

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



**FACULDADE DE ENGENHARIA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

Aline Féboli

**ESTUDOS FITOQUÍMICOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTI-HELMÍNTICO DA *OPUNTIA FICUS-INDICA***

Ilha Solteira

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

ESTUDOS FITOQUÍMICOS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI- HELMÍNTICO DA *OPUNTIA FICUS-INDICA*

ALINE FÉBOLI

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia - UNESP – Campus de Ilha Solteira, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.
Área de conhecimento: Química dos Materiais

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela da Silva de Laurentiz

Ilha Solteira

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

F289e Féboli, Aline.
Estudos fitoquímicos e avaliação do potencial anti-helmíntico da opuntia ficus-indica / Aline Féboli. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2015
65 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais, 2015

Orientador: Rosangela da Silva de Laurentiz
Inclui bibliografia

1. Palma forrageira. 2. Fitoterapia. 3. Atividade anti-helmíntica. 4. Nematoides gastrointestinais.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ESTUDOS FITOQUÍMICOS E AVALIAÇÃO DO POTÊNCIAL ANTI-HELMÍNTICO DA
Opuntia ficus-indica

AUTORA: ALINE FÉBOLI

ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Materiais ,
Área: QUÍMICA DOS MATERIAIS, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ
Departamento de Física e Química / Unesp - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita
Filho"

Prof. Dr. LUCIANO ALVES DOS ANJOS
Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Profa. Dra. VANESSA DE ANDRADE ROYO
Departamento de Biologia Geral / Universidade Estadual de Montes Claros

Data da realização: 15 de junho de 2015.

DEDICO

Aos meus pais, por todo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, agradeço ao meu pai Gilson Antônio Féboli pela educação, por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida, por me incentivar e me educar sempre da melhor forma. Agradeço a minha mãe Sueli Ap. Frezarin Féboli, por todo amor, carinho, companheirismo e compreensão.

Agradeço a minha irmã Patrícia Féboli por fazer parte da minha vida e dos meus dias em Ilha Solteira, agradeço pela amizade, compreensão e companheirismo.

Ao Claudinei da Silva Martins, pela paciência, compreensão, amizade, amor e por me incentivar sempre que eu preciso.

À professora Rosângela da Silva de Laurentiz por me orientar, pela paciência, dedicação e pelo incentivo, por estar ao meu lado sempre que eu preciso e pelo tempo dedicado.

À Marina Laiz Sebastião Piza, Suelen Carolina e ao Jeferson Augusto, pelo trabalho realizado.

Aos Professores da pós-graduação pelo conhecimento adquirido.

Aos Professores e funcionários do DFQ pelo apoio e contribuição.

Aos colegas de Graduação e pós-graduação, pela amizade e companheirismo.

A todos meus amigos, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

E à CAPES pelo auxílio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)

RESUMO

A *Opuntia ficus-indica* (*O. ficus*), pertencente à família Cactaceae, é uma planta nativa do México e conhecida no Brasil como "palma forrageira". Esta planta apresenta propriedades medicinais interessantes. *O. ficus* tem um bom potencial nutritivo e é fácil cultivar, muito utilizada na alimentação de pequenos ruminantes especialmente em zonas áridas do nordeste do Brasil. Embora esta planta seja usada como alimento para ovinos, a literatura não contém quaisquer relatórios sobre as suas propriedades anti-helmínticas. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade ovicida e larvicida da *O. ficus* por meio dos extratos hidroalcoólicos de cladódios e frutos em ensaios de eclosão dos ovos (EHA), desenvolvimento larval (LDA) e migração larval (LMIA) usando ovos e larvas de nematoides gastrointestinais de ovinos naturalmente infectados. Para o EHA foi observada uma inibição da eclodibilidade de ovos maior do que 90% para ambos os brutos extratos dos cladódios e frutos na concentração de 50 mg/mL ou mais elevada ($p < 0,05$). Ambos os extratos mostraram uma resposta dose dependente com o mesmo valor de IC_{50} de 9,9 mg/mL. No LDA, o extrato hidroalcoólico bruto dos cladódios mostrou 98,7% de inibição do desenvolvimento das larvas a 12,5 mg/mL, enquanto o extrato hidroalcoólico bruto dos frutos apresentou 100% de atividade a 50 mg/mL, respectivamente, com um IC_{50} de 3,4 mg/mL e 3,7 mg/mL ($p < 0,05$). No LMIA, os resultados foram maiores do que 65% de inibição da migração das larvas na partir da concentração de 1,56 mg/mL com IC_{50} de 0,35 mg/mL e 0,76 mg/mL, respectivamente para os extratos brutos dos frutos e cladódios. O fracionamento dos extratos hidroalcoólicos brutos dos frutos e cladódios forneceu quatro frações. Entre os extratos fracionados, os extratos aquoso residual e em acetato de etila dos cladódios, na concentração mais baixa testada (1,56 mg / mL) resultou em 100% de inibição do desenvolvimento larval. O mesmo resultado foi obtido para extrato aquoso e em n-hexano dos frutos. Portanto, o IC_{50} para LDA não pôde ser calculado para estes extratos. O extrato em n-hexano dos cladódios não apresentou inibição da migração e desenvolvimento larval em qualquer concentração avaliada. Para os EHA os melhores resultados de inibição da eclodibilidade dos ovos para os extratos fracionados foram obtidos com ambos os extratos aquosos dos frutos e dos cladódios com IC_{50} de 1,5 mg/mL e 7,2 mg/mL, respectivamente. Os frutos e cladódios da *O. ficus* apresentaram perfis fitoquímicos semelhantes com a presença de alcalóides, taninos, flavonóides e saponinas em maiores quantidades. A análise dos dados a partir dos testes *in vitro* e da prospecção fitoquímica indicou um efeito somatório entre as atividades dos

fitoconstituintes; os taninos presentes nos extratos aquosos foram os fitoconstituintes que mais contribuíram para a ação anti-helmíntica da planta. Os resultados atestam que *O. ficus* apresenta significativa atividade ovicida e larvicida *in vitro* contra *Haemoncus contortus*, principal parasita encontrado nas fezes dos animais doadores, sugerindo que a planta além do seu potencial nutricional ainda pode ser uma aliada no controle de parasitas em ovinos.

Palavras-chave: Palma forrageira. Fitoterapia. Atividade anti-helmíntica. Nematoides gastrointestinais.

ABSTRACT

Opuntia ficus-indica (*O. ficus*), which is native to Mexico and is known as “palma forrageira” in Brazil, is a species belonging to the family Cactaceae. This plant displays interesting medicinal properties. *O. ficus* display good nutritional potential is easy to cultivate and is used as feed for small ruminants feed especially in arid areas of northeastern Brazil. Although this plant serves as food for sheep, the literature does not contain any reports on its anthelmintic properties. This paper reports on the ovicidal and larvicidal activity of *O. ficus* from hydroalcoholic extracts of cladodes and fruits through egg hatch assay (EHA), the larval development assay (LDA), and the larval migration assay (LMIA) using eggs and larvae of gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. For EHA was observed an egg hatch inhibition greater than 90% for both the crude extracts of cladodes and fruits when using a concentration of 50 mg/mL or higher ($p < 0.05$). Both extracts showed a dose-dependent response with the same value to LD₅₀ of 9.9 mg/mL. In the LDA, crude hydroalcoholic extract of cladodes showed 98.7 % of inhibition of larval development at 12.5 mg/ mL while the crude hydroalcoholic extract of fruits showed 100% at 50 mg/mL, respectively with an LD₅₀ of 3.4 mg/mL and 3.7 mg/mL ($p < 0.05$). In the LMIA, crude extracts showed results greater than 65% inhibition of larval migration at 1.56 mg/mL revealing LD₅₀ of 0.35 mg/mL and 0.76 mg/mL for the extract of fruit and cladodes, respectively. Fractionation of the crude hydroalcoholic extracts of fruits and cladodes yielded four fractions. Among the fractionated extracts, the residual aqueous and in ethyl acetate extracts of cladodes, in the lowest concentration tested (1.56 mg/mL) resulted in 100% inhibition of larval development. The same result was obtained for n-hexane and aqueous extract of fruits. Therefore, the LD₅₀ for LDA could not be calculated for these extracts. The n-hexane extract of cladodes failed to show inhibition of larval migration and development at any concentration explored. For EHA the better results of inhibition of egg hatching were obtained with both aqueous extracts of fruits and cladodes with LD₅₀ of 1.5 mg/mL and 7.2 mg/mL, respectively. The *O. ficus* fruits and cladodes presented a similar chemical profile: the phytoconstituents included alkaloids, tannins, flavonoids, and saponins. Analysis of the data from the *in vitro* tests and of the phytochemical screening of the fractionated extracts indicated a summation effect among the activities of the phytoconstituents; the tannins present in the aqueous extracts were the constituents that mainly accounted for the anthelmintic action of the plant. The results attested that *O. ficus* exhibits ovicidal and larvicide activities *in vitro* against *Haemoncus contortus*,

main parasites found in the feces of donor animals, suggesting that the plant beyond their nutritional potential can still be an ally in controlling parasites in sheep.

Keywords: Palma forrageira. Phytotherapy. Anthelmintic activity. Gastrointestinal nematodes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ovo de <i>Haemonchus contortus</i>	16
Figura 2- Larva de <i>Haemonchus contortus</i>	17
Figura 3- Verme adulto de <i>H. contortus</i>	18
Figura 4- Ciclo de vida do <i>H. contortus</i>	19
Figura 5- Esqueleto estrutural base dos principais metabólitos secundários (fitoconstituintes)	25
Figura 6- Espécie da <i>O. ficus</i> município Ilha Solteira– SP	27
Figura 7- Frutos da <i>O. ficus</i>	28
Figura 8- Etapas para coleta das fezes e separação dos ovos	32
Figura 9- Fluxograma da extração do extrato hidroalcoólico bruto com solventes de diferentes polaridades.....	39
Figura 10- Determinação do CI ₅₀ para o EC (A) e EF (B) a partir da % de inibição da eclodibilidade em função do log da concentração	44
Figura 11- Determinação do CI ₅₀ para o EC (A) e EF (B) a partir da % de inibição do desenvolvimento larval em função do log da concentração.	45
Figura 12- Determinação do CI ₅₀ para o EC (A) e EF (B) a partir da % de inibição da migração larval em função do log da concentração.	45
Figura 13- Determinação do CI ₅₀ para o EH, EA, ED e EHA dos cladódios a partir da % de inibição da eclodibilidade em função do log da concentração.	47
Figura 14- Determinação do CI ₅₀ para o EH, EA, ED e EHA dos cladódios a partir da % de inibição do desenvolvimento larval em função do log da concentração	47
Figura 15- Determinação do CI ₅₀ para o EH, EA, ED e EHA dos frutos a partir da % de inibição do desenvolvimento larval em função do log da concentração	48
Figura 16- Determinação do CI ₅₀ para o EH, EA, ED e EHA dos frutos a partir da % de inibição do desenvolvimento larval em função do log da concentração.	49
Figura 17- Estrutura geral de taninos hidrolisáveis (1) e condensados (2)	52
Figura 18- Larva infectante de <i>H. contortus</i>	53
Figura 19- Larvas infectantes de <i>H. contortus</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Resultados dos EHT, LDT e LMT para os extratos brutos dos frutos (EF) e cladódios (EC) da <i>O. ficus</i>	43
Tabela 2-Resultado dos EHT e LDT com os extratos particionados dos cladódios: fração em hexano (EH), fração em diclorometano (ED), fração em acetato de etila (EA) e fração aquosa (EHA).	46
Tabela 3-EHT e LDT com os extratos particionados dos frutos: fração em hexano (EH), fração em diclorometano (ED), fração em acetato de etila (EA) e fração aquosa (EHA).....	49
Tabela 4- Resultado da prospecção fitoquímica dos cladódios e da polpa dos frutos da <i>O. ficus</i>	51
Tabela 5- Composição bromatológica dos cladódios e frutos da <i>O. ficus</i> – matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), fibra bruta (FB).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI₅₀- Concentração inibitória 50%

DMSO-Dimetilsulfóxido

EA- Extrato em acetato de etila

EC- Extrato de cladódios

ED- Extrato em diclorometano

EF- Extrato do fruto

EH- Extrato em hexano

EHA- Extrato hidroalcoólico

EHT- Egg Hatch Test

EtOH- Etanol

et al. - (demais autores)

H₂SO₄- Ácido sulfúrico

H. contortus- *Haemonchus contortus*

HCl- Ácido Clorídrico

Kg- Kilograma

LDT- Larval Development Test

LMT-Larval Migration Test

Mg- Magnésio

NH₄OH- Hidróxido de amônio

O. fícus- *Opuntia fícus-indica*

OPG- Ovos por grama de fezes

PBS- Tampão fosfato salino

rpm- Rotação por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OVINOCULTURA	16
1.2	<i>H. CONTORTUS</i> E CICLO DE VIDA	18
1.2.1	Controle sanitário	19
1.2.2	Fitoterapia como tratamento para o controle da parasitose	20
1.3	FITOCONSTITUINTES	23
1.3.1	<i>Opuntia ficus-indica</i>	26
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	REAGENTES, MATERIAL BIOLÓGICO, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS	30
3.1.1	Reagentes	30
3.1.2	Materiais e equipamentos	30
3.2	COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS	30
3.2.1	Preparo das diferentes concentrações dos extratos	31
3.3	CONTROLES	31
3.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA	32
3.4.1	Coleta e separação de ovos	32
3.4.2	Teste de eclodibilidade de ovos (EHT)	33
3.4.3	Teste de desenvolvimento larval (LHT)	34
3.4.4	Teste de migração larval (LMT)	34
3.4.5	Determinação das espécies de helmintos presentes nas fezes utilizadas nos ensaios	35
4	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	35
4.1	ALCALOIDES	36

4.2	ANTRAQUINONAS	36
4.3	FLAVONOIDES	37
4.4	SAPONINAS.....	37
4.5	TANINOS	37
5	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	38
6	ANÁLISE CENTESIMAL E MINERAL DOS CLADÓDIOS E FRUTOS	39
7	ANÁLISES ESTATÍSTICA	41
8	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	42
9	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58

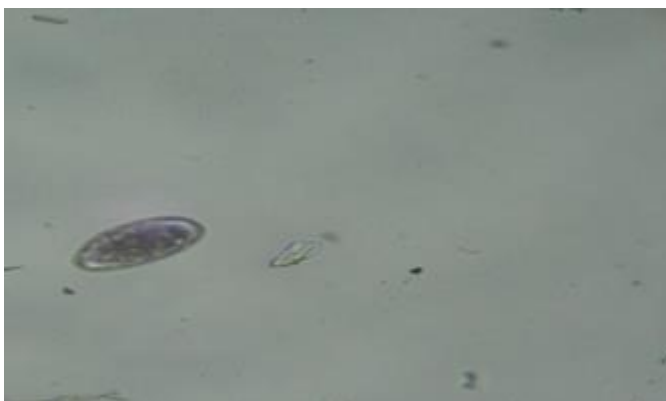
1 INTRODUÇÃO

1.1 OVINOCULTURA

A ovinocultura é uma das principais atividades pecuárias desenvolvidas no Brasil com um rebanho estimado em 14 milhões de animais. O aumento na criação de ovinos se deve principalmente ao aumento da comercialização de carne devido ao seu menor teor de gordura e à utilização do leite para a fabricação de queijos finos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA, 2013).

Embora a produção de ovinos seja uma atividade em expansão, sua produção é limitada, principalmente devido ao manejo sanitário inadequado dos animais, que conduzem a sérios problemas como infecção e infestação parasitária, diminuindo assim a produtividade do rebanho e com isso aumentam os custos para o produtor (ROBERTS, 1982). Dentre os parasitas que afetam ovinos e que ocasionam grandes prejuízos ao rebanho está o *Haemonchus contortus* (FIGURAS 1 e 2). Este parasita é hematófago e se aloja no abomaso ingerindo na forma adulta cerca de 0,05 mL de sangue por dia, desta forma, um ovino com infecção moderada (2000 vermes de *H. contortus*) pode perder de 5 a 7% do seu volume de sangue diariamente o que acarreta anemia, hipo-proteinemia e baixo ganho de peso. Os animais com grande infestação desse parasita geralmente vão a óbito (SOUZA et al., 2009).

Figura 1- Ovo de *Haemonchus contortus*



Fonte: Próprio autor.

Figura 2- Larva de *Haemonchus contortus*



Fonte: Próprio autor.

O método de controle dos nematoides gastrointestinais em ovinos deve ser realizado através de um manejo adequado de pastagem e por vermifugação realizada através de anti-helmínticos sintéticos, como: ivermectina, albendazol, oxfendazol, closantel, levamisole e moxidectina. Por décadas o uso indiscriminado desses vermífugos sem respeitar dose e critérios epidemiológicos acabou por selecionar parasitas resistentes agravando ainda mais o quadro da infestação (MELO et al., 2005).

Os primeiros relatos de resistência anti-helmíntica surgiram na década de 70 em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e na década de 90 no Brasil, nos estados do Rio Grande do Sul, Ceará, Bahia e Pernambuco (MELO et al., 2003). Relatos de resistência parasitária em vários locais do mundo evidenciou que esse é um problema em disseminação e não um problema local (MORAES et al., 2010).

O uso incorreto desses anti-helmínticos pode levar à contaminação de carne e leite que ao serem consumidos podem desencadear o surgimento de resistência parasitária de helmintos em humanos. Além disso, existe a preocupação com o risco ambiental devido à contaminação do solo pelas fezes e urina dos animais que contêm resíduos do metabolismo desses compostos (KELLAR, 1997; ATHANASIADOU et al., 2008).

Apesar da resistência parasitária, o controle sanitário ainda é feito essencialmente pelo uso dos anti-helmínticos sintéticos, entretanto, algumas alternativas têm sido estudadas com a

finalidade de propor novos métodos de controlar a infestação como o uso de plantas medicinais (SOUSA et al., 2013).

1.2 *H. CONTORTUS* E CICLO DE VIDA

A principal parasitose que acometem ovinos é a Hemoncose que é ocasionada por nematoides do gênero *Haemonchus*, que se alojam no abomaso dos animais, podendo ser observado a olho nu na sua forma adulta (FIGURA 3), pois seu tamanho varia de 1 a 2,5 cm de comprimento (VIEIRA, 1989).

Figura 3- Verme adulto de *H. contortus*



Fonte: Ray Kaplan (2014).

Este parasita pertence à Classe *Nematoda*, ordem *Strongylida*, Superfamília *Trichostrongyloidea*, Família *Trichostrongylidae*, Gênero *Haemonchus* (VIEIRA, 1989).

O parasita *H. contortus* possui um ciclo de vida evolutivo, onde há o desenvolvimento no hospedeiro, conhecido por fase parasitária e o desenvolvimento no ambiente externo do animal, denominado como fase de vida livre.

As fêmeas são ovíparas prolíferas. Assim que os ovos são eliminados nas fezes em temperatura ambiente (26°C) as larvas passam do primeiro estágio L1 para o estágio L3 na própria pastagem em aproximadamente cinco dias.

Em temperaturas mais baixas o desenvolvimento é mais lento, podendo durar semanas ou até meses. A temperatura ideal para desenvolvimento das larvas é de 18 a 26 °C.

O ciclo parasitário inicia-se quando o ruminante ingere a larva infectante (L3) juntamente com a pastagem, onde em seu abomaso a mesma passa do estágio L3 para L4 e em duas ou três semanas para o estágio L5 (FIGURA 4) (MELO, 2005).

Figura 4- Ciclo de vida do *H. contortus*



Fonte: Echevarria (1996).

1.2.1 Controle sanitário

O controle da parasitose é essencialmente realizado através do uso de anti-helmínticos sintéticos, mas o uso indiscriminado desses compostos acabou por selecionar parasitas resistentes (MELO, 2005) e com isso doses maiores devem ser administradas e em períodos menores.

Os primeiros sinais de surgimento de resistência anti-helmíntica começaram a ser detectados quando as doses que antes eram letais passaram a não produzir mais o mesmo

feito. O aumento da resistência pode ser explicado pela teoria da evolução, devido à seleção natural, ou seja, os indivíduos mais adaptados sobrevivem para que ocorra a reprodução (LEATHWICK et al., 2001; MOLENTO, 2004; MELO, 2005). Os parasitas resistentes passam seus alelos para seus descendentes e o modo como é realizada a vermifugação e a intensidade do tratamento estão relacionados com a disseminação dos alelos que determinam a taxa de resistência (PRICHARD, 2001).

Para um efetivo controle desses parasitas é ideal um manejo adequado, como manter sempre limpas e desinfetadas as instalações onde os animais se encontram, fazer revezamento de piquetes e separar os animais por faixa etária, pois animais mais novos são mais susceptíveis às verminoses (SOUZA, 2002).

Antes de realizar a vermifugação é de extrema importância realizar o exame de OPG (ovos por gramas de fezes), pois se o animal não estiver com o OPG elevado essa vermifugação inadequada selecionará os parasitas resistentes (THOMAZ et al., 2004).

A vermifugação indiscriminada e o curto espaço de tempo entre uma vermifugação e outra, além da não rotação dos princípios ativos utilizados são fatores determinantes para o surgimento da resistência aos anti-helmínticos (BARNES; DOBSON, 1990; VIEIRA; CAVALCANTE, 1999).

1.2.2 Fitoterapia como tratamento para o controle da parasitose

As plantas vêm sendo usadas pelo homem para cura de seus males e de seus animais de estimação desde os primórdios da humanidade. A descoberta de que algumas plantas teriam propriedades curativas teve como base a observação de hábitos alimentares de animais doentes que passavam a ingerir plantas que rotineiramente não faziam parte de sua dieta. Com o passar do tempo o homem desenvolveu a capacidade de, a partir da sua própria experimentação, escolher plantas para a cura de seus males distinguindo aquelas que poderiam ajudar e outras que lhes trariam maior desconforto (ALVES, 2013).

A ação curativa ou tóxica de uma planta está estreitamente relacionada com a presença e natureza de seus metabólitos secundários. Esses compostos também chamados de metabólitos especiais ou fitoconstituintes são compostos orgânicos produzidos pelas plantas em resposta a ferimentos, ataques de parasitas, insetos, outras plantas e condições ambientais (GOBBE NETO; LOPES, 2007; ALVES, 2013). As condições ambientais em que a planta é cultivada como falta ou excesso de água, pH do solo e temperatura são extremamente importantes na

produção de alguns metabólitos secundários. Esses fatores atuam de forma que a mesma planta crescendo em condições ambientais diferentes pode apresentar diferentes tipos de fitoconstituintes e, portanto, propriedades biológicas relacionadas à presença desses metabólitos também diferentes (KEUTGEN; PAWELZIK, 2007).

As plantas também não produzem todas os mesmos tipos de metabólitos secundários, pois estes estão também ligados a espécie e gênero da planta (CONSTANTINE; KARCHESY, 1998; FUMAGALI et al., 2008). Os mais comuns encontrados em plantas e que apresentam propriedades biológicas são flavonoides, lignanas, polifenóis, taninos, alcaloides, glicosídeos cardiotônicos, saponinas, antraquinonas, terpenos e esteroides entre outros (PEREIRA et al., 2012).

Dentre esses metabólitos os taninos são conhecidos por apresentarem atividade anti-helmíntica, desta forma, inúmeras plantas taníferas têm sido investigadas quanto a seu uso no tratamento da parasitose em ovinos (VILLALBA et al., 2010; KATIKI et al., 2013; WILLIAMS et al., 2014). Entretanto, apesar de apresentar ação anti-helmíntica taninos são também conhecidos por sua ação tóxica quando administrados em grandes quantidades, devido à sua capacidade de complexar proteínas (MONTEIRO et al., 2005; OLIVEIRA, 2011; OKUDA; ITO, 2011; SOUZA, 2012).

Outro fato relevante na investigação e utilização de plantas como anti-helmíntica vem de informações da medicina popular através do conhecimento de plantas utilizadas contra verminoses humanas e animais (VASCONCELOS et al., 2005). Apesar de serem muitos os relatos de uso de plantas com ação anti-helmíntica muitas delas têm comprovação científica sobre sua eficácia ou toxicidade (KETZIS et al., 2002; ASSIS et al., 2003; GIRÃO et al., 2004; BRITO JUNIOR et al., 2011; VILLEGAS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

O uso indiscriminado de plantas medicinais pode ocasionar sérios danos à saúde humana e animal, sendo que em grande parte dos casos o efeito tóxico ocorre devido à alta dosagem utilizada (COELHO, 1998; CORDEIRO et al., 2005; AMORIM et al., 2007; ALVES, 2013).

Desta forma, na tentativa de contribuir para o uso seguro de plantas no tratamento da parasitose em ovinos, vários pesquisadores têm se empenhado em avaliar a eficácia e efeitos tóxicos das plantas usadas na medicina popular através de testes *in vitro* com parasitas isolados e *in vivo* com ovinos e caprinos naturalmente ou artificialmente infectados (AL-QARAWI et al., 2001; MACIEL et al., 2008; NERY et al., 2009; CUNHA, 2014).

Diversas plantas brasileiras vêm sendo utilizadas no combate a verminoses, embasadas no conhecimento popular, porém poucas têm sua atividade comprovada cientificamente. Segundo Krychak-Furtado (2006), 106 espécies foram citadas com ação anti-helmíntica, entretanto menos de 17% tiveram suas eficácias comprovadas. Das espécies identificadas, apenas 17,9% foram indicadas para tratamento de nematoides de ruminantes.

A erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) é utilizada para tratamento de vermes em humanos e, também já foi investigada quanto a sua eficácia em vermes de ovinos. Ketzis et al. (2002) avaliaram a planta em ensaios *in vivo* com animais infectados artificialmente com as larvas L3 de *H. contortus*. Os animais foram suplementados com óleo da planta em diversas doses por Kg de peso vivo. Dez dias após o tratamento os animais foram eutanasiados, assim comparando o número de vermes adultos com os animais tratados com o óleo da erva e os animais não tratados. O tratamento não apresentou eficácia e ocasionou reações adversas nos animais, quando administrados em altas doses. Porém nos testes *in vitro* comprovou-se que o óleo da planta reduz a viabilidade dos ovos e de vermes adultos. Apesar de esta planta ter destaque quanto ao seu uso contra vermes que acometem humanos e animais, a mesma não apresentou eficácia nos experimentos realizados por estes autores.

A batata-de-purga (*Ipomoea purga*) é um tubérculo utilizado na medicina popular contra lombrigas e vermes e foi avaliada em ensaios *in vitro* e *in vivo* para determinação da sua atividade anti-helmíntica sobre helmintos de ovinos e caprinos. Girão et al. (2004), realizaram testes *in vivo* com caprinos naturalmente infectados por nematoides gastrointestinais utilizando a batata-de-purga. Os animais alimentados com a planta apresentaram redução no OPG de apenas 37% após o tratamento.

Melhores resultados com a mesma planta foram obtidos por Brito Junior et al. (2011) que ao realizarem os ensaios *in vivo* observaram redução de 90% no OPG após 60 dias do início do tratamento. As diferenças de resultados entre esses autores podem estar relacionadas à dose administrada, ao tempo de tratamento e às diferenças entre as plantas utilizadas nos dois experimentos.

A erva-lombrigueira (*Spigelia anthelmia*) é uma planta bastante utilizada na medicina popular no Brasil para o tratamento de verminoses. A ação anti-helmíntica dessa planta sobre nematoides de ovinos foi comprovada em ensaios *in vitro* e *in vivo* por Ademola et al. (2007).

Estudos *in vivo* com a uva-turca (*Phytolacca icosandra*), mostrou que o consumo do extrato etanólico das folhas na concentração de 250 mg/ kg de peso corporal do animal inibiu

parcialmente o OPG mostrando a ação anti-helmíntica da planta sem causar efeito tóxico ao animal (VILLEGAS et al., 2012).

O jaborandi-falso (*Piper aduncum*) foi avaliada em ensaio *in vitro* sobre a eclodibilidade dos ovos de helmintos com CI_{50} de 2,4 mg/mL (OLIVEIRA et al., 2014), entretanto a planta não foi avaliada em ensaios *in vivo*.

Ribeiro et al (2014) avaliaram o efeito anti-helmíntico do pinhão-bravo (*Jatropha mollissima*) por meio de experimentos *in vitro* e *in vivo*, onde se concluiu que nos testes *in vitro* houve a inibição da eclodibilidade dos ovos e do desenvolvimento larval apresentando uma eficiência de 70 e 77%, respectivamente. Os testes *in vivo* mostraram que a planta também foi eficaz com redução na contagem de OPG após 28 dias de experimento.

A grande parte das plantas citadas acima que apresentam ação anti-helmíntica são de fácil cultivo e obtenção, portanto podem ser uma alternativa à substituição parcial ou total dos anti-helmínticos sintéticos.

Desta forma, a fitoterapia é uma alternativa ao uso dos anti-helmínticos sintéticos e atrai grande atenção pois se enquadra no contexto de agricultura orgânica, com a redução do impacto ambiental e dos resíduos químicos dos vermífugos sintéticos nos alimentos de origem animal. Aliado a esses fatores também se enquadra a redução de custos ao produtor com a diminuição do tempo de carência para comercialização e valorização dos produtos. Além disso, o uso de algumas plantas pode além de exercer efeito anti-helmíntico atuar sobre a saúde geral do animal pelo fato de conter fitoconstituintes que podem ter ação anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (GALATI et al., 2003; TESORIERE et al., 2004; ZOU et al., 2005).

1.3 FITOCONSTITUENTES

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos pelas plantas e não estão diretamente relacionadas com seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, porém garantem vantagens para manutenção de sua vida e perpetuação da espécie. Sua produção é baseada nas necessidades ecológicas da planta (SANTOS, 2007).

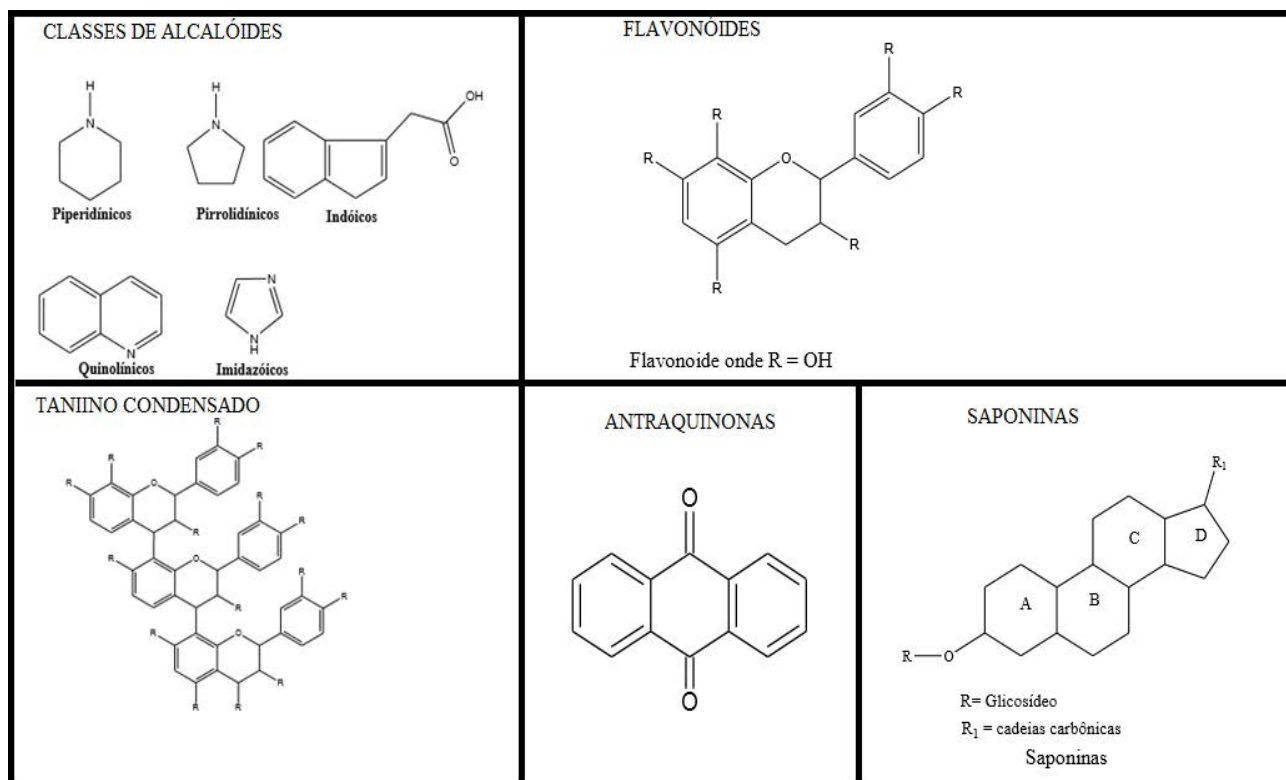
As plantas respondem de forma diferente aos estímulos ambientais de natureza física, química ou biológica, portanto existem variações químicas entre as plantas (mesma espécie ou

não), devido a fatores como fertilidade, umidade e tipo de solo, radiação solar, temperatura entre outros (MARTINS, 2011).

Os fitoconstituintes presentes nas plantas são compostos orgânicos que possuem as mais variadas estruturas químicas contendo carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio sendo distribuídos em várias classes de acordo com suas propriedades físicas e químicas (KUMAR, 2011). As estruturas químicas das principais classes de fitoconstituintes são apresentadas na FIGURA 5.

As propriedades biológicas ou toxicidade exibidas pelas plantas estão relacionadas diretamente à natureza e quantidade de seus fitoconstituintes. Por exemplo, a ação anti-inflamatória de muitas plantas medicinais geralmente está associada à presença de flavonoides, compostos polifenólicos e lignanas assim como a atividade analgésica e protetora do sistema cardiovascular (SILVA et al., 2005; KUMAR; PANDEY, 2013). A atividade analgésica sob o sistema nervoso central apresentada por algumas plantas geralmente está associada à presença de alcaloides (FAROUK et al., 2008; WILLIAMS, 2012).

A atividade anti-helmíntica e antimicrobiana frequentemente está associada à presença de taninos e saponinas (KIM et al., 2003; CASTEJON, 2011). Algumas plantas apesar do uso medicinal apresentam também substâncias tóxicas e seu uso deve ser controlado como é o caso do confrei (*Symphytum officinale* L.) que é utilizado na medicina tradicional como cicatrizante, mas possui também alcaloides pirrolizidínicos que possuem comprovadamente ação hepatotóxica e carcinogênica.

Figura 5- Esqueleto estrutural base dos principais metabólitos secundários (fitoconstituintes)

Fonte: Próprio autor.

Outras plantas medicinais também podem apresentar risco dependendo da dosagem utilizada como a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e arnica (*Arnica montana* L.), que podem causar irritação gastro-intestinal; o mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) que pode lesionar o sistema nervoso central; o cambará (*Lantana câmara* L.) que pode causar hepatotoxicidade; a cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC), que pode causar distúrbios gastro-intestinais e a arruda que pode provocar uma série de efeitos colaterais incluindo aborto e fortes hemorragias (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005). O chá verde (*Camellia sinensis* Theaceae) se consumido em excesso pode ocasionar danos ao fígado e arritmia, além interagir com outros medicamentos (SOUZA, 2012).

Dentro do contexto do uso de plantas medicinais como alternativa ao tratamento de enfermidades existe a necessidade de conhecer a planta não só pelos seus benefícios, mas também pelo tipo de efeitos adversos que ela pode apresentar e principalmente conhecer os níveis seguro de administração (MONTEIRO et al., 2005; SOUZA, 2012; ALVES, 2013).

Uma alternativa a fim de descobrir plantas com propriedades medicinais com menores riscos de toxicidade é a avaliação de plantas que já fazem parte da alimentação como por exemplo ervas e condimentos já utilizados como aromatizantes como o caso do orégano, salsa

e alguns tipos de pimentas (SILVA et al., 2005; NERY, 2009). O mesmo pode ser feito para plantas a serem utilizadas na saúde animal, principalmente aquelas que são oferecidas ao animal sazonalmente dependendo da escassez de alimentos como é o caso da *Opuntia ficus indica* (MORAIS; VASCONCELOS, 2007; GALVÃO JUNIOR et al., 2014). Esta planta possui potencial nutricional e limites de segurança do uso já determinado, entretanto não há relatos na literatura de seu uso medicinal na saúde animal (BISPO et al., 2007).

1.3.1 *Opuntia ficus-indica*

Opuntia ficus indica é uma planta nativa do México, encontrada na América Central, América do Sul, Austrália e na África (LEO et al., 2010), é uma planta xerófila, cresce selvagemmente em zonas áridas e semiáridas de todo o mundo, aproximadamente 10 a 12 espécies são utilizadas pelo homem para produção de alimentos e corantes (STINTZING et al., 2005).

Pertence ao Reino Plantae, Classe *Dycotyledonea*, Subclasse *Dialipetalas*, Ordem *Caryophyllales*, Família *Cactaceae*, Gênero *Opuntia*. A *O. ficus* conhecida popularmente no Brasil como palma forrageira, teve seu nome determinado por Tourneford em 1700, devido às suas características morfológicas serem semelhantes a uma planta espinhosa comum na cidade da Grécia, *Opus* (SÁENZ et al., 2006).

A planta é conhecida popularmente por diversos nomes dependendo de sua localização, como: na Espanha seu nome é Higo-de-indicas, em Portugal Figo-da-índia, Figueira-da-índia, Piteira ou Figo-do-diabo, na Itália Fico d'India, França Figue-de-barbarie, EUA e África do Sul Prickly pear ou Cactus pear (SEMEDO, 2012).

A *O. ficus* (FIGURAS 6 E 7) é uma planta arbustiva que possui a capacidade de reservar quantidades significativas de água em seus cladódios para sua sobrevivência em longos períodos de estiagem, possuindo ramificações, podendo a planta ser rasteira ou até mesmo arbórea, chegando a até 4 metros de altura (GONZALES et al., 1990). Os cladódios são um tipo de modificação caulinar formados por ramos de caule modificados, que contém clorofila e grande quantidade de água armazenada internamente e funcionam como folhas na sua função fotossintética. Os cladódios podem apresentar coloração de verde a avermelhados (FEUGANG et al., 2006).

A planta possui várias propriedades biológicas como atividade antioxidante, neuroprotetora, atividade antiproliferativa e também é utilizada na medicina popular para o

tratamento da gastrite, diabetes e no combate a inflamações e dores (STINTZING et al., 2005; SÁENZ, C et al., 2006; FEUGANG, et al., 2006). Dentre seus principais fitoconstituintes se encontram compostos fenólicos, saponinas, carotenoides e também betalaínas nos frutos (SEMEDO, 2012).

Figura 6- Espécie da *O. ficus* município Ilha Solteira– SP



Fonte: Próprio autor.

Figura 7- Frutos da *O. ficus*



Fonte: Próprio autor.

A planta possui significativo valor nutricional sendo muito utilizada na alimentação de ovinos. Estudos *in vivo* estabeleceram que níveis de inclusão da planta em torno de 56% não causam prejuízo à saúde do animal, portanto, não afetam negativamente parâmetros zootécnicos (VERAS et al., 2002; SANTOS et al., 2007; GALVÃO JUNIOR et al., 2014). Apesar de seu uso na alimentação de ovinos não existe na literatura estudos sobre a ação anti-helmíntica da planta. Portanto, devido ao exposto surgiu o interesse em se avaliar o potencial anti-helmíntico da *O. Ficus* sobre helmintos de ovinos inicialmente em ensaios *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial anti-helmíntico *in vitro* da *O. fícus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Determinação da atividade anti-helmíntica *in vitro* a fim de avaliar:

- Inibição da eclodibilidade de ovos;
- inibição do desenvolvimento larval;
- inibição da migração larval.

Determinação da classe de fitoconstituintes responsável pelo efeito anti-helmíntico da planta e composição centesimal e mineral:

- Fracionamento dos extratos brutos com solventes de polaridade crescentes;
- ensaios *in vitro* com os extratos particionados;
- análise centesimal e mineral dos cladódios e frutos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES, MATERIAL BIOLÓGICO, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS

3.1.1 Reagentes

Etanol, magnésio metálico, ácido clorídrico, cloreto férrico, hidróxido de sódio, clorofórmio, hexano, acetato de etila, diclorometano, ácido acético glacial, ácido sulfúrico, éter etílico, hidróxido de amônio, acetato de chumbo, cloreto de sódio e PBS, todos com grau analítico. Reagente de Bouchardat, reagente de Bertrand, reagente de Mayer, reagente de Dragendorf da Synth. Ivermectina, Levamisol e Albendazol (Fluka). Anfotericina, Dimetilsulfóxido, Yeast (parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*) e meio Early balanceado, todos da Sigma-Aldrich.

3.1.2 Materiais e equipamentos

Estufa de ar circulante (Marconi), vidrarias em geral, Rotaevaporador (Buchi), placas de cultura de 24 e 48 poços, tubos falcon, microscópio de luz invertida (Bel), centrífuga (Marconi), agitador magnético, peneiras metálicas de várias reticulações (Bertel), pipetas automáticas, microscópios DM 2500-Leica adaptado ao sistema computadorizado para análise de imagens LAS V5 (Leica Application Suite).

3.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS

Os cladódios e frutos foram coletados no Campus II da UNESP- Ilha Solteira-SP em setembro de 2014. Os cladódios foram lavados, picados e secos em estufa de ar circulante a 50 °C por 4 dias e então triturados em moinho de facas até a obtenção de um pó bem fino. Cerca de 100g do pó de cladódios foram imersos em etanol a 70% e mantidos sob agitação magnética por 7 dias à temperatura ambiente em recipiente recoberto com papel alumínio para

evitar degradação pela luz. A seguir a mistura foi filtrada a vácuo e o solvente rotaevaporado para fornecer o extrato bruto dos cladódios (o sólido obtido da filtração foi novamente imerso em etanol e extraído outras duas vezes).

Para a obtenção do extrato dos frutos os mesmos foram lavados, descascados e a polpa separada das sementes. Cerca de 5g de polpa úmida foi colocada em tubos falcon (6 tubos) contendo 10 mL de etanol 70% que foram então centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante dos tubos foi transferido para um balão de fundo redondo. O resíduo sólido dos tubos foi novamente centrifugado com etanol por mais três vezes. Todos os sobrenadantes foram reunidos no balão, o qual foi rotaevaporado fornecendo o extrato bruto da polpa. Os extratos brutos dos frutos e dos cladódios foram armazenados em freezer até o uso nos ensaios.

3.2.1 Preparo das diferentes concentrações dos extratos

Para os ensaios de atividade anti-helmíntica os extratos brutos dos cladódios e dos frutos foram avaliados em concentrações variando de 100 a 1,25 mg/mL preparadas por diluição da maior concentração de 100 mg/mL (1g de extrato bruto diluído em 9.400 uL de H₂O + 600 uL de DMSO).

Todos os frascos contendo as diluições do extrato foram mantidos refrigerados até o uso nos ensaios *in vitro*.

3.3 CONTROLES

Foram preparados controles negativos e positivos, sendo utilizados para comparação com resultados obtidos a partir dos extratos e partições. O controle DMSO foi utilizado para verificar uma possível toxicidade do solvente utilizado na diluição dos extratos. Esse controle foi preparado pela mistura de 0,2 mL de DMSO em 3,8 mL de água destilada. Para os ensaios de EHT e LDT foi utilizada água como controle negativo e PBS para o LMT. Como controle positivo foram utilizados albendazol 25 µg/mL para os ensaios de EHT, ivermectina 10 µg/mL para os ensaios de LDT e Levamisol (0,5%) para os ensaios de LMT. Nos ensaios de LDT também foi utilizado um meio nutritivo preparado a partir da mistura de 0,25 g de Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), 22,5 mL de solução salina e 2,5 mL de meio Early balanceado.

Após preparo o meio foi armazenado a -4°C até o uso. O controle antibiótico utilizado foi a solução de anfotericina B contendo $25\mu\text{g/mL}$.

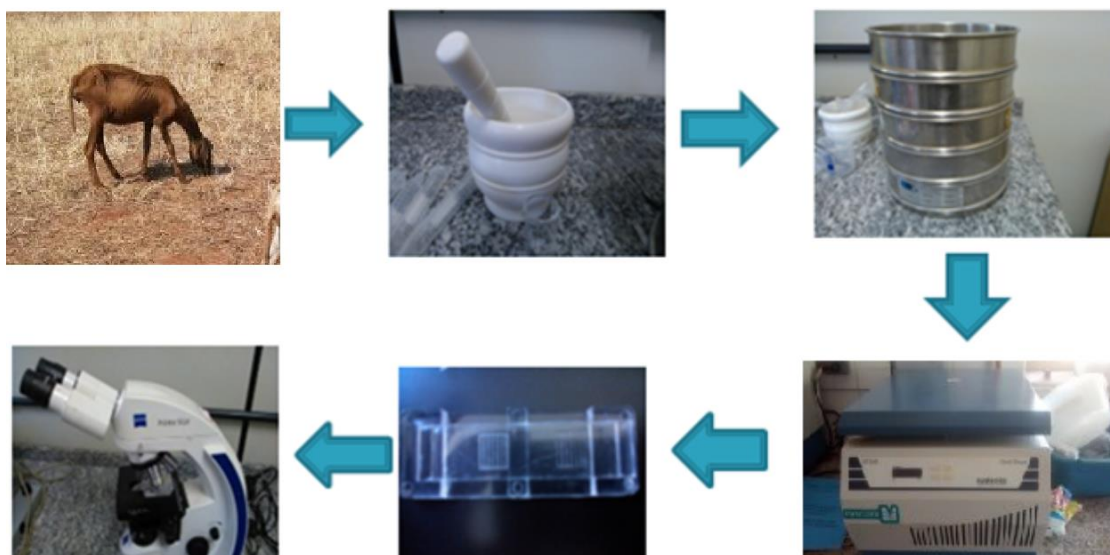
3.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA

3.4.1 Coleta e separação de ovos

Foram utilizados ovos de nematoides gastrointestinais coletados nas fezes de ovinos naturalmente infectados da raça Santa Inês, criados no setor de Ovinocultura e Caprinocultura da Fazenda de Ensino Pesquisa e Extensão (FEPE – Ilha Solteira).

Para a coleta de ovos (FIGURA 8) foram utilizados animais que apresentam um número de ovos por gramas de fezes (OPG) superior a 2.500, sendo dessa forma considerada uma elevada taxa de infecção. O OPG foi determinado usando o método de Gordon & Whitlock (1939).

Figura 8- Etapas para coleta das fezes e separação dos ovos



Fonte: Próprio autor.

As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal do animal, acondicionadas em sacos plásticos a temperatura ambiente e conduzidas ao Laboratório de Produtos Naturais para separação e contagem dos ovos. As fezes foram diluídas em água morna (40°C) para que

ficassem moles e homogêneas sendo, em seguida, filtradas em peneiras de diferentes reticulações (1 mm a 25 μ m). Os ovos ficaram retidos na peneira de 25 μ m e foram transferidos com auxílio de uma pisseta para um tubo falcon de 50 mL. Esse volume foi dividido em tubos falcon e centrifugados a 3.000 rpm por cerca de cinco minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o volume do tubo completado com solução salina saturada para a suspensão dos ovos e, novamente centrifugados por cinco minutos a 3.000 rpm. O conteúdo dos tubos foi despejado na peneira de 25 μ L para a lavagem dos ovos com água destilada e a seguir despejado em recipiente cônico para decantação por 30 minutos a temperatura ambiente. Com auxílio de uma pipeta o conteúdo do fundo do tubo foi transferido para um outro recipiente acertando o volume final em 10 mL. Esse recipiente foi usado como reservatório dos ovos para os experimentos *in vitro*. A partir desse reservatório foi determinado o número de ovos contidos em 25 μ L dessa solução usando a câmara de Mac Master extrapolando-se para o volume contido no tubo.

Para fornecer resultados com confiabilidade o procedimento para coleta de fezes e separação dos ovos foi realizado inúmeras vezes, sempre para se obter ovos frescos preservando a qualidade na eclosão.

3.4.2 Teste de eclodibilidade de ovos (EHT)

Para os testes *in vitro* foram utilizadas placas de cultura de células contendo 24 poços, onde em cada poço foi adicionado um volume contendo 100 ovos.

Os EHT foram realizados de acordo com Coles et al. (1992), onde foram utilizadas seis concentrações de cada extrato e três controles, cada qual com quatro repetições. Os extratos foram solubilizados em DMSO de forma a proporcionar as concentrações a serem avaliadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 mg/mL) adicionou-se a cada poço volume igual ao da suspensão de ovos. Os controles utilizados foram: água (controle negativo), DMSO solvente no qual foram diluídos os extratos e Albendazol 25 μ L/mL (controle positivo). Após a adição dos ovos e dos extratos a placa foi tampada e deixada à temperatura ambiente por 48h. O resultado foi obtido pelo número de ovos não eclodidos que foram contados em microscópio invertido e comparados ao número de ovos colocados em cada poço da placa, logo, expresso em termos de % de inibição da eclodibilidade.

A % de inibição da eclodibilidade foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{L1}{(L1 + \text{ovos})} \times 100$$

3.4.3 Teste de desenvolvimento larval (LHT)

Os LHT foram realizados de acordo com Costa et al. (2008), onde 100 ovos em solução foram adicionados em cada um dos poços utilizando a placa de 24 poços e a cada um desses poços foram adicionados 20 µL de meio nutritivo (1g de Yeast + 90 mL de solução salina 9% + 10 mL de meio Early). A placa foi mantida sob condições de umidade à temperatura ambiente por 48 h, período no qual os ovos eclodem e as larvas estão na fase de desenvolvimento chamada de L1. A seguir 200µL de cada concentração do extrato (100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 mg/mL) foram adicionados a cada poço, a placa foi incubada por mais cinco dias a temperatura ambiente. Foram feitas quatro repetições para cada concentração e controles. Ao final do quinto dia foi possível observar em microscópio invertido se os extratos possuem ação sobre o desenvolvimento das larvas. As L1 e L3 em cada poço foram contadas em microscópio invertido (UENO; GONÇALVES, 1998).

O resultado foi expresso em termos de eficácia em bloquear a passagem de L1 para a fase L3.

$$\% \text{ IDL} = \frac{L1}{L1 + L3} \times 100$$

3.4.4 Teste de migração larval (LMT)

Os LMT foram realizados através da metodologia adaptada de Hernández-Villegas et al. (2012). Foram utilizadas larvas infectantes (L3) provenientes da coprocultura realizada com fezes de animais naturalmente infectados. Os ovos atingiram a fase L3 após oito dias e foram então recolhidas por sedimentação utilizando a técnica de Baermann. As larvas foram armazenadas a 4 °C até a utilização. Quinhentas L3 vivas foram adicionadas para tubos falcon contendo, separadamente, o negativo controle (PBS, pH 7,2), o controle positivo (levamisol a 1%) e os extratos nas várias concentrações (12,5; 6,25 e 3,125 mg/mL de PBS). Todas as incubações foram realizadas durante três horas a 28 °C. As larvas L3 de cada tubo foram lavadas com PBS, centrifugadas (3500 rpm) três vezes, a seguir cada tubo falcon foi adaptado com peneiras com aberturas de 25µm (as peneiras são flexíveis e foram adaptadas à boca do

tubo por meio de um elástico) e a seguir vertidos em placas de Petri contendo água destilada. Após três horas foi feita a contagem das larvas que migraram, num microscópio invertido, através de aliquotas de 25 µL (cinco repetições). A quantidade de larvas obtidas após a contagem das alíquotas deve ser extrapolada ao conteúdo total em mL medido na placa de Petri ao final das três horas. Para cada concentração foram realizadas quatro repetições.

$$\% \text{ de migração} = \frac{A}{A - B} \times 100\%$$

A- L3 que migraram no controle negativo

B-L3 que migraram com o extrato

3.4.5 Determinação das espécies de helmintos presentes nas fezes utilizadas nos ensaios

Para a determinação das espécies de helmintos presentes nas fezes dos ovinos foi realizada uma coprocultura utilizando ovos recentemente coletados e mantidos por sete dias sob as mesmas condições descritas para o ensaio de desenvolvimento larval (item 3.4.3), mas sem a adição do extrato. Os dados morfométricos e fotomicrografias dos helmintos foram obtidos em sistema computadorizado para análise de imagens LAS V5 (Leica Application Suite), adaptado aos microscópios DM 2.500-Leica com o sistema de contraste interferencial de fase.

A comparação entre as medidas efetuadas e os dados da literatura permitiram classificar as espécies de helmintos presentes nas fezes dos animais escolhidos como doadores.

4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A prospecção dos fitoconstituintes (metabólitos especiais) foi realizada de acordo com metodologia descrita por Harborne (1998) que se baseia na adição de reagentes específicos para cada classe de fitoconstituintes. A presença ou ausência de uma determinada classe de fitoconstituintes é evidenciada pela alteração da cor ou formação de precipitados. Foram utilizados testes para determinação de alcaloides, flavonoides, saponinas, antraquinonas e taninos.

4.1 ALCALOIDES

5 g de material vegetal pulverizado foram aquecidos até ebulição por 15 minutos com HCl 10%. O extrato obtido foi filtrado e extraído com duas porções de 10 mL de clorofórmio. Após a filtração, o solvente foi evaporado em banho-maria e o resíduo dissolvido em HCl 10%. Em seguida foram realizados os testes com os reativos específicos para a determinação de alcaloides.

O resultado positivo para a presença de alcaloides pode ser indicado pelo surgimento de coloração amarelo tijolo após a adição (3 gotas) de Reagentes de Bouchardat e Dragendorff (individualmente) ao extrato vegetal.

O uso de Reagente de Mayer indica, após a adição de algumas gotas, a presença de alcaloides pelo desenvolvimento de um precipitado branco.

4.2 ANTRAQUINONAS

A um tubo de ensaio contendo material vegetal pulverizado (1 g) foram adicionados 8 mL de etanol a 25%. O tubo foi aquecido diretamente numa chama por um minuto. O extrato obtido foi filtrado para outro tubo de ensaio contendo 4 mL de H_2SO_4 5% e aquecido levemente, a seguir foram adicionados 5 mL de éter etílico para a extração. A fase orgânica foi decantada para outro tubo de ensaio e a fase aquosa foi acrescida de 5 mL de NH_4OH diluído. O tubo foi agitado fortemente e em seguida, deixado em repouso. A reação positiva para antraquinonas é evidenciada pela coloração rósea ou avermelhada (Reação de Borntranger).

Outro teste envolve a reação do material vegetal pulverizado (0,5 g) contido em um vidro de relógio com algumas gotas de NaOH a 0,5 %. A observação do aparecimento de coloração amarelada, indica a presença de antraquinona na forma reduzida, ou de coloração avermelhada indica a presença da antraquinona na forma oxidada.

4.3 FLAVONOIDES

1 g de material vegetal em pó foi aquecido, em banho-maria, com 10 mL de etanol 70%. O extrato foi filtrado e submetido à identificação pelos testes abaixo:

Reação de Shinoda: 2 ml de extrato etanólico foram colocados em um tubo de ensaio e foram adicionados fragmentos de Mg metálico. Em seguida, foi adicionado 1 mL de HCl concentrado. A coloração rósea ou vermelha indica a presença de flavonóides.

Reação com FeCl_3 : dilui-se o extrato com água na proporção 1:5 em seguida, colocaram-se em dois tubos de ensaio 5 mL do extrato diluído. Adicionou-se pela parede do tubo 1 gota de FeCl_3 2%. Esperou-se para observar o desenvolvimento de cor, que poderia variar entre verde, amarelo-castanho e violeta, de acordo com o tipo de composto flavonídico.

4.4 SAPONINAS

Teste da espuma: 1 g de material vegetal foi aquecido até a ebulição com 10 mL de água. Após resfriamento, o extrato foi filtrado. O líquido resultante foi agitado vigorosamente em um tubo de ensaio hermeticamente fechado durante 15 segundos. A formação de espuma persistente por mais de 15 minutos indica a presença de saponinas.

4.5 TANINOS

1 g de vegetal pulverizado foi aquecido, até a ebulição em tubo de ensaio com 10 mL de água. O extrato foi filtrado e, em seguida, foram realizadas reações de identificação. 10 mL de solução de acetato de chumbo saturada foram adicionadas e deixadas em repouso por 5 minutos, posteriormente adicionou-se 0,5 mL de ácido acético glacial. A reação de identificação baseia-se na turvação do meio e precipitação de compostos resultantes.

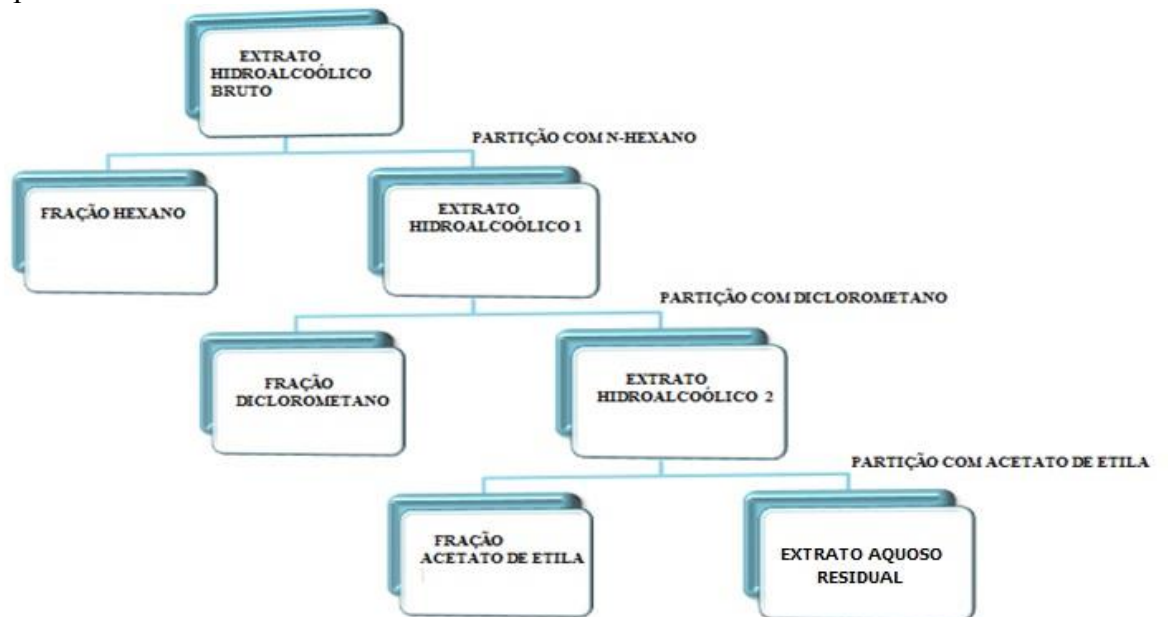
Para identificação de taninos condensados e hidrolisáveis, realizou-se reação com FeCl_3 a 2%. A cor azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e a cor verde taninos condensados.

5 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

Os cladódios foram secos em estufa de ar circulante a 50°C por aproximadamente 72 horas e a seguir triturados em moinho de facas. O pó obtido foi submetido à extração exaustiva em etanol 70 % em água (v/v), na proporção de 15 g/100mL de solvente, por 7 dias sob agitação. Para o fruto, a extração foi realizada com etanol 70 %, por centrifugação durante 10 minutos a 3.000 rpm (como no item 3.2). Após filtração o líquido obtido para cada um dos extratos foi rotaevaporado à pressão reduzida até a metade do volume (50 mL). Essa mistura foi colocada em um funil de separação ao qual foram adicionados sequencialmente solventes de polaridade crescente (n-hexano, diclorometano e acetato de etila), conforme fluxograma da FIGURA 9.

Após adição de hexano (50mL) a mistura foi agitada no funil de separação e a fase em hexano foi separada e rotoevaporada para fornecer o extrato hexânico (este procedimento foi repetido por 3 vezes). À fase restante do funil foi adicionado diclorometano (50 mL) e novamente o procedimento já descrito foi repetido para fornecer o extrato em diclorometano. O procedimento foi repetido com acetato de etila para fornecer o extrato em acetato de etila. O líquido restante no funil é constituído por água e parte do etanol que permaneceu solúvel em água (extrato hidroalcoólico 3), sendo, portanto constituído por compostos muito polares solúveis em água.

Figura 9- Fluxograma da extração do extrato hidroalcoólico bruto com solventes de diferentes polaridades



Fonte: Próprio autor.

6 ANÁLISE CENTESIMAL E MINERAL DOS CLADÓDIOS E FRUTOS

Para determinar os teores de matéria seca (%), proteína bruta (%), extrato etéreo (%), cinzas (%) e energia bruta (kcal/kg), amostras de bagaço úmido foram enviadas ao Laboratório de Bromatologia do Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP, Câmpus de Ilha Solteira. As análises bromatológicas foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2006).

7 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios foram expressos como média das repetições $\pm$ desvio padrão. Os dados foram analisados por ANOVA e comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa SYSTAT. Os valores de CI_{50} foram obtidos utilizando análise de regressão não-linear com o programa GraphPrism 5.0.

8 RESULTADO E DISCUSSÃO

O estudo sobre o uso de plantas como alternativa à substituição de vermífugos químicos no controle de helmintos tem crescido muito nas últimas décadas, como pode ser visto pelo número crescente de trabalhos publicados sobre o tema (MALI; MEHTA, 2008; KONÉ et al., 2012; SOUZA et al., 2013). Entretanto, a maioria das plantas avaliadas não são plantas que comumente seriam consumidas pelos animais o que não é o caso da *O. ficus* que já é utilizada na alimentação de ruminantes. Essa planta possui considerável valor nutricional sendo muito utilizada na alimentação de ruminantes em várias regiões do Nordeste principalmente em épocas de pouca disponibilidade de alimento (VERAS et al., 2002). Na literatura existem dados sobre a composição centesimal e mineral da planta que apresenta alto conteúdo de minerais e valores de proteína bruta de até 6,5% dependendo das condições de cultivo, sendo a quantidade de proteína bruta inversamente proporcional à idade da planta (TOSTO et al., 2007). Alguns trabalhos também apresentam a prospecção fitoquímica da planta com detecção de taninos, flavonoides, saponinas e cumarinas (MARTINEZ et al., 2011; TOMAS et al., 2012;). Entretanto, não existe na literatura estudos sobre avaliação anti-helmíntica da *O. ficus* que apresenta muitos dos fitoconstituintes aos quais são atribuídos, de acordo com a literatura citada, inúmeras propriedades biológicas inclusive atividade anti-helmíntica como é o caso dos taninos (COSTA et al., 2002; KAHIYA et al., 2003; NERY, 2009). Muitas dos trabalhos descritos na literatura utilizam testes *in vitro* para uma avaliação preliminar da atividade anti-helmíntica de uma planta, estes testes apresentam uma série de vantagens, já que são mais baratos e mais rápidos, pois com base nos resultados destes testes se pode sugerir a ação anti-helmíntica da planta. Entretanto, resultados positivos nos testes *in vitro* não são uma certeza de atividade anti-helmíntica, mas são um bom indicativo para a realização dos testes *in vivo* (VASCONCELOS et al., 2005).

Os principais testes para a determinação *in vitro* da atividade anti-helmíntica são os testes de eclodibilidade (EHT), desenvolvimento larval (LDT) e migração larval (LMT) onde a partir dos resultados é possível avaliar índices (porcentagens) de inibição da eclodibilidade dos ovos, inibição do desenvolvimento larval e inibição da migração larval (a partir de ovos dos parasitas presentes nas fezes) em comparação com os controles. Quanto maior a porcentagem de inibição nesses ensaios maior é a atividade apresentada pela planta (POWERS et al., 1982).

O EHT tem como objetivo avaliar a capacidade dos extratos em impedir a eclosão dos ovos. Nesse caso o que se obtêm em avaliações que detectam compostos bioativos é a interrupção do processo de desenvolvimento blastular do embrião do nematoide ou mesmo de vias enzimáticas ou de enzimas associadas a eclosão. O LDT avalia se o extrato em análise possui ação sobre o desenvolvimento das larvas do estágio L1 para o L3 que é o estágio infectante que ao ser consumido pelo animal irá se transformar na forma adulta do parasita que se aloja no abomaso (NERY et al., 2009). No estágio L3 a larva tem que migrar tanto no pasto quanto no sistema digestivo do ruminante e o LMT avalia o efeito que o extrato tem sobre a motilidade da larva ou seja sobre a capacidade de migração, geralmente os extratos ativos causam paralisia que afeta a motilidade das larvas (FORTES et al., 2013).

A atividade anti-helmíntica da *O. ficus* foi avaliada utilizando os testes *in vitro* descritos acima com a finalidade de fornecer suporte para a realização dos testes anti-helmínticos *in vivo*. Os resultados da avaliação *in vitro* são apresentados na TABELA 1.

Tabela 1- Resultados dos EHT, LDT e LMT para os extratos brutos dos frutos (EF) e cladódios (EC) da *O. ficus*.

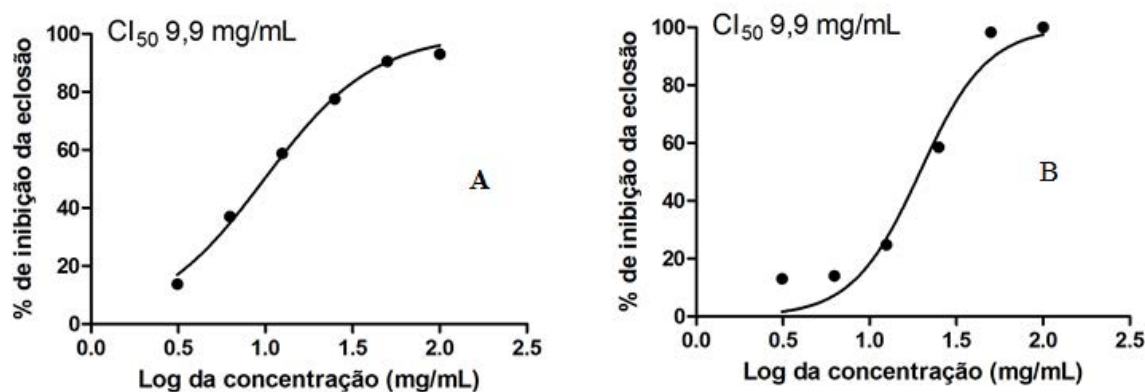
Conc.* (mg/mL)	EHT		LDT		LMT	
	EC	EF	EC	EF	EC	EF
100	93,0 ± 2,2b	100±0a	100±0a	100±0a	—	—
50	90,5 ± 1,5b	98,2 ±0,5a	100±0a	100±0a	—	—
25	77,5 ± 2,1c	58,5±2,6b	99,7±0,5 ^a	96,2±0,9b	—	—
12,5	58,7 ± 2,3d	24,7±1,2c	98,7±1,9 ^a	86,7±2,2c	83,8 ±1,1b	84,5±1,5 c
6,25	37,0 ± 2,2e	14,0±0,8 d	73,7±1,7b	68,5±2,1d	82,2 ±1,2b	83,8±1,1b,c
3,125	13,7 ± 0,9f	13,0 ±0,8d	51,2±0,96c	49,2±0,9e	80.1 ±1,7e	83,1±0,6 c,d
(+)	100± 0 a		100± 0 a		100±0 a	
(-)	6,0± 1,4d		5,0± 0,9e		3,8±1,7 e	

Nota: ***(+)** controle positivo: EHT albendazol (25 µg/mL), LDT ivermectina (10 µg/mL) e LMI levamisol (5%)
; **(-)** controle negativo: água
Fonte: Próprio autor.

Os resultados do EHT mostram que o extrato dos frutos não apresentou diferença em relação ao controle positivo (albendazol, 25 $\mu\text{g/mL}$) nas concentrações de 100 e 50 mg/mL , enquanto o mesmo resultado foi obtido para o extrato dos cladódios somente para a concentração de 100 mg/mL .

À primeira vista a comparação entre os dados de EHT para EC e EF obtidos apresentam diferenças, entretanto, o valor de CI_{50} calculado para os dois extratos foi de 9,9 mg/mL (FIGURA 10).

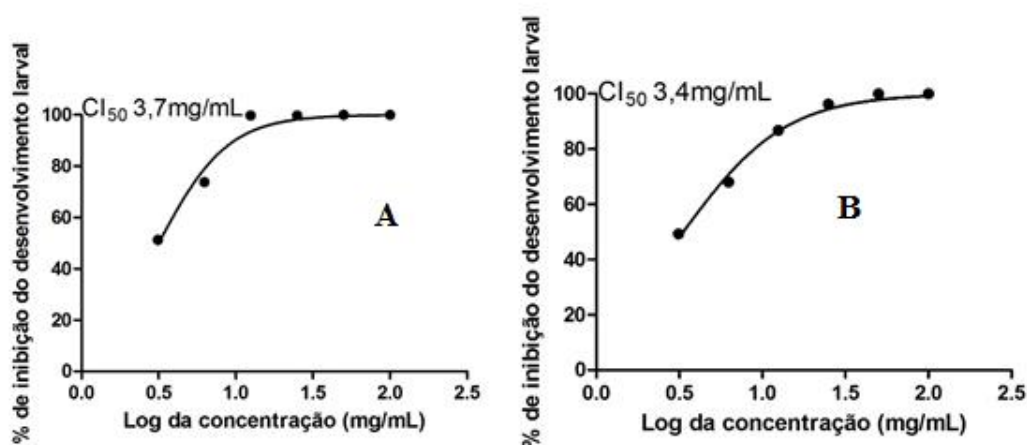
Figura 10- Determinação do CI_{50} para o EC (A) e EF (B) a partir da % de inibição da eclodibilidade em função do log da concentração



Fonte: Próprio autor.

Em relação ao LDT os dois extratos apresentaram bons resultados até a concentração de 6,25 mg/mL com valores de CI_{50} de 3,7 mg/mL e 3,4 mg/mL , respectivamente para EC e EF (FIGURA 11).

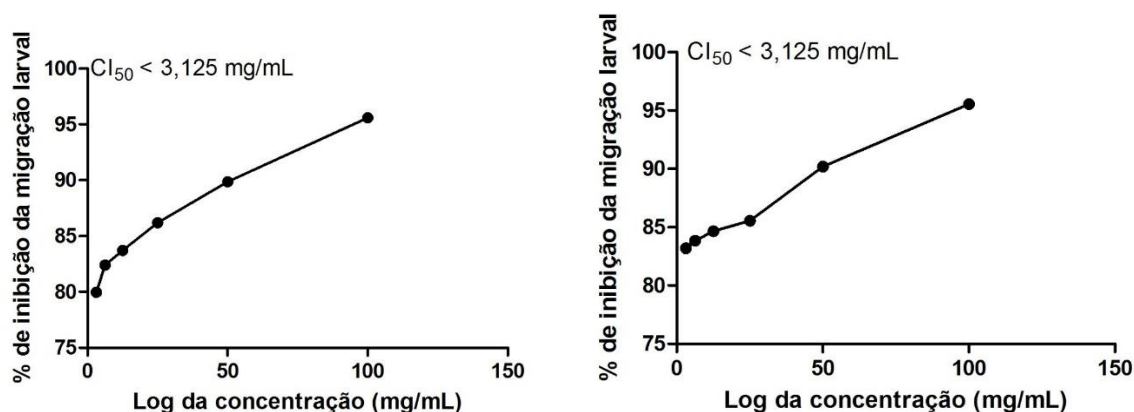
Figura 11- Determinação do CI_{50} para o EC (A) e EF (B) a partir da % de inibição do desenvolvimento larval em função do log da concentração.



Fonte: Próprio autor.

O LMT foi realizado apenas nas três menores concentrações devido à maior sensibilidade das L3. Os resultados deste teste indicam forte efeito de ambos os extratos sobre a migração larval das L3 com valores de inibição maiores do que 80% mesma na menor concentração. (TABELA 1). Os valores de CI_{50} para EC e EF (FIGURA 12) foram respectivamente menores do que 3,125 mg/mL que foi a menor concentração avaliada.

Figura 12- Determinação do CI_{50} para o EC (A) e EF (B) a partir da % de inibição da migração larval em função do log da concentração.



Fonte: Próprio autor.

Em todo os testes foi observado comportamento dose dependente para ambos os extratos, entretanto para o LMT esse efeito foi menos pronunciado não apresentando diferença significativa entre os resultados de inibição obtidos em função da concentração.

Os testes foram realizados inicialmente com os extratos brutos EC e EF, portanto, seria difícil atribuir a atividade apresentada pelos extratos a alguma classe específica de

fitoconstituintes. Desta forma, os extratos foram particionados com solventes de diferentes polaridades na tentativa de isolar, ainda que parcialmente, algumas classes de fitoconstituintes e avaliar novamente essas frações nos ensaios de EHT e LDT.

Os EC e EF brutos foram particionados com solventes de polaridade crescentes fornecendo as frações do EC em: hexano (0,27g), diclorometano (0,30g), acetato de etila (0,63g), e água (0,24g), e do EF em: hexano (0,35g), diclorometano (0,40g), acetato de etila (0,80g) e água (0,33g). Essas frações foram submetidas aos EHT e LDT sendo os resultados dessa avaliação apresentados nas TABELAS 2 e 3 respectivamente.

As frações em hexano (EH) e diclorometano (ED), a partir dos cladódios (TABELA 2), apresentaram baixos valores de inibição tanto da eclodibilidade quanto do desenvolvimento larval mesmo na maior concentração avaliada (25 mg/mL). O hexano é um solvente apolar que em contato com os fitoconstituintes presentes no extrato bruto dos cladódios (EC) arrasta somente os apolares ou de muito baixa polaridade como alguns óleos essenciais, compostos terpênicos e cumarinas simples. Na fração em diclorometano podem estar presentes fitoconstituintes com polaridades superiores aos encontrados na fração hexânica como alguns tipos de triterpenos, alcaloides e esteroides. Entretanto, pelos resultados obtidos nos ensaios é possível concluir que os fitoconstituintes presentes nessas frações não contribuem de forma significativa para a atividade apresentada pelo extrato bruto.

Tabela 2- Resultado dos EHT e LDT com os extratos particionados dos cladódios: fração em hexano (EH), fração em diclorometano (ED), fração em acetato de etila (EA) e fração aquosa (EHA).

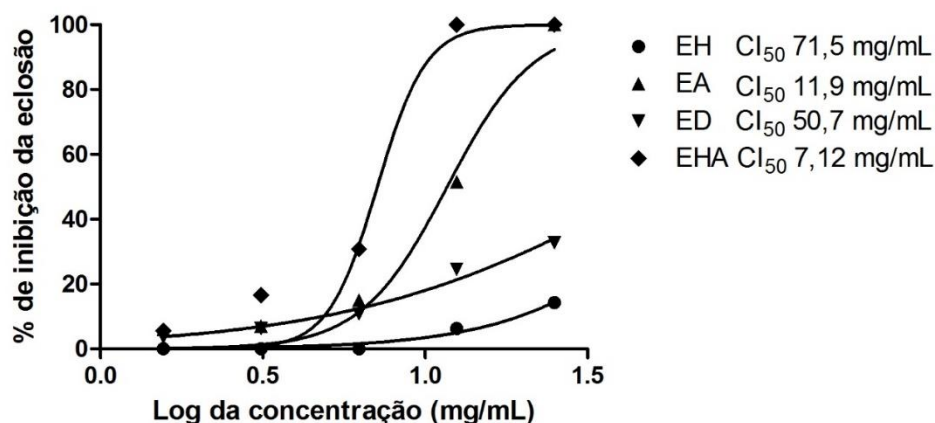
Conc*. (mg/mL)	EHT				LDT	
	EH	ED	EA	EHA	EH e ED	EA e EHA
25	14,2±1,7b	32,7±1,7b	100±0a	100± 0a	0± 0 d	100± 0a
12,5	6,7±0,9c	24,5±2,6c	51,5±1,3b	100 ± 0a	0± 0 d	100 ± 0a
6,25	0± 0 d	10,7±0,9d	15,0±0,8c	30,7±0,9b	0± 0 d	100± 0a
3,125	0± 0 d	6,2±0,5e	7,0±0,8d	16,5±0,6c	0± 0 d	100 ± 0a
1,562	0± 0 d	3,50±0,6e	6,0±0,8d	5,5± 1,3d	0± 0 d	100 ± 0a
(+)	100 ± 0 a				100 ± 0 a	
(-)	5,2 ± 1,5 d				6,1 ± 1,3 d	

Nota: * (+) controle positivo: EHT albendazol (25 µg/mL) e LDT ivermectina (10 µg/mL); (-) controle negativo: água

Fonte: Próprio autor.

As frações em acetato de etila (EA) e água (hidroalcoólico 3-EHA) forneceram melhores resultados com CI_{50} de 11,9 mg/mL e 7,12 mg/mL, respectivamente, para o EHT (FIGURA 13).

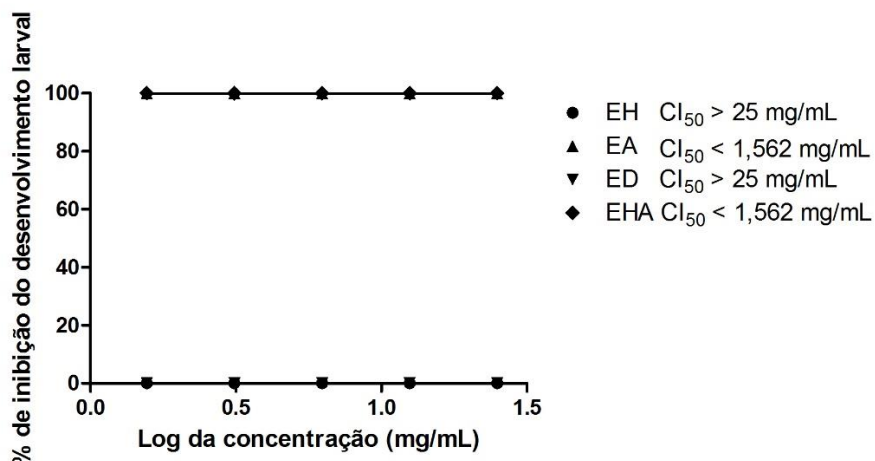
Figura 13- Determinação do CI_{50} para o EH, EA, ED e EHA dos cladódios a partir da % de inibição da eclodibilidade em função do log da concentração.



Fonte: Próprio autor.

Na fração EA podem estar presentes compostos mais polares como alcaloides mais complexos e compostos fenólicos e na fração EHA compostos solúveis em água como taninos e flavonoides. Essas duas frações apresentaram 100% de eficiência em bloquear o desenvolvimento das larvas do estágio L1 para o L3 mesmo na menor concentração avaliada sendo assim o CI_{50} para essas duas frações no ensaio de LDT é menor do que 1,52 mg/mL que foi a menor concentração avaliada (FIGURA 14).

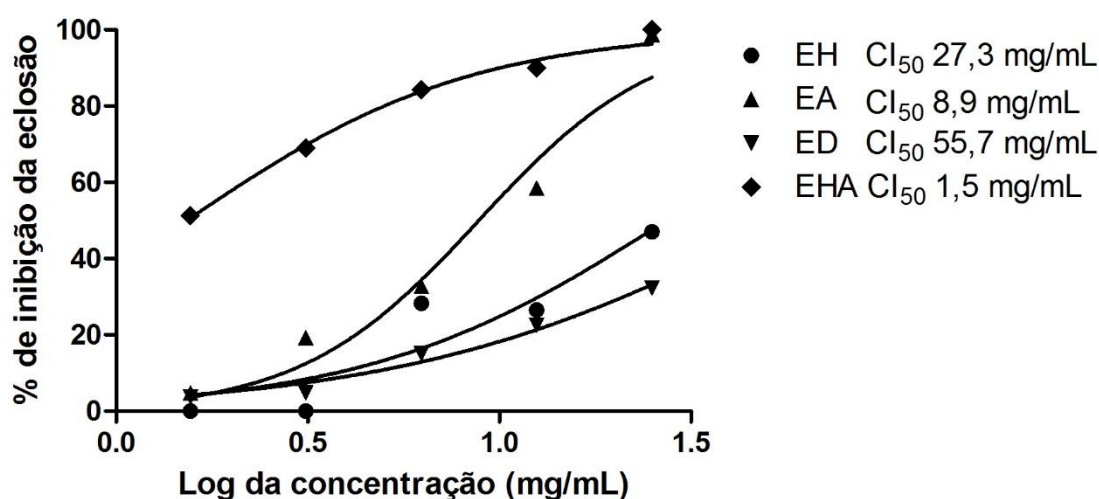
Figura 14- Determinação do CI_{50} para o EH, EA, ED e EHA dos cladódios a partir da % de inibição do desenvolvimento larval em função do log da concentração



Fonte: Próprio autor.

O extrato em hexano (EH) obtido a partir do extrato bruto dos frutos apresentou fraca atividade sobre a inibição da eclosão dos ovos assim como a fração em diclorometano (ED) (TABELA 3). As frações EA e EHA dos frutos foram as mais eficazes no EHT com CI_{50} de 8,9 e 1,5 mg/mL, respectivamente (FIGURA 15).

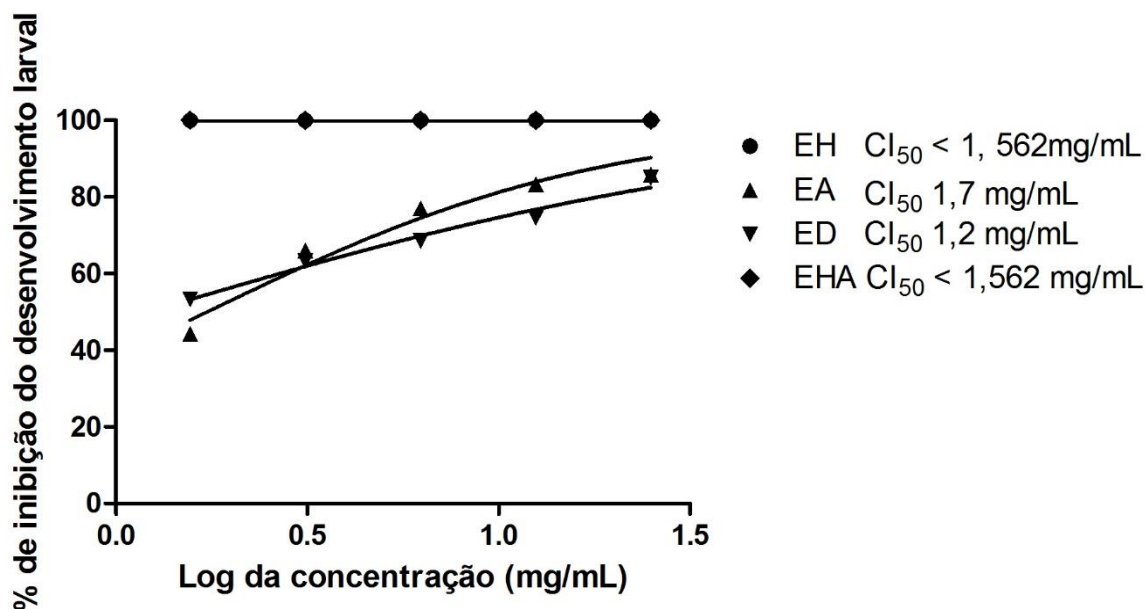
Figura 15- Determinação do CI_{50} para o EH, EA, ED e EHA dos frutos a partir da % de inibição do desenvolvimento larval em função do log da concentração



Fonte: Próprio autor.

Para o LDT todas as frações mostraram bons resultados, com CI_{50} menores que 2 mg/mL (FIGURA 16), sendo as frações em hexano e água as que apresentaram maiores valores de inibição do desenvolvimento larval (TABELA 3). A atividade significativa da fração em hexano pode estar relacionada a uma maior quantidade de saponinas e alcaloides presentes no fruto, bem como as diferenças estruturais na base desses compostos que podem afetar diretamente a atividade, além da presença de pigmentos ausentes nos cladódios.

Figura 16- Determinação do CI₅₀ para o EH, EA, ED e EHA dos frutos a partir da % de inibição do desenvolvimento larval em função do log da concentração.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 3- EHT e LDT com os extratos particionados dos frutos: fração em hexano (EH), fração em diclorometano (ED), fração em acetato de etila (EA) e fração aquosa (EHA).

	EHT				LDT			
Conc.* mg/ML	EH	ED	EA	EHA	EH	ED	EA	EHA
25	47,0 ±2,2b	32,2±2,1b	98,7±1,5a	100±0a	100± 0 a	85,0±0,8b	85,7±1,7b	100±0a
12,5	26,5±1,0c	22,5±2,1c	58,5±1,9b	90,0±0,8b	100±0 a	74,5±1,7c	83,2±0,9b	100±0a
6,25	28,2±2,3c	15,0± 0,8d	32,7± 1,9c	84,2±0,9c	100± 0 a	68,5±1,3d	77,1±1c	100±0a
3,125	0 ±0d	4,7±0,9e	19,2±0,9d	69,0±0,8d	100± 0 a	63,2±0,9e	67,0±2,1d	100±0a
1,562	0 ± 0d	3,5± 0,6e	4,7 ±1,7e	51,2±3,5e	86,0±1,4b	53,2±2,7f	44,2±1,7e	100±0a
(+)	100± 0 a				100± 0 a			
(-)	7,1± 1,0 d				4,0± 1,3 d			

Nota: * (+) controle positivo: EHT albendazol (25 µg/mL) e LDT ivermectina (10 µg/mL); (-) controle negativo: água

Fonte: Próprio autor.

A partir dos resultados obtidos nos EHT com as frações EH, EA, ED e EHA dos cladódios e frutos foi possível verificar que as mais ativas, portanto, as que mais contribuem para a atividade apresentada pelos extratos brutos (TABELA 1) foram as frações em acetato de etila (EA) e em água (EHA) tanto para cladódios quanto para frutos. Para os LDT essas

mesmas frações são as que mais contribuem para a ação observada para o extrato bruto dos cladódios. Entretanto, para os frutos todas as frações mostraram-se ativas indicando um efeito somatório entre todos os fitoconstituintes presentes no fruto. A coloração dos extratos particionados dos frutos mostrou que os pigmentos do extrato bruto foram divididos entre as várias frações obtidas com maior intensidade no extrato hexânico. A atividade larvicida do extrato hexânico do fruto foi muito superior à do extrato hexânico dos cladódios indicando que esses pigmentos podem ser responsáveis pelo resultado observado por essa fração no fruto.

Desta forma, com a finalidade de se pesquisar quais fitoconstituintes (qualitativamente) estão presentes nos cladódios e frutos, foram realizados os ensaios de prospecção fitoquímica.

Os fitoconstituintes são produzidos pelas plantas num mecanismo relacionado à defesa da planta tanto a agressões externas quanto a condições ambientais (ALVES, 2013). A produção dos metabólitos secundários está relacionada a atuação desses fatores sobre a planta, portanto, como as propriedades biológicas das plantas estão relacionadas à presença desses compostos, plantas da mesma espécie, mas cultivadas sob diferentes condições podem apresentar diferentes propriedades biológicas (KEUTGEN; PAWELZIK, 2007). A variação na produção dos metabólitos secundários também tem relação com a idade da planta e estágio de desenvolvimento (floração e frutificação) (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Portanto, existe a necessidade da realização de estudos fitoquímicos como forma de comparação de estudos realizados com a mesma planta, mas em locais e condições diferentes das utilizadas na literatura.

A prospecção fitoquímica realizada com os cladódios e os frutos da *O. ficus* teve como objetivo a determinação da (s) classe (s) de fitoconstituintes responsável pelo efeito anti-helmíntico dos extratos brutos além de fazer a comparação com resultados descritos na literatura.

A TABELA 4 apresenta os resultados da prospecção fitoquímica dos cladódios e dos frutos. Os testes mostraram que cladódios e frutos apresentam as mesmas classes de fitoconstituintes diferindo apenas nas quantidades observadas.

Os cladódios apresentaram maior quantidade de alcaloides, enquanto os frutos uma quantidade maior de saponinas. Os frutos apresentam, além dos fitoconstituintes determinados nos ensaios, pigmentos responsáveis pela sua coloração violeta, as betalainas. A presença das betalainas nos frutos também pode estar exercendo efeito somatório com outros fitoconstituintes, pois muitas das propriedades biológicas atribuídas aos frutos da *O. ficus*

estão associadas à presença das betalainas (GONÇALVES et al., 2015). As betalainas são pigmentos naturais que apresentam atividade antioxidante, antiviral e antimicrobiana, mas não existem dados na literatura sobre avaliações anti-helmínticas desses compostos (VOLP et al., 2009).

Tabela 4- Resultado da prospecção fitoquímica dos cladódios e da polpa dos frutos da *O. ficus*.

Metabólito secundário	Reativo/ Teste-Figura	Material vegetal	
		Cladódios	Frutos
Alcaloides	Mayer	-	-
	Bouchardat	+++	++
	Dragendorff	++	+
Antraquinonas	Bornträger	-	-
	Hidróxido de sódio	-	-
Flavonoides	Magnésio + HCl (Reação de Shinoda)	+++	+++
	Cloreto Férrico	+++	+++
Saponinas	Teste da espuma	++	+++
Taninos	Cloreto férrico	+++	+++
	Acetato de chumbo	+++	+++

Nota: (-) Não detectado, (+) concentração Baixa, (++) presente em concentração moderada, (+++) presente em alta concentração.

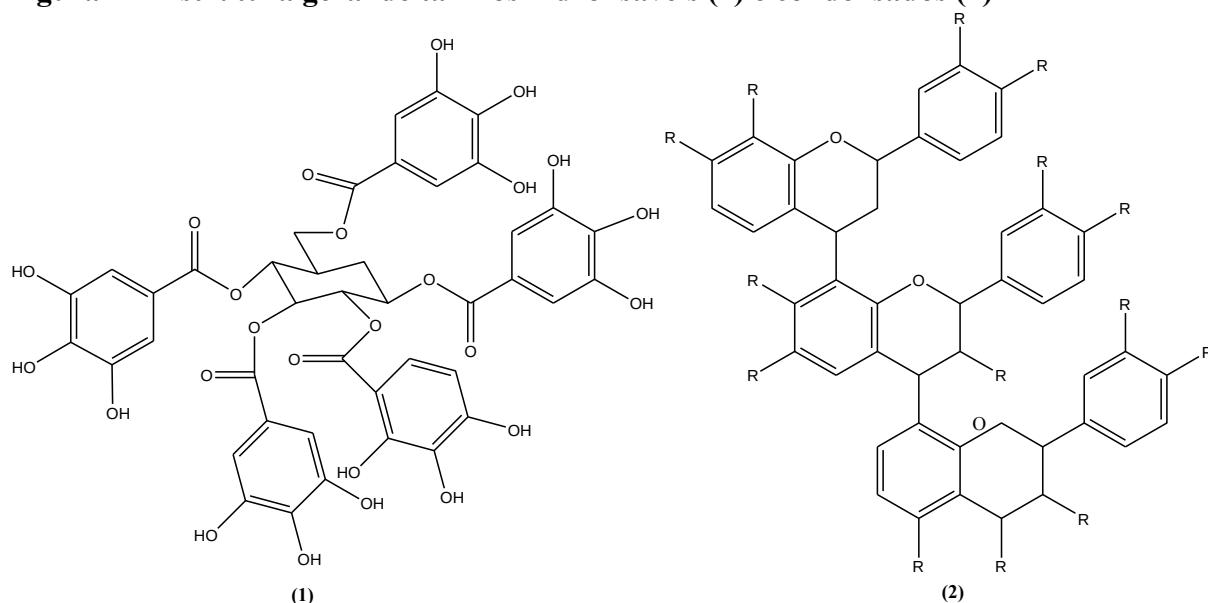
Fonte: Próprio autor.

Os resultados da prospecção fitoquímica da *O. ficus* estão de acordo com os encontrados por Ginestra et al. (2009) e Stintzing (2005). Entretanto, variações nas quantidades e natureza química dos fitoconstituintes podem ocorrer devido às diferentes condições ambientais em que a planta foi submetida bem como a idade da mesma.

As frações mais ativas nos ensaios foram as que continham taninos (fração em acetato de etila e água), portanto boa parte do efeito sobre os ovos e larvas mostrado pela *O. ficus* pode estar relacionada à presença dessa classe de fitoconstituente. A atividade anti-helmíntica de muitas plantas relatadas na literatura geralmente é atribuída à presença de tanino (VILLALBA et al., 2010; KATIKI et al., 2013; WILLIAMS et al., 2014) que são os compostos polifenólicos muito encontrados em plantas que crescem em locais de escassez de água, solos

pobres e altas temperaturas. Esses compostos possuem considerável estabilidade no trato digestório dos ruminantes, sendo tóxicos somente se ingeridos em doses elevadas (OLIVEIRA, 2011). A toxicidade dos taninos advém da sua capacidade de complexar com proteínas e íons metálicos (OKUDA; ITO, 2011; MONTEIRO et al., 2005). Classicamente, segundo a estrutura química, os taninos são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados (FIGURA 17).

Figura 17- Estrutura geral de taninos hidrolisáveis (1) e condensados (2)



Fonte: Próprio autor.

Apesar de bem descrita na literatura as propriedades anti-helmínticas dos taninos a presença de outros fitoconstituintes na planta podem contribuir para a ação destes atuando em sinergismo como no caso de saponinas que podem alterar a permeabilidade de membranas celulares de micro-organismos (SCHENKEL et al., 2001; EFFERTH; KOCH, 2011).

Apesar da ação dos extratos da *O. indica* sobre ovos e larvas de nematoides de ovinos naturalmente infectados existe a necessidade de se determinar sobre quais espécies de nematoides essa ação ocorre. Apesar da infestação por *H. contortus* ser a mais comum também podem existir outros tipos de nematoides que afetam ovinos, portanto, foi realizado o diagnóstico morfológico dos nematoides de acordo com a metodologia descrita por Santiago (1968) através da medida da extremidade caudal e cranial das L3. As L3 foram medidas em relação ao comprimento total e comprimento da bainha e os dados obtidos foram então comparados com dados estabelecidos para várias espécies de nematoides descritos na literatura (Santiago, 1968). Essa comparação de valores mostrou que 98% das larvas

(FIGURA 18; FIGURA 19) presentes na avaliação eram de *H. contortus*. Após essa análise é possível concluir que os extratos possuem ação sobre ovos e larvas de *H. contortus*.

Figura 18- Larva infectante de *H. contortus*



Fonte: Próprio autor.

Figura 19- Larvas infectantes de *H. contortus*



Fonte: Próprio autor.

A atividade anti-helmíntica está ligada não somente à presença de taninos (fração aquosa mais ativa), mas muito provavelmente a somatória de efeitos de fitoconstituintes como saponinas, flavonoides, taninos e pigmentos (nos frutos) presentes nas frações que apresentaram maior eficácia.

Além da determinação qualitativa dos fitoconstituintes da *O. ficus* a composição centesimal e mineral da planta também foi realizada com a finalidade de comparar dados da literatura para plantas cultivadas em outras condições ambientais e de diferentes idades com a planta utilizada neste estudo.

A *O. ficus* é uma planta que possui amplo uso na alimentação animal principalmente em regiões áridas como o nordeste brasileiro, pois além do valor nutricional seus cladódios armazenam cerca de 90% do seu peso em água. O teor de proteína e fibra varia de planta para planta dependendo das condições de cultivo e da idade. A planta que foi utilizada neste trabalho tem idade aproximada de 5 anos e foi cultivada na cidade de Ilha Solteira, em clima

tropical. Os resultados da análise centesimal e de minerais dessa planta são apresentados na TABELA 5.

Tabela 5- Composição bromatológica dos cladódios e frutos da *O. ficus* – matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), fibra bruta (FB)

Composição	Cladódios (%)	Frutos (%)
MS	14,61	12,03
Umidade	85,39	87,97
MM	19,46	15,33
EE	1,51	3,87
PB	2,92	5,77
FB	9,45	15,71

Fonte: Próprio autor.

Os resultados obtidos nestas análises estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura para proteína bruta, fibra bruta e matéria seca dos cladódios (STINTZING, 2005; TOSTO et al., 2007; ARAÚJO et al., 2008; GALVÃO JUNIOR et al., 2014). Para os frutos a composição bromatológica foi semelhante aos valores encontrados por Kossori et al. (1998), mas diferentes dos encontrados por Chiteva; Wairagu (2013), sendo que essas diferenças podem ser atribuídas principalmente ao estado de maturação do fruto (CHITEVA; WAIRAGU, 2013).

A similaridade da constituição da planta utilizada em nosso estudo com dados publicados na literatura, ainda que para plantas mais jovens, sugere que mesmo sob condições diferentes de cultivo essa planta não sofre alterações significativas nos seus níveis nutricionais bem como na sua constituição em fitoconstituintes (GINESTRA et al., 2009; STINTZING, 2005).

Os resultados indicam que a *O. ficus* pode ser não só uma fonte nutricional para ruminantes, mas também ser usada para fins terapêuticos devido às propriedades biológicas

descritas na literatura (atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante) além do seu possível efeito anti-helmíntico comprovado até o momento em testes *in vitro*.

9 CONCLUSÕES

A *O. ficus* apresenta atividade ovicida e larvicida *in vitro* sobre ovos e larvas de *Haemoncus contortus* comprovada através de ensaios de eclodibilidade dos ovos, desenvolvimento larval e migração larval. Estes resultados fornecem suporte para a realização dos testes *in vivo* utilizando a planta como suplemento às rações de ovinos.

REFERÊNCIAS

- ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Anthelmintic activity of *Spigelia anthelmia* extract against gastrointestinal nematodes of sheep. **Parasitology Research**, Heidelberg, v. 1, n. 101, p. 63-69, 2007.
- AL-QARAWI, A. A.; MAHMOUND, O. M.; SOBIAH, H. E. M.; ADAM, S. E. A preliminary study on the anthelmintic activity of *Calotropis procera* latex against *Haemonchus contortus* infection in Najdi sheep. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 25, n. 1, p. 61-70, 2001.
- ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013.
- AMORIM, M. F. D.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, M. S. T.; PITA, J. C. L. R.; DANTAS, J. G.; RAMALHO, J. A.; XAVIER, A. L.; PALOMARO, T. V.; JÚNIOR, N. L. B. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 448-454, 2007.
- ARAÚJO, L. F.; SILVA, F. L. H.; BRITO, E. A.; JUNIOR, S. O.; SANTOS E. S. Enriquecimento proteico da palma forrageira com *Saccharomyces cerevisiae* para alimentação de ruminantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 401-407, 2008.
- ASSIS, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S.; COSTA, C. T. C.; SOUZA, J. L. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *spigelia anthelmia* Linn. extracts on *haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, n.3, p. 43-49, 2003.
- ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J.; KYRIAZAKIS, I. Exploiting synergisms and interactions in the nutritional approaches to parasite control in sheeps production systems. **Small Ruminat Reserch**, Amsterdam, v. 76, n.1, p. 2-11, 2008.
- BARNES, E. H.; DOBSON, R. J. Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: Computer model to stimulate grazing systems and the evaluation of anthelmintic resistance. **International Journal of Parasitology**, Navi Mumbai, v. 20, n.7, p. 823-831, 1990.
- BISPO, S. V.; FERREIRA M. A.; VÉRAS, A. S. C.; BATISTA, A. M. V.; PESSOA, R. A. S.; BLEUEL, M. Palma forrageira em substituição ao feno de capim-elefante. Efeito sobre consumo, digestibilidade e características de fermentação ruminal em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 36, n. 6, p. 1902-1909, 2007.
- BRITO JUNIOR, L.; SILVA, M. L. C. R.; LIMA, F. H.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, W. W. Estudo comparativo da ação anti-helmíntica do *Operculina hAMILTONII* (batata de purga) e do *Mormodicacharantia* (melão de são caetano) em caprinos naturalmente infectados, **Ciência e Agrotecnologia**, Campina Grande, v. 35, n. 4, p. 797-802, 2011.
- CASTEJON, F. V. **Taninos e saponinas**. 2011. 29 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

CHITEVA, R.; WAIRAGU, N. Chemical and nutritional content of *Opuntia ficus-indica* (L.). **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 12, n. 21, p. 3309-3312, 2013.

COSTA, C. T. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MACIEL, M. V.; MORAIS, S. M.; CASTRO, C. M. S.; BRAGA, R. R., OLIVEIRA, L. M. B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 284-287, 2008.

COSTA, C. T. C.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Efeito ovicida de extratos de sementes de *mangifera indica* sobre *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 57-60, 2002.

COELHO, H. L. Farmacovigilância: um instrumento necessário. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 871-875, 1998.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 44, n.1, p. 35-44, 1992.

CONSTANTINE, G. H.; KARCHESY, J. Variations in hypericin concentrations in *Hypericum perforatum* L. and commercial products. **Pharmaceutical Biology**, London, v. 36, n. 5, p. 365-367, 1998.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C., SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Joao Pessoa , v. 15, n. 3, p. 272-278, 2005.

CUNHA, M. P. V.; ALVES, NETO, A. F.; SUFFREDINI, I. B.; ABEL, L. J. C. Avaliação da atividade anti-helmíntica de extratos brutos de plantas da floresta amazônica e mata Atlântica brasileira sobre *Haemonchus contortus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte , v. 66, n. 2, p. 374-380, 2014.

ECHEVARRIA, F. A. M. Resistência anti-helmíntica. In: PADILHA, T. (Ed). **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes Coronel Pacheco**. Minas Gerais: EMBRAPA-CNPGL, 1996. p. 53-75.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. **Current Drug Targets**, Bussum, v. 12, n.12 p. 122-132, 2011.

FAROUK, L.; LAROUBI, A.; ABOUFATIMA, R.; BENHARREF, A.; CHAIT, A. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: possible mechanisms involved. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 3, n. 115, p.449-454, 2008.

FEUGANG, J. M.; KONARSKI, P.; ZOU, D.; STINTZING, F. C.; ZOU, C. Nutritional and **Journal Ethnopharmacology**, Shannon , v. 115, n. 1, p. 449-454, 2008.

FEUGANG, J. M.; KONARSKI, P.; ZOU, D.; STINTZING, F. C.; ZOU, C. Medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp) cladodes and fruits. **Frontiers in Bioscience**, Nova York, v. 11, n. 1, p. 2574-2589, 2006.

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnostic. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 12, p. 1391-1402, 2013.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, C. A. R.; MACHADO, S. P. F. M.; VIDOTI, J. G.; OLIVEIRA, B. J. A. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GALATI, E. M.; MONDELLO, M. R.; MONFORTE, M.T.; GALLUZO, M.; MICELI, N.; TRIPODO, M. M. Effect of *Opuntia ficus-indica* (L) Mill. Cladodes in the Wound-Healing Process. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, Lago Vista, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2003.

GINESTRA, G.; MARY, L. P.; BENNETT, R. N.; ROBERTSON, J.; MANDALARI, G.; NAEBAD. A.; CURTO, R. B. L.; BISIGNANO, G.; FAULDS, C. B.; WALDRON, K. W. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Lago Vista, v. 57, n. 10, p. 10323–10330, 2009.

GIRÃO, E. S.; CARVALHO, J. H.; LEAL T. M.; VIEIRA, L. da S.; MEDEIROS, L. P. **Plantas medicinais no controle de helmintos em caprinos**. [S.l.]: Embrapa-Nordeste, 2004. p. 1-32.

GONÇALVES, L. C. P.; MARCATO, A. C.; RODRIGUES, A. C. B.; PAGANO, A. P. E.; FREITAS, B. C.; MACHADO, C. O.; NAKASHIMA, K. K.; ESTEVES, L. C.; LOPES, N. B.; BASTOS, E. L. Betalainas: das cores das beterrabas à fluorescência das flores. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 292-309, 2015.

GONZALES, F. J.; JARABO, S. M. M. La chumbera como cultivo de zonas áridas. **Hojas Divulgadoras**, Palma De Mallorca, v. 90, n. 1, p. 24, 1990.

GORDON, H. M; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**, Washington, v. 12, n.1, p. 50-52, 1939.

GALVÃO JUNIOR, G. B. G.; SILVA, A. B. J.; MORAIS, G. H. J.; LIMA, N. L. Palma forrageira na alimentação de ruminantes: cultivo e utilização. **Acta Veterinária Brasília, Mossoró**, v. 8, n. 1, p. 78-85, 2014.

VEIGA JUNIOR, V. F. V.; PINTO, C. A. plantas medicinais: cura segura. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

KATIKI, L. M.; FERREIRA, J. F.; GONZALEZ, J. M.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY DS, A. C.; AMARANTE, A. F. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and

hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 18, n.1, p. 192-218, 2013.

KAHIYA, C.; MUKARATIRWA, S.; THAMSBORG, S. M. Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 265-274, 2003.

KELLAR, Q. A. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, n. 1, p. 413-426, 1997.

KETZIS, J.; TAYLOR, A.; BOWMAN, D. L.; WARNICK, H. N. *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. **Small Ruminantes Research**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 193-200, 2002

KEUTGEN, A. J.; PAWELZIK, E. Modifications of strawberry fruit antioxidant pools and fruit quality under NaCl stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 1, p. 4066-4072, 2007.

KIM, D. O.; JEONG, S. W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 231-326, 2003.

KONÉ, W. M.; KOFFI, A. G.; BOMISSO E. L.; TRABI, F. H. Ethnomedical study and iron content of some medicinal herbs used in traditional medicine in cote d'ivoire for the treatment of anaemia. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine**, Ile-Ife, v. 9, n.1, p. 81-87, 2012.

KOSSORI, R. L. K.; VILLAUME, C. Essadiq el boustani, yves sauvaire and luc méjean. composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). **Plant Foods for Human Nutrition**, New York, v. 52, n. 3, p. 263–270, 1998.

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

KUMAR, D. Antiinflammatory, analgesic, and antioxidant activities of methanolic wood extract of *Pterocarpus santalinus* L. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, Mumbai, v. 2, n. 2, p. 200-202, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids. **The Scientific World Journal**, New York, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2013.

LEATHWICK, D. M.; POMROY, W. E.; HEATH, A. C. Anthelmintic resistance in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, Oxfordshire, v. 49, n. 6, p. 227-235, 2001.

LEO, M.; BRUZUAL DE ABREU, M.; POWLOWSKA, A. M.; CIONI, P. L.; BRANCA, A. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC-P-DA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 3, n.1, p. 48-52, 2010.

MALI, R. G.; MEHTA, A. A. A review on anthelmintic plants. **Natural Product Radance**, Niscair, v. 7, n. 1, p. 446-475, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO MAPA. **Caprinos e ovinos**. [S.l.: s.n.], 2011. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>. Acesso em: 5 set2013.

MARTINS, S. C. C. **Avaliação do potencial biológico de *Opuntia ficus-indica***. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

MELO, A. C. F. L. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003.

MELO, A. C. F. L. **Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil**. 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Faculdade de Ciências Veterinárias., Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

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

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

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

MORAIS, D. A. E. F.; VASCONCELOS, A. M. Alternativas para incrementar a oferta de nutrientes no semiárido brasileiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 1-24, 2007.

NERY, P. S.; DUARTE, E. R.; MARTINS, E. R. Plant efficacy in small ruminant gastrointestinal nematode control: a review of published studies. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 330-338, 2009.

GOBBO NETO, G. L.; LOPES, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 374-381, 2007.

OKUDA, T.; ITO, H. Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. **Molecules**, Tokio, v. 16, n. 16 p. 2191-2217, 2011.

OLIVEIRA, L. O.; VIEIRA, M. T.; NUNES, F.; VANESSA, R. F. V.; DUARTE, R. E.; MOREIRA, L. D.; KAPLLA, C. A. M.; MARTINS, R. E. Chemical composition and efficacy in the egg-hatching inhibition of essential oil of *Piper aduncum* against *Haemonchus contortus* from sheep. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, l, v. 24, n. 3, p. 288-292, 2014.

OLIVEIRA, L. M. B. Plantas taniníferas e o controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria , v. 41, n. 11, p. 1967-1974, 2011.

PEREIRA, J. R.; CARDOSO, G. C. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

POWERS, K. G.; WOOD, J. B.; GIBSON, T.; SMITH, H. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 265-84, 1982.

PRICHARD, R. K. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 445-452, 2001.

RAY, K. **American consortium for small ruminant parasite control**. Estados Unidos: Local de Edição, 2015. Disponível em: <
<http://www.wormx.info/Resources/Topics/Kaplan2014.html>> Acesso em: 19 fev. 2015

RIBEIRO, R. C. A.; ANDRADE, F.; MEDEIROS, M.; CAMBOIM, S. A.; PEREIRA JUNIOR, A. F.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W. Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob *Haemonchus contortus* em ovinos no semiárido paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica , v. 34, n. 11, p. 1051-1055, 2014.

ROBERTS, J.; SWAN, R. A. Quantitative studies of ovine haemonchosis. The interpretation and diagnostic significance of the changes in serial egg counts of *Haemonchus contortus* in a sheep flock. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam , v. 9, n. 1, p. 211-216, 1982.

SÁENZ, C.; BERGER H.; GARCIA, J. C.; GALLETTI, L.; CORTÁZAR, V. G.; HIGUERA, I. **Utilización agroindustrial del nopal. boletín de servicios agrícolas de la FAO**, 162. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2006.

SANTIAGO, M. A. M. ***Haemonchus* Cobb, 1898 (Nematoda: Trichostrongylidae). Contribuição ao estudo da morfologia, biologia e distribuição geográfica das espécies parasitas de ovinos e bovinos no Rio Grande do Sul**. 1968. 89 f. Tese (Livro-Docência)- Faculdade De Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1968.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3. ed. Florianópolis: UFRGS- UFSC, 2001. p. 711-40.

SEMEDO, A. C. J. **Compostos bioativos de *Opuntia ficus-indica***. 2012. 140 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)– Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

SILVA, D. J. S.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos bioquímicos e biológicos**. Viçosa: UFV, 2006. p. 235.

SILVA, R.; SOUZA, G. H. B.; DA SILVA, A. A.; DE SOUZA, V. A.; PEREIRA, A. C.; ROYO, V. A.; SILVA, M. L. A.; DONATE, P. M.; ARAÚJO, A. L. S. M.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (–)-cubebin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Kidlington, v. 15, n. 4, p. 1033–1037, 2005.

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

SOUZA, L. P. **Padronização de extratos vegetais *Astronium urundeuva* (Anacardiácea)**. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

SOUZA, P. N. S. **Eficácia de extratos vegetais para controle das helmintose ovina, no norte de Minas Gerais**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)– Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2009.

SOUZA, A. P.; RAMOS, C. I.; DALAGNOL, C. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no estado de Santa Catarina. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Brasil, 2002. p. 1.-6.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Cactus stems (*Opuntia spp.*): a review on their chemistry, technology, and uses. **Molecular Nutrition Food Research**, Weinheim, v. 49, n.2, p. 175–194, 2005.

TESORIERE, L.; BUTERA, D.; PINTAUDI, A. M.; ALLEGRA, M.; LIVREA, M. A. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits decreases oxidative stress in healthy humans. A comparative study with vitamin C. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.80, n.1, p. 391-395, 2004.

THOMAZ, S. V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C. Resistance of gastrointestinal nematodes of anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 41-47, 2004.

TOMÁS, C. H.; HUAMÁN, M.; AGUIRRE, M.; BRAVO, A.; LEÓN, Q. M. GUERRERO, A.; ORIHUELA, R.; AVILÉS, Y. D. Estudio químico y fitoquímico de la *opuntia ficus-indica* “tuna”, y elaboración de un alimento funcional. **Revista Peruana de Química e Ingeniería Química**, Lima, v. 15, n. 1, p. 70-74, 2012.

TOSTO, M. S. L.; ARAÚJO, G. G. L.; OLIVEIRA, R. L.; BAGALDO, A. R.; DANTAS, F. R.; MENEZES, D. R.; CHAGAS, E. C. O. Composição química e estimativa de energia da palma forrageira e do resíduo desidratado de vitivinícolas **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 8, n. 1, p. 239-249, 2007.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4. ed. Japão: JICA, 1998. 166 p.

VASCONCELOS, C. A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 97-106, 2005.

VERAS, R. M. L.; FERREIRA, M. A.; CARVALHO, F. F. R, VÉRAS, A. S.C. Farelo de Palma Forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) em Substituição ao Milho. 1. Digestibilidade Aparente de Nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG , v. 31, n. 3, p. 1-2, 2002.

VIEIRA, L. S.; BERNE, M. E. A.; CAVALCANTE, A. C. R.; MENEZES, R. A. A. **Redução do número de ovos por grama de fezes (OPG) em caprinos medicados com anti-helmínticos**. Sobral: EMBRAPA, 1989. 18 p. (Boletim de Pesquisa, 11).

VILLALBA, J. J.; PROVENZA, F. D.; HALL, J. O.; LISONBEE, L. D. Selection of tannins by sheep in response to gastrointestinal nematode infection. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 6, p. 2189-2198, 2010.

VILLEGAS, H. M. M.; ARGÁEZ, B. R.; VIVAS, R. R. I.; ACOSTA, T. J. F. J.; GONZÁLEZ, M. M.; FARFÁN, C. M. *In vivo* anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 189, n.1, p. 284-290, 2012.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

WAIRAGU, R. C.; WAIRAGU, N. Chemical and nutritional content of *Opuntia ficus-indica* (L.). **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 12, n. 1, p. 3309-3312, 2013.

WILLIAMS A. R.; ROPIAK, H. M.; FRYGANAS, C. F.; DESRUES, O.; HARVEY, I. M.; THAMBORG, S. M. Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. **Parasites & Vectors**, London, v. 7, n. 7, p. 518, 2014.

WILLIAMS, P. Review of modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. **Journal of Natural Products**, London, v. 75, n. 1, p. 1261–1261, 2012.

ZOU, D. M.; BREWER, M.; GARCIA, F.; FEUGANG, K. M.; WANG, J.; ZANG, R.; LIU, H.; ZOU, C. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. **Nutrition Journal**, London , v. 4, n. 4, p. 25-36, 2005.