

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

**Ação anti-helmíntica do extrato de *Piper cubeba* em
ovinos**

Clara de Araujo Sanchez
Médica Veterinária

Dracena
Dezembro/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

**Ação anti-helmíntica do extrato de *Piper cubeba* em
ovinos**

Clara de Araujo Sanchez

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Velludo Gomes de Soutello

Co-orientadora: Prof. Dra. Rosangela da Silva de Laurentiz

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Dracena
Dezembro/2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

S211a Sanchez, Clara de Araujo.
Ação anti-helmíntica do extrato de Piper cubeba em ovinos
/ Clara de Araujo Sanchez. -- Dracena: [s.n.], 2020.
42 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de
Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2020.

Orientador: Ricardo Velludo Gomes de Soutello
Co-orientadora: Rosangela da Silva de Laurentiz
Inclui bibliografia.

1. Fitoterápicos. 2. Helmintos. 3. Resistência. 4.
Ruminantes. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas
CRB 8/6665



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Ação anti-helmíntica do extrato de Piper cubeba em ovinos

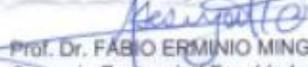
AUTORA: CLARA DE ARAÚJO SANCHEZ

ORIENTADOR: RICARDO VELLUDO GOMES DE SOUTELLO

COORIENTADORA: ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. RICARDO VELLUDO GOMES DE SOUTELLO
Curso de Engenharia Agrônoma / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena


Prof. Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena


Prof. Dr. WESLEN FABRÍCIO PIRES TEIXEIRA
Universidade Federal de Goiás / Goiânia/GO

Dracena, 05 de dezembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Clara de Araujo Sanchez – nasceu em 28 de dezembro de 1990, na cidade de Andradina– SP. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Fundação Educacional de Andradina – SP em março de 2011, graduando –se em janeiro de 2016. Em março de 2018 ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, na FCAT/Unesp - Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Câmpus de Dracena.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe, cozinheira, da pele escura e do candomblé que enfrentou todas as barreiras e que trabalhou incansavelmente para eu conseguir me formar e realizar o mestrado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre me guiar, me orientar e me dar forças pra conseguir chegar onde eu quero.

Agradeço minha família, minha mãe Néia e meu pai Claudio por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas.

Agradeço ao meu namorado João Vitor por me ajudar em todos as coletas e análises e por sempre estar comigo em todos os momentos sendo eles bons ou ruins.

Agradeço ao meu orientador, professor Ricardo, pela oportunidade, por me orientar, confiar, transmitir seus conhecimentos e acreditar no meu trabalho.

Agradeço a professora Rosangela por ter me ensinado tanto e me ajudado estando perto ou mesmo longe sem medir esforços.

Agradeço a todos que me ajudaram nas atividades experimentais, Juliana, Rui, Vinícius, João Carlos e Giulia, principalmente a Juliana e a Giulia, minhas companheiras em todas as situações nesses dois anos de mestrado.

Agradeço aos funcionários das fazendas Santa Luzia e Córrego Seco, Mauricio, Iago, Antonio e Ubirajara pela ajuda nos experimentos.

Agradeço aos demais professores e funcionários da FCAT Unesp Dracena.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram até o presente momento.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Dracena



Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Ação anti-helmíntica do extrato bruto da Piper cubeba." (Anti-helminthic action of Piper cubeba crude extract), registrada com o nº 01/2019,R2 – CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). Ricardo Velludo Gomes de Soutello – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilio Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de 18/04/2019.

Dracena, 18 de abril de 2019.


Profa. Dra. Sirlei Aparecida Maestá
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ação anti-helmíntica do extrato de *Piper cubeba* em ovinos

RESUMO - O objetivo do estudo foi avaliar a atividade anti-helmíntica do extrato da *Piper cubeba* em helmintos gastrintestinais de ovinos naturalmente infectados. Foram realizados três estudos, Estudo 1: eficácia anti-helmíntica do extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* na dosagem de 2,5 mg/kg de peso vivo (PV) fornecidas em três doses, uma a cada 14 dias; Estudo 2: eficácia anti-helmíntica do extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* na dosagem de 5,0 mg/kg de PV em única dose no dia zero e a toxicidade desse produto; Estudo 3: eficácia anti-helmíntica do extrato hexânico da *Piper cubeba* na dosagem de 5,0 mg/kg de PV. Foram utilizados 33, 30 e 10 animais nos estudos 1, 2 e 3, respectivamente. Nos estudos 1 e 2, um grupo foi mantido sem tratamento anti-helmíntico e os outros dois foram tratados: um com extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* e o outro com fosfato de levamisol em única dose no dia zero (10 mg/kg de PV) via subcutânea. As coletas das fezes foram realizadas nos dias 0, 4, 10, 14, 21, 28, 35 e 42 no estudo 1 e até os 35 no estudo 2 para posterior análises de ovos por grama de fezes (OPG) e culturas de larvas. No estudo 1, o percentual de redução do levamisol foi de 100%, permanecendo até 21 dias após o tratamento. O percentual do extrato foi de 45%, 81% e 93% após a primeira, segunda e terceira dose em relação ao grupo controle, respectivamente. Nas coproculturas os gêneros de larvas encontradas em ordem de prevalência foram *Haemonchus*, *Cooperia*, *Oesophagostomun* e *Trichostrongylus*. No estudo 2, o percentual de redução do fosfato de levamisol foi de 100% como controle negativo, permanecendo até 21 dias após o tratamento. O percentual de redução do extrato foi de 96,6%, 96,2% e 91,8% aos 14, 21 e 28 dias após a aplicação comparado ao grupo controle respectivamente. Nas coproculturas, os gêneros de larvas encontradas em ordem de prevalência foram *Haemoncus*, *Cooperia*, *Oesophagostomun*. Os testes de toxicidade visando função renal e hepática não apresentaram alterações após a administração do extrato. No estudo 3, após 10 dias o extrato hexânico apresentou redução de 56,6% no OPG dos animais. De acordo com os testes realizados, pode-se concluir que o extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* demonstrou atividade anti-helmíntica sem apresentar toxicidade nos animais tratados, porém esta atividade não se dá pelos compostos apolares do extrato como mostrou no teste realizado com o extrato hexânico.

Palavras-chave: fitoterápicos, helmintos, resistência, ruminantes.

Anthelmintic action of *Piper cubeba* extract on sheep

ABSTRACT - The present work aimed to evaluate the anthelmintic activity of *Piper cubeba* crude extract in gastrointestinal helminths of naturally infected sheep raised on pasture by in vivo testing. Two tests were performed, one to evaluate the anthelmintic efficacy of *Piper cubeba* crude extract, one to evaluate the anthelmintic efficacy of *Piper cubeba* hexane extract and to evaluate the toxicity of the tested product. Study 1 was conducted in a naturally infected herd using 33 Santa Inês sheep. One group was maintained without anthelmintic treatment and the other two were treated, one with 2.5 mg / kg PV extract in 3 doses every 14 days and the other with Levamisol phosphate 10 mg / kg PV in single dose. on D0. Stool collections were performed on days 0, 4, 10, 14, 21, 28, 35 and 42. The percentage reduction of Levamisol was 100%, remaining until 21 days after treatment. The percentage of the extract was 45% at 14 days after the first dose, 81% at 14 days after the second dose and 93% 14 days after the third dose compared to the control group. In coprocultures the genera of larvae found in order of prevalence were *Haemoncus* , *Cooperia*, *Oesophagostomun* and *Trichostrongylus* sp. Study 2 was conducted in another naturally infected herd using 30 sheep of the breed. One group was maintained without anthelmintic treatment and the other two were treated, one with 5 mg / kg single dose PV extract on D0 and the other with 10 mg / kg PV single dose levisol phosphate on D0. Fecal collections were performed on days 0, 7, 14, 21, 28 and 35. The percentage of reduction of Levisol phosphate was 100% as negative control, remaining until 21 days after treatment. The percentage of extract reduction was 96.6% at 14 days after application, 96.2% at 21 days and 91.8% at 28 days, compared to the control group. In coprocultures, the genera of larvae found in order of prevalence were *Haemoncus.*, *Cooperia*, *Oesophagostomun*. Toxicity tests with the parameters Urea, Creatinine and AST showed no changes after the administration of the extract. In study 3, the anthelmintic efficacy test was performed to evaluate the action of *Piper cubeba* hexane extract in 10 animals at a single dose of 5mg / kg in D0. After 10 days the extract obtained partial efficacy with a reduction of 56.6% in the opg of the animals. The crude extract of *Piper cubeba* showed anthelmintic activity without toxicity in treated animals but this activity is not due to the nonpolar compounds of the extract as shown in the test performed with hexane extract.

Keywords: herbal medicines, helminths, resistance, ruminants.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	10
1.1. INTRODUÇÃO	10
1.1.1. Objetivo Geral	11
1.1.2. Objetivos específicos	11
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	12
1.2.1. Desenvolvimento dos Helmintos Gastrintestinais nos Ovinos.....	12
1.2.2. Controle Anti-Helmíntico.....	13
1.2.3. Fitoterápicos e Fitoconstituintes no Controle Anti-Helmíntico	14
CAPÍTULO 2 – AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DO EXTRATO DE PIPER CUBEBA EM OVINOS.....	22
Resumo	22
Abstract	23
1.1. INTRODUÇÃO	24
1.2. MATERIAL E MÉTODOS	25
1.2.1. Preparo dos extratos hidroetanólicos da Piper cubeba.....	25
1.2.2. Preparo do extrato hexânico	25
1.2.3. Estudo 1: Extrato hidroetanólico com múltiplas doses.....	26
1.2.4. Estudo 2: Extrato hidroetanólico em dose única.....	27
1.2.4.1. Análise dos parâmetros bioquímicos.....	28
1.2.5. Estudo 3: Extrato hexânico em dose única	28
1.2.6. Análise estatística.....	29
1.3. RESULTADOS	29
1.3.1. Estudo 1	29
1.3.2. Estudo 2	31
1.3.4. Estudo 3	34
1.4. Discussão	35
1.4.1. Estudo 1:	35
1.4.2. Estudo 2:	36
1.4.2.1. Análise dos parâmetros bioquímicos	38
1.4.3. Estudo 3:	38
1.5. CONCLUSÃO	39
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO

A criação de ovinos (*Ovis aries*) é uma atividade executada mundialmente, com produção de carne anual de 14 milhões de toneladas, o que constitui cerca de 3% da produção mundial de carne (FAO, 2016).

Os países tropicais e subtropicais comportam a maioria da população ovina, devido a fatores geoclimáticos aos quais os animais são adaptados Jimenez – Sanz et al. (2016). O Brasil vem ao longo dos anos se estabelecendo no cenário agropecuário global e a ovinocultura não se torna exceção nesse mercado, sendo uma atividade de grande rentabilidade por meio da carne, couro, leite e lã, possuindo menores exigências de extensão de pastagem com menos animais por área comparada a produção bovina (GIANLOURENÇO et al., 2013).

Segundo a FAO (2016), o Brasil ocupa a 18^o posição na classificação mundial de ovinos e a utilização das áreas de pastagens vem sendo cada vez mais exploradas como fonte primária de energia na dieta de ruminantes, proporcionando papel importante na pecuária de corte e incrementando a oferta de produtos Euclides et al. (2002). Porém sistemas que incluem pastejo de animais contribuem para o aumento de infecções por helmintos gastrintestinais (MENDONÇA et al., 2014).

As doenças parasitárias representam impacto negativo em potencial para a produção animal, comprometendo, muitas vezes, o processo de transformação dos produtos de origem animal Stotzer et al. (2014), com perdas estimadas em 13,96 bilhões de dólares/ano, sendo mais da metade (US\$ 7,10 bilhões) relacionadas somente aos nematoides gastrintestinais (GRISI et al., 2014).

A sensibilidade desses animais a estes parasitas tornou-se grande problema na produção devido a estas helmintoses ocorrerem por meio de infecções de várias espécies de parasitas do trato gastrintestinal. Além disso, causam sérios problemas sanitários como perda de peso, anemia, letargia, anorexia e até a morte, levando a prejuízos como diminuição da produção e aumento do valor do produto final. (TAYLOR et al., 2007).

O controle dessas parasitoses é basicamente feito por meio de

desverminações que permanece essencialmente com bases químicas. Decorrente do insuficiente repasse de tecnologia, ou mesmo de informações inadequadas referentes à frequência de tratamento e à utilização incorreta das drogas antiparasitárias em ovinos, foi observada grande diminuição da eficácia desses produtos nas principais regiões produtoras brasileiras, inclusive, com o aparecimento de cepas resistentes a vários grupos químicos disponíveis no mercado (MOLENTO *et al.*, 2004)

Neste sentido, as pesquisas estão cada vez mais direcionadas à busca por tratamentos alternativos como, por exemplo, a fitoterapia (MOLENTO *et al.*, 2004).

Trabalhos preliminares com *Piper cubeba* indicaram que a pimenta apresenta atividades biológicas importantes como antioxidante, antimicrobiana e anti-helmíntica Carlis *et al.* (2019). Produtos naturais quando vindos de espécies vegetais, apresentam grande importância no desenvolvimento de novos medicamentos. A fitoterapia pode trazer grandes benefícios ao produtor, consumidor e meio ambiente. No entanto, estudos *in vivo* são escassos e carecem de informações.

1.1.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade anti-helmíntica do extrato hidroalcoólico e hexânico da *Piper cubeba* em helmintos gastrintestinais de ovinos naturalmente infectados criados a pasto por meio de testes *in vivo*.

1.1.2. Objetivos específicos

- Avaliar a redução na contagem de OPG após a administração dos extratos hidroetanólico e hexânico da *Piper cubeba* por meio de testes *in vivo*.
- Analisar parâmetros bioquímicos para avaliar possível toxicidade referente ao extrato hidroetanólico em maior dosagem.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Desenvolvimento dos Helmintos Gastrintestinais nos Ovinos

Os gêneros de maior ocorrência no estado de São Paulo são *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp, *Cooperia* spp, *Oesophagostomum* spp e *Strongyloides* spp. De acordo com Amarante (1995). A família *Trichostrongylidae* tem maior importância e patogenicidade nas infecções.

O *Trichostrongylus* em infecções severas causa grave enterite. Quando instalados no intestino delgado penetram abaixo do epitélio do órgão em que se encontram presentes, causando lesões na mucosa e exsudação de proteínas séricas. Andronicos *et al.* (2012). Os principais danos são atrofia das vilosidades, espessamento da mucosa e erosão do epitélio o que levam a alteração e comprometimento da absorção dos nutrientes. Animais parasitados tendem a ter uma redução no consumo de alimentos Holmes *et al.* (1985). Os sinais clínicos da *Cooperia* são similares aos do *Trichostrongylus*.

Os *Strongilóides*, apresentam aspectos biológicos distintos dos demais, pois as larvas infectam seus hospedeiros, por penetração cutânea, ingestão de pastagens contaminadas e pela transmissão da matriz para a cria pela ingestão do colostro. Esta espécie pode habitar o epitélio do intestino delgado, duodeno e jejuno, levando a inflamações semelhantes ao citado anteriormente (AMARANTE *et al.*, 2007).

O gênero *Oesophagostomum* é um dos mais patogênicos. A enfermidade é causada por larvas que se localizam na mucosa do intestino causando inflamação e formação de nódulos. Os sinais clínicos são anorexia, diarreia intensa e anemia Horak e Clark, (1996). Porém segundo Amarante *et al.* (2004), normalmente as infecções são mistas podendo haver parasitos de outras espécies além dos citados.

O *Haemonchus* é hematófago e consome 0,05mL a 0,08mL de sangue por dia, sendo assim um animal infectado por 500 parasitas, uma infecção relativamente leve, perderá de 25 mL a 40 mL de sangue por dia. No entanto ao final de cinco meses, terá perdido até 6 litros de sangue. Um animal com uma infecção severa de 10 a 59 mil vermes poderá perder diariamente até 4 litros de sangue Marquadt *et al.*, (2000). Os animais que possuem carga parasitária elevada, além da anemia grave, também apresentam edemas submandibulares, caquexia, letargia, prostração e

ascite. (AMARANTE, 2004 e URQUHART, 1998).

O ciclo de vida desses parasitos é dividido em fase exógena (dentro do ovo no meio ambiente) e fase endógena (dentro do hospedeiro). Inicia-se pela ingestão do parasita na fase L3 que é a forma infectante, chegando ao meio externo pelas fezes ou secreções. O ovo é eclodido liberando larvas L1 que evoluem até o terceiro estágio no meio exterior podendo ter um desenvolvimento favorecido pela umidade e temperaturas consideravelmente altas de 25°C a 27°C (SEQUEIRA; AMARANTE, 2001).

1.2.2. Controle Anti-Helmíntico

No início da década de 1980, com o lançamento das lactonas macrocíclicas, endectocidas de amplo espectro (avermectinas e milbemicinas) largamente utilizados em animais domésticos, houve uma chamada revolução no mercado de produtos veterinários para o controle de parasitos Geary et al. (2005). Porém, com o tempo, várias formulações contendo avermectinas foram liberadas no mercado com o preço reduzido levando ao uso indiscriminado e, conseqüentemente, à seleção de populações resistentes de endo e ectoparasito. A utilização incorreta e indiscriminada desses produtos e a falta de conhecimento sobre aspectos epidemiológicos do agente parasitário pelos produtores têm provocado o surgimento de resistência dos nematódeos, ou seja, a seleção dos parasitos à ação dos medicamentos utilizados podendo apresentar-se como um dos principais problemas sanitários na cadeia de produção animal (PAIVA *et al.*, 2001).

Sendo assim, é extremamente importante que haja sucesso no controle dessas infecções nos sistemas de produção baseando-se em um bom conhecimento da epidemiologia básica, das particularidades regionais e o tipo dos sistemas produtivos (CEZAR *et al.*, 2010).

Devido a problemática da resistência anti-helmíntica, vem crescendo o interesse em desenvolver e utilizar outros métodos de controle das helmintoses. Uma das alternativas tem sido o uso de extratos vegetais como anti-helmíntico natural (MOLENTO *et al.*, 2004).

1.2.3. Fitoterápicos e Fitoconstituintes no Controle Anti-Helmíntico

Desde a antiguidade, plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de diversas doenças. Estudos revelam que entre os anos de 5.000 e 2.800 a.C, o homem já realizava o cultivo de cereais e fazia uso de algumas plantas medicinais. As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas com propriedades farmacológicas. No entanto, a fitoterapia é o tratamento de enfermidades através de vegetais frescos, drogas vegetais ou extratos vegetais (OLIVEIRA; AKISUE, 1997).

Sendo assim, o uso de fitoterápicos com finalidade profilática ou curativa passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS (Organização Mundial da Saúde) em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para seu uso. De acordo com a OMS, 80% da população mundial depende das práticas tradicionais no que se refere à atenção primária a saúde e 85% dessa parcela utiliza plantas ou preparações à base de vegetais (MAIOLI-AZEVEDO; FONSECA-KRUEL, 2007).

O intenso crescimento de produtos naturais está relacionado a alguns fatores, dentre eles: efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e incorreto de medicamentos sintéticos. Contudo, diante da carência financeira, devido a ampla camada da população não ter acesso a medicina institucionalizada, a fitoterapia é uma alternativa viável para a maioria dos brasileiros. (ALBUQUERQUE *et al.*, 1998).

Nas últimas décadas, as plantas têm sido usadas como uma fonte promissora de moléculas alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de câncer, dor, infecções e infestações parasitárias. 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. (SANTOS *et al.*, 2007).

As propriedades biológicas ou toxicidade exibidas pelas plantas estão relacionadas diretamente à natureza e quantidade de seus fitoconstituintes. Sendo assim, a ação antiinflamatória de muitas plantas medicinais normalmente está associada à presença de flavonoides, compostos polifenólicos e lignanas (PANDEY

et al., 2013).

Vários grupos de pesquisa em todo o mundo realizaram estudos sobre o uso de plantas e extratos para o tratamento de parasitas gastrointestinais em ovinos. Esses estudos demonstraram a importância dessa área de pesquisa como alternativa no controle da infecção (SOLDERA-SILVA *et al.*, 2018).

A atividade anti-helmíntica dessas plantas está geralmente associada à presença de taninos Katiki *et al.* (2017). No entanto, alguns estudos vêm ressaltando a atividade em plantas não- taníferas como por exemplo *Cymbopogon citratus*, cujas propriedades anti-helmínticas estão relacionadas a outros tipos de componentes contidos em óleos essenciais (MACEDO *et al.*, 2015).

Nos estudos de Krychak-Furtado (2006), 35 extratos vegetais foram avaliados *in vitro* contra nematóides gastrintestinais de ovinos. Destes, 13 extratos apresentaram eficiência superior a 80%: coraçãozinho (*Melochia villosa*), aster (*Aster lanceolatus*), capim arroz (*Oryza latifolia*), roseira do brejo (*Pavonia angustifolia*), pitomba (*Trichilia pallida*), guiné (*Petiveria alliacea*), jenipapo (*Genipa americana*), xaxim (*Dicksonia sellowiana*) (pó seco 1 g), *D. sellowiana* (pó seco 2 g), *D. sellowiana* (extrato bruto), *D. sellowiana* (extrato filtrado), *Pterocaulon interruptum* (fração acetila) e *P. interruptum* (extrato bruto). Nos testes *in vivo* em ovinos, o extrato de *P. interruptum* foi administrado por via oral, na dosagem de 33,34 mg kg⁻¹ de peso corporal e obteve-se redução de 47% no número de ovos de trichostrongilídeos eliminados nas fezes. Já a administração de *Dicksonia sellowiana* em forma de pó seco, na dose de 5 g kg⁻¹ p.c., determinou 86,6% de redução de ovos dos nematóides gastrintestinais.

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

No Brasil, as espécies da família *Piperaceae* são localizadas de Norte a Sul, com boa ocorrência no Estado do Rio de Janeiro. (SUNILA; KUTTAN *et al.*, 2004).

Estudos fitoquímicos de espécies de *Piperaceae* têm levado ao isolamento de metabólitos especiais das vias biossintéticas do chiquimato, acetato-mevalonato e mista, com destaque para as substâncias isoladas do gênero *Piper* (amidas, lignanas, neolignanas, arilpropanoides, flavonoides, cromenos). Na literatura, registra-se também a ocorrência de derivados do ácido benzoico e seconeolignanas (*Peperomia*), e derivados catecólicos (*Piper*, seção *Pothomorphe*) (MARQUES *et al.*, 2011).

O jaborandi-falso (*Piper aduncum*) foi avaliado em ensaio *in vitro* sobre a eclodibilidade dos ovos de helmintos com CI50 de 2,4 mg/mL, entretanto a planta não foi avaliada em ensaios *in vivo* (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A *Piper cubeba* é uma planta não-tanífera nativa da Indonésia que nas últimas décadas vem sendo muito estudada principalmente pela presença de lignanas bioativas como a hinoquinina, cubebina, diidrocubebina entre outras (LAURENTIZ *et al.*, 2015).

As sementes provindas de frutos coletados e cuidadosamente secos antes de se madurar resultam numa aparência muito semelhante a popular pimenta-do-reino. O sabor é picante, ligeiramente amargo e persistente e possuem óleos essenciais usados para tratamentos de desordens circulatórias e doenças das vias urinárias. Na medicina tradicional indiana é usada para aliviar dores gástricas, enterites, diarréias e inflamações e para tratar icterícia aguda Chopra *et al.* (1956). O fruto de *P. cubeba* contém um óleo rico em terpenos, sendo o sabineno e o eucaliptol a maior proporção (MAGALHÃES *et al.*, 2012).

Além disso, o extrato hidroalcoólico de frutas de *P. cubeba* apresenta cerca de 24 lignanas com estruturas químicas altamente variadas Elfami *et al.* (2007). Apesar da diversidade estrutural dos componentes presentes no extrato de *P. cubeba*, as atividades biológicas desse extrato são geralmente atribuídas às lignanas cubebina e hinokinina, que são os compostos nas concentrações mais altas Lima *et al.* (2018). A pimenta também possui atividade antiparasitária como esquistossomicida (MAGALHÃES *et al.*, 2012) e tripanocida (ESPERANDIUM *et al.*, 2013).

As lignanas consistem em metabólitos secundários que apresentam uma ampla gama de propriedades biológicas. Entre essa grande variedade estrutural de

lignanas estudadas em plantas, destaca-se a cubebina que vem se tornando alvo de estudo por vários grupos de pesquisa principalmente a fim de potencializar propriedades farmacológicas. A cubebina é encontrada em várias espécies de plantas, porém na *Piper cubeba* possui quantidades consideráveis, sendo esta atualmente a principal fonte de extração (PISSURNO *et al.*, 2017).

Resultados de avaliações *in vitro* preliminares concluem que essas lignanas quando atuam em sinergismo podem apresentar atividade anti-helmíntica no controle de parasitoses em ovinos confirmando também a segurança do consumo da planta.

1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALBUQUERQUE, J. M. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: Ministério da Educação, 1989.

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

AMARANTE, A. F. T.; SALES, R. O. Controle de endoparasitoses dos ovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 1, n. 2, p. 25-47, 2007.

AMARANTE, A. F. T. Atualidades no controle de endoparasitoses ovinas. *In*: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINOCULTURA, Campinas. **Anais [...]**. Campinas: CATI/SAA, 1995. p. 33- 49.

ANDRONICOS, N. M.; MCNALLY, J.; KOTZE, A. C.; HUNT, P. W.; AARON, I. Trichostrongylus colubriformis larvae induce necrosis and release of IL33 from intestinal epithelial cells *in vitro*: Implications for gastrointestinal nematode vaccine design. **Int. J. Parasitol.**, v. 42, p. 295-304, 2012.

CARLIS, M. S. P.; FÉBOLI, A.; LAURENTIZ, A. C.; FILARDI, R. S.; PRIZANTELLI, A. H. O.; SILVA, A. M. L.; ANJOS, L. A.; MAGALHÃES, L. G.; LAURENTIZ, R. S. In vitro anthelmintic activity of the crude hydroalcoholic extract of Piper cubeba fruits and isolated natural products against gastrointestinal nematodes in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 000, p. 108932-000, 2019.

CEZAR, A. S.; TOSCAN, G.; CAMILLO, G. Multiple resistance of gastrointestinal nematodes to nine diferente drugs in a sheep flock in southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 157-160, 2010.

CHOPRA, R. N.; NAYER, S. L.; CHOPRA, I. C. **Glossary of indian medicinal plants**. New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research, 1956..

ELFAHMI RUSLAN, K.; BATTERMAN, S.; BOS, R.; KAYSER, O. WOERDENBAG, H. J.; QUAX, W. Lignan profile of *Piper cubeba*, an Indonesian medicinal plant. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 35, p. 397-402, 2007.

ESPERANDIM, V. R. in vitro antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil obtained from the fruits of *Piper cubeba*. **Planta Medica**. v. 79, p. 1653–1655, 2013.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistics division. **Production, live animals, regions, sheep**. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/pt/>. Acesso em: 31 out. 2019.

GEARY, T. G. Ivermectin 20 years on: Maturation of a wonder drug. **Trends**

Parasitol., v. 21, n. 11, p. 530-532, 2005.

GIANLORENÇO, V. K. **Produção de carne ovina pode ser mais rentável que bovina**. São Paulo: SEBRAE. 2013. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/>
Acesso em: 03 maio de 2019.

GIRÃO, E. S.; CARVALHO, J. H. de; LOPES, A. S.; MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N. **Avaliação de plantas medicinais com efeito anti-helmintico para caprinos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte. (Pesquisa em andamento, n. 78).

GRISI, L.; LEITE, R. L.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Braz. J. Veterinary Parasitology**. v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

HOLMES, C. R. Application of a weighing system for measuring total evaporative water losses in large ruminants. **Journal of Thermal Biology**. v. 10, p. 5-7, 1985.

HORAK, I. G.; CLARK, R. **The pathological physiology of helminth infestations**. [S.l.: s.n.], 1966.

HORAK, I. G.; CLARK, R. The pathological physiology of helminth infestations: Oesophagostomum columbianum. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 33, p. 139-60, 1966.

JAMARILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus Piper (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v. 88, n. 4, p. 706-716, 2001.

JIMENEZ-SANZ, A. L.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A.; COSTA, R. L. D.; BELTRAME, R. T.; RUA M, A. S.; MADELLA-OLIVEIRA, A. F. Relação entre fatores associados às parasitoses gastrointestinais, desempenho e estado fisiológico de ovelhas Santa Inês. **Agropecuária Técnica**, v. 37, n. 1, p. 88-95, 2016.

KATIKI, L. M.; BARBIER, A. M. E.; ARAUJO, R. C.; VERÍSSIMO, C. J.; LOUVANDINI, H.; FERREIRA, J. F. S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. **Vet. Parasitol.** v. 243, p. 47-51, 2017.

KRYCHACKY-FURTADO, S. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vitro***. 2006. 127 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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.

LAURENTIZ, R. S. Avaliação da atividade antimicobacteriana da lignana diidroscubebina extraída da *Piper cubeba* e de seus derivados semissintéticos. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 17, n. 4, p. 782-789, 2015.

LIMA, R. G.; BARROS, M. T.; LAURENTIZ, R. S. Medicinal Attributes of Lignans

Extracted from *Piper cubeba*: **Current Developments. ChemistryOpen**, v. 7, p. 180- 191, 2018.

MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, L. M. B.; RIBEIRO, W. L. C.; SANTOS, J. M. L.; SILVA, K. C.; ARAÚJO FILHO, J. V.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L. Anthelmintic activity of *Cymbopogon citratus* against *Haemonchus contortus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 24, n.3, p. 268-275, 2015.

MAGALHÃES, L. G.; SOUZA, J. M.; WAKABAYASHI, K. A.; LAURENTIZ, R. S.; VINHÓLIS, A. H.; REZENDE, K. C.; SIMARO, G. V.; BASTOS, J. K.; RODRIGUES, V.; ESPERANDIM, V. R.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res.**, v. 110, n. 5, p. 1747-1754, 2012.

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSCECA-KRUEL, V. S. da. Plantas Mediciniais e ritualísticas vendidas em feiras livres no município do Rio de Janeiro, R. J.: Brasil: estudo de caso da zona norte e sul. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 21, n. 2, 2007.

MARQUADT, W. H.; DEMAREE, R. S.; GRIEVE, R. B. **Parasitology and Vector Biology**. 2. ed. [S.l.]: Academic Press, 2000.

MARQUES, A. M.; VELOZO, L. S. M.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Aristolactams from roots of *Ottonia anisum* (Piperaceae). **Natural Product Communications**, v. 6, p. 939-942, 2011.

MENDONÇA, V. M.; SANTOS, A. J.; NASCIMENTO, I. R.; OLIVEIRA, M. A. S.; ROCHA, S. S.; CABRAL, E. S. Perspectivas da fitoterapia veterinária: plantas potenciais na terapia dos animais de produção. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, p.1-5, 2014.

MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método FAMACHA como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1139- 1145, 2004.

OLIVEIRA, D. B.; AMORIM, A.; BRAGA, M. M.; MATTOS, D. G.; ALMOSNY, N. R. P. Atividade anti- Helmíntica da babaneira (*Musa* sp) em caprinos. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, Salvador. **Anais [...]**. Salvador: Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1997. p. 65.

OLIVEIRA F, AKISUE M. K. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

OLIVEIRA, P. A.; PINTO, D. M.; RUAS, J. L.; SANTOS, T. R. B.; PAPPEN, F. G.; SALVADEGO, T. A.; BORBA, T. C.; FERIGOLLO, A. P. Eficácia de diferentes fármacos no controle parasitário em ovinos. **Science and Animal Health**, v. 2, n. 2, p. 126- 136, 2014.

PAIVA, F. Resistência a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 20, n.120, p.29-32, 2001.

PISSURNO, A. P. R.; LAURENTIZ, R. S. Cubebina: uma molécula com grande potencial. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 2, p. 656-671, 2017.

SEQUEIRA, T. C. G. O.; AMARANTE, A. F. T. **Parasitologia veterinária: animais de produção**. Rio de Janeiro: EPUB, 2001.

SOLDERA-SILVA. Assessment of anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of *Persea americana* seed extracts. **Veterinary Parasitology**, v. 251, n.15, p. 34-43, 2018.

STOTZER, E. S.; LOPES, L. B.; ECKSTEIN, C.; MORAES, M. C. M. M.; RODRIGUES, D. S.; BASTINETTO, E. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária: uma Revisão. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity**, v. 8, n. 3, p. 198-221, 2014.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn. And piperine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, n. 2-3, p. 339- 346, 2004. TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary parasitology**. 3. ed. Philadelphia: Oxford: Blackwell Publishing, 2007. 874 p.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 273.

CAPÍTULO 2 – AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DO EXTRATO DE *PIPER CUBEBA* EM OVINOS

ANTI-HELMINE ACTION OF *PIPER CUBEBA* EXTRACT IN SHEEP.

Clara de Araujo Sanchez¹, Juliana Alencar Gonçalves¹, João Vitor França Pirola¹, Rui Santin¹, Vinicius Fernandes¹, João Carlos Fagundes¹, Rosangela da Silva de Laurentiz², Ricardo Velludo Gomes de Soutello¹.

¹Unesp - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, CEP: 17.900-000, Dracena, SP, Brasil.

² Unesp – Faculdade de Engenharia Campus de Ilha Solteira, CEP 15.385-000, Ilha Solteira, SP, Brasil.

* Corresponding author: Tel.: +55 18 996537736, Fax No.: +55 18 38218200; e-mail address: claraasan@hotmail.com (C.A. Sanchez).

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar a atividade anti-helmíntica do extrato da *Piper cubeba* em helmintos gastrintestinais de ovinos naturalmente infectados. Foram realizados três estudos, Estudo 1: eficácia anti-helmíntica do extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* na dosagem de 2,5 mg/kg de peso vivo (PV) fornecidas em três doses, uma a cada 14 dias; Estudo 2: eficácia anti-helmíntica do extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* na dosagem de 5,0 mg/kg de PV em única dose no dia zero e a toxicidade desse produto; Estudo 3: eficácia anti-helmíntica do extrato hexânico da *Piper cubeba* na dosagem de 5,0 mg/kg de PV. Foram utilizados 33, 30 e 10 animais nos estudos 1, 2 e 3, respectivamente. Nos estudos 1 e 2, um grupo foi mantido sem tratamento anti-helmíntico e os outros dois foram tratados: um com extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* e o outro com fosfato de levamisol em única dose no dia zero (10 mg/kg de PV) via subcutânea. As coletas das fezes foram realizadas nos dias 0, 4, 10, 14, 21, 28, 35 e 42 no estudo 1 e até os 35 no estudo 2 para posterior análises de ovos por grama de fezes (OPG) e culturas de larvas. No estudo 1, o percentual de redução do levamisol foi de 100%, permanecendo até 21 dias após o tratamento. O percentual do extrato foi de 45%, 81% e 93% após a primeira, segunda e terceira dose em relação ao grupo controle, respectivamente. Nas coproculturas os gêneros de larvas encontradas em ordem de prevalência foram *Haemonchus*, *Cooperia*, *Oesophagostomun* e *Trichostrongylus*. No estudo 2, o percentual de redução do fosfato de levamisol foi de 100% como controle negativo, permanecendo até 21 dias após o tratamento. O percentual de redução do extrato foi de 96,6%, 96,2% e 91,8% aos 14, 21 e 28 dias após a aplicação comparado ao grupo controle respectivamente. Nas coproculturas, os gêneros de larvas encontradas em ordem de prevalência foram *Haemoncus*, *Cooperia*, *Oesophagostomun*. Os testes de toxicidade visando função renal e hepática não apresentaram alterações após a administração do extrato. No estudo 3, após 10 dias o extrato hexânico apresentou redução de 56,6% no OPG dos animais. De acordo com os testes realizados, pode-se concluir que o extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* demonstrou

atividade anti-helmíntica sem apresentar toxicidade nos animais tratados, porém esta atividade não se dá pelos compostos apolares do extrato como mostrou no teste realizado com o extrato hexânico.

Palavras chave: fitoterápicos, helmintos, resistência, ruminantes.

Abstract

The present work aimed to evaluate the anthelmintic activity of *Piper cubeba* crude extract in gastrointestinal helminths of naturally infected sheep raised on pasture by in vivo testing. Two tests were performed, one to evaluate the anthelmintic efficacy of *Piper cubeba* crude extract, one to evaluate the anthelmintic efficacy of *Piper cubeba* hexane extract and to evaluate the toxicity of the tested product. Study 1 was conducted in a naturally infected herd using 33 Santa Inês sheep. One group was maintained without anthelmintic treatment and the other two were treated, one with 2.5 mg / kg PV extract in 3 doses every 14 days and the other with Levamisol phosphate 10 mg / kg PV in single dose. on D0. Stool collections were performed on days 0, 4, 10, 14, 21, 28, 35 and 42. The percentage reduction of Levamisol was 100%, remaining until 21 days after treatment. The percentage of the extract was 45% at 14 days after the first dose, 81% at 14 days after the second dose and 93% 14 days after the third dose compared to the control group. In coprocultures the genera of larvae found in order of prevalence were *Haemoncus* , *Cooperia*, *Oesophagostomun* and *Trichostrongylus* sp. Study 2 was conducted in another naturally infected herd using 30 sheep of the breed. One group was maintained without anthelmintic treatment and the other two were treated, one with 5 mg / kg single dose PV extract on D0 and the other with 10 mg / kg PV single dose levisol phosphate on D0. Fecal collections were performed on days 0, 7, 14, 21, 28 and 35. The percentage of reduction of Levisol phosphate was 100% as negative control, remaining until 21 days after treatment. The percentage of extract reduction was 96.6% at 14 days after application, 96.2% at 21 days and 91.8% at 28 days, compared to the control group. In coprocultures, the genera of larvae found in order of prevalence were *Haemoncus.*, *Cooperia*, *Oesophagostomun*. Toxicity tests with the parameters Urea, Creatinine and AST showed no changes after the administration of the extract. In study 3, the anthelmintic efficacy test was performed to evaluate the action of *Piper cubeba* hexane extract in 10 animals at a single dose of 5mg / kg in D0. After 10 days the extract obtained partial efficacy with a reduction of 56.6% in the opg of the animals. The crude extract of *Piper cubeba* showed anthelmintic activity without toxicity in treated animals but this activity is not due to the nonpolar compounds of the extract as shown in the test performed with hexane extract.

Key words: herbal medicines, helminths, resistance, ruminants.

1.1. INTRODUÇÃO

A produção de ovinos (*Ovis aries*) é uma atividade executada mundialmente, com produção de carne anual de 14 milhões de toneladas, o que constitui cerca de 3% da produção mundial de carne (FAO, 2016).

Os países tropicais e subtropicais comportam a maioria da população ovina, devido a fatores geoclimáticos aos quais os animais são adaptados Jimenez – Sanz et al. (2016). O Brasil vem ao longo dos anos se estabelecendo no cenário agropecuário global e a ovinocultura não se torna exceção nesse mercado, sendo uma atividade de grande rentabilidade por meio da carne, couro, leite e lã, possuindo menores exigências de extensão de pastagem com menos animais por área comparada a produção bovina (GIANLOURENÇO et al., 2013).

Segundo a FAO (2016), o Brasil ocupa a 18^o posição na classificação mundial de ovinos e a utilização das áreas de pastagens vem sendo cada vez mais exploradas como fonte primária de energia na dieta de ruminantes, proporcionando papel importante na pecuária de corte e incrementando a oferta de produtos Euclides et al (2002). Porém sistemas que incluem pastejo de animais contribuem para o aumento de infecções por helmintos gastrintestinais (MENDONÇA et al., 2014).

As doenças parasitárias representam impacto negativo em potencial para a produção animal, comprometendo, muitas vezes, o processo de transformação dos produtos de origem animal Stotzer et al. (2014), com perdas estimadas em 13,96 bilhões de dólares/ano, sendo mais da metade (US\$ 7,10 bilhões) relacionadas somente aos nematoides gastrintestinais (GRISI et al., 2014).

A sensibilidade desses animais a estes parasitos tornou-se grande problema na produção devido a estas helmintoses ocorrerem por meio de infecções de várias espécies de parasitas do trato gastrintestinal. Além disso, causam sérios problemas sanitários como perda de peso, anemia, letargia, anorexia e até a morte, levando a prejuízos como diminuição da produção e aumento do valor do produto final. (TAYLOR et al., 2007).

O controle dessas parasitoses é basicamente feito por meio de desverminações que permanece essencialmente com bases químicas. Decorrente

do insuficiente repasse de tecnologia, ou mesmo de informações inadequadas referentes à frequência de tratamento e à utilização incorreta das drogas antiparasitárias em ovinos, foi observada grande diminuição da eficácia desses produtos nas principais regiões produtoras brasileiras, inclusive, com o aparecimento de cepas resistentes a vários grupos químicos disponíveis no mercado (MOLENTO *et al.*, 2004)

Neste sentido, as pesquisas estão cada vez mais direcionadas à busca por tratamentos alternativos como, por exemplo, a fitoterapia (MOLENTO *et al.*, 2004).

Trabalhos preliminares com *Piper cubeba* indicaram que a pimenta apresenta atividades biológicas importantes como por exemplo a atividade anti-helmíntica Carlis *et al.* (2019). Produtos naturais quando vindos de espécies vegetais, apresentam grande importância no desenvolvimento de novos medicamentos. A fitoterapia pode trazer grandes benefícios ao produtor, consumidor e meio ambiente. No entanto, estudos *in vivo* são escassos e carecem de informações.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade anti-helmíntica do extrato hidroalcoólico e hexânico da *Piper cubeba* em helmintos gastrintestinais de ovinos naturalmente infectados criados a pasto por meio de testes *in vivo*.

1.2. MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1. Preparo dos extratos hidroetanólicos da *Piper cubeba*

Sementes de *Piper cubeba* importadas da Índia, já secas, foram trituradas (500g) em liquidificador e colocadas em frasco de vidro graduado contendo 1,5 L de etanol 70%. O frasco foi mantido em agitação orbital durante 7 dias em temperatura ambiente (23°C). Após 7 dias, o material foi filtrado por meio de bomba à vácuo e em seguida concentrado no rotaevaporador, conforme a técnica preconizada por Simões *et al.* (1999).

1.2.2. Preparo do extrato hexânico

No estudo 3 as sementes de *Piper cubeba* já secas foram trituradas (500g) e colocadas em um frasco contendo 1,5L de hexano. O frasco foi mantido em agitação

orbital durante 7 dias em temperatura ambiente (23° C). Após 7 dias, o material foi filtrado por meio de bomba a vácuo e, em seguida, rotaevaporado (SIMÕES *et al.*, 1999).

Após o processamento dos frutos de *Piper cubeba*, 500g de sementes produziram 75 mL de extrato na concentração de 25 mg/mL (CARLIS *et al.*, 2019). Sendo assim, foram administradas doses entre 2 a 10 mL do material, conforme o peso do animal, por via oral, utilizando uma seringa de 10 mL.

1.2.3. Estudo 1: Extrato hidroetanólico com múltiplas doses

O ensaio foi desenvolvido na fazenda Santa Luzia, município de Castilho-SP, localizada no Oeste Paulista conveniada com a Unesp – Câmpus de Dracena/SP (latitude 20°52'09.0" sul, longitude 51°29'22.9"oeste) no período de maio a junho de 2018. A região possui clima tropical, caracterizado pelas temperaturas elevadas e com amplitude que não ultrapassa os 10°C. Para tanto foram utilizados 33 ovinos da raça Santa Inês naturalmente infectados por nematódeos gastrintestinais, machos e fêmeas com peso médio de 35 kg, que permaneceram todo o experimento no mesmo piquete. Foram pesados e identificados individualmente no dia 0 (zero), sendo coletadas amostras fecais para determinação do número de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG) e posterior distribuição dos animais de forma casualizada em três tratamentos: Controle: sem tratamento anti-helmíntico; Extrato: tratados com extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* à 2,5 mg/kg de PV com 3 doses, uma a cada 14 dias (D0, D14 e D28), o material foi administrado via oral, totalizando 42 dias; Levamisol: tratados com fosfato de levamisol 18,8% (Ripercol®) em única dose (D0) de 10 mg/kg de PV no D0 por via subcutânea.

As coletas das fezes foram realizadas aos 0, 4, 10, 14, 21, 28, 35 dias e 42 diretamente da ampola retal de cada animal para realização de exames coprológicos. Realizou-se a quantificação de ovos por gramas de fezes (OPG), feita por meio da câmara de McMaster, segundo Gordon e Whitlock (1939), e posteriormente foi realizada a cultura de larvas pela técnica de Roberts e O`Sullivan (1950) e identificação pela chave de Keith (1953).

A redução de OPG (R-OPG) dos produtos, foi calculada segundo a fórmula proposta por Coles *et al.* (1992):

Redução = $(1 - (OPG_t/OPG_c)) \times 100$ onde,

OPG_t = OPG do tratamento

OPG_c = OPG do controle

1.2.4. Estudo 2: Extrato hidroetanólico em dose única

O ensaio foi realizado em animais oriundos da mesma propriedade, no período de outubro a novembro de 2018, utilizando 30 ovinos da raça Santa Inês, machos e fêmeas com peso médio de 35kg, que permaneceram todo o experimento no mesmo piquete. Foram pesados e identificados individualmente no dia 0 (zero), coletadas amostras fecais para determinação do número de ovos de helmintos por grama de fezes (OPG) e posterior distribuição dos animais de forma casualizada em três tratamentos: Controle: (sem tratamento anti-helmíntico); Extrato: tratado com extrato 5 mg/kg de PV (produto em teste) em dose única no D0 administrado por via oral; Levamisol: tratado com Fosfato de Levamisol 18,8% (Ripercol®) 10 mg/kg de PV em única dose no D0 por via subcutânea.

As coletas das fezes foram realizadas aos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias diretamente da ampola retal de cada animal para realização de exames coprológicos. Realizou-se a quantificação de ovos por gramas de fezes (OPG), feita por meio da câmara de McMaster, segundo Gordon e Whitlock (1939), e posteriormente foi realizada a cultura de larvas, pela técnica de Roberts e O`Sullivan (1950) e identificação pela chave de Keith (1953).

A redução de OPG (R-OPG) dos produtos, foi calculada segundo a fórmula proposta por Coles et al. (1992):

Redução = $(1 - (OPG_t/OPG_c)) \times 100$ onde,

OPG_t = OPG do tratamento

OPG_c = OPG do controle

Em ambos os estudos, as fezes foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidos em uma geladeira (5°C) para conservação até o momento das análises (até 24h após a coleta).

1.2.4.1. Análise dos parâmetros bioquímicos

As técnicas bioquímicas foram realizadas no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas FCAT-UNESP, Câmpus de Dracena, apenas nos animais que foram submetidos ao extrato bruto da *Piper cubeba* do estudo 2 para análise de possível toxicidade. Foram realizadas 3 coletas de sangue (5 mL) a cada 7 dias (uma no D0, uma no D7 e outra no D14) por meio de venopunção da veia jugular externa em tubos de vacutainer contendo ativador de coágulo, para retração e obtenção do soro as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 5000 rpm. Em seguida, o soro foi separado, dividido em alíquotas e reservado em tubos plásticos com tampa (ependorfs).

Para a determinação da uréia foi utilizado espectrofotômetro Bioclin com comprimento de onda ajustado para 340 nm, com kit comercial para uréia enzimática UV da marca Bioclin, que requer 10 µL de soro para cada análise em duplicatas. Para determinar a creatinina o comprimento de onda foi ajustado para 510 nm e foi utilizado o kit comercial para creatinina enzimática colorimétrica da marca Bioclin, que requer 250 µL de soro para cada análise com duplicatas.

Para determinar a aspartato amino transferase (AST) cinética, o comprimento de onda foi ajustado para 340 nm, com kit comercial para AST cinética Bioclin, que requer 100 µL de amostra para cada análise com duplicatas.

1.2.5. Estudo 3: Extrato hexânico em dose única

O ensaio foi realizado em animais oriundos da mesma propriedade, no mês de Junho de 2019 utilizando 10 animais jovens, provindos do mesmo rebanho, com peso médio de 25 kg aos quais foram administrados uma única dose de 5 mg/kg de peso vivo de extrato hexânico dos frutos da *Piper cubeba* no dia zero (D0). As coletas de fezes foram realizadas no D0 e D10.

A redução de OPG (R-OPG) dos produtos, foi calculada segundo a fórmula proposta por Coles et al. (1992) visando o D0 como grupo controle:

$$\text{Redução} = (1 - (\text{OPGt}/\text{OPGD0})) \times 100 \text{ onde,}$$

OPGt = OPG do tratamento

OPGD0 = OPG no D0

1.2.6. Análise estatística

O percentual de redução do número de ovos por gramas de fezes (R- OPG) para cada grupo foi calculado comparando o OPG do grupo controle com o do pós-tratamento utilizando as médias aritméticas das contagens de OPG antes e após o tratamento, por meio do programa 'Reso' FECRT Analysis Program, version 2.0 (WURSTHORN; MARTIN, 1989).

A avaliação da eficácia anti-helmíntica do material testado foi confirmada por meio da porcentagem de R-OPG maior ou igual a 95%, segundo a classificação do índice de eficácia proposto pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP).

Os resultados foram analisados por ANOVA e comparados pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa SAS University Edition (versão 9.4).

1.3. RESULTADOS

1.3.1. Estudo 1

As médias de OPG e as eficácias calculadas dos produtos testados estão descritas na tabela 1. O percentual de redução do Levamisol foi de 100% como controle positivo, permanecendo com OPG 0 até 21 dias após o tratamento. O percentual do extrato foi de 45% com 14 dias após a primeira dose, 81% aos 14 dias após a segunda dose e 93% aos 14 dias após a terceira dose.

Tabela 1. Médias aritméticas das contagens de OPG dos grupos tratados e percentual de redução do OPG de cada grupo.

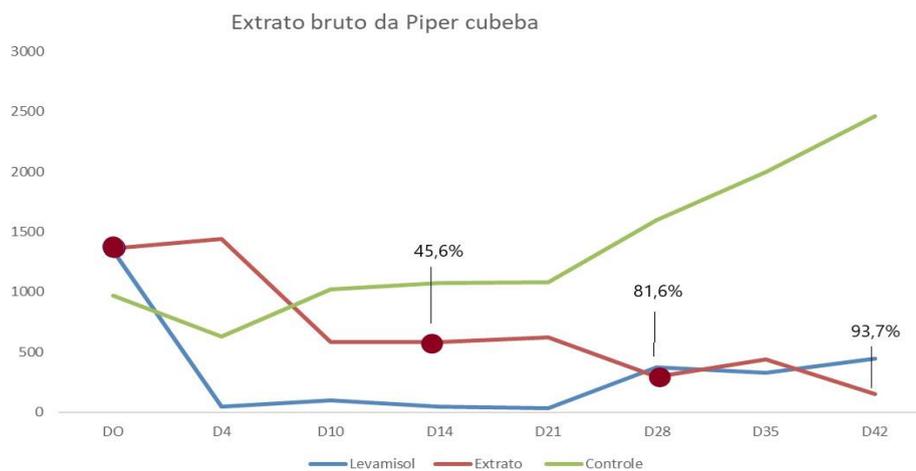
Dias Coletas	Lev		Ext		Cont
	OPG	R-OPG %	OPG	R-OPG %	OPG
D0	1340,9 a	-	1363,6a	-	969,1a
D4	44,4 a	95,4 (99;77)	1437,5b	-128,4 (43;-351)	629,1ab
D10	0a	100	585ab	42,9 (85;-51)	1025b
D14	7,1 a	100	585ab	45,6 (92;-37)	1075b
D21	37,5 a	96,5 (99;87)	622,7b	42,4 (86;-143)	1081,8c
D28	375 a	76,5 (93;49)	293,7a	81,6 (96;46)	1595,8b
D35	327,2 a	83,6 (94;44)	438,8a	78,0 (95;19)	1998,7b
D42	445,4 a	81,9 (93;39)	154,5a	93,7 (98;74)	2462,2b

Legenda: Lev – Fosfato de Levamisol 18,8%. Ext – Extrato de Piper cubeba em etanol a 25 mg/ml. Cont – sem administração de anti-helmíntico, R-OPG – Percentual de redução, Int. Conf.- Intervalo de confiança. Letras minúsculas nas médias de cada tratamento indicam diferença estatística pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

Considerando os resultados de OPG nas 3 aplicações, não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos tratados a partir do 28º dia. Na terceira aplicação, os grupos tratados com fosfato de levamisol e com o extrato hidroetanólico da *Piper cubeba* não diferiram estatisticamente, pois nos dias em que o OPG do grupo tratado com levamisol começa a aumentar, há um aumento na R-OPG do grupo tratado com extrato devido a diminuição do OPG.

O grupo controle permaneceu com médias crescentes desde o D0 até o D42 aumentando o desafio parasitário relacionado aos grupos tratados.

FIGURA 1: Dinâmica da contagem de ovos por gramas de fezes dos três grupos durante 42 dias e percentual de redução (R-OPG) no grupo tratado com o produto testado.



A cultura de larvas do grupo do levamisol apresentou no D0 maior quantidade de *Haemonchus* spp., seguido por *Strongiloides* spp., *Cooperia* spp. e *Trichostrongylus* spp.. Apenas, após o 21º dia houve predominância de 100% de *Haemonchus* até o D42 como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de larvas de helmintos gastrintestinais de ovinos observadas durante as coletas, através da coprocultura dos tratamentos com Fosfato de Levamisol 18,8% na dose de 10 mg/kg de peso vivo, extrato bruto da *Piper cubeba* na dose de 2,5mg/kg de peso vivo e controle.

Dias	Larvas de helmintos gastrintestinais (%)		
	Controle	Extrato	Levamisol
(D0)	H66%C5%T7%O3%S19%	H77%C1,7%O1%S20,3	H72%C7%TO6%S11%
(D4)	H80%C3%T4%O1%S12%	H8,6%O91,4%	-
(D10)	H78%C9%T10%O3%	H59%T29%O12%	-
(D14)	H77%C5%O18%	H63,2%C9,8%O27%	-
(D21)	H85%C6%O9%	H25%C40%O35%	H100%
(D28)	H73%C20%O7%	C100%	H100%
(D35)	H100%	-	H100%
(D42)	H100%	-	H100%

Legenda: H – *Haemonchus*, C – *Cooperia*, T – *Trichostrongylus*, O – *Oesophagostomum*, S – *Strongyloides*.

Em relação ao grupo tratado com extrato, houve predominância do gênero *Haemonchus* apenas no D0, já no D4 o percentual diminui para 8,6 e apresenta percentual de 91,4 de *Oesophagostomum spp.* Nos Dias 10 e 14 começam a aparecer larvas de *Trichostrongylus spp.* e *Cooperia spp.* e 14 dias após a segunda dose ocorre predominância do gênero *Cooperia*. Nos dias 35 e 42 não foram encontradas larvas. O grupo controle permaneceu com predominância de *Haemonchus* desde o D0 até o D42.

Com base no comportamento da ação do extrato hidroetanólico descrito no presente teste, foi sinalizada a necessidade da realização do estudo 2 utilizando maior dosagem e com análise dos parâmetros bioquímicos para verificar possível toxicidade.

1.3.2. Estudo 2

Como descrito na Tabela 3, o percentual de redução do OPG utilizando o fosfato de levamisol foi de 100% como controle positivo, permanecendo até 21 dias após o tratamento. O percentual de redução de OPG após a utilização do extrato hidroetanólico foi de 96,6% com 14 dias após a aplicação, 96,2% aos 21 dias e 91,8% aos 28 dias.

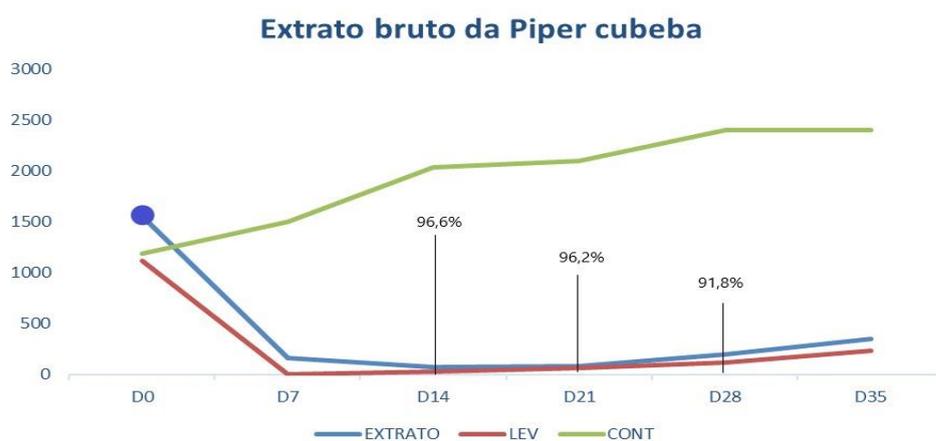
Tabela 3: Médias aritméticas das contagens de OPG dos grupos tratados e percentual de redução do OPG de cada grupo.

Dias Coleta	Lev		Ext		Cont
	OPG	%R-OPG	OPG	%R-OPG	
D0	1155 ^a	-	1560a	-	1185 ^a
D7	0a	100	160a	89,3 (96;73)	1500b
D14	30 ^a	98,5 (100;93)	70a	96,6 (99;84)	2040b
D21	60 a	97,1 (99;93)	80a	96,2 (99;85)	2100b
D28	120 a	95,1 (98;89)	200a	91,8 (99;88)	2430b
D35	230 a	91,0 (97;86)	350a	86,3 (97;85)	2550b

Legenda: Levamisol – Fosfato de Levamisol 18,8%. Extrato – Extrato de *Piper cubeba* em etanol a 25 mg/ml. Controle – sem administração de anti-helmíntico. Entre parênteses: Intervalo de confiança de cada tratamento. Letras minúsculas nas médias de cada tratamento indicam diferença estatística pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

A partir do D7, observa-se que a redução do OPG dos grupos tratados com o extrato hidroetanólico e com fosfato de levamisol não diferem entre si ($p > 0,05$). Nos D14 e D21, as reduções atingem 95%, permanecendo efetivo até o D28 e apenas no D35 as R-OPGs começam a diminuir conforme o aumento de OPG (Tabela 3).

FIGURA 2: Dinâmica da contagem de ovos por gramas de fezes dos três grupos durante 35 dias e percentual de redução (R-OPG) no grupo do extrato.



A cultura de larvas do grupo tratado com fosfato de levamisol apresentou predominância de 100% do gênero *Haemonchus* desde o D0 até o D35 (Tabela 4).

Tabela 4. Porcentagem de larvas de helmintos gastrintestinais de ovinos observadas durante as coletas, através da coprocultura dos tratamentos com Fosfato de Levamisol 18,8% na dose de 10 mg/kg de peso vivo, extrato bruto da *Piper cubeba* 5mg/kg de peso vivo e controle.

Dias Coletas	Larvas de helmintos gastrintestinais (%)		
	Controle	Extrato	Levamisol
(D0)	H86%C5,50%O8,50%	H100%	H100%
(D7)	H76%C2%O22%	H100%	-
(D14)	H79%C7%O14%	H58%C42%	H100%
(D21)	H88%C10%O2%	H15%C38%O47%	H100%
(D28)	H90%O10%	H29%C42%O29%	H100%
(D35)	H87%C7%O6%	H100%	H100%

Legenda: H – *Haemonchus*, C – *Cooperia*, T – *Trichostrongylus*, O – *Oesophagostomum*, S – *Strongyloides*.

No grupo tratado com extrato hidroetanólico houve predominância de 100% de *Haemonchus spp.* até o D7, diminuindo para 58% no D14 seguido da *Cooperia spp.* com 42%, indicando susceptibilidade do gênero ao produto testado. Nos dias D21 e 28 houve aparecimento e predominância do gênero *Oesophagostomum*, já no D35 voltou a ter predominância de *Haemonchus spp.* O grupo controle permaneceu com predominância de *Haemonchus* desde o D0 até o D42.

1.3.3. Análise dos parâmetros bioquímicos

Devido a maior dosagem do extrato hidroetanólico utilizada no presente estudo, foram avaliadas variáveis bioquímicas conforme os padrões de referência de acordo com o Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LacVet) descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos em ovinos tratados com o extrato bruto da *Piper cubeba* a 5 mg/kg de peso vivo (PV).

Animal		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média	
Uréia	D0	76	79	94	87	82	85	77	97	69	72	81,8	
	Ref.	D7	135	106	74	64	81	110	110	66	69	80	89,5
	17-43	D14	80	102	76	66	94	79	115	114	108	77	91,1
Creatinina	D0	0,7	0,7	0,7	0,9	0,8	0,8	0,8	1	0,8	0,9	0,8	
	Ref.	D7	1,2	1	1,5	1,1	0,9	1,2	1,6	1,5	1,3	1,3	1,2
	1,2-1,9	D14	1,2	1,3	1,2	1,1	1	1	1,4	0,9	1,2	1,1	1,1
AST	D0	46	35	59	60	60	72	21	61	59	112	58,5	
	Ref.	D7	43	37	53	53	50	49	66	55	83	134	62,3
	0-90	D14	54	52	46	55	67	49	54	50	65	87	57,9

Legenda: Ref – Padrão de referencia (LacVet).

No presente estudo, a creatinina e não apresentou alterações comparando os valores antes e após a utilização do extrato (produto testado), permanecendo dentro dos parâmetros de referência.

As médias de AST se mantiveram dentro do padrão de referência indicando que o extrato bruto da *Piper cubeba* não apresentou possível hepatotoxicidade na concentração e na dose utilizada.

A uréia apresentou-se alterada desde o D0 em todos os animais de todos os grupos, porém, no presente estudo, não houve alteração após a administração do extrato.

O tratamento com o extrato bruto da *Piper cubeba* não aponta alterações nas funções renais e hepáticas como observado por meio dos parâmetros bioquímicos.

1.3.4. Estudo 3

A análise do extrato hexânico da *Piper cubeba* demonstrou uma redução na contagem de OPG de 56,6%, 10 dias após o tratamento na dosagem de 5 mg/kg de PV e concentração de 25 mg/ml, mesma utilizada com o extrato hidroetanólico no estudo 2 (Tabela 6).

Tabela 6: Porcentagem de larvas de helmintos gastrintestinais de ovinos observadas durante as coletas, através da coprocultura no tratamento com o Extrato hexânico da *Piper cubeba* a 25 mg/ml na dose de 5 mg/kg de peso vivo.

Coletas	Larvas de helmintos gastrintestinais (%)					
	OPG	R-OPG%	H	C	T	O
(D0)	795	-	75%	12%	0%	13%
(D10)	345	56,6	0%	0%	0%	100%

H – *Haemonchus*, C – *Cooperia*, T – *Trichostrongylus*, O - *Oesophagostomum*

As culturas de larvas mostraram predominância do gênero *Haemonchus* no D0 e 10 dias após a aplicação do extrato hexânico da *Piper cubeba* há aparecimento de *Oesophagostomum* spp.

1.4. Discussão

1.4.1. Estudo 1:

Os resultados do estudo 1 indicam que o extrato passou a ser efetivo apenas após a terceira dose, proporcionando redução na contagem de OPG a cada aplicação. Sabe-se que a eficácia de um produto anti-helmíntico é considerada adequada quando este atinge valores de R-OPG de pelo menos 90% (COLES *et al.*, 1992).

Se o período para avaliação de R-OPG for inferior a 10 dias após o tratamento, a produção de ovos poderá ser suprimida, levando a superestimação da eficácia anti-helmíntica Martin., *et al.* (1985). Por esse motivo, a recomendação é coletar amostras de fezes 10 a 14 dias após o tratamento (COLES *et al.*, 1992). Desta forma, pôde-se observar o efeito do extrato hidroetanólico a partir do 10º dia (42,9%), mantendo até o 14º (45,6%) promovendo ação anti-helmíntica parcial do produto segundo o MAPA. Dentro dessa faixa de eficácia, foi encontrada em outro estudo utilizando alho desidratado adicionado à mistura mineral na concentração de 2% (aproximadamente 8 mg/kg/peso/vivo/dia) no controle de nematódeos, em que se observou a redução de OPG de 47,3% (BIANCHIN *et al.*, 1999).

Após 14 dias da segunda administração do extrato hidroetanólico, foi observada redução de 81,6%, indicando ainda baixa efetividade (MAPA, PORTARIA N ° 48, DE 12 DE MAIO DE 1997) para registro de produto. No entanto, após 14 dias

da terceira dose, houve redução de 93,7%, já apresentando efetividade moderada.

Resultados semelhantes aos do presente estudo, foram obtidos, avaliando o extrato da *Artemisia absinthium* em condições *in vivo* com dados aos quais apresentaram efetividade no extrato etanólico na dose de 2 g/kg com redução do OPG de ovelhas infectadas por *H. contortus* de 90,46%, valores que se assemelharam ao albendazol (TARIQ *et al.*, 2009).

Na cultura de larvas do grupo tratado com extrato hidroetanólico, houve predominância do gênero *Haemonchus* seguido de *Strongiloides spp* no D0, porém 4 dias após a primeira aplicação apresentou 91,4% de *Oesophagostomum spp.* e apenas 8,6% de *Haemonchus spp.* Já no D14 houve aumento na proporção de larvas encontradas de *Haemonchus*. Porém, 7 dias após a segunda aplicação (D21), houve predominância dos gêneros *Oesophagostomum* e *Cooperia*. No entanto, no D28 foram encontradas apenas larvas de *Cooperia spp* e a partir de 7 dias após a terceira aplicação, não foram encontradas larvas nas culturas. Em outros trabalhos utilizando teste de eficácia com o levamisol, também houve predominância de *Haemonchus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum* em diversas propriedades (MELO *et al.*, 2003).

1.4.2. Estudo 2:

No estudo 2, o tratamento com extrato hidroetanólico na dose de 5mg/kg foi eficaz aos 14 dias após a administração. Os percentuais de inibição da eclosão dos ovos do extrato da *Piper cubeba* e lignanas mostraram resultados significativos também em trabalhos preliminares. O extrato, nas maiores concentrações avaliadas, inibiu a eclosão dos ovos em 100%, mostrando atividade ovicida sem diferença significativa em relação ao controle de albendazol (12,5 µg / mL) (CARLIS *et al.*, 2019).

Além disso, o tratamento com extrato hidroetanólico permaneceu efetivo até o 28º dia, apresentando efetividade semelhante ao fosfato de levamisol. Resultados semelhantes foram observados com a utilização de *Nauclea latifolia*, que apresentou eficácia anti-helmíntica no extrato aquoso da casca administrado em ovelhas naturalmente infectadas. A porcentagem de redução (93,8%) com a dosagem de 1600 mg/kg do extrato foi comparável a 5 mg/kg de albendazol (94,1%) (ONYEYILI

et al., 2001).

O tratamento com o fosfato de levamisol mostrou-se efetivo aos 7 dias após a aplicação e permaneceu até o 28º dia. A resistência parasitária ao fosfato de levamisol 18,8% é muito comum, uma vez que esta é uma das formulações mais frequentemente utilizadas em ruminantes (MELLO *et al.*, 2003). No entanto não foi observada no presente estudo.

Em ambos os estudos, o gênero *Oesophagostomum* apresentou resistência ao extrato hidroetanólico, entretanto apresentaram menores percentuais de *Haemonchus* spp. tanto no primeiro estudo como no segundo. Sendo assim, o extrato demonstrou ação superior sob *Haemonchus* spp. comparado ao levamisol, que apesar de permanecer com 100% de redução durante 28 dias consecutivos, na cultura de larvas apresentou predominância de *Haemonchus* spp. em quase todas as coletas. Em um trabalho realizado com bovinos na mesma propriedade também descreve predominância do gênero *Oesophagostomum* após tratamento anti-helmíntico, apresentando resistência à moxidectina (CONDI *et al.*, 2009).

O grupo controle permaneceu com predominância de *Haemonchus* spp desde o D0 ao D35, mostrando constante desafios parasitários aos grupos experimentais e a ausência de fatores extra-tratamentos na redução de OPG (MOLENTO *et al.*, 2004).

A ação eficaz do tratamento com o extrato hidroetanólico sobre *Haemonchus* spp. também puderam ser observada em estudos *in vitro* preliminares, usando microscopia eletrônica de varredura, alterações estruturais induzidas no estágio L3 de *Haemonchus* após contato *in vitro* com lignanas isoladas do extrato hidroetanólico da *Piper cubeba*. As principais alterações observadas entre o controle e o L3 tratado envolviam principalmente a superfície do corpo (cutícula). Em comparação com a condição de controle, foram observadas alterações estruturais extensas na superfície da cutícula L3, a qual foi lesionada, com exposição interna do conteúdo e perda da forma cilíndrica principalmente após o tratamento com as lignanas hinokinina e dihidrocubebina (CARLIS *et al.*, 2019).

Outros trabalhos foram realizados com o intuito de avaliar os efeitos anti-helmínticos de plantas e frutos do gênero *Piper*, no entanto, as atividades que foram consideravelmente efetivas se deram a outros tipos de conjunto de compostos e não

necessariamente aos compostos presentes, como por exemplo, as lignanas. Existem relatos que outras plantas do gênero *Piper* possuem propriedades anti-helmínticas contra vários tipos de parasitas (ADATE *et al.*, 2012). Contudo, o presente estudo é o primeiro a relatar a atividade *in vivo* dos extratos de *Piper cubeba* em nematóides gastrointestinais de ovinos naturalmente infectados com o intuito de contribuir para a busca de moléculas cujas estruturas químicas possam ser usadas como alvos para o desenvolvimento de novos anti-helmínticos.

Sendo assim conforme os dados obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que o extrato hidroetanólico foi eficaz após 14 dias em única dose, apresentando redução de 96,6% no período de avaliação pós-tratamento (HOTSON *et al.* 1970 e MARTIN *et al.*, 1985). Assim, o extrato bruto da *Piper cubeba* na concentração de 25 mg/mL e na dosagem de 5 mg/kg apresentou efetividade com redução acima de 95% após 14 dias permanecendo efetivo até o 28º dia. O estudo 1, por ter sido realizado com metade da dose utilizada no estudo 2, houve necessidade de 3 aplicações para começar a obter uma redução acima de 90%.

1.4.2.1. Análise dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos analisados não demonstraram alterações com relação aos padrões de referência após a aplicação do extrato, com exceção da uréia que já vinha alterada antes da aplicação, uma vez que, qualquer processo que induza um aumento do catabolismo proteico, como alimentação, pode resultar em elevação na concentração sanguínea de uréia (SATAKE *et al.*, 2006).

Alguns autores avaliaram a toxicidade do extrato bruto da *Piper cubeba* por diferentes protocolos e encontraram um LD50 maior que 2000 mg/kg em ratos machos albinos Wistar (PERAZZO *et al.*, 2013; MOUID *et al.*, 2016). Do mesmo modo, estudo avaliando o potencial tripanocida das moléculas cubebina e hinokinina em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* na dose de 50 mg/kg também não observaram toxicidade (ESPERANDIM *et al.*, 2013).

1.4.3. Estudo 3:

O extrato hexânico da *Piper cubeba* na concentração de 25 mg/mL e dosagem de 5 mg/kg não apresentou eficácia como no estudo 2 com o extrato

hidroetanólico na dose de 5 mg/kg. No entanto apresentou resultado semelhante ao do estudo 1 após a administração da primeira dose de 2,5 mg/kg do extrato hexânico.

Analisando os resultados obtidos na cultura de larvas, o extrato hexânico também mostrou efetividade contra o gênero de *Haemonchus*, o qual é o principal parasita de ovinos no Brasil Arosemena *et al.* (1999); Amarante *et al.* (2004) e Ramos *et al.* (2004). Da mesma forma, em estudo testando extratos hexânico e etanólico da semente de manga (*Mangífera indica*) em ovos de *Haemonchus spp* foi observado que o extrato etanólico inibiu 95,66% da eclosão dos ovos a 50mg/ml comparado ao extrato hexânico fornecido na mesma concentração, porém, não apresentou significância entre os tratamentos (COSTA *et al.*, 2002). Por outro lado, a cultura de larvas realizada no presente estudo também evidenciou resistência do gênero *Oesophagostomum* ao extrato hexânico.

1.5. CONCLUSÃO

O extrato hidroetanólico da *Piper cubeba*, demonstrou ação antiparasitária para nematódeos gastrintestinais de ovinos em uma ou em três aplicações dependendo da dose utilizada, sem apresentar sinais de toxicidade.

O extrato hexânico não apresentou efetividade como o extrato hidroetanólico, ainda que sua ação aponte certa capacidade anti-helmíntica.

Mais estudos devem ser realizados buscando maior conhecimento sobre a eficácia do produto.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADATE, P. S.; PARMESAWARAN, D. S.; CHAUHAN, Y. In vitro Anthelmintic Activity of Stem Extracts of Piper betle Linn Against Pheritima posthuma. **Pharmacog J.**, v. 4, p. 61–65, 2012.
- AMARANTE, A. F. T. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 13, Supl. 1, p.68-71, 2004
- ANDRADE, S. M. L. In vitro antiparasitic activity and chemical composition of the essential oil obtained from the fruits of Piper cubeba. **Planta Med.**, p. 1653-1655, 2013.
- AROSEMENA, N. A. E. Easonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. **Revue Méd. Vét.**, [s. l.], v. 150, p. 873-6, 1999.
- BIANCHIN, I. **Eficiência do pó de alho (*Allium sativum*) no controle dos parasitos de bovinos.** Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1999. p. 31. (Boletim de Pesquisa, n. 8),
- CARLIS, M. S. P.; FÉBOLI, A.; LAURENTIZ, A. C.; FILARDI, R. S.; PRIZANTELLI, A. H. O.; SILVA, A. M. L.; ANJOS, L. A.; MAGALHÃES, L. G.; LAURENTIZ, R. S. *In vitro* anthelmintic activity of the crude hydroalcoholic extract of Piper cubeba fruits and isolated natural products against gastrointestinal nematodes in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 000, p. 108932-000, 2019.
- COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H. M. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, p. 35-44, 1992.
- CONDI, G. K.; SOUTELLO, R. G. V.; AMARANTE, A. F. T. Moxidectin-resistant nematodes in cattle in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 161, p. 213-217, 2009.
- COSTA, C. T. C.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Ovicidal effect of Mangifera indica seeds extracts on Haemonchus contortus. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 57-60, 2002.
- ESPERANDIM, V. R.; FERREIRA, D. S.; REZENDE, K. C. S.; MAGALHÃES, L. G.; MEDEIROS, J. S.; PAULETTI, P. M.; JANUÁRIO, A. H.; LAURENTIZ, R. S.; BASTOS, J. K.; SÍMARO, G. V.; CUNHA, W. R.; EUCLIDES, V. P. B.; EUCLIDES FILHO, K.; COSTA, F. P. Desempenho de Novilhos F1s Angus Nelore em Pastagens de Brachiaria decumbens Submetidos a Diferentes Regimes Alimentares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 470-481, 2002.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistics division. **Production, live animals, regions, sheep.** 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/pt/> Acesso em: 31 out. 2019.

GIANLORENÇO, V. K. **Produção de carne ovina pode ser mais rentável que bovina**. São Paulo: SEBRAE. 2013. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/> Acesso em: 03 maio de 2018.

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.

GRISI, L.; LEITE, R. L.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

JIMENEZ-SANZ, A. L.; QUIRINO, C. R.; PACHECO, A.; COSTA, R. L. D.; BELTRAME, R. T.; RUA M, A. S.; MADELLA-OLIVEIRA, A. F. Relação entre fatores associados às parasitoses gastrointestinais, desempenho e estado fisiológico de ovelhas Santa Inês. **Agropecuária Técnica**, v. 37, n. 1, p. 88-95, 2016.

KEITH, R. K. Differentiation of infective larval of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, v. 1, p. 223-235, 1953.

MARTIN, P. J.; ANDERSON, N.; JARRETT, R. G. Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep. **Aust. Vet. J.**, v. 62, p. 38-43, 1985.

MCKENNA, P. B. The effect of previous cold storage on the subsequent recovery of infective third stage nematode larvae from sheep faeces. **Vet. Parasitol.**, v. 80, p. 167-172, 1998.

MELO, A. C.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, p. 339-344, 2003.

MENDONÇA, V. M.; SANTOS, A. J.; NASCIMENTO, I. R.; OLIVEIRA, M. A. S.; ROCHA, S. S.; CABRAL, E. S. Perspectivas da fitoterapia veterinária: plantas potenciais na terapia dos animais de produção. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, p.1-5, 2014.

MOLENTO, M. B.; TASCIA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONOI, R.; STECCA, E. Método FAMACHA como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1139-1145, 2004.

MOUID, M. G.; SHAKIL, S. S.; KAVIMANI, S. Effect of methanolic extract of Piper cubeba Linn. fruits on the pharmacokinetics of Pioglitazone in rats. **World. J. Pharm. Sci.**, v. 4, p. 104-109, 2016.

ONYEYLI, P. A. Anthelmintic activity of crude aqueous extract of *Nauclea latifolia* stem bark against ovine nematodes. **Fitoterapia**, v. 72, p. 12-21, 2001.

PERAZZO, F. F.; RODRIGUES, I. V.; MAISTRO, E. L.; SOUZA, S. M.; NANAYKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T.; SOUZA, G. H. B. Anti-inflammatory and analgesic evaluation of hydroalcoholic extract and fractions from seeds of *Piper cubeba* L. (Piperaceae). **Pharmacog. J.**, v. 5, p. 13-16, 2013.

RAMOS, C. I. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciênc. Rural**, v. 34, p. 1889-95, 2004.

ROBERT, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, p. 99-102, 1950.

SATAKE, F. Constituintes sanguíneos de bugiospretos (*Alouatta caraya*) e macacos-prego (*Cebus apella*) capturados no resgate de fauna da Usina Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP 2006. 60f.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: /Editora UFSC, 1999.

STOTZER, E. S.; LOPES, L. B.; ECKSTEIN, C.; MORAES, M. C. M. M.; RODRIGUES, D. S.; BASTINETTO, E. Impacto econômico das doenças parasitárias na pecuária: uma Revisão. **Brazilian Journal of Hygiene and Animal Sanity**, v. 8, n. 3, p. 198-221, 2014.

TARIQ, K. A.; CHISTI, M. Z.; AHMAD, F.; SHAWL, A. S. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 9, p. 83-8, 2009.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R.; GOODEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n. 1-2, p. 183-194, 2002.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary parasitology**. Philadelphia: Willey- Blackwell, 2007. p. 600.