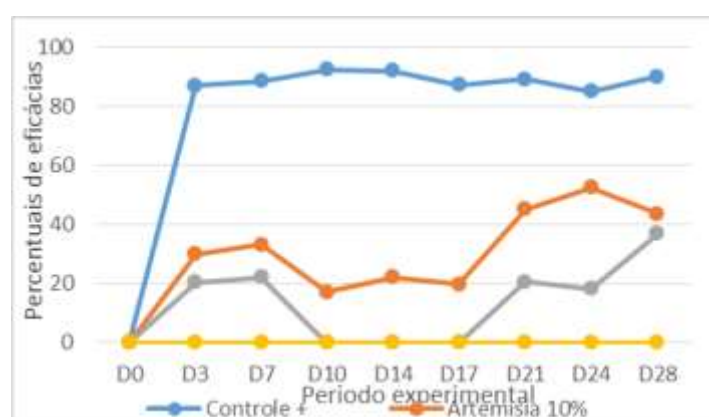


Figura 3. Eficácia média das reduções dos ovos por grama de fezes (OPG) dos ovinos infectados artificialmente com *Hamonchus. contortus* e tratados com *Artemisia annua* via

Apesar de inúmeros estudos com artemisinina terem mostrado efeito sobre uma variedade de parasitas, tais como nematoides gastrintestinais, *Fasciola hepática*, *Plasmodium* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp., *Neospora caninum* e *Schistosoma* spp., e de estar sendo testada com sucesso no tratamento do câncer (FERREIRA, 2007), a mesma não apresentou atividade anti-helmíntica no fornecimento *per os* sobre ovinos artificialmente infectados *H. contortus*. Dessa forma, a hipótese da eficácia do agrupamento fundamental que confere atividade à artemisinina no presente estudo não apresentou ser eficiente. Os endoperóxidos são classificados como agentes esquizotocidas sanguíneos no caso do controle de *Plasmodium* spp. na malária (TARANTO et al., 2006). Supostamente a artemisinina não exerce o seu efeito contra o *H. contortus*. Elucidando a hipótese da reação com os grupos heme das moléculas de hemoglobina digeridas pelos parasitas, alterando a estrutura celular e suas funções, através dos radicais livres derivados da artemisinina e, com isso, prejudica o crescimento e a reprodução dos parasitas (WRIGHT; WARHURST, 2002 apud FERREIRA; GONZALEZ, 2008). Entretanto, além do mecanismo alimentar, que permite o rompimento da ponte peróxido, outros também podem estar envolvidos, pois constatou-se ação da artemisinina no parasita não hematófago de camundongo *Echinostoma caproni*. Se o modo de ação da artemisinina sobre o parasita fosse indireta, ou seja, prejudicando sua reprodução, por exemplo, sua eficácia sobre as fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* estaria condicionada à sua ingestão através do sangue. O mesmo foi afirmado para nematoides gastrintestinais (FERREIRA et al., 2006).

6. CONCLUSÃO

Foi possível concluir que a concentração de artemisinina nas amostras de *Artemisia. annua* administradas *per os* apresentou elevado teor do princípio ativo. Quando fornecidas via alimentação aos bovinos naturalmente infestados por *Rhipicephalus. (Boophilus) microplus*, não apresentou ação carrapaticida, não elucidando a possível hipótese de ação indireta da artemisinina na dose avaliada. Quanto ao consumo de *A. annua* em ovinos artificialmente infestados também não demonstrou atividade vermífida sobre *Haemonchus. contortus*.

6.REFERENCIAS

ALLEN, P. C.; LYDON, J.; DANFORTH, H. D. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. **Poultry Science**, Savoy, v.76, p.1156-1163, 1997.7

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**, Amsterdam, v.120, p.91-106, 2004.

AROSEMENA, N. A. E.; BEVILAQUA, C. M. L.; MELO, A. C. F. L.; GIRÃO, M. D. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid areas in Brazil. **Revue Médecine Vétérinaire**, Toulouse, v. 150, p. 873-876. 1999.

AVERY, M. A. ALVIM-GASTON, M., RODRIGUES, C.R., Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 7. Direct modification of (+)-artemisinin in vivo antimalarial screening of new, potential reclinical antimalarial candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 45, p. 4321-4335, abr. 2002.

BARRETO, M.A.; SILVA, J.S. Avaliação da resistência de nematódeos gastrintestinais em rebanhos caprinos do Estado da Bahia – (Resultados Preliminares). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador : Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p.160.

BASSO, L.M.S.; MONTEIRO, A.C.; BELO, M.A.A.; SOARES, V.E.; GARCIA, M. V.; MOCHI, D.A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 595-600, 2005.

CALA, A. C.; CHAGAS, A. C. S.; FERREIRA, J. F. S.; GONZALEZ, J. M.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGGIO, M. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; SOUSA, I. M. O.; MAGALHÃES, P. M.; BARIONI-JÚNIOR, W. Anthelmintic activity of *Artemisia annua* L. extracts and artemisinin in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 2012. No prelo.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA L.S.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.154, p.167-170, 2008.

CARDOSO, P.C.S. **Avaliação *in vitro* dos possíveis efeitos mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos das drogas antimaláricas artemisinina e artemeter em linfócitos humanos**. 2012. 42 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia Celular) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

CELEGHINI, R.M.S.; SILVA A.P.; SOUSA, I.M.O.; FOGLIO, M.A.M. Evaluation of *Artemisia annua* L. clean-up methods for artemisinin quantification by HPLC. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, Botucatu, v.8, p.119-122, 2006.

CELEGHINI, R. M. S. et al. 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 usando extratos vegetais. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v.13, n.1, p.156-160, 2004.

CHAGAS, A.C.S.; OLIVEIRA, M.C.S.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A.; MAGALHÃES, P.M. **Parecer sobre a atividade antiparasitária de *Artemisia annua* sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em laboratório e a campo**. São Carlos:Embrapa Pecuária Sudeste, 2012. (Circular Técnica 69).

CHAGAS, A.C.S.; PASSOS, W.M.; PRATES, H.T.; FURLONG, J. E LEITE, R.C. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.39, p. 247-253, 2002.

CHAGAS, A.C.S.; KATIKI, L. M.; SILVA, I.C.; GIGLIOTTI, R.; ESTEVES, S.N.; OLIVEIRA, M.C.S.; BARIONI-JÚNIOR, W. *Haemonchus contortus*: A multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 62, p. 1-6, 2013.

CHENG, C.; NG D. S. W.; CHAN, T. K.; GUAN, S. P.; HO, W. E.; KOH, A. H.M.; IAN, H. Y.

A.; LAUWONGW. S. F. Anti-allergic action of anti-malarial drug artesunate in experimental mast cell-mediated anaphylactic models. **Allergy**, Copenhagen, v. 68, n.2, p.195–203, 2013.

CREEK, D. J.; CHIU, F. C. K.; PRANKED, R. J.; CHARMAN, S. A.; CHARMAN, W. N. Kinetics of iron-mediated artemisinin degradation: effect of solvent composition and iron salt. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 94, p. 1820-1829, 2005

DHINGRA, V.; RAO, K. V.; NARASU, M. L. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalarial drugs. **Life Sciences**, Oxford, v. 66, n. 4, p. 279-300, 2000.

DOS SANTOS, V.T.; GONÇALVES, P.C. Verificação de estirpe de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, Porto Alegre, v.9, p.201-209, 1967.

DOURADO, J. C. L. **Influência do sumo de melão-de-são-caetano (*Mormodica charantia*, L) sobre a atividade reprodutiva de teleóginas de *Boophilus microplus* , Canestrini, 1887**. 2001. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2001.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYATT, Z. N. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.25, p.512-518, 1964.

DU, J.H.; ZHANG, H.D.; MA, Z.J.; JI, K.M. Artesunate induces oncosis-like cell death in vitro and has antitumor activity against pancreatic cancer xenografts in vivo. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Baltimore, v.65, p.895–902, 2010.

EKANEM, A. P.; BRISIBE, E. A. Effects of ethanol extract of *Artemisia annua* L. against monogenean parasites of *Heterobranhus longifilis*. **Parasitology Research**, Berlin, v.106, p.1135-1139, 2010.

SANTOS, F.S.; VOGEL, F.S.F. Amitraz and cypermethrin resistance ticks *Rhipicephalus* (*Boophilus*)*microplus* cattle herds located in Rio Grande do Sul from 2005 to 2011. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.111, n.581-582, p.121-124, 2012.

FERREIRA, J. F.; RITCHEY, K. D.; CASSIDA, K. A.; TURNER, K. E.; GONZALEZ, J. M. Agrotechnological aspects of the anti-malarial plant *Artemisia annua* and its potential use in animal health in Appalachia. In: INTERNATIONAL CENTER FOR AGRICULTURAL RESEARCH IN DRY AREAS, INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PERFUME, 2006, Jerba. **Proceedings...** Jerba: CGIAR, 2006. p.797-804.

FURLONG, J. Controle do carrapato dos bovinos na região Sudeste do Brasil. **Caderno Técnico da Escola. Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, n.8, p.49-61, 1993.

GAZIM, Z.C.; DEMARCHI, I.G.; LONARDONI, M.V.C.; AMORIM, A.C.L.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M.; FERREIRA, G.A.; LIMA, E.L.; COSMO, F.A.; CORTEZ, D.A.G. Acaricidal activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari; Ixodidae). **Experimental Parasitology**, San Diego, v.129, p.175-180, 2011.

GONZÁLES, J. C.; SERRA-FREIRE, N. M. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.12, n.69, p.14-6, 1992.

GONZALES, J.C. **O carrapato do boi: vida, resistência e controle**. São Paulo: Mestre Jou, 1974. 101p.

GORDON, H. McL; WHITLOCK, A.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal Council Scientific Industry Research Australia**, Melbourne, v. 12, p. 50-52, 1939.

HAYNES, R. K.; VONWILLER, S. C. From Qinghao, marvelous herb of antiquity, to the antimalarial qinghaosu – and some remarkable new chemistry. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 30, p. 73-79, 1997.

IDRIS, U. A.; ADAM, S. E.; TARTOUR, G. The anthelmintic efficacy of *Artemisia herba-alba* against *Haemonchus contortus* infection in goats. **National Institute of Animal Health Quarterly**, Tokyo, v. 22, p. 138-143, 1982.

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.

JAIN, D.C.; MATHUR, A.K.; GUPTA, M.M.; SINGH, A.K.; VERMA, R.K.; GUPTA, A.P.;

KUMAR, S. Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.43, p.993-1001, 1996.

KEISER, J.; RINALDI, L.; VENEZIANO, V.; MEZZINO, L.; TANNER, M.; UTZINGER, J.; CRINGOLI, G. Efficacy and safety of artemether against a natural *Fasciola hepatica* infection in sheep. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, p. 517–522, 2008.

KEISER, J.; SHU-HUA, X., TANNER, M.; UTZINGER, J. Artesunate and artemether are effective fasciolicides in the rat model and in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 57, p. 1139-1145, 2006.

KIM, J.T.; PARK, J.Y.; SEO, H.S.; 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, n.1-2, p.53-63, 2002.

KLAYMAN, D, Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, Washington, v. 228, p. 1049-1055, 1985.

KLAYMAN, D.L. *Artemisia annua*: from weed to respectable antimalarial plant. In: BALANDRIN, A.D.K.A.M.F. (Ed.). **Human medicinal agents from plants**. Washington: American Chemical Society, 1993. p. 242-255.

KRECEK, R. C.; GROENEVELD, H. T.; VAN WIK, J. A. Effects of time of day, season and stratum on *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* third-stage larvae on irrigated pasture. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 40, p. 87-98. 1991.

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**, Tokyo, v.65, n. 11, p.1171-1177, 2003.

LA-SCALEA, M. A.; SILVA, H. S. R. C.; FERREIRA, E. I. Redução voltamétrica de artemisinina e sua interação com grupo heme (hemina). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 371-383, 2007.

LEE, M. R. ALVIM-GASTON, M., RODRIGUES, C.R., Plants against malaria part II: *Artemisia annua* (qinghaosu or the sweet wormwood). **Journal of**

theRoyal College of Physicians of Edinburgh, Edinburgh, v. 32, p. 300-305, 2002.

MARTINEZ, M.L.; DA SILVA, M.V.G.B.; MACHADO, M.A.; TEODORO, R.L.; VERNEQUE, R.S. A biologia molecular como aliada no combate aos carrapatos. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004. Pirassununga. **Anais...** p. 1-3.

MARTINEZ, S. S. **Composição do nim**. In: MARTINEZ, S.S. **ONim –Azadirachta indica**: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2002. p. 23-30.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M.; CASTILLO-HERRERA,G.A.; ROSARIO-CRUZ, R.; FLORES-FERNANDEZ, J.M.; LOPEZ-RAMIREZ, J.; HERNANDEZ-GUTIERREZ, R. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, Berlin, 108: 481-487.2011.

MELO, A.C.; BEVILAQUA, C.M. Abordagem genética da resistência anti-helmíntica em *Haemonchus Contortus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.100, n.555-556, p. 141-146, 2005.

MENDES, E.C.; MENDES, M.C.; SATO, E.Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, april 2013. No prelo.

MENDES, E. C. **Resistência do carrapato *rhipicephalus (boophilus) microplus* (acari:ixodidae) a amitraz e alternativas de controle com extratos vegetais e fungos entomopatogênicos**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio, São Paulo, 2011.

MESHINICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal for Parasitology**, Oxford,v. 32, n.13, p. 1655-1660, 2002.

MESHINICK, S. R.; JEFFORD, C. W.; POSNER, G. H.; AVERY, M. A.; PETERS, W. Second-generation antimamalarial endoperoxides. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 12, p. 79-82, 1996.

MOLENTO, M. B. Avanços no diagnóstico e controle das helmintoses em caprinos. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE CAPRINOCULTURA (SIMPAC), 1., 2005, Jaboticabal. **Anais...**Jaboticabal: FCAV/UNESP, 2005. p. 101-110.

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

OLIVO, C.J.; CARVALHO, N.M.; SILVA, J.H.S.; VOGEL, F.F, MASSARIOL, P.; MEINERZ, V.G.; AGNOLIN, C.; MOREL, A.F. E VIAU, V.F.V. Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p. 406-407, 2008.

ONYIAH, L. C.; ARSLAN, O. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. **Journal of Thermal Biology**, New York, v. 30, p. 203–211. 2005.

PEREIRA M.C.; LABRUNA M.B.; SZABÓ M.P.J; KLAFFE G.M.**Rhipicephalus (Boophilus) microplus**: biologia, controle e resistência. São Paulo: Medvet, 2008. 192p.2008.

RIBEIRO, V.L.S.; AVANCINI. C.; GONÇALVES, K.; TOIGO, E.; VON-POSER, G. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus* **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.151, p.351-354, 2011.

RODRIGUEZ, A.S.; RODRIGUEZ, C.M.; CRUZ, A.C. Efecto ixodicida de los extractos etanólicos de algunas plantas sobre garrapa- tas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista MVZ Córdoba**, Montería, v.15, p.2175-2184, 2010.

RODRIGUEZ, A.S.; RODRIGUEZ, C.M.; CRUZ, A.C. Efecto ixodicida de los extractos etanólicos de algunas plantas sobre garrapa- tas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista MVZ Córdoba**, Montería, v.15, p.2175-2184, 2010.

ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, Campo Grande, v.1, n.2, p.43-50, 2002.

ROSADO-AGUILA, J.A.; AGUILAR-CABALLERO, A.; RODRIGUEZ- VIVAS, R.I.; BORGES-ARGAEZ, R.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; MENDEZ-GONZALEZ, M. Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, 168: 299-303. 2010.

RUAS, J. L.; BERNE, M. E. A. Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos e ovinos. In: CORREA, F. R.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M.; DEL, C.; LEMOS, R. A. A. (Ed.). **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. v.2, p. 19-162.

SANGSTER, N.C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.98, p. 89-109, 2001.

SAS Institute. **SAS 9.1.3 help and documentation**. Cary, 2002-2004.

SCZESNY-MORAES, E. A.; BIANCHIN, I.; SILVA, F. K.; CATTO, B. J.; HORNER, R. M.; PAIVA, F. Resistência anti-helmíntica de nematódeos gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.30, n.3, p.229-236, 2010.

SILVA, H. S. R. C. **Antimaláricos potenciais: pró-fármacos poliméricos e formas de liberação controlada de artemisinina**. 209 f. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SILVA, W.C.; MARTINS, J.R.S.; SOUZA, E.M.; HEIZEN, H.; CESIO, M.V.; MATO, M.; ALBETRECHT, F.; AZEVEDO, A.L.; BARROS, N.M. Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest for the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.164, p.267-274, 2009.

SINGH, N. P.; LAI, H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells. **Life Science**, Oxford, v.70, 49-56, 2001

SMITH, T.; WEATHERS, P.J.; CHEETHAM, R.D. Effects of gibberellic acid on hairy root cultures of *Artemisia annua*: Growth and artemisinin production. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, Dordrecht, v.33, p.75–79, 1997.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. México: Nueva Editorial Interamericana, 1987. 782p.

SOUSA BRITO, A. R. M. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNIFESP, 2003. 590 p.

SQUIRES, J.M.; FOSTER, J.G.; LINDSAY, D.S.; CAUDELL, D.L.; ZAJAC, A.M., 2010. Efficacy of an orange oil emulsion as an anthelmintic against *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*) and in sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.172, p.95–99, 2010.

TARANTO, A. G.; CARNEIRO, J. W. M.; ARAUJO, M. T.; SILVA, B. M. Estudo sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos. **Sitientibus**, Feira de Santana, v. 34, p. 47-58, 2006.

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.

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

UHLEMANN, A. C. et al. A single amino acid residue can determine the sensitivity of SERCAs to artemisinins. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 12, n. 7, p. 628-629, 2005.

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.

VERCRUYSSSE, J. ALVIM-GASTON, M., RODRIGUES, C.R., International harmonisation of anthelmintic efficacy guidelines. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 96. p. 171-193, 2001.

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

WHARTON, R.H.; UTECH, K.B.W. The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus*(Canestrini) (Ixodidae) to the assesment of tick numbers on cattle. **Journal of the Australian Entomological Society**, v.9, p.171-182, 1970.

WOOD, I.B. ALVIM-GASTON, M., RODRIGUES, C.R., World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 58, n. 3, p. 181-213, 1995.

WOODROW, C. J.; HAYNES, R. K.; KRISHNA, S. Artemisinin. **Postgraduate Medical Journal**, London, v. 81, p. 71-78, 2004.

WU, Y. Commentary: How might qinghaosu (artemisinin) and related compounds kill the intraerythrocytic malaria parasite? A chemist's view. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 35, n. 5, p. 255-259, 2002.

YANG, D. M.; LIEW, F. Y. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitology**, Cambridge, v.106, p.7-11, 1993.